

ANGÉLICA PATARO REIS

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS DE α -GALACTOSIDASES DE
*Aspergillus terreus***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

T

R375p
2007

Reis, Angélica Pataro, 1975-

Purificação, caracterização bioquímica e aplicações
biotecnológicas de α -galactosidases de *Aspergillus terreus* /
Angélica Pataro Reis. – Viçosa, MG, 2007.
xiv, 108f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurílio Alves Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 96-108.

1. Enzimas de fungos. 2. α -galactosidase.
3. *Aspergillus terreus*. 4. Hidrólise. 5. Cinética enzimática.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.7

ANGÉLICA PATARO REIS


**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS DE α -GALACTOSIDASES DE
*Aspergillus terreus***

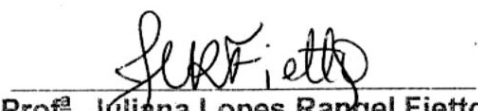
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de agosto de 2007.


Prof.^a M^a Goreti de Almeida Oliveira
(Co-Orientadora)


Prof. José Humberto de Queiroz


Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem


Prof.^a Juliana Lopes Rangel Fietto



Prof. Maurílio Alves Moreira
(Presidente da Banca)

Dedico este trabalho às duas pessoas que preenchem a minha vida de amor, carinho e dedicação. Sem essas pessoas a minha vida não teria sentido.

Aos meus dois amores, Marcelo e Laura.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre me abençoando, protegendo toda minha família e as pessoas que estão à minha volta e por me dar a oportunidade de conquistar mais essa vitória. Muito Obrigada Senhor!

Aos meus queridos pais, Roberto e Clara, e meus irmãos, Alex e Toninho, que sempre me cobriram de muito amor e companheirismo durante todos os momentos da minha vida.

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

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

Um agradecimento muito especial tenho que fazer ao meu tão estimado orientador, Sebastião Tavares de Rezende, que desde agosto de 2000, quando iniciei meus trabalhos de iniciação científica, a todo momento depositou confiança em mim, sendo sempre compreensivo nos momentos difíceis, me dando a orientação e o incentivo necessários para seguir em frente e conquistar tudo que conquistei.

Devo também muitos agradecimentos à minha co-orientadora Valéria Monteze Guimarães, que juntamente com o professor Sebastião teve uma grande participação na realização deste trabalho, me dando apoio, sugestões e sendo sempre amiga e companheira em todos os momentos.

Aos co-orientadores e professores Maria Goreti de Almeida Oliveira e Maurílio Alves Moreira pela colaboração, amizade e apoio.

A todos os demais professores pelos conhecimentos e ajuda nos momentos necessários.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial, ao secretário Eduardo Pereira Monteiro, pela atenção, dedicação e amizade.

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

Ao Laboratório de Enzimologia do BIOAGRO, onde a maior parte do meu trabalho foi realizado.

Aos Laboratórios de Análises Bioquímicas e de Proteínas do BIOAGRO, onde parte dos meus experimentos foram realizados.

Às grandes amigas Ana Paula e Camila, que não mediram esforços para me ajudar na etapa final e mais difícil do meu trabalho.

Ao amigo Daniel Luciano Falkoski, pela amizade, ensinamentos, e ajuda em todos os momentos necessários.

À amiga Pollyanna, pela amizade, apoio e companheirismo desde que a conheci.

À amiga Lílian, por ajudar e compartilhar durante tantos anos cada etapa deste trabalho.

Ao Sr. Fausto Sant'Anna pela amizade e colaboração com o Laboratório de Enzimologia.

À minha estagiária Ludmila, pela ajuda, dedicação e amizade.

À todos os amigos que estiveram sempre presentes, contribuindo de alguma maneira para a realização deste trabalho: Fabrícia, Maíra, Joana, Liliane, Sandra, Cristina, Juliana, Naldo e Gláucia.

Enfim, agradeço a todos aqueles que passaram pela minha vida e me ajudaram a crescer como pessoa.

SUMÁRIO

	Página
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS GERAIS.....	3
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. α -Galactosidases	4
2.2. Mecanismo de ação e estrutura tridimensional das α -galactosidases	6
2.3. Aplicações industriais	12
2.4. A soja e seus fatores antinutricionais.....	13
2.5. Hidrólise enzimática dos RO em derivados de soja	15
2.6. Considerações sobre produção de enzimas por fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Reagentes utilizados.....	19
3.2. Cultivo dos microorganismos para produção da enzima α - galactosidase	20
3.3. Estabelecimento das condições ótimas de cultivo para o fungo mais promissor	21

1.1.	3.4. Determinação da atividade de α-galactosidase com diferentes	
1.2.	substratos.....	21
	3.4.1. Substrato sintético ρ -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ NP α Gal).....	21
	3.4.2. Açúcares não redutores como substratos	21
	3.4.3. Açúcares redutores como substratos	22
	3.4.4. Outros substratos sintéticos	22
	3.4.5. Com polímeros	22
	3.5. Determinação do teor de proteína	23
	3.6. Purificação da α -galactosidase.....	23
	3.6.1. Cromatografia de gel filtração.....	25
	3.6.2. Cromatografia de interação hidrofóbica.....	25
	3.6.3. Cromatografia de troca iônica.....	25
	3.6.4. Cromatografia de afinidade	26
	3.6.5. Ultrafiltração.....	26
	3.6.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida – Gel nativo	26
	3.6.6.1. Preparo do gel	26
	3.6.6.2. Preparo da amostra.....	27
	3.6.6.3. Condições utilizadas durante a eletroforese	27
	3.6.6.4. Localização e identificação da banda protéica contendo atividade de α -galactosidase	27
	3.6.6.5. Extração da enzima α -galactosidase do gel.....	28
	3.7. Determinação do grau de pureza e da massa molecular aparente das α -galactosidases de <i>Aspergillus terreus</i>	28
	3.7.1. Eletroforese	28
	3.7.2. Coloração dos géis de eletroforese	29
	3.7.3. Utilização de gel filtração para determinação da massa molecular	29
	3.8. Conversão das células vermelhas sangüíneas tipo B em tipo O pelas α -galactosidases de <i>Aspergillus terreus</i>	30
	3.9. Hidrólise de RO em extrato desengordurado de soja.....	30
	3.10. Extração dos RO	31

3.11. Determinação do teor de RO por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	32
3.12. Caracterização bioquímica e cinética das α -galactosidases de <i>Aspergillus terreus</i>	32
3.12.1. Efeito do pH na atividade das α -galactosidases	32
3.12.2. Efeito da temperatura na atividade das α -galactosidases.....	33
3.12.3. Termoestabilidade e determinação de meia-vida.....	33
3.12.4. Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max})	34
3.12.5. Efeito de íons, açúcares e agentes redutores na atividade das α -galactosidases de <i>Aspergillus terreus</i>	35
3.12.6. Determinação da constante de inibição (K_i) da α -galactosidase	35
3.12.7. Determinação da energia de ativação	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Seleção do microorganismo e condições ótimas para a produção da α -galactosidase	37
4.2. Purificação das α -galactosidases extracelulares do fungo <i>Aspergillus terreus</i>	38
4.3. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das α -galactosidases de <i>Aspergillus terreus</i>	46
4.4. Caracterização das α -galactosidases E1 e E2 de <i>Aspergillus terreus</i>	53
4.4.1. Efeito do pH.....	53
4.4.2. Efeito da temperatura sobre a atividade das α -galactosidases do fungo <i>Aspergillus terreus</i>	56
4.4.3. Parâmetros cinéticos	63
4.4.4. Especificidade das α -galactosidases E1 e E2 fungo <i>Aspergillus terreus</i> com outros substratos	72
4.4.5. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade das α -galactosidases do fungo <i>Aspergillus terreus</i>	74

4.4.6. Constante de inibição (K _i) para o açúcar galactose	78
4.4.7. Determinação da energia de ativação para as α-galactosidases do fungo <i>Aspergillus terreus</i>	82
4.5. Conversão das células vermelhas sanguíneas tipo B em tipo O pela enzima α- galactosidase	86
4.6. Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em extrato desengordurado de soja.....	86
5. CONCLUSÕES	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
BSA	Albumina sérica bovina
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DNS	Dinitrossalicilato
DP	Desvio padrão
Ea	Energia de ativação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
kDa	Kilodalton
Ki	Constante de inibição
K _m	Constante de Michaelis-Menten
I	Inibidor
log	Logaritmo
MM	Massa molecular
o-NP-β-Gal	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
o-NP-β-Glc	o-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
m-NP-α-Gal	<i>m</i> -nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo
ρ-NP-α-Gal	ρ-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo
ρ-NP-β-Glc	ρ-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo
ρ-NP-β-Gal	ρ-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
ρ-NP-α-Glc	ρ-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo
ρ-NP-β-Xil	ρ-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo
ρ-NP-α-Man	ρ-nitrofenil-α-D-manopiranosídeo
ρ-NP-α-Ara	ρ-nitrofenil-α-D-arabinopiranosídeo
ρ-NP	ρ-nitrofenol
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
rpm	Rotação por minuto
RO	Oligossacarídeos de rafinose
S	Substrato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético

Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade de atividade enzimática
v/v	Volume/volume
Vo	Velocidade inicial
V _{max}	Velocidade máxima
V	Volts

RESUMO

REIS, Angélica Pataro, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Purificação, caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas de α -galactosidases de *Aspergillus terreus*.** Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Co-orientadores: Valéria Monteze Guimarães, Maurílio Alves Moreira e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

A enzima α -Galactosidase (α -D-galactosideo galactohidrolase, EC 3.2.1.22) catalisa a clivagem de resíduos terminais α -1,6-galactosil presentes em vários substratos, incluindo oligossacarídeos lineares e ramificados, polissacarídeos e substratos sintéticos tal como o *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (*p*NP α Gal). A α -galactosidase é de grande importância devido seu potencial em aplicações industriais. Dentre estas a capacidade em hidrolisar os oligossacarídeos de rafinose (RO) que são os principais fatores responsáveis por distúrbios gastrintestinais relacionados com a ingestão de produtos derivados de soja. A mucosa intestinal de humanos e animais monogástricos não possui a enzima α -galactosidase, essencial para a hidrólise desses oligossacarídeos. Portanto a redução desses açúcares nos derivados de soja poderá melhorar as qualidades nutricionais desses alimentos. O objetivo deste trabalho foi produzir, purificar e caracterizar α -galactosidases de *Aspergillus terreus*, avaliando sua capacidade hidrolítica sobre os oligossacarídeos de rafinose (RO) presentes em produtos de soja. O fungo *Aspergillus terreus* cresceu em meio mineral líquido contendo farelo de trigo como fonte de carbono por 168 horas a 28 °C. Para obtenção da α -galactosidase purificada E1 e parcialmente purificada E2, foram utilizadas cromatografias de gel filtração, interação hidrofóbica, troca iônica e afinidade.

Foi também utilizado gel nativo como última etapa de purificação da α -galactosidase E1. Atividades máximas das α -galactosidasas E1 e E2 foram detectadas em pH 5,0 e 5,5 e nas temperaturas de 60 e 50 °C, respectivamente. A enzima α -galactosidase E1 manteve 90% de sua atividade inicial quando pré-incubada por 12 horas a 55 °C e a α -galactosidase E2 manteve apenas 5 % da sua atividade quando pré-incubada nas mesmas condições. Os valores da K_M para ρ NP α Gal, melibiose, estaquiose e rafinose para a α -galactosidase E1 foram de 0,66, 1,92, 10,94 e 27,93 mM, respectivamente, enquanto que, para a α -galactosidase E2 o K_M para ρ NP α Gal e melibiose foram de 0,20 e 20,14 mM, respectivamente. As α -galactosidasas apresentaram especificidade para galactose em posição α , hidrolisando o substrato sintético ρ NP α Gal, estaquiose, rafinose e melibiose. Sulfato de cobre, cloreto de mercúrio, nitrato de prata e SDS inativaram totalmente as duas enzimas, enquanto que sulfato de zinco inativou totalmente a α -galactosidase E1 e reduziu 48 % a atividade da α -galactosidase E2. A α -galactosidase E2 na presença do substrato ρ NP α Gal sofreu inibição competitiva com galactose (K_i 0,76 mM). Para o substrato ρ NP α Gal foi encontrada uma energia de ativação igual a 51,17 e 36,71 kJ/mol para as α -galactosidasas E1 e E2, respectivamente. Para o substrato melibiose a energia de ativação para a α -galactosidase E1 foi de 53,83 kJ/mol e para a E2 foi 39,83 kJ/mol. Para os substratos rafinose e estaquiose, a energia de ativação encontrada foi de 55,18 e 42,81 kJ/mol, respectivamente, para a α -galactosidase E1. Os resultados dos tratamentos do extrato desengordurado de soja com as α -galactosidasas E1 e E2 mostraram uma redução de 100% da estaquiose após 12 horas de incubação, porém a rafinose ainda permaneceu 24 % a mais que o teor inicial, fenômeno que pode ser justificado pelo fato deste açúcar ser um dos produtos da hidrólise da estaquiose havendo então um acúmulo de rafinose. Para a α -galactosidase E2, ao final de 12 horas de incubação com o extrato desengordurado, 18 e 25 % dos açúcares rafinose e estaquiose foram hidrolisados, respectivamente. Portanto, observa-se que preferencialmente a α -galactosidase E1 pode ser utilizada para redução dos RO, sendo indicada para utilização industrial no processamento destes açúcares.

ABSTRACT

REIS, Angélica Pataro, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2007.

Purification, biochemical characterization and biotechnological uses of α -galactosidases from *Aspergillus terreus*. Adviser: Sebastião Tavares de Rezende. Co-advisers: Valéria Monteze Guimarães, Maurílio Alves Moreira e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

The enzyme α -galactosidase (α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22) catalyzes the cleavage of α -1,6-galactosyl terminal residues present in different substrates, including linear and branching oligosaccharides, polysaccharides and synthetic substrates such as *p*-nitrophenyl- α -1,6-galactosyl -D- galactopyranoside (p NP α Gal). The α -galactosidase is very important because of its potential industrial uses. Among these uses, it stands out the capacity to hydrolyze raffinose oligosaccharides (RO), which are the main responsible factors for gastrointestinal disorders related with the ingestion of soybean-derived products. The intestinal mucous membrane of humans and monogastric animals lacks the α -galactosidase enzyme, which is essential for the hydrolysis of these oligosaccharides. The reduction of these soybean-derived sugars can therefore improve the nutritional quality of these foods. The objective of this work was to produce, purify and characterize α -galactosidases from *Aspergillus terreus*, evaluating its hydrolytic capacity on raffinose oligosaccharides (RO) found in soybean products. The fungus *Aspergillus terreus* grew in mineral liquid medium containing wheat bran as carbon source for 168 hours at 28 °C. Gel-filtration, hydrophobic interaction, ion exchange and

affinity chromatographies were used to obtain purified α -galactosidase E1 and partially purified E2. Native gel was also used as the last stage of α -galactosidase E1 purification. Maximum activities of α -galactosidases E1 and E2 were detected at pH 5 and 5.5 and at the temperatures 60 and 50 °C, respectively. Enzyme α -galactosidase E1 maintained 90% of its initial activity when pre-incubated for 12 hours at 55 °C, whereas α -galactosidase E2 maintained only 5% of its activity when pre-incubated in the same conditions. K_M values for ρ NP α Gal, mellibiose, stachyose and raffinose for α -galactosidase E1 were 0.66, 1.92, 10.94 and 27.93 mM, respectively, whereas for α -galactosidase E2 the K_M for ρ NP α Gal and mellibiose was 0.20 and 20.14 mM, respectively. The α -galactosidases showed specificity for galactose at α position, hydrolyzing synthetic ρ NP α Gal substrate, mellibiose, stachyose and raffinose. Copper sulfate, mercury chloride, silver nitrate and SDS totally inactivated the two enzymes, whereas zinc sulfate totally inactivated α -galactosidase E1 and reduced α -galactosidase E2 activity by 48%. The α -galactosidase E2 in the presence of ρ NP α Gal substrate underwent competitive inhibition by galactose (K_i 0.76 mM). Activation energy of ρ NP α Gal substrate was found to be 51.17 and 36.71 kJ/mol for α -galactosidases E1 and E2, respectively. The mellibiose substrate had activation energy for α -galactosidase E1 and E2 of 53.83 and 39.83 kJ/mol respectively. Substrates raffinose and stachyose had activation energy of 55.18 and 42.81 kJ/mol respectively, for α -galactosidase E1. The treatments of defatted soybean extract with α -galactosidases E1 and E2 resulted in 100% reduction in stachyose after 12 hours of incubation, however raffinose still remained 24% higher than the initial level, which can be explained by the fact that this sugar is one of the products of stachyose hydrolysis, causing therefore its accumulation. After 12 hours of incubation of α -galactosidase E2 with the defatted extract, 18 and 25% of raffinose and stachyose were hydrolyzed, respectively. Therefore, it can be concluded that α -galactosidase E1 can be preferably used to reduce RO, being indicated for the industrial processing of these sugars.

1. INTRODUÇÃO

A soja é considerada um dos principais produtos agrícolas do mundo devido a sua alta produtividade, capacidade adaptativa e qualidade nutricional. É amplamente consumida pela população, na forma de óleo e seus derivados, como margarinas e gordura hidrogenada, como extrato hidrossolúvel, como proteína texturizada e ainda como matéria prima para muitos produtos industrializados. A fração óleo é utilizada na indústria de alimentos para a produção de margarina, óleo de cozinha, agentes emulsificantes e vários outros produtos. A fração protéica, altamente significativa, é comumente empregada na fabricação de ração animal. O leite de soja ou extrato hidrossolúvel é visto como um substituto de baixo custo ao leite de vaca, sendo uma alternativa alimentar para populações intolerantes à lactose (KHARE & KRISHNA, 1994).

Entretanto, apesar de seu alto valor nutricional e aplicabilidade, a soja tem seu consumo limitado devido a alguns fatores, dentre eles se destaca a capacidade em causar sintomas indesejáveis como flatulência, náuseas, desconforto e diarreia em humanos e outros animais. Resultados de estudos em humanos e monogástricos têm claramente demonstrado que o alto conteúdo de oligossacarídeos de rafinose (RO) presentes nessa leguminosa

são os principais causadores desses sintomas. A mucosa do intestino delgado de humanos e animais como aves e suínos, não apresentam as α -1,6-galactosidases, enzimas necessárias à conversão dos RO em açúcares mais simples. No intestino grosso, os RO são fermentados por bactérias anaeróbicas, o que resulta na liberação de grandes quantidades de CO₂, H₂ e CH₄. Essa produção de gases, conhecida como flatulência intestinal, está associada com cólicas, diarreia dispepsia e constipação (SUAREZ *et al.*, 1999).

Pesquisas têm demonstrado que α -galactosidases de diferentes fontes são eficientes na hidrólise enzimática dos RO presentes nos produtos derivados de leguminosas, especialmente produtos de soja. Há grande interesse na indústria alimentícia na redução dos níveis desses açúcares em produtos como extrato hidrossolúvel (leite de soja), farinha e melaço de soja, via hidrólise enzimática, visando reduzir os sintomas indesejáveis e aumentar o seu valor nutricional (SANNI *et al.*, 1997).

Várias α -galactosidases de plantas e microbianas foram extraídas, isoladas e testadas quanto à sua capacidade de uso para hidrólise dos RO em derivados de soja em escala industrial, apresentando resultados significativos (VIANA *et al.*, 2005; FALKOSKI *et al.*, 2006).

Considerando os organismos atualmente estudados com o objetivo de selecionar enzimas hidrolíticas com potencial para aplicação em processos biotecnológicos, merecem grande destaque os fungos filamentosos, principalmente as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (FALKOSKI *et al.*, 2006; PRASHANTH *et al.*, 2005). Dentre as características vantajosas para estudos de prospecção de enzimas hidrolíticas, destacam-se: produção de um amplo espectro de enzimas hidrolíticas com possibilidade de aplicação na hidrólise dos mais diversos substratos, sejam eles naturais ou sintéticos; produção de enzimas extracelulares, o que favorece o processo de obtenção e purificação enzimática; baixa seletividade com relação à fonte de carbono, o que permite a utilização de substratos de baixo custo (farelo de trigo, bagaço de cana, etc) para o crescimento e desenvolvimento destes microrganismos em meio de cultura e, produção de enzimas com maior estabilidade térmica, o que é de grande interesse para aplicação em processos industriais.

Portanto, o estudo de α -galactosidases de diferentes fontes é de grande interesse, tanto para o conhecimento das características moleculares e cinéticas destas enzimas, como para o desenvolvimento de um processo industrial, que visa à redução dos açúcares não digeríveis (RO) em leguminosas, como a soja e seus derivados. Dessa forma o uso da soja poderá ser intensificado, como uma alternativa protéica destinada ao consumo humano e animal.

1.1. Objetivos Gerais

Os objetivos gerais deste trabalho foram produzir α -galactosidases de *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus terreus* CCT 4083 e *Monascus ruber* CCT 1236, purificar e caracterizar a enzima do fungo mais promissor e avaliar sua capacidade hidrolítica sobre os oligossacarídeos de rafinose (RO) presentes em produtos de soja.

1.2. Objetivos específicos

- Identificar e selecionar fungos capazes de produzir a enzima α -galactosidase;
- Estabelecer condições ótimas de cultivo para o fungo selecionado;
- Purificar e caracterizar bioquimicamente e cineticamente a(s) α -galactosidase(s) produzida(s) pelo fungo, avaliando: estabilidade da enzima em função do pH; efeito da temperatura; termoestabilidade e meia vida; efeito de íons e outros compostos na atividade enzimática; especificidade da enzima por substratos naturais, sintéticos e polímeros; K_M e V_{max} ; determinação de possíveis inibidores; tipo de inibição e K_i e determinação da energia de ativação;
- Avaliar a capacidade hidrolítica da enzima, sobre os oligossacarídeos de rafinose (RO) do extrato desengordurado de soja;
- Avaliar a capacidade da enzima de converter as células vermelhas sangüíneas tipo B em tipo O;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. α -Galactosidases

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

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

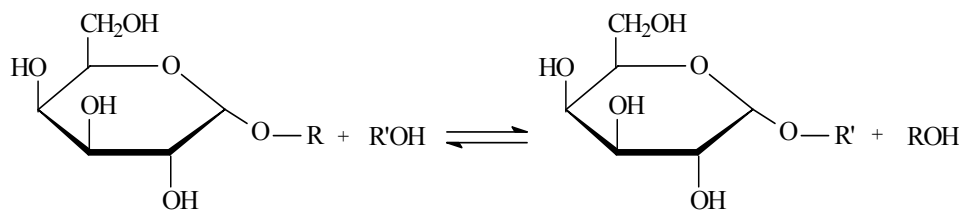


Figura 1 – Esquema da reação catalisada pela α -galactosidase.

A molécula hidroxílica aceptor, $R'OH$, é comumente a água, embora R e R' possam ser grupos alifáticos ou aromáticos. Sob condições especiais, a síntese *de novo* pode ocorrer usando a D-galactose como doador. Esse

processo geralmente tem sido observado quando a enzima é incubada com altas concentrações de monossacarídeos, resultando em moléculas derivadas da polimerização da glicose e galactose (DEY & PRIDHAM, 1972; SPANGENBERG *et al.*, 2000).

α -Galactosidases intracelular e extracelular ocorrem em microrganismos, plantas e animais. A enzima catalisa a hidrólise de ligações α -1,6 de resíduos α -D-galactosídeos em uma grande variedade de substratos, incluindo oligossacarídeos lineares e ramificados, polissacarídeos e substratos sintéticos como p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo $pNP\alpha Gal$ (SIMERSKÁ *et al.*, 2006).

Formas multimoleculares da α -galactosidase já foram descritas em muitas fontes vegetais (GUIMARÃES *et al.*, 2001; SHIVANNA *et al.*, 1990; ALANI *et al.*, 1989) e também purificadas de microrganismos (ADEMARK *et al.*, 2001). A α -galactosidase de semente de soja madura é uma proteína tetramérica com massa molecular de 160 kDa em pH 4,0. Em pH 7,0, a proteína dissocia-se em subunidades com massas moleculares de 38 e 40 kDa. Ambas as formas monomérica e tetramérica são enzimaticamente ativas, mas com propriedades cinéticas diferentes (DEL CAMPILLO & SHANNON, 1982).

Várias α -galactosidases, tanto de plantas como de microrganismos têm sido purificadas e os respectivos genes identificados e clonados (GARRO *et al.*, 1996; BERGKAMP *et al.*, 1996; MI *et al.*, 2007). α -Galactosidases tem sido obtidas a partir de muitas espécies de fungos, dentre eles, *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 (ZAPATER *et al.*, 1990), *Aspergillus niger* (SOMIARI & BALOGH, 1992), *Aspergillus nidulans* (RIOS *et al.*, 1993), *Aspergillus fumigatus* (REZENDE *et al.*, 2005), *Aspergillus orizae* (SHANCAR & MULIMANI, 2006) e *Penicillium griseoroseum* (FALKOSKI *et al.*, 2006). Por apresentar capacidade em secretar grande quantidade de várias enzimas em seu meio de cultivo, o gênero *Aspergillus* é especialmente utilizado para a produção de enzimas comercialmente importantes (VERDOES *et al.*, 1995).

α -Galactosidases também possuem atividade de transglicosilase, observada primeiramente em leveduras por BLANCHARD E ALBON (1950), onde a enzima era capaz de transferir uma molécula de galactose a partir de uma melibiose para uma segunda molécula de melibiose aceptora formando

uma maninotriose. Estudos mais recentes avaliam a atividade de transglicosilação de outras α -galactosidases. ENEYSKAYA, *et al.* (1998), PUCHART & BIELY (2005) e SIMERSKÁ *et al.* (2006) estudaram atividade de transglicosilação das α -galactosidases dos fungos filamentosos *Trichoderma reesei*, *Aspergillus fumigatus* e *Talaromyces flavus*, respectivamente.

Em humanos, a α -galactosidase é uma enzima lisossomal, necessária para o metabolismo de glicoesfingolípídeos. A sua deficiência resulta na doença de Fabry, a qual é uma doença hereditária ligada ao cromossomo X, caracterizada pelo acúmulo de glicoesfingolípídeos neutros nos lisossomos (DESNICK *et al.*, 1987; MARANVILLE & ZHU, 2000). De acordo com MYAMURA *et al.* (1996), esta doença está relacionada com a forma inativa da α -galactosidase, a qual apresenta a região C-terminal truncada devido a presença de um códon de terminação prematuro. A natureza lipídica do material acumulado foi caracterizada pela presença de principalmente dois glicoesfingolípídios, a globotriaosilceramida (GL-3) e, em menor grau, a galabiosilceramida, que permitiram a caracterização da doença de Fabry entre outras esfingolipidoses (GERMAIN, 2000). Dessa forma, sem a enzima α -galactosidase em quantidade suficiente para realizar a tarefa adequadamente, algumas substâncias (basicamente a GL-3) se acumulam nos lisossomos, principalmente nas células encontradas nas paredes dos vasos.

2.2. Mecanismo de ação e estrutura tridimensional das α -galactosidases

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

Estudos de especificidade com α -galactosidase de amêndoas doce e

aril α -D-galactosídeos mostraram que a natureza eletrônica do aglicom exercia notável influência sobre a taxa de hidrólise enzimática. Por meio desses estudos, observou-se também que o mecanismo de ação para a α -galactosidase de amêndoas doce assemelhava-se às hidrólises alcalina e ácida de aril glicosídeos, o que, conseqüentemente, podia ser atribuído a presença de grupos básicos e ácidos no sítio ativo. Esses grupos foram identificados por Dey e Malhotra (citados por DEY & PRIDHAM, 1972) como carboxil (desprotonado) e imidazol (protonado), respectivamente.

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

Baseando-se nesses resultados, Dey (citado por DEY & PRIDHAM, 1972) postulou um mecanismo de duas etapas para a ação da α -galactosidase de amêndoas doce (Figura 2).

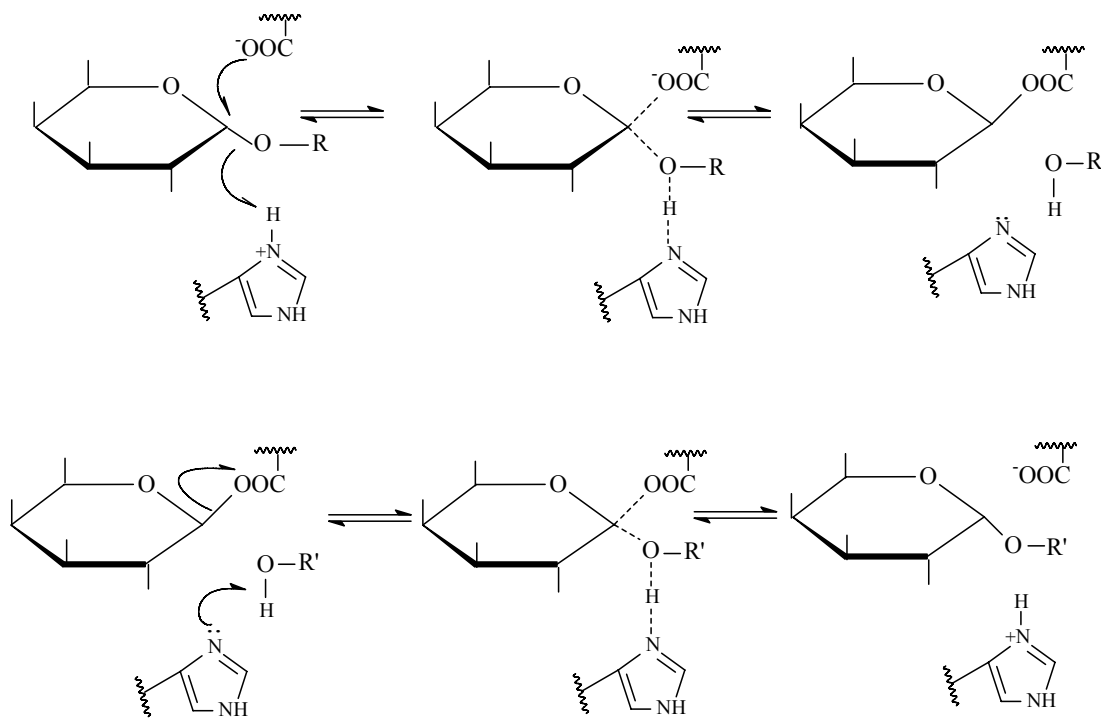


Figura 2 – Mecanismo de ação de duas etapas postulado por Dey (citado por DEY & PRIDHAM, 1972) para a α -galactosidase de amêndoa doce.

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

Estudos de modificação química da α -galactosidase de côco indicaram a presença de dois grupos carboxil, tirosina e triptofano e a ausência do grupo

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

Com base em experimentos de modificação química e nos resultados de estudos cinéticos, MATHEW & BALASUBRAMANIAM (1987) propuseram um novo mecanismo de ação para a α -galactosidase (Figura 3).

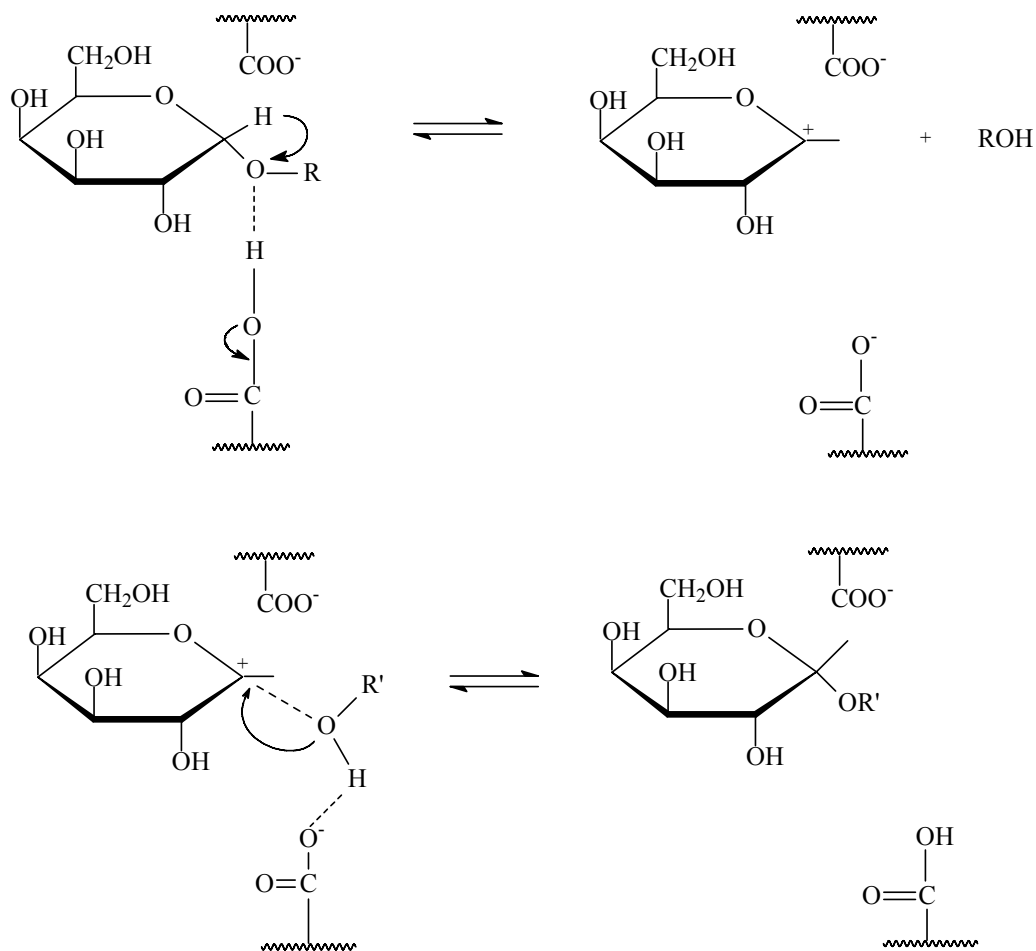


Figura 3 – Mecanismo de ação para α -galactosidase de côco sugerido por MATHEW e BALASUBRAMANIAM, 1987.

No mecanismo de ação proposto para a α -galactosidase, o grupo com pK_a de 3,8 é um grupo carboxil presente na forma ionizada para estabilizar um carbocátion intermediário e a presença deste grupo ionizado protege o carbocátion do ataque direcionado por um nucleófilo, permitindo que o produto retenha a mesma configuração anomérica do substrato. A molécula de galactose assume uma configuração de meia cadeira quando o carbocátion é formado. O grupo com pK_a de 6,5 é um grupo carboxílico perturbado que está presente na forma protonada e está envolvido na doação de um próton. Este grupo carboxílico é perturbado devido ao ambiente hidrofóbico produzido pela presença de resíduos de triptofano e tirosina em sua vizinhança (MATHEW & BALASUBRAMANIAM, 1987).

Estudos cristalográficos foram realizados em α -galactosidases de arroz (FUJIMOTO *et al*, 2003) e de *Trichoderma reesei* (GOLUBEV *et al*, 2004).

Esses estudos mostraram que a α -galactosidase de arroz consiste de um domínio catalítico com estrutura em $(\beta/\alpha)_8$ -barril e, o domínio C-terminal é constituído de 8 fitas β , contendo um motivo chave-grega (Figura 4A). A estrutura da α -galactosidase de arroz complexada com D-galactose mostrou que, esta molécula liga-se na fenda do sítio ativo, no lado C-terminal do $(\beta/\alpha)_8$ -barril central do domínio catalítico (FUJIMOTO *et al.*, 2003). O modelo cristalográfico da α -galactosidase de *Trichoderma reesei* consiste de 2 domínios, um domínio catalítico N-terminal $(\beta/\alpha)_8$ -barril e um domínio C-terminal, formado de estruturas β antiparalelas (Figura 4B). Esta proteína contém 4 sítios de N-glicosilação localizados no domínio catalítico. De modo similar à α -galactosidase de arroz, a galactose liga-se à enzima de *Trichoderma reesei* na fenda do sítio ativo localizado no centro do barril do domínio catalítico (GOLUBEV *et al.*, 2004). As análises dos complexos α -galactosidas-galactoses revelaram os resíduos do sítio ativo e forneceram uma base estrutural para a identificação do possível mecanismo de reação enzimática (FUJIMOTO *et al.*, 2003; GOLUBEV *et al.*, 2004).

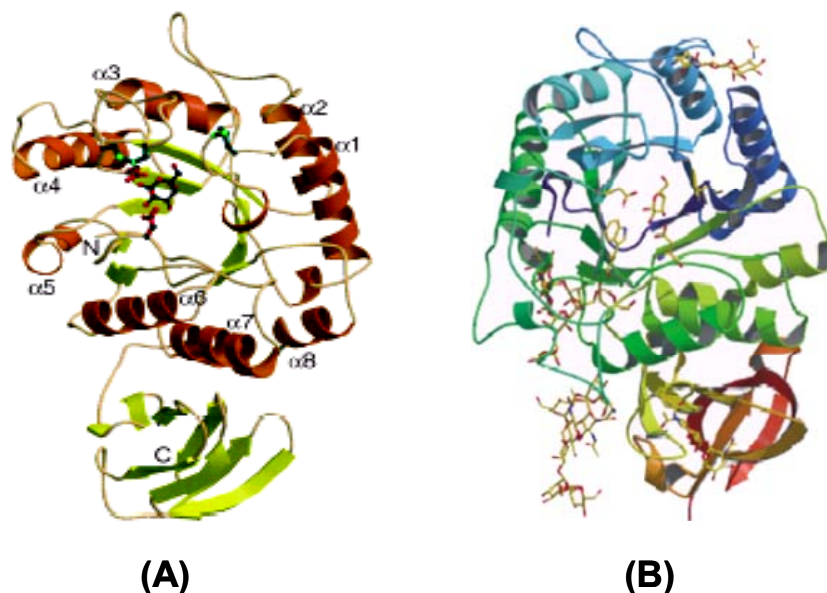


Figura 4 – Estruturas das α -galactosidases de arroz **(A)** e de *Trichoderma reesei* **(B)** complexadas com D - galactose (FUJIMOTO *et al*, 2003; GOLUBEV *et al*, 2004).

2.3. Aplicações industriais

As α -galactosidases apresentam potencial em várias aplicações industriais. Tais enzimas podem ser usadas, por exemplo, na hidrólise de rafinose de xarope de açúcar de beterraba (KOBAYASHI & SUZUKI, 1972). De acordo com THIPPESWAMY & MULIMANI (2002), estudos de imobilização de α -galactosidase em nylon tem sido desenvolvidos com o objetivo de hidrolisar rafinose em melaço de beterraba. 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 utilizadas na conversão de sangue do grupo B para sangue do grupo O (ZHU & GOLDSTEIN, 1994; PUCHART *et al.*, 2000). As células do grupo B apresentam um antígeno B ligado a membrana do eritrócito, já as células do grupo O apresentam um antígeno H também ligado a membrana do eritrócito, o qual é precursor das células do grupo B. Dessa forma, com hidrólise do resíduo terminal α -D-galactosil do antígeno B, o converte em antígeno H, ou seja,

sangue do grupo O (HOBBS *et al.*, 1995). Isso representa uma importante ferramenta na terapia de transfusão sangüínea.

Segundo PUCHART *et al.* (2000), outra aplicação industrial de α -galactosidases é na usina açucareira. Pequenas quantidades de rafinose e/ou estaquiase 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 da enzima sejam conhecidos, pois as demandas industriais com estas propriedades reduzem os custos para resfriamento e reaquecimento.

α -Galactosidases possuem também potencial para diminuir os sintomas indesejáveis causados pela ingestão de rafinose e estaquiase presentes em leguminosas em geral. Dentre estas, a soja se destaca.

2.4. A soja e seus fatores antinutricionais

A soja constitui um dos produtos de maior importância na economia brasileira ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país. Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, sendo responsável pela produção de mais de 58 milhões de toneladas deste grão no ano de 2006 (www.ibge.gov.br).

O grão de soja possui alto teor de lipídeos (15-25 %) e um conteúdo de proteínas (30-45%), com uma composição de aminoácidos adequada à alimentação. Apresenta também, carboidratos (20-35 %) e cerca de 5 % de cinzas (MOREIRA, 1999).

O leite de soja, extrato hidrossolúvel, é um dos produtos protéicos de soja, podendo ser comparável ao leite de vaca em conteúdo de proteínas e gorduras, que tem obtido alta aceitabilidade em programas de nutrição infantil (MOREIRA, 1999). De acordo com DESJARDINS *et al.* (1990), o leite de soja é rico em proteínas de alta qualidade e não contém colesterol e lactose, apenas pequenas quantidades de ácidos graxos saturados. O leite de soja é uma alternativa para as pessoas portadoras de certas intolerâncias ao leite de origem animal e a algumas deficiências genéticas, como a ineficiência em metabolizar a lactose (DE LUMEN, 1992). Adicionalmente, devido à alta produção de soja nos países tropicais, sua utilização na alimentação dos

animais, como suínos na fase de aleitamento representa uma alternativa econômica bastante atrativa (DUFFUS & SAUGHTER, 1980).

Embora sejam indiscutíveis as vantagens do emprego da soja na alimentação humana e de alguns animais, no Brasil o consumo desta leguminosa é baixo devido à presença de uma série de fatores antinutricionais, dentre os quais se destacam os inibidores de proteases, lectinas, taninos, proteínas alergênicas e pouco digeríveis, as lipoxigenases, os oligossacarídeos de rafinose (RO) e outros (BELLAVIER & SNIZEK, 1999).

Os inibidores de tripsina são proteínas que estão distribuídas nas sementes de plantas e particularmente, em sementes de leguminosas, podendo ser encontrada nas folhas, tendo massa molecular de até 24 kDa (BIRK, 1989). Estas proteínas complexam com a enzima tripsina (RICHARDSON, 1981), prejudicando o processo digestivo e causando um menor aproveitamento dos alimentos e hipertrofia pancreática (LIENER, 1986).

Segundo SGARBIERI, (1996), as 4 isoformas da enzima lipoxigenase da soja são importantes na tecnologia da soja para oxidar rapidamente ácidos graxos poliinsaturados gerando peróxidos de ácidos graxos que se degradam em aldeídos e cetonas voláteis. Estes se ligam às proteínas e outros componentes do grão de soja dando origem ao gosto e aroma de capim, tradicionalmente conhecido como “beany flavor” ou gosto desagradável da soja. A inativação térmica rápida e eficiente destas enzimas, que se dá a temperaturas superiores a 85 °C previne a formação destes compostos.

Outro fator antinutricional importante na soja refere-se ao alto teor de oligossacarídeos de rafinose (RO) encontrado em suas sementes, sendo os segundos carboidratos solúveis mais abundantes nas plantas (DEY, 1990). Os oligossacarídeos são considerados como fonte primária de energia e substratos para a síntese de outros compostos, durante a germinação (JIMÉNEZ *et al.*, 1985). Em sementes de soja madura, os açúcares solúveis constituem aproximadamente 10% do peso seco. Sacarose, rafinose e estaquiose constituem mais que 99% dos açúcares solúveis presentes. Devido ao alto conteúdo dos oligossacarídeos de rafinose, a ingestão de soja resulta em flatulência, náuseas, desconforto e diarreia. A flatulência é resultante do metabolismo anaeróbico de α -1,6-galactosídeos de rafinose presente nos

grãos das leguminosas (PRICE *et al.*, 1988). A mucosa do intestino delgado de humanos e de alguns animais monogástricos, como aves e suínos são desprovidas das α -1,6-galactosidases, enzimas necessárias à conversão dos RO em açúcares mais simples. Conseqüentemente, 100% dos RO não são degradados e são então conduzidos ao intestino grosso onde bactérias anaeróbias possuem os sistemas enzimáticos necessários para a fermentação desses açúcares, o que resulta na liberação de grandes quantidades de CO₂, H₂ e CH₄ (STEGGERDA & DIMMICK, 1966; SUAREZ *et al.* 1999).

2.5. Hidrólise enzimática dos RO em derivados de soja

A hidrólise dos RO pode ser catalisada pelas α -galactosidases (α -D-galactosideo galactohidrolase, E.C. 3.2.1.22) ou invertases (EC 3.2.1.26, β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase), ou ambas. A atividade destas enzimas aumentam durante a germinação das sementes (SARAVITZ *et al.*, 1987). Enquanto α -galactosidases hidrolisam ligações α -1,6 produzindo galactose e sacarose, invertases hidrolisam ligações β -1,2, produzindo melibiose e frutose ou glicose e frutose.

Um esquema da estrutura dos RO está mostrado na Figura 5.

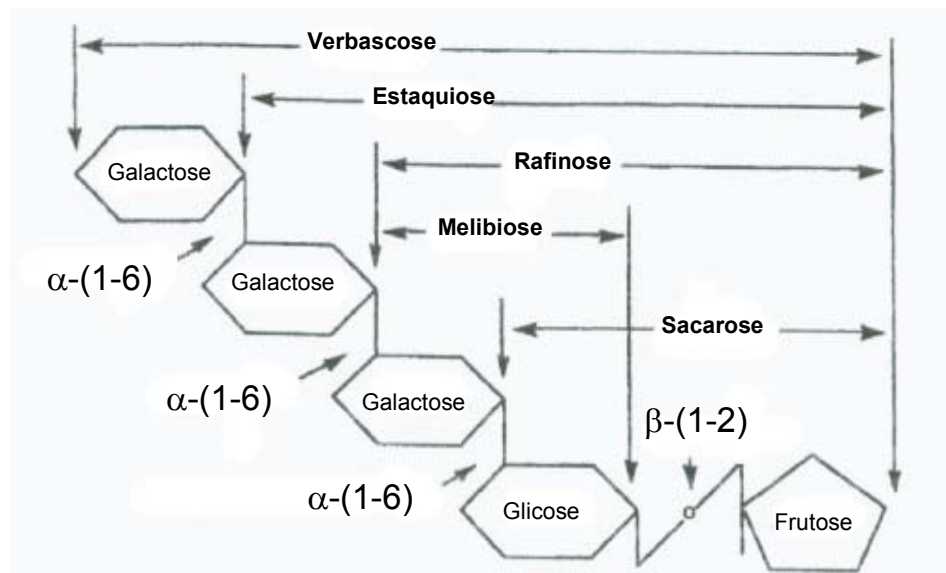


Figura 5: Estrutura dos oligossacarídeos de rafinose (RO).

Existem vários relatos sobre a utilização de α -galactosidases de origem

vegetal e microbiana na degradação dos oligossacarídeos presentes no leite de soja e em outras farinhas obtidas de leguminosas (SOMIARI & BALOGH, 1995; MULIMANI *et al.*, 1997; GUIMARÃES *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2005; FALKOSKI *et al.*, 2006 e VIANA *et al.*, 2007).

Processos para o tratamento enzimático do leite de soja utilizando α -galactosidases fúngicas foram propostos por SUGIMOTO & VAN BAUREN (1970) que usaram preparações comerciais de α -galactosidases de *Aspergillus saitoi*. THANANUNKUL *et al.* (1976) utilizaram micélios de *Mortierella vinaceae* imobilizados em gel de poliacrilamida como fonte de α -galactosidase para remoção dos RO do leite de soja. Com esse mesmo propósito CRUZ & PARK (1982) utilizaram preparações das enzimas α -galactosidase e invertase produzidas por *Aspergillus oryzae*. Posteriormente MULIMANI *et al.* (1995) avaliaram a capacidade de hidrólise dos RO do leite de soja pela α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi*. 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. KOTWAL *et al.* (1998) estudaram a produção de α -galactosidases pelo fungo *Humicola sp* e sua aplicação na hidrólise dos RO em leite de soja. A produção de α -galactosidases pelo *Aspergillus fumigatus* foi estudada por DE REZENDE (1998), entretanto a enzima não foi capaz de hidrolisar os RO nas condições experimentais. THIPPESWAMY & MULIMANI (2002) relataram a hidrólise dos oligossacarídeos da família da rafinose por α -galactosidase livre e imobilizada em gel de poliacrilamida de *Gibberella fujikuroi* em leite de soja nos intervalos de 3, 6 e 12 horas.

Recentemente vários estudos estão sendo realizados com α -galactosidases de diferentes fontes, sendo avaliada sua capacidade em hidrolisar os RO presentes nos derivados de soja. VIANA *et al.* (2007) avaliaram a capacidade da α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* hidrolisar os RO presentes no leite e no melaço de soja. Já FALKOSKI *et al.* (2006) avaliaram o poder de hidrólise das α -galactosidases de soja, *Aspergillus terreus* e *Penicillium griseoroseum* sobre os RO presentes no extrato desengordurado de soja.

2.6. Considerações sobre produção de enzimas por fungos do gênero *Aspergillus*

Fungos filamentosos produzem um amplo espectro de enzimas e atualmente representam uma das mais importantes fontes de enzimas hidrolíticas com potencial para aplicação em processos biotecnológicos (SENA *et al.*, 2006). Por serem capazes de secretar grande quantidade de várias enzimas em seu meio de cultivo, o gênero *Aspergillus* é especialmente utilizado para a produção de enzimas comercialmente importantes (VERDOES *et al.*, 1995), merecendo destaque.

O gênero *Aspergillus* possui mais de 100 espécies. Apresenta uma reduzida necessidade nutricional, podendo ser isolado do solo, água, vegetação, material em decomposição e ar (RAPER *et al.*, 1999).

Inúmeras enzimas destes microrganismos vêm sendo isoladas, purificadas e sua aplicabilidade nos mais diferentes ramos da indústria avaliadas. Algumas espécies como *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus soyae* são utilizados na produção de alimentos. *Aspergillus oryzae* é grande produtor de α -amilases, α -galactosidases e enzimas pectinolíticas (FRANCO & LANDGRAF, 1996 e SHANCAR & MULIMANI, 2007). *Aspergillus niger* é utilizado para produção comercial de ácidos cítrico, glucônico e gálico e das enzimas α -galactosidases, β -galactosidases, amiloglicosidases, lipases e pectinases (ADEMARK *et al.*, 2001, NOROUZIAN *et al.*, 2006 e ALI, 2006).

BOTELA *et al.* (2007) avaliaram a produção de xilanases e pectinases pelo fungo *Aspergillus awamori* determinando um grande potencial deste microrganismo na produção destas enzimas. CHEN *et al.* (2007) purificaram e caracterizaram uma β -mananase produzida pelo fungo *Aspergillus sulfureus* com grande potencial de aplicação na indústria de alimentos, tendo depois clonado e superexpressado esta enzima em *Pichia pastoris*.

Vários fungos do gênero *Aspergillus* são também importantes fontes das enzimas α -galactosidases, sendo encontrado na literatura inúmeros trabalhos de isolamento, caracterização e avaliação do potencial de aplicação destas enzimas (ADEMARK *et al.*, 2001, PRASHANT & MULIMANI, 2005, DE REZENDE *et al.*, 2005, FALKOSKI *et al.*, 2006 e SHANCAR & MULIMANI,

2007).

A utilização de fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse comercial é também vantajosa devido ao fato destes microrganismos excretarem estas proteínas para o meio de cultura, o que facilita o processo de obtenção e purificação destas moléculas.

Uma das possíveis limitações na utilização destes fungos na indústria de alimentos seria a ausência de status GRAS (“generally regarded as safe”) para estes microrganismos. Entretanto, esta é uma barreira que pode ser superada, haja visto que, os avanços tecnológicos nos campos da biologia molecular e da tecnologia do DNA recombinante, somados ao grande conhecimento já existente sobre a estrutura genômica de vários gêneros de fungos filamentosos, permitem que os genes que codifiquem proteínas de interesse sejam facilmente identificados e posteriormente clonados e superexpressos em outro organismo que não ofereçam riscos à saúde humana (LIU *et al.*, 2007, MI *et al.*, 2007, CHEN *et al.*, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1. Reagentes utilizados

Da Sigma Chemical Company (EUA) foram obtidos os reagentes: Brilliant Blue G, albumina sérica bovina (BSA), acetato de sódio, carbonato de sódio, rafinose, estaquiase, dodecil sulfato de sódio (SDS), fosfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de manganês, ácido cítrico, β -mercaptoetanol, etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido dinitrosalicílico (DNS), para-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ -NP- α Gal), para-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ρ -NP- β Gal), para-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (ρ -NP- α Gli), orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ρ -NP- β Gal), para-nitrofenil- α -D-xilopiranosídeo (ρ -NP- α Xil), para-nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo (ρ -NP- α Ara), para-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (ρ -NP- α Man), para-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ -NP- β Gli), meta-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (m-NP- α Gal), orto-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (o-NP- β Gli), orto-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (o-NP- α Gal), solução de 4 % (p/v) de sulfato de cobre.

As resinas cromatográficas Sephacryl S200, Phenyl-Sepharose, Q-Sepharose foram obtidas da Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden.

Da Merk S. A. Indústrias Químicas foram obtidos os seguintes reagentes: p-nitrofenol (p-NP), sacarose, glicose, lactose, frutose, nitrato de

prata, tartarato de sódio e potássio e cloreto de potássio.

Da LABTEST Diagnóstica S.A. foi obtido Glicose GOD-ANA (Ensaio Enzimático Colorimétrico).

Da Empresa Bunge Alimentos, RS, Brasil foi obtida a farinha desengordurada de soja.

3.2. Cultivo dos microorganismos para produção da enzima α -galactosidase

Os fungos analisados quanto a capacidade de produzir a α -galactosidase foram *Aspergillus terreus* CCT 4083 e *Monascus ruber* CCT 1236, obtidos pela Fundação Tropical André Toselo (Campinas –SP) e *Aspergillus versicolor*, isolado e identificado pela Universidade Federal de Viçosa-MG, cedido pelo Laboratório de Bromatologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular .

Foram feitos repiques dos fungos em meio sólido nutritivo, BDA (ágar batata dextrosado), para a multiplicação de esporos. Os fungos foram repicados em tubo de ensaio inclinado com o meio e incubados em estufa a 25°C por 6 dias. Após 6 dias de crescimento, foi preparada neste mesmo tubo a suspensão de esporos com adição de 10 mL de água destilada esterilizada. Dessa suspensão, alíquotas de 1 mL foram retiradas e transferidas para vários erlenmeyers contendo 25 mL de meio mineral líquido, com galactose ou farelo de trigo como fonte de carbono. Os fungos foram crescidos a 28°C, sob agitação, a 150 rpm, por vários intervalos de tempo.

O meio mineral líquido contém 7,0 g/L de KH_2PO_4 ; 2,0 g/L de K_2HPO_4 ; 0,1g/L de MgSO_4 ; 1,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,6 g/L de extrato de levedura e 10g/L de galactose ou farelo de trigo como fonte de carbono.

A capacidade de produção da α -galactosidase pelo fungo foi avaliada, utilizando um ensaio enzimático específico com o substrato sintético p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo ($\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$). Para tanto, foram determinadas as atividades de α -galactosidase nos sobrenadantes dos meios de cultura de cada fungo nos vários intervalos de tempo de crescimento. Após cada período de incubação a cultura sobrenadante foi coletada por filtração em papel de filtro e armazenada a -20°C.

3.3. Estabelecimento das condições ótimas de cultivo

Foram estabelecidas as condições ótimas de cultivo, como melhor tempo de crescimento e melhor fonte de carbono para o *Aspergillus terreus* e este foi produzido em maior quantidade nessas condições, para posterior purificação da enzima. A atividade da α -galactosidase produzida por este fungo foi avaliada sobre diferentes substratos no final das etapas de purificação.

3.4. Determinação da atividade de α -galactosidase com diferentes substratos

3.4.1 Substrato sintético p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo ($pNP\alpha Gal$)

O ensaio padrão para a determinação da atividade de α -galactosidase foi conduzido utilizando o substrato $pNP\alpha Gal$. Para esse ensaio, a mistura de reação teve um volume final de 1 mL, contendo 650-740 μL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0; 10-100 μL de extrato enzimático e 250 μL da solução de $pNP\alpha Gal$ 2 mM. A reação foi conduzida por 15 min em banho-maria a 40 °C e interrompida com adição de 1 mL de Na_2CO_3 0,5 M. Os valores de absorbância obtidos a 405 nm foram transformados em μmol de p -NP utilizando uma curva padrão construída com 0-0,16 μmol a partir de uma solução estoque de 2 μM . A atividade de α -galactosidase foi expressa em $mM \cdot min^{-1}$.

3.4.2. Açúcares não redutores como substratos

Ensaio para a atividade de α -galactosidase foram realizados sobre os açúcares não redutores sacarose, rafinose e estaquiose com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) (MILLER, 1956). O sistema de reação foi contido por 100-300 μL da amostra enzimática, 250 μL de solução de açúcar (sacarose, rafinose ou estaquiose) 50 mM e 450-650 μL 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 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 0,2-2,0 μmols de glicose, utilizando solução estoque de concentração 1 mg.mL^{-1} .

3.4.3. Açúcares redutores como substratos

Os ensaios da atividade de α -galactosidase sobre os açúcares redutores melibiose, lactose e maltose foram realizados por meio da medida de formação de glicose, pelo método da glicose oxidase (STENBERG *et al.*, 1970). O ensaio foi conduzido com 300-500 μL da amostra enzimática, 200 μL de solução de açúcar redutor 100 mM e 400-600 μL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A reação foi conduzida por 50 min, a 40°C sendo interrompida pela imersão dos tubos em banho de água fervente por 5 min, seguido da imersão dos tubos em água gelada para redução da temperatura do meio de reação. Em cada tubo foi adicionado 500 μL do reativo de glicose oxidase (GOD) e incubados 15 min, a 37°C. A quantidade de glicose formada foi estimada espectrofotometricamente a 510 nm, por meio de uma curva padrão construída com 0-0,4 μmols de glicose, utilizando solução estoque de concentração 1 mg.mL^{-1} .

3.4.4. Outros substratos sintéticos

Os ensaios das atividades da α -galactosidase sobre estes substratos foram indênticos ao descrito no item 3.4.1, exceto que foram utilizados os substratos sintéticos o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (o-NP- β -Gal), p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p-NP- α -Gal), p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (p-NP- α -Glc), p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p-NP- β -Glc), m-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (m-NP- α -Gal), p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (p-NP- β -Gal), p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (p-NP- α -M), o-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (o-NP- β -Glc), p-nitrofenil- α -L-arabinopiranosídeo (p-NP- α -A) e p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (p-NP- β -X), todos na concentração final de 0,5 mM.

3.4.5. Polímeros

Ensaio para atividade da α -galactosidase foram também realizados

com os polímeros goma guar e goma locusta como substratos, com o uso do reagente dinitrossalicilato, DNS (MILLER, 1956). Para o ensaio foram utilizados 500 µL da amostra enzimática, 500 µL do substrato goma guar e goma locusta 1% (p/v) tamponada em pH 5,0. As amostras foram incubadas por 4 horas a 40°C.

3.5. Determinação do teor de proteína

Para determinar o teor protéico das amostras enzimáticas foi utilizada a metodologia descrita por BRADFORD (1976). Para os ensaios foram utilizados 25-800 µL da amostra enzimática, 0-775 µL de água destilada e 200 µL do reagente de Bradford 5X. Após 15 min de reação foi feita a leitura a 595 nm e os valores de absorbância foram convertidos em concentração de proteína utilizando uma curva padrão feita com 0 a 20 µg de BSA (albumina sérica bovina). O teor de proteína foi expresso em mg de proteína por mL de amostra enzimática.

O reagente de Bradford 5X, foi preparado misturando-se 100 mg de Comassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol 95% (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85% (v/v). A mistura foi deixada sob agitação e, após a solubilização, o volume foi completado para 200 mL e a solução filtrada em papel Whatman nº1. O método baseia-se no desenvolvimento da cor, em função da ligação da proteína com o pigmento Comassie Brilliant Blue G-250.

3.6. Purificação da α -galactosidase

O processo utilizado para purificar as enzimas α -galactosidases extracelulares do fungo *Aspergillus terreus* está representado de forma resumida no fluxograma da Figura 6.

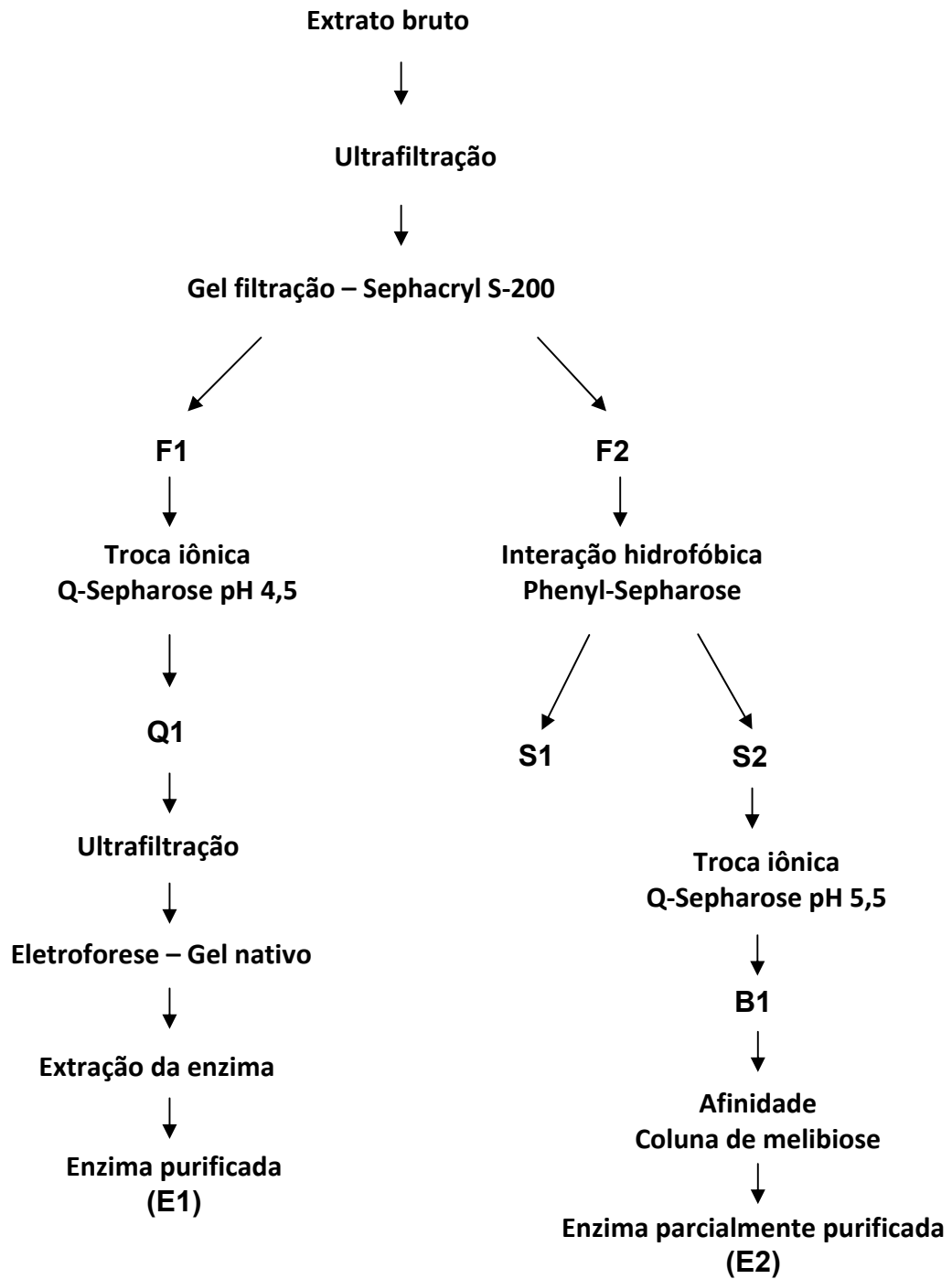


Figura 6: Seqüência das etapas do processo de purificação das α -galactosidases de *Aspergillus terreus*.

3.6.1. Cromatografia de filtração em gel

O sobrenadante da cultura do *Aspergillus terreus*, cultivado por 168 horas a 25 °C em meio mineral líquido contendo farelo de trigo, foi concentrado por ultrafiltração (Amicon) modelo 8400 (Bedford, MA) utilizando membrana com poro de 10 kDa, e posteriormente submetido à cromatografia de gel filtração em resina Sephacryl S-200 (88 x 2,5 cm) equilibrada em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,5. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão a 4 °C, com fluxo contínuo de 20 mL.h⁻¹ e coletadas frações de 4 mL. Foram obtidos dois picos protéicos com atividade de α -galactosidase, F1 e F2.

3.6.2. Cromatografia de interação hidrofóbica

A fração F2 proveniente da etapa anterior de gel filtração, foi submetida à cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl-Sepharose (10 x 2 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,5 com 1 M de sulfato de amônio. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, seguido por um gradiente salino decrescente, formado por três volumes da coluna de tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,0 com 1 M de sulfato de amônio e o mesmo volume de tampão sem sulfato de amônio. Foram obtidos dois picos protéicos com atividade de α -galactosidase, S1 e S2. A cromatografia foi realizada a 4 °C, com fluxo de 40 mL.h⁻¹ sendo coletadas frações de 3 mL por tubo.

3.6.3. Cromatografia de troca iônica

A fração enzimática F1 proveniente da gel filtração foi submetida a cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose (10 x 2 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5. As proteínas foram eluídas com 50 mL do mesmo tampão, seguido por um gradiente salino crescente, formado por 150 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 puro e 150 mL do mesmo tampão acrescido de 0,7 M de NaCl. A cromatografia foi realizada a 4 °C, com fluxo de 40 mL.h⁻¹. Frações de 3 mL foram coletadas e as que apresentaram atividade de α -galactosidase foram reunidas. Foi obtido um pico protéico, Q1, com atividade de α -galactosidase.

A fração S2 proveniente da etapa anterior de interação hidrofóbica

também foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose nas mesmas condições, porém em pH 5,5. Foi obtido um pico protéico, B1, com atividade de α -galactosidase.

3.6.4. Cromatografia de afinidade

A fração enzimática B1 proveniente da troca iônica foi submetida a cromatografia de afinidade em coluna de Melibiose (8 x 1,2 cm), equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5. A amostra enzimática foi aplicada na coluna e deixada em repouso por aproximadamente 2 horas para que a enzima pudesse interagir com a resina aderindo a ela. A resina foi lavada com 5 volumes da coluna de tampão e em seguida a proteína foi eluída com o mesmo tampão adicionado de 4mM de pNP α Gal. Foi obtido um pico protéico E2 com atividade de α -galactosidase.

3.6.5. Ultrafiltração

O processo de ultrafiltração foi utilizado durante as etapas de purificação para concentração das amostras enzimáticas. As frações foram concentradas usando uma célula de ultrafiltração Amicom, com uma membrana de exclusão de 10 kDa. Durante o processo a célula de ultrafiltração foi imersa em banho de gelo para evitar perdas na atividade enzimática.

3.6.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida – Gel nativo

A fração Q1, proveniente da troca iônica, foi concentrada por ultrafiltração e submetida a corridas eletroforéticas em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes com intuito de purificar a enzima.

3.6.6.1. Preparo do gel

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) foi realizada conforme descrito por LAEMMLI (1970), com modificações. O gel separador foi preparado a partir da mistura de uma solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida 30% (p/v) (4mL), tampão Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8 (2,5 mL), persulfato de amônio 10% (p/v) (0,05 mL), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino (TEMED) (0,010 mL) e água destilada (3,6 mL).

O gel empilhador foi preparado a partir de uma mistura de uma solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida 30% (p/v) (1,3mL), tampão Tris/HCl, 0,5 M, pH 6,8 (2,5 mL), persulfato de amônio 10% (p/v) (0,05 mL), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino (TEMED) (0,020 mL) e água destilada (6,2 mL).

A montagem dos sistemas foi feita utilizando placas de vidro com dimensões de 20 x 12 cm (placa maior) e 20 x 10 cm (placa menor). Foi estabelecida uma camada de 6 cm para o gel separador e 1,5 cm para o gel empilhador, sendo o restante do espaço do sistema designado para a amostra a ser aplicada.

3.6.6.2. Preparo da amostra

A fração Q1 concentrada foi preparada para ser submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes. Para cada 1mL da amostra eram adicionados 0,154 mL de tampão Tris/HCl, 0,5 M, pH 6,8; 0,128 mL de glicerol e um “traço” de azul de bromofenol, para sinalizar o “status” da corrida eletroforética.

3.6.6.3. Condições utilizadas durante a eletroforese

Uma solução de Tris/HCl, 0,025M, pH 8,3 contendo glicina 0,192M, foi utilizado como tampão de tanque durante a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. Após alguns testes, ficou estabelecido que a eletroforese seria conduzida a 5°C, utilizando uma voltagem de 220 V, durante 40 horas.

3.6.6.4. Localização e identificação da banda protéica contendo atividade de α -galactosidase

Ao término da corrida eletroforética, uma faixa de aproximadamente 1 cm de largura foi longitudinalmente extraída do gel para a localização da banda protéica contendo atividade de α -galactosidase. A faixa extraída do gel foi acondicionada em uma placa de petri e lavada com tamão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0 durante 1 minuto. Após esta lavagem a placa foi cuidadosamente coberta com uma solução tamponada (tampão acetato de

sódio, 100 mM, pH 5,0) de pNP α Gal (4mg.mL⁻¹) e incubada por 5 minutos a 40 °C em banho-maria. A banda protéica contendo a enzima α -galactosidase pode ser facilmente evidenciada pelo surgimento de uma banda amarela no local onde a enzima se encontrava no momento que a corrida eletroforética foi interrompida.

3.6.6.5. Extração da enzima α -galactosidase do gel

Após a localização da posição da enzima α -galactosidase no gel, a faixa foi realinhada ao gel original, a fim de servir de guia para a realização de um corte transversal no gel. Esta faixa transversal foi fragmentada em pedaços menores e posteriormente triturada, a seco, em gral de porcelana. Após uma total desintegração do gel, 40 mL de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0 foram adicionados ao macerado e posteriormente repassados para um béquer de 100 mL. Esta mistura foi mantida sob agitação, em agitador magnético durante 24 horas a 5°C, com o bjetivo de maximizar a extração da enzima da malha do gel. Ao final do processo a mistura foi então filtrada em papel de filtro, para eliminação dos resíduos macroscópicos do gel.

3.7. Determinação do grau de pureza e da massa molecular aparente das α -galactosidases de *Aspergillus terreus*

3.7.1. Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), contendo SDS e β -mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por LAEMMLI (1970). Os géis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30% (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 mol.L⁻¹, pH 8,8 para o gel separador, e tampão Tris/HCl 0,5 mol.L⁻¹, pH 6,8 para o gel empilhador, persulfato de amônio 10% (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v), e N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino (TEMED). A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente, a 100 V, em placas do Sistema Mini-Gel da Sigma Chemical Co. As amostras submetidas à eletroforese foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 50%, lavadas com acetona e adicionadas ao tampão de amostra desnaturante 3 vezes concentrado (0,19 M

Tris/HCl pH 6,8, 2,3 % p/v de SDS, 1 % v/v de glicerol, 5 % v/v de β -mercaptoetanol e azul de bromofenol), fervidas durante 5 minutos e aplicadas no gel (LAEMMLI, 1970).

Os marcadores de massa molecular utilizados foram: albumina bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), gliceraldeído-3P-desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lactoalbumina (14 kDa).

3.7.2. Coloração dos géis de eletroforese

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

Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em solução fixadora (50 % de metanol, 12 % de ácido acético glacial e 38 % de água destilada) por no mínimo 2 horas. Posteriormente, o gel foi lavado três vezes com solução de etanol 50 %, durante 10 min. Em seguida, o gel foi lavado por 1 min com solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v), sendo logo depois lavado com água destilada durante 20 segundos. O gel foi incubado com solução de nitrato de prata 0,2 % contendo 37 μ L de formaldeído 37 % (v/v) por 30 min e então lavado três vezes com água destilada por 20 segundos. Finalmente, o gel foi incubado em solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, 1 mL da solução de tiosulfato de sódio 0,02 %, e 25 μ L de formaldeído 37 %), até visualização das bandas protéicas. A reação foi interrompida com adição de 3 mL de ácido acético glacial.

3.7.3. Utilização de gel filtração para determinação da massa molecular.

As massas moleculares das α -galactosidases de *Aspergillus terreus* nas suas conformações nativas foram estimadas por cromatografia de gel filtração utilizando resinas Sephacryl S-200 e S-300. A coluna (70 x 1,6 cm) empacotada com a resina foi previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio, 100 mM, pH 6,2. O fluxo utilizado em todas as cromatografias foi de 30 mL.h⁻¹, sendo que as frações coletadas tinham o volume de 1 mL.

Uma cromatografia utilizando azul de dextrana foi executada, com o objetivo de determinar o volume vazio da coluna.

As massas moleculares das α -galactosidases E1 e E2 de *A. terreus* foram estimadas correlacionando-se as constantes de eluição das proteínas-padrão (K_{av}) com o logaritmo das massas moleculares das respectivas proteínas. Os padrões de massa molecular utilizados na Sephacryl S-200 foram aldolase (158 kDa), albumina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), quimotripsinogênio (25 kDa) e ribonuclease A (13,7 kDa) e na Sephacryl S-300 foram tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa) e aldolase (158 kDa).

3.8. Conversão das células vermelhas sanguíneas tipo B em tipo O pelas α -galactosidases de *A. terreus*

Os eritrócitos humanos B+ foram coletados e armazenados a 4 °C em citrato de sódio 0,105 M e determinado o seu hematócrito. As células foram centrifugadas por cinco minutos a 3000 rpm, sendo as hemácias separadas do plasma. As células foram então lavadas cinco vezes com tampão CGB (5 mM de citrato de sódio, 300 mM de glicina e 1 mg.mL⁻¹ de BSA, pH 5,8) por três minutos a 2000 rpm. As células lavadas foram diluídas com tampão CGB para um hematócrito que contenha 8% dos eritrócitos B+. Para essa diluição foram utilizados 2,3 mL (10 U) das enzimas α -galactosidaseS E1 e E2, 1 mL de hemácia e 9,2 mL do tampão CGB. A mistura reacional foi incubada por quatro horas a 35 °C. Após a incubação, as células foram lavadas cinco vezes com tampão PBS (10 mM de NaH₂PO₄, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, pH 7,4) e tratadas com o antisoro monoclonal anti-B (Hobbs *et al.*, 1995). A ausência de aglutinação indica que as células que continham o antígeno B foram convertidas em antígeno H.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de p-NP por minuto nas condições de ensaio.

3.9. Hidrólise de RO em extrato desengordurado de soja

O extrato desengordurado de soja foi obtido a partir da farinha desengordurada de soja. Uma alíquota de 20g da farinha desengordurada de soja foi ressuspendida em 200 mL (p/v 1:10) de água destilada e

homogeneizada em um agitador magnético por 10 min até dissolução dos sólidos. Posteriormente o extrato foi submetido aos testes de hidrólise de RO utilizando as enzimas α -galactosidases do fungo *A. terreus*.

As duas α -galactosidases do fungo *A. terreus* foram testadas quanto à capacidade em hidrolisar RO presentes em derivados de soja. Alíquotas de 20 mL do extrato desengordurado de soja foram transferidas para erlenmeyers de 50 mL em triplicata. Em cada erlenmeyer foram adicionados 5 mL das α -galactosidases E1 e E2 (total de 10 U de enzima em ambos os casos) e incubados a 120 rpm em Incubador Shaker Series 25 D, New Brunswick, por 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h a 40 °C.

Para a determinação da porcentagem de hidrólise dos RO presentes no extrato desengordurado de soja, essas preparações foram liofilizadas e os RO extraídos de aproximadamente 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 desengordurado de soja em função do tempo de incubação com a enzima.

3.10. Extração dos RO

As extrações dos RO do extrato desengordurado de soja tratado e não tratado enzimaticamente, foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por GUIMARÃES *et al.* (2001) com modificações. Aproximadamente 30 mg das amostras liofilizadas pesadas foram usadas para o processo de extração dos açúcares solúveis. Os açúcares foram extraídos em três etapas sucessivas de tratamento com etanol 80%, a 100 °C, por 5 min. Após cada extração feita com álcool 80 %, 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 ressuspensos em 1 mL de etanol 80% e congelados a -20 °C. Após 24 h as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições já descritas, passadas em filtro Milipore de 0,45 micra de diâmetro e o filtrado obtido armazenado em freezer a -20 °C para posterior análise por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

3.11. Determinação do teor de RO por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os RO extraídos do extrato desengordurado de soja tratados e não tratados enzimaticamente com a α -galactosidase, foram analisados por CLAE em cromatógrafo Shimadzu série 10A (Kyoto, Japão), usando como fase estacionária uma coluna contendo o grupo aminopropil, Supelcosil LC-NH₂ 25 cm x 4,6 mm (Supelco, Bellefonte, PA). Como fase móvel, foi utilizado a mistura de acetonitrila e água (80:20) em condições isocráticas. As análises foram realizadas a 35 °C, sob fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Todo o processo foi controlado por um computador acoplado ao sistema.

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

3.12. Caracterização bioquímica e cinética das α -galactosidases de *A. terreus*

3.12.1 Efeito do pH na atividade das α -galactosidases

Foi determinado o pH de maior atividade das α -galactosidases E1 e E2 de *A. terreus*. O ensaio foi realizado com 650 μ L de tampão McIlvaine

(MCLLVAIN, 1921) nos valores de pH: 3,0; 3,6; 4,0; 4,6; 5,0; 5,6; 6,0; 6,6; 7,0 e 7,6, 100 μL da fração enzimática E1 e E2 diluída quatro vezes e 250 μL de $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ 2 mM. A mistura foi incubada a 40 °C por 15 min e em seguida foi adicionado 1 mL de solução 0,5 M de carbonato de sódio para o aparecimento da cor. As leituras das absorbâncias foram feitas a 405 nm.

Foi também determinado a estabilidade da enzima nos diferentes valores de pH. Para este ensaio, 300 μL das enzimas E1 e E2 e 700 μL do tampão Mcllvaine nos valores de pH: 3,0; 3,6; 4,0; 4,6; 5,0; 5,6; 6,0; 6,6; 7,0 e 7,6 foram incubados em banho-maria a 40 °C por 6 h. Após o tempo de pré-incubação, foi realizado um ensaio enzimático utilizando 100 μL da amostra enzimática pré-incubada, 650 μL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e 250 μL de $\rho\text{-NP}\alpha\text{Gal}$ 2 mM. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a 40 °C por 15 min, e em seguida foi adicionado 1 mL de solução 0,5 M de carbonato de sódio para o aparecimento da cor. As leituras das absorbâncias foram feitas a 405 nm.

3.12.2. Efeito da temperatura na atividade das α -galactosidases

A determinação da temperatura de maior atividade das α -galactosidases foi realizada com as amostras de α -galactosidases E1 e E2. A mistura de reação e as condições de ensaio foram às mesmas já descritas na determinação do pH ótimo. Entretanto, foram utilizados no ensaio tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0. O ensaio enzimático foi realizado nas temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 65 °C.

3.12.3. Termoestabilidade e determinação de meia-vida

A termoestabilidade da α -galactosidase E1 foi testada nas temperaturas de 55, 60 e 65 °C e da α -galactosidase E2 nas temperaturas de 45, 50 e 55 °C. Alíquotas das amostras enzimáticas juntamente com tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 foram pré-incubadas em banho-maria nas diferentes temperaturas por vários intervalos de tempo. Após cada tempo de pré-incubação foram retiradas 50 μL da amostra enzimática pré-incubada e realizado o ensaio como descrito no item 3.4.1. A temperatura do ensaio enzimático foi de 60°C para a α -galactosidase E1 e 50°C para a E2.

A meia-vida para as α -galactosidases E1 e E2 de *A. terreus* foi determinada nas temperaturas de 55, 60 e 65°C para E1 e 45, 50 e 55°C para E2. Nesse ensaio, a enzima e o tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 foram pré-incubados por variados tempos, ou seja, até a perda da metade da atividade enzimática inicial. Após cada tempo de pré-incubação foram retiradas 50 μ L da amostra enzimática e realizado o ensaio conforme descrito no item 3.4.1. Os valores de meia-vida foram obtidos pelo ajuste dos dados experimentais de termoestabilidade a uma equação, utilizando o programa Curve Expert 1.3.

3.12.4. Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max})

Os valores de K_M e V_{max} para diferentes substratos foram obtidos para as α -galactosidases E1 e E2. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados com diferentes concentrações do substrato pNP α Gal, melibiose, rafinose e estaquiose.

Para a α -galactosidase E1 foi utilizado 100 μ L (diluída 10X), 40 μ L, 30 μ L e 70 μ L da enzima para os ensaios com os substratos pNP α Gal, melibiose, rafinose e estaquiose, respectivamente. A mistura foi incubada em banho-maria por 15 minutos para o ensaio com o pNP α Gal a 60°C. Para o substrato rafinose nas concentrações de 3-20 mM foram incubadas por 90 min e nas concentrações 50-250 mM foram incubadas por 45 min a 60 °C. Para o substrato estaquiose, em todas as concentrações, a mistura reacional foi incubada por 50 min a 60 °C e para a melibiose nas concentrações de 0,75-15mM a mistura reacional foi incubada por 120 min e nas concentrações de 25-100mM por 60 min 60°C.

Para a α -galactosidase E2 foi utilizado 100 μ L (diluída 10X) e 300 μ L da enzima para os ensaios com os substratos pNP α Gal e melibiose, respectivamente. A mistura foi incubada em banho-maria por 15 min para o ensaio com o pNP α Gal a 50°C. Para o substrato melibiose, em todas as concentrações, a mistura reacional foi incubada por 150 min a 50 °C.

Os valores de K_M e V_{max} para os substratos rafinose e estaquiose não foram determinados para a α -galactosidase E2, pois foi verificado que esta

amostra possui atividade sobre sacarose e portanto está provavelmente contaminada com a enzima invertase.

Os ensaios enzimáticos para os diferentes substratos foram feitos em triplicata e conduzidos conforme descrito no item 3.4.

3.12.5. Efeito de íons, açúcares e agentes redutores na atividade das α -galactosidases de *A. terreus*

O efeito de alguns efetores sobre a atividade das α -galactosidases E1 e E2 foram analisados. Para o ensaio enzimático uma mistura de reação foi formada por 500 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0; 200 μ L do efetor na concentração de 10mM e 50 μ L da enzima. Essas amostras foram pré-incubadas por 30 min a 60 e 50°C para as enzimas E1 e E2, respectivamente. Ao final desse tempo foram adicionados 250 μ L da solução de pNP α Gal 2 mM, sendo então a mistura novamente incubada por 15 min nas mesmas temperaturas. Após o período de incubação foi adicionado 1 mL de solução 0,5 M de carbonato de sódio para paralisar a reação. As leituras das absorbâncias foram feitas a 405 nm.

Os efetores utilizados foram: CaCl₂, HgCl₂, SDS, NaCl, CuSO₄, KCl, ZnSO₄, MgCl₂, AgNO₃, β -mercaptoetanol, EDTA, frutose, galactose, glicose, manose, sacarose, melibiose, lactose, maltose, rafinose e estaquiose.

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

O valor de K_i para o inibidor galactose foi determinado somente para a α -galactosidase E2, pois somente esta foi inibida na presença deste açúcar. Para determinação da taxa de inibição foram realizados ensaios enzimáticos em presença e ausência de galactose, a qual é o produto da hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose pela enzima α -galactosidase. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados como descrito no item 3.12.5, com concentrações de pNP α Gal que variaram de 0,05 a 4,0 mM, na ausência ou presença de 1,5 e 3,0 mM do inibidor galactose.

3.12.7. Determinação da energia de ativação

Utilizando a equação de Lineweaver Burk foram calculados os valores

de $V_{m\acute{a}x}$ da enzima α -galactosidase E1 de *Aspergillus terreus* para os substratos pNP α Gal, melibiose, rafinose e estaquiase nas temperaturas de 35, 45, 50, 55, 60 e 65 °C. Para a enzima α -galactosidase E2 foram calculados os valores de $V_{m\acute{a}x}$ para os substratos pNP α Gal e melibiose nas temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55, °C.

A energia de ativação (E_a) das α -galactosidasas para hidrólise destes substratos foi estimada pelo gráfico de Arrhenius, que correlaciona $\text{Log } V_{m\acute{a}x}$ vs $1.T^{-1}$ (K^{-1}).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção do microorganismo e condições ótimas para a produção da α -galactosidase

A capacidade dos fungos *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor* e *Monascus ruber* em secretar a α -galactosidase quando crescidos em meio mineral com galactose ou farelo de trigo como fonte de carbono foi avaliada (Tabela 1). Dentre os fungos analisados, *Monascus ruber* não se mostrou capaz de produzir a enzima. Os outros dois apresentaram alta capacidade em produzir a α -galactosidase, sendo o *Aspergillus terreus* o mais promissor. Nos meios com farelo de trigo como fonte de carbono, houve alta produção quando comparada aos meios com galactose. A atividade de α -galactosidase foi detectada nas culturas de *Aspergillus terreus* e *Aspergillus versicolor* após um tempo de crescimento de 48 e 96 h, respectivamente. A maior atividade da enzima foi observada na cultura do *Aspergillus terreus* contendo farelo de trigo, após 168 h de crescimento. Portanto este fungo foi selecionado para ser produzido em maior quantidade, nas condições ótimas de cultivo.

De acordo com esses resultados, KOTWAL *et al.* (1998) e KOTWAL *et al.* (1999) demonstraram que farelo de trigo foi um bom indutor para α -galactosidase extra e intracelular do fungo *Humicola sp*, quando crescido por 144 h. A galactose também não foi um bom indutor da atividade de α -

galactosidase para o fungo *Talaromyces flavus* (SIMERSKÁ *et al.*, 2007). Ao contrário, para as α -galactosidases de *Bacillus stearothermophilus* e α -galactosidases intra e extracelular de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 a galactose foi um bom indutor da atividade destas enzimas (GOTE *et al.*, 2006 e VIANA *et al.*, 2007). Estes microrganismos foram crescidos por 24 e 31 h, respectivamente.

Tabela 1: Atividade de α -galactosidase ($\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$) nos meios de cultura dos fungos *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor* e *Monascus ruber*, crescidos a 28 °C por vários intervalos de tempo na presença de galactose ou farelo de trigo como fonte de carbono.

Tempo de Crescimento (h)	<i>A. terreus</i>		<i>A. versicolor</i>		<i>M. ruber</i>	
	Gal	F. trigo	Gal	F. trigo	Gal	F. trigo
24	0	0	0	0	0	0
48	0	0,358	0	0,009	0	0
72	0	0,510	0	0,080	0	0,01
96	0,01	0,489	0	0,102	0	0,01
120	0,01	0,482	0,01	0,205	0	0,01
144	0,01	0,804	0,01	0,466	0	0,01
168	0,01	0,875	0,02	0,610	0	0,01
192	0,01	0,703	0,01	0,250	0	0,01
216	0,01	0,678	0,01	0,224	0	0,01
240	0,02	0,684	0,01	0,275	0	0,01

Todos os valores de atividade da α -galactosidase foram determinados em triplicata, nos quais o desvio padrão foi sempre menor que 10%.

4.2. Purificação das α -galactosidases extracelulares do fungo *A. terreus*

Após o crescimento da cultura do fungo *A. terreus* em meio mineral líquido com farelo de trigo por 168 h a 28 °C, o meio foi filtrado e o sobrenadante, contendo as enzimas secretadas pelo fungo, foi ultrafiltrado e submetido ao processo de purificação. Durante todas as etapas de purificação a atividade da α -galactosidase foi determinada usando o substrato p-NP α Gal, como descrito no item 3.4.1 e a concentração de proteína determinada por

absorbância a 280nm e pelo método de Bradford, descrito no item 3.5. A medida da atividade específica ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) foi utilizada como parâmetro para avaliação da eficiência de cada método de purificação empregado. O resumo dos resultados obtidos em cada etapa de purificação das α -galactosidases de *Aspergillus terreus* pode ser observado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Resumo das etapas de purificação da α -galactosidase E1 produzida no filtrado da cultura de *Aspergillus terreus*.

Etapas	Ativ. Total (U)	Prot. Total (mg)	Ativ. Espec. ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Fator de Purificação	Rend. (%)
Extrato bruto	56,32	124,98	0,45	1,0	100
Sephacryl S-200					
*F1	10,27	2,49	4,12	9,15	18,24
F2	33,77	13,18	2,56	5,69	59,96
Q-Sepharose pH 4,5					
*Q1	7,19	0,83	8,46	18,80	12,76
Gel nativo					
*E1	3,95	0,12	32,92	73,15	7,01

1U = quantidade de enzima que produz 1 μmol de ρ -NP por min.

Tabela 3: Resumo das etapas de purificação da α -galactosidase E2 produzida no filtrado da cultura de *Aspergillus terreus*.

Etapas	Ativ. Total (U)	Prot. Total (mg)	Ativ. Espec. (U.mg ⁻¹)	Fator de Purificação	Rend. (%)
Extrato bruto	56,32	124,98	0,45	1,0	100
Sephacryl S-200					
F1	10,27	2,49	4,12	9,15	18,24
*F2	33,77	13,18	2,56	5,69	59,96
Phenyl-Sepharose					
S1	10,80	3,31	3,26	7,24	19,18
*S2	11,82	2,98	3,97	8,82	20,99
Q-Sepharose pH 5,5					
*B1	7,16	0,54	13,25	29,44	12,71
Coluna de Melibiose					
*E2	4,12	0,18	22,89	50,87	7,31

1U = quantidade de enzima que produz 1 μ mol de p-NP por min.

Para obtenção da α -galactosidase purificada E1, o sobrenadante da cultura do *Aspergillus terreus* concentrado foi submetido à cromatografia de gel filtração sendo obtidos dois pools protéicos com atividade de α -galactosidase, F1 (frações 48 a 60) e F2 (frações 78 a 104), como está mostrado na Figura 7. Nesta etapa de purificação houve um aumento na atividade específica de 9,15 vezes para F1 e 5,69 vezes para F2, com um rendimento de 18,24 e 59,96%, respectivamente.

A fração F1 foi recromatografada em coluna de troca iônica, Q-Sepharose, equilibrada com tampão acetato de sódio, pH 4,5, 50 mM, obtendo-se um pico de α -galactosidase Q1 (frações 50 a 60) (Figura 8). Esta etapa promoveu um acréscimo no valor da atividade específica. O fator de purificação foi de 18,80 vezes com um rendimento de 12,76% do total de α -galactosidase.

As fração enzimática Q1 foi concentrada por ultrafiltração, utilizando uma membrana com um limite de exclusão de 10 kDa, e submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes (gel

nativo). A utilização de um gel em condições não desnaturantes tem como uma das principais vantagens, o fato de permitir que a proteína mantenha a maioria das características físico-químicas normalmente detectadas em seu estado nativo, dentre as quais, a manutenção da estrutura tridimensional e a manutenção de sua atividade.

Desta forma, ao término da corrida eletroforética uma faixa longitudinal do gel foi recortada e incubada em uma solução tamponada (tampão acetato de sódio, pH 5, 100 mM) do substrato pNP α Gal (4 mg.mL⁻¹), tendo como objetivo, determinar as regiões dos géis que continham as banda protéica com atividade de α -galactosidase (Figura 9).

As bases químicas que garantiram o sucesso do emprego desta técnica para a identificação da enzima α -galactosidase no gel são facilmente compreensíveis, uma vez que um dos produtos da hidrólise do pNP α Gal por enzimas α -galactosidases, o p-NP, possui uma coloração amarela quando está em seu estado desprotonado. Estado este, que ocorre naturalmente, devido ao alto pH do gel de poliacrilamida (em torno de 8,3).

Após as revelações do gel nativo, a α -galactosidase, chamada então de α -galactosidase E1, foi extraída do gel como descrito no item 3.6.6.5. Ao final deste processo, a enzima pura α -galactosidase E1 apresentou um fator de purificação de 73,15 vezes com um rendimento de 7,01%.

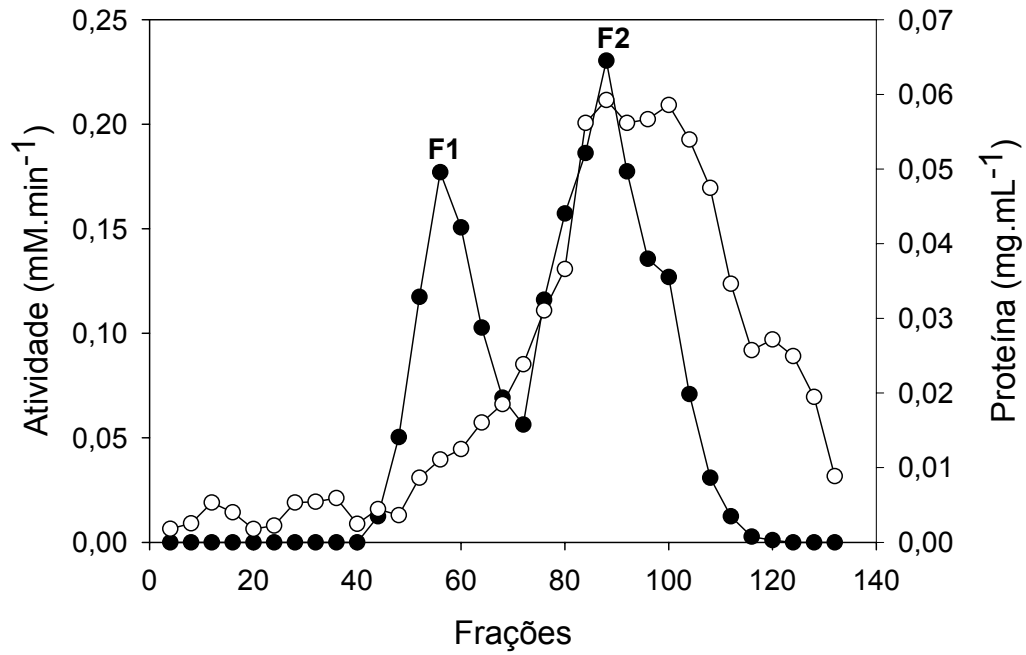


Figura 7: Perfil cromatográfico do extrato bruto concentrado contendo α -galactosidase de *Aspergillus terreus* em resina de Sephacryl S-200. Atividade de α -galactosidase (●), proteína total (○).

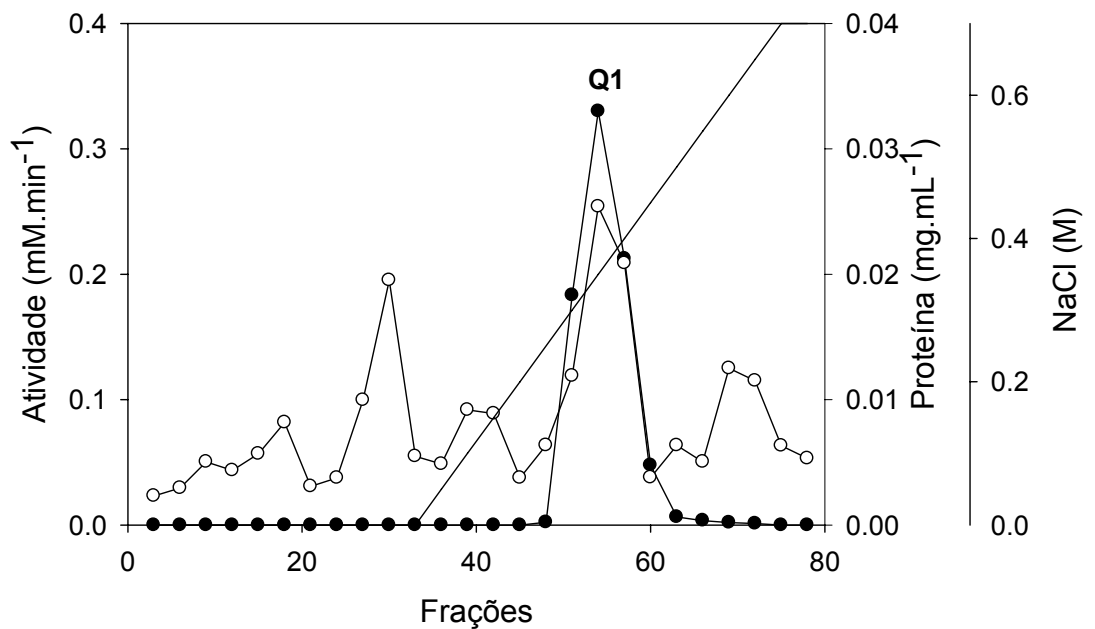


Figura 8: Perfil cromatográfico da fração F1 contendo a α -galactosidase de *Aspergillus terreus* em resina de Q-Sepharose. Atividade de α -galactosidase (●), proteína total (○) e gradiente crescente de NaCl (0 - 0,7 M) (-).

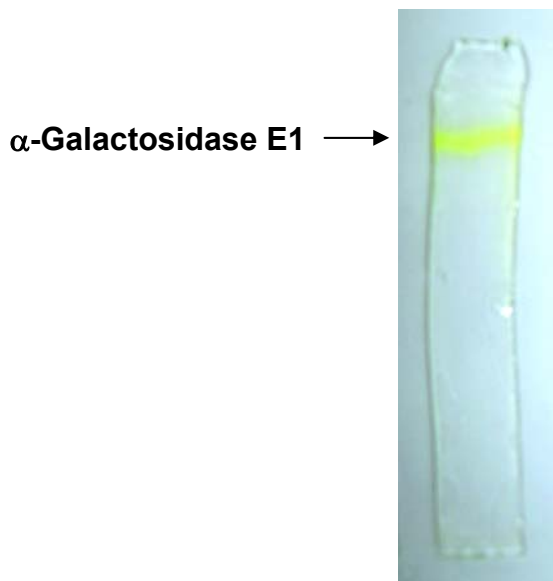


Figura 9: Resultado da revelação do gel nativo com pNP α Gal evidenciando a presença da atividade da α -galactosidase E1 de *Aspergillus terreus*.

Para obtenção da α -galactosidase parcialmente purificada E2, a fração F2 proveniente da cromatografia de gel filtração, foi submetida à cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl-Sepharose previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,5 com 1 M de sulfato de amônio. Foram obtidos dois picos protéicos com atividade de α -galactosidase, S1 (frações 70 a 82) e S2 (frações 104 a 124) (Figura 10). O pool protéico S2 foi recromatografado em coluna de troca iônica, Q-Sepharose, equilibrada com tampão acetato de sódio, pH 5,5, 50 mM. Foi obtido um pico protéico, B1 (frações 36 a 52), com atividade de α -galactosidase (Figura 11). Esta etapa promoveu um grande acréscimo na atividade específica com um fator de purificação de 29,44 vezes. Finalmente, o pool de proteína B1 foi submetido a uma cromatografia de afinidade, sendo aplicada em coluna de Melibiose e eluída com tampão adicionado de 4mM de pNP α Gal (Figura 12). Este último passo da purificação resultou em uma amostra enzimática parcialmente purificada, que foi chamada de α -galactosidase E2 (frações 36 a 50), com um fator de purificação de 50,87 vezes e um rendimento de 7,31%,

A possibilidade de um organismo expressar mais de uma enzima com

atividade α -galactosidase é um fato que pode ser facilmente observado na literatura. VERBANETS *et al.* (2001) fracionaram duas α -galactosidases de *Penicillium sp.* após cromatografia de troca iônica. ADEMARK *et al.* (2001) purificaram quatro diferentes formas de α -galactosidases de *Aspergillus niger* após quatro etapas de purificação. GROSSMANN & TERRA (2001), avaliando extratos enzimáticos obtidos a partir do intestino de larvas de *Tenebrio molitor*, detectaram que este inseto expressa três enzimas com atividade α -galactosidase no seu epitélio intestinal.

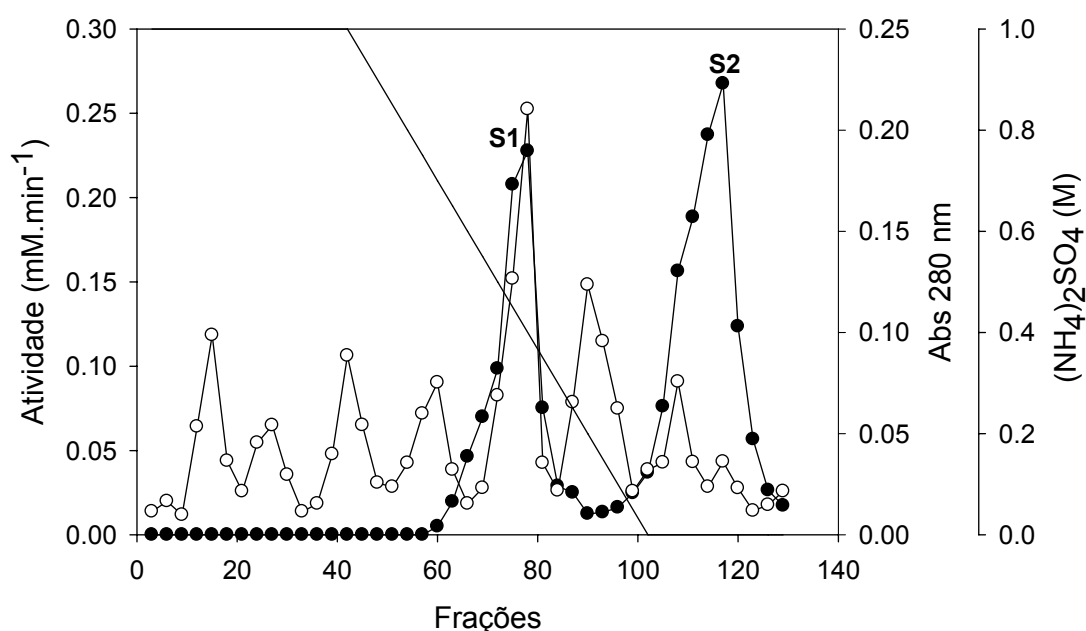


Figura 10: Perfil cromatográfico da fração F2 contendo atividade de α -galactosidase em resina de Phenyl Sepharose. Atividade de α -galactosidase (●), proteínas (○) e (-) gradiente decrescente de sulfato de amônio (1 – 0 M).

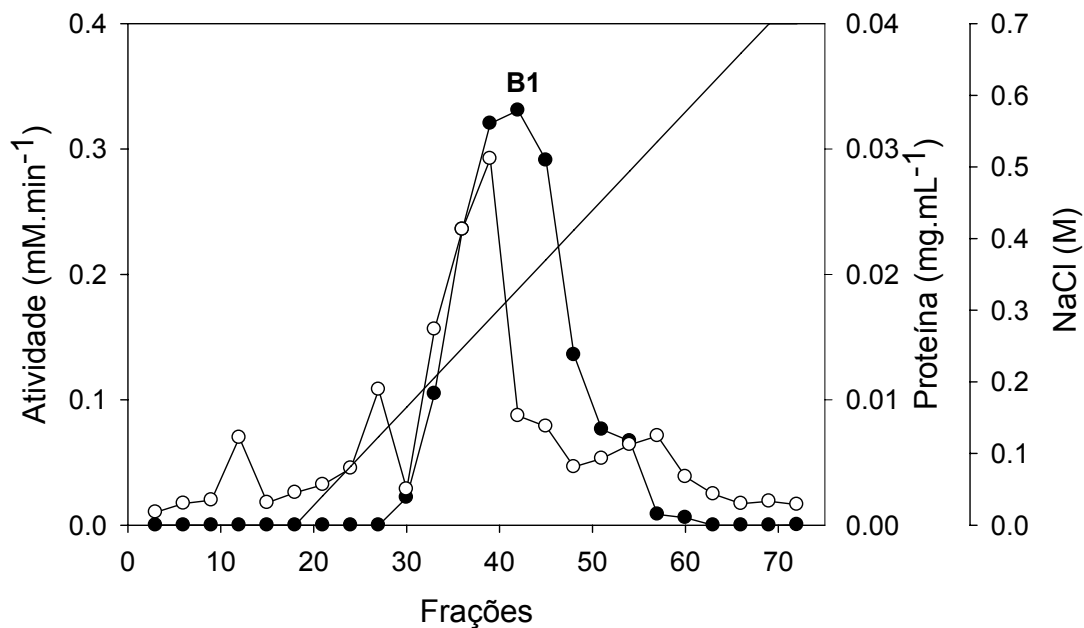


Figura 11: Perfil cromatográfico da fração S2 contendo a α -galactosidase de *Aspergillus terreus* em resina de Q-Sepharose. Atividade de α -galactosidase (●), proteína total (○) e gradiente crescente de NaCl (0 - 0,7 M) (-).

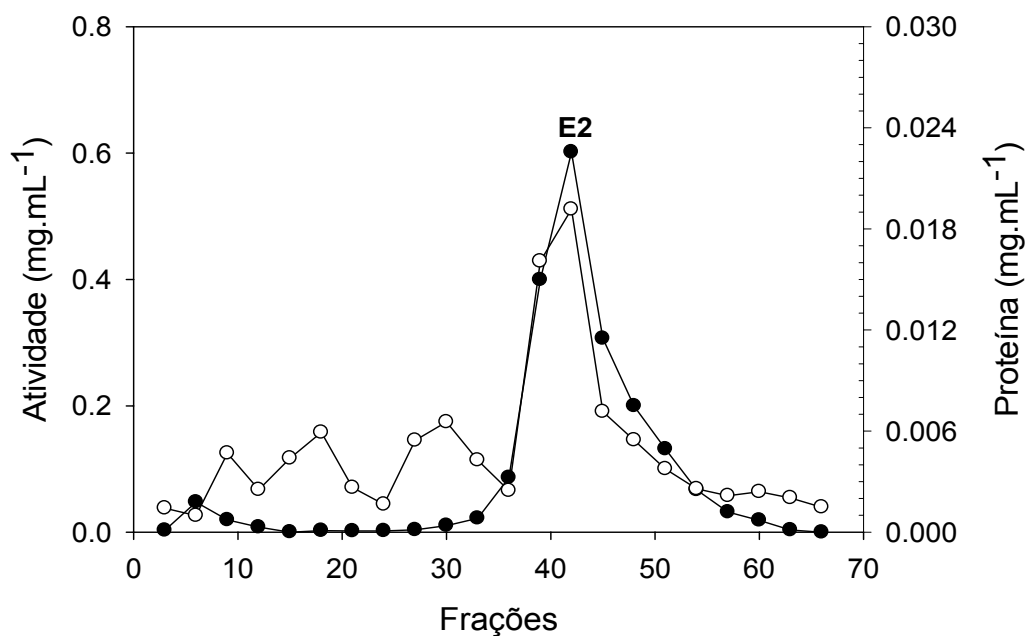


Figura 12: Perfil cromatográfico da fração B1 contendo a α -galactosidase de *Aspergillus terreus* em coluna de Melibiose. Atividade de α -galactosidase (●), proteína total (○). Após a fração 30, o tampão foi adicionado de 4mM de $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ para eluição da enzima.

KING *et al.* (2002), após cinco etapas de purificação, obtiveram uma α -galactosidase de *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* purificada 908 vezes, com um rendimento de 7%. KIM *et al.* (2002) purificaram uma α -galactosidase de *Oryzae sativa* 524 vezes, com uma recuperação de 52% da atividade enzimática.

Após precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose e cromatografia de gel filtração em coluna de Sephacryl S-200 a α -galactosidase extracelular de *Penicillium sp.* F63 CGMCC 1669 foi purificada e seu gene clonado posteriormente (MI *et al.*, 2007). REZESSY-SZABÓ *et al.* (2007) purificaram a α -galactosidase do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* CBS395.62/b após cinco passos de purificação obtendo um rendimento de 60% com um fator de purificação de 114 vezes.

A α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii* foi purificada 16,7 vezes com um rendimento de 58,3%, após cromatografias de gel filtração em Sephadex G-150 e troca iônica em DEAE-Sepharose (VIANA *et al.*, 2006). Também, após concentração por ultrafiltração, precipitação alcoólica e cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl Sepharose, a α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* foi purificada 389 vezes, com um rendimento de 44 % (GOTE *et al.*, 2006).

Purificações parciais também são realizadas em vários trabalhos na literatura. VIANA *et al.* (2005) purificaram parcialmente a α -galactosidase de soja, obtendo uma purificação de 26 vezes com um rendimento de 25%. α -Galactosidase de *Penicillium griseoroseum* também foi purificada parcialmente através da precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração em coluna de Sephacryl S-200 (FALKOSKI *et al.*, 2006).

4.3. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das α -galactosidases de *A. terreus*

Para a avaliação da purificação das α -galactosidases do fungo *Aspergillus terreus* a amostra enzimática, chamada de α -galactosidases E1 após ser extraída do gel nativo, foi concentrada por ultrafiltração e submetida à eletroforese, em gel de poliacrilamida 12 %, sob condições desnaturantes. A

massa molecular da enzima α -galactosidase E1 de *Aspergillus terreus* foi calculada a partir da regressão linear obtida correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares de proteínas padrão com a distância percorrida no gel SDS-PAGE (Figura 15A). A partir da equação de regressão obtida, estimou-se uma massa molecular aproximada de 72,3 kDa. O perfil de migração das proteínas presentes nessa amostra está apresentado na Figura 13.

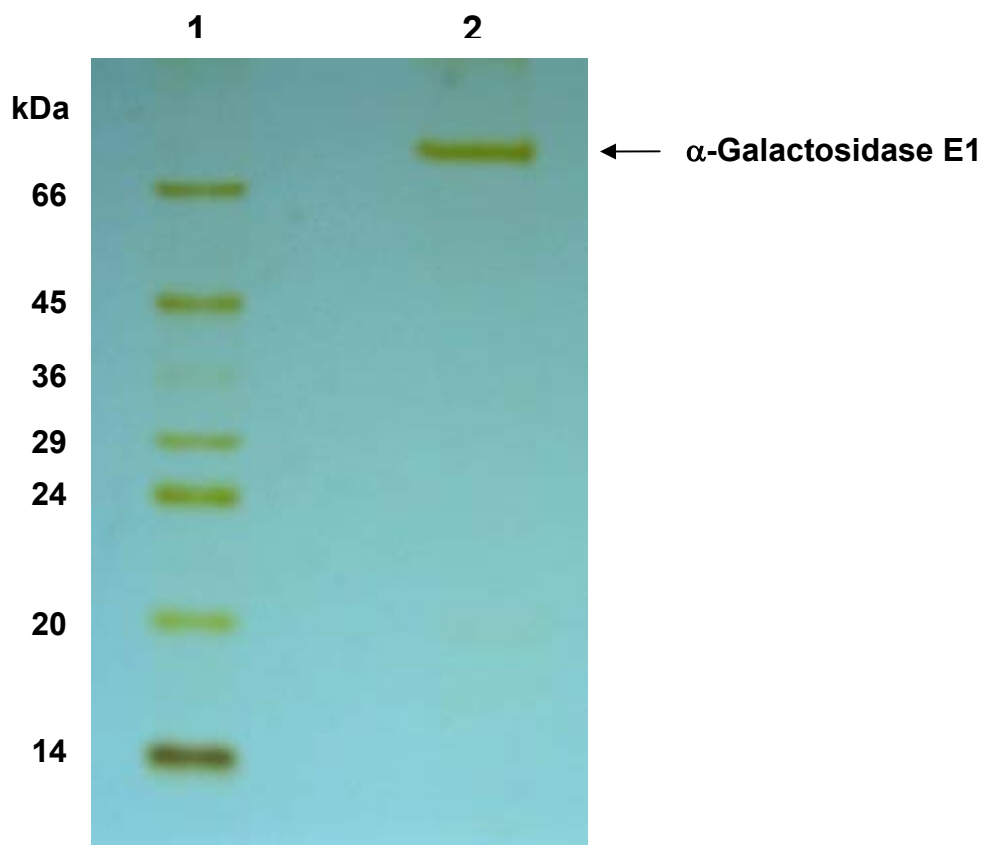


Figura 13: Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12 %), corado com prata, da α -galactosidase E1 fungo *Aspergillus terreus*. A linha 1 contém as bandas protéicas referentes aos marcadores de peso molecular. A linha 2 contém a banda referente a amostra de proteína que foi extraída do gel nativo.

Podemos observar claramente, uma única banda protéica na raia onde foi aplicada a amostra da enzima α -galactosidase E1 sendo desta forma, confirmado o alto grau de pureza desta proteína e a eficácia do protocolo de purificação utilizado.

A amostra enzimática, chamada de α -galactosidases E2, após o último passo da purificação em coluna de afinidade também foi submetida à

eletroforese, em gel de poliacrilamida 12 %, sob condições desnaturantes. Como as corridas eletroforéticas foram conduzidas separadamente para as duas enzimas, houve a necessidade da obtenção de duas equações lineares para estimar as massas moleculares (Figura 15B). A partir da equação de regressão obtida para esta corrida eletroforética, estimou-se uma massa molecular aproximada de 51,5 kDa. O perfil de migração das proteínas presentes nessa amostra está apresentado na Figura 14.

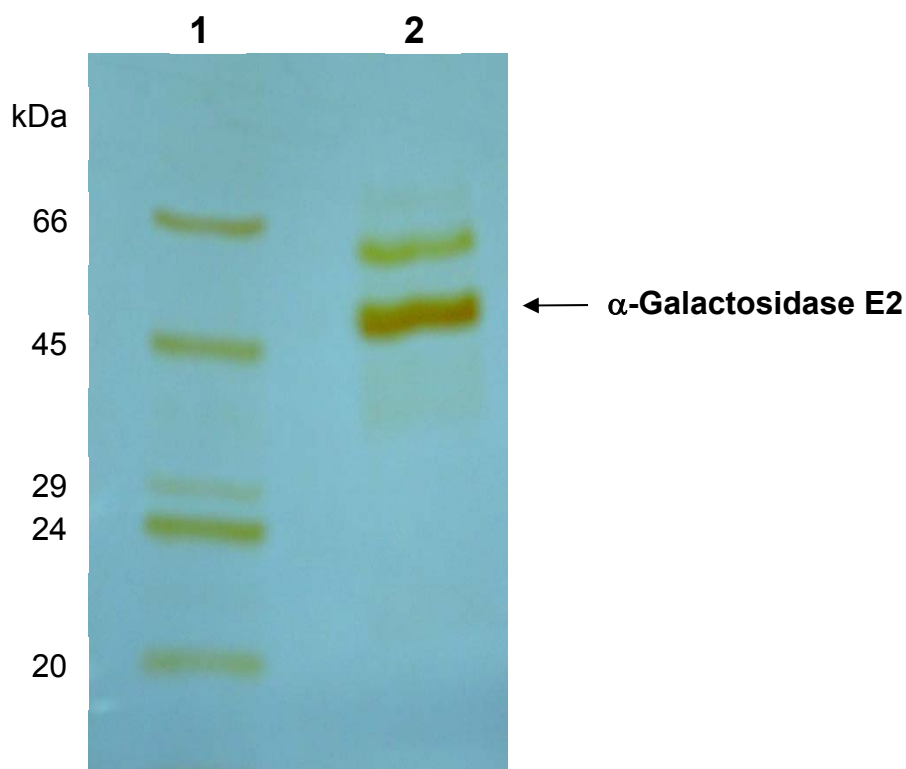


Figura 14: Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12 %), corado com prata, da amostra enzimática contendo a α -galactosidase E2 do fungo *Aspergillus terreus*. A linha 1 contém as bandas protéicas referentes aos marcadores de peso molecular. A linha 2 contém as bandas referentes a amostra de proteína resultante da cromatografia de afinidade.

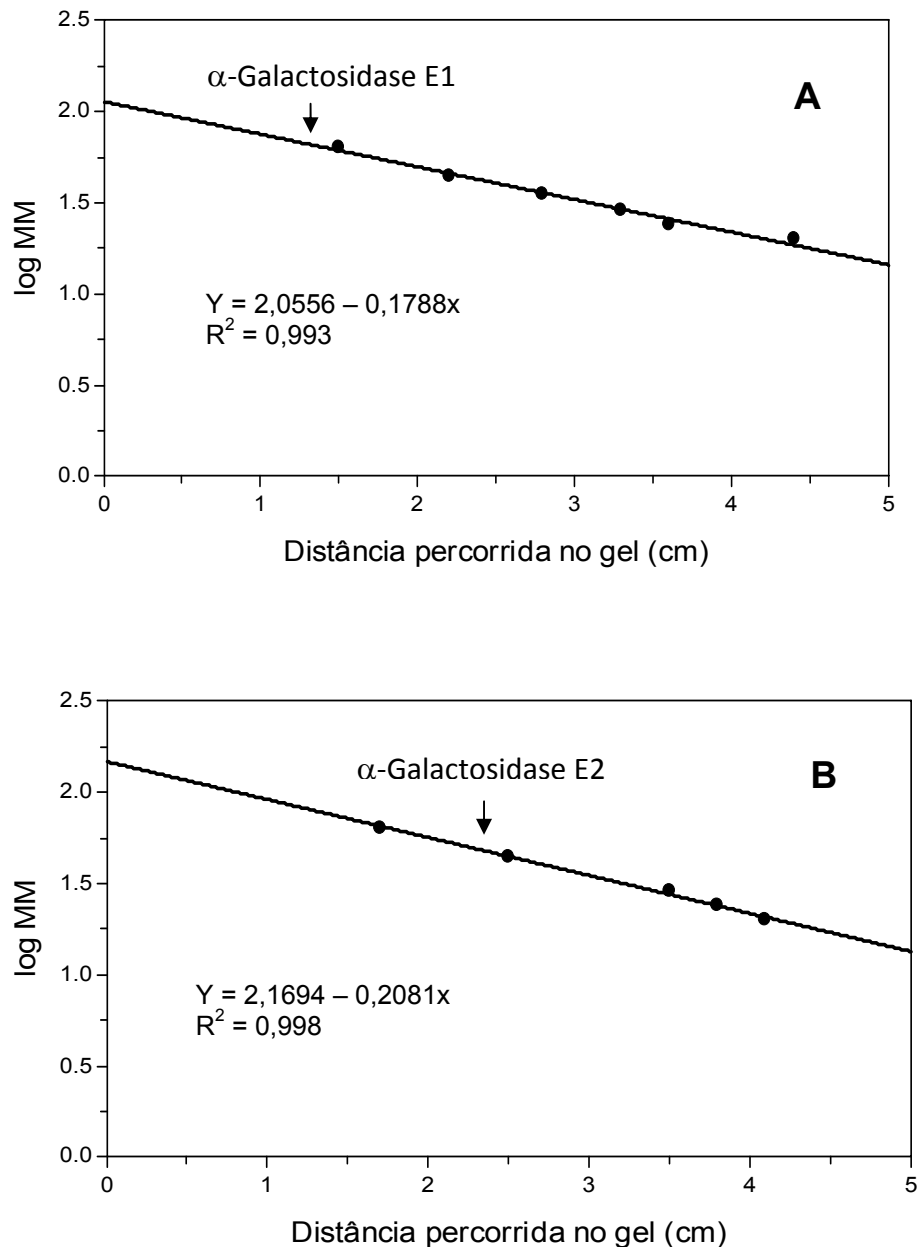


Figura 15: Determinação da massa molecular das enzimas α -galactosidases E1 (A) e E2 (B) de *Aspergillus terreus*. Marcadores de massa molecular: Albumina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (36 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), Inibidor de tripsina (20 kDa).

As massas moleculares das α -galactosidases E1 e E2 de *Aspergillus terreus* também foram estimadas por filtração em gel, utilizando uma coluna empacotada com a resina Sephacryl S-300 e S-200, respectivamente, como

descrito no item 3.7.3. As massas foram estimadas a partir da regressão linear, obtida correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares de proteínas padrão com a constante de eluição (K_{av}) das respectivas proteínas (Figuras 16 e 17). A constante K_{av} foi calculada pela equação:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Onde V_e = volume de eluição da proteína

V_o = volume vazio da coluna

V_t = volume total de resina

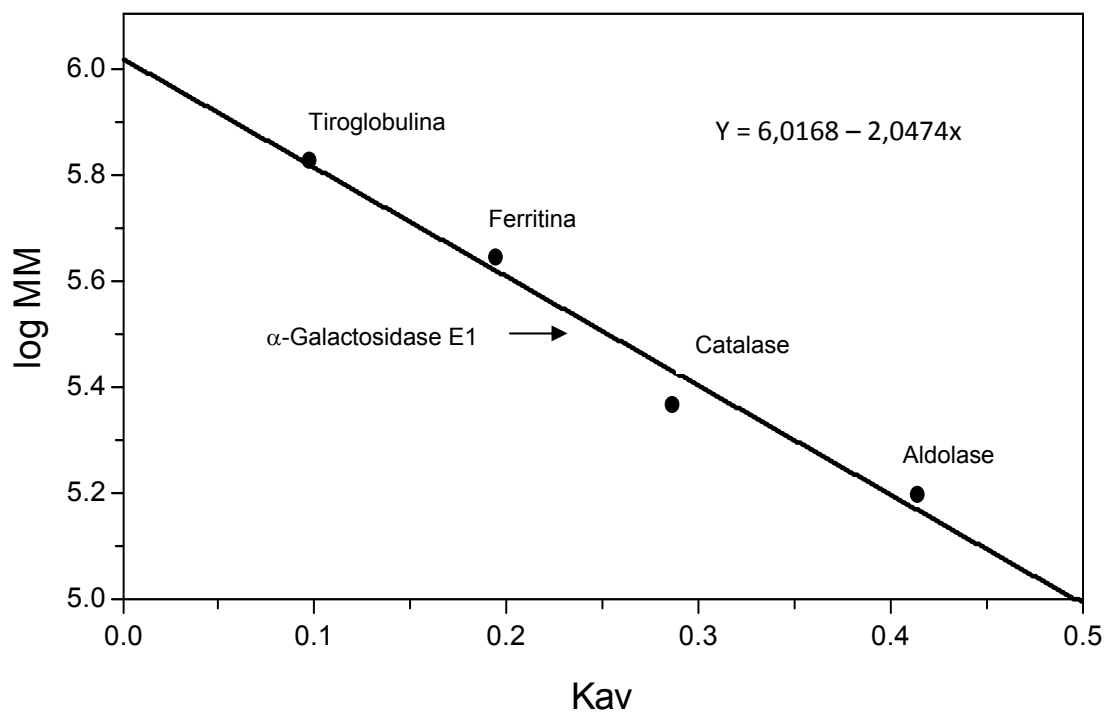


Figura 16: Determinação da massa molecular da enzima α -galactosidase E1 do fungo *Aspergillus terreus* por gel filtração em resina Sephacryl S-300. Os padrões de massa molecular utilizados (●) foram aldolase (158 kDa), catalase (232 kDa), ferritina (440 kDa) e tiroglobulina (669 kDa).

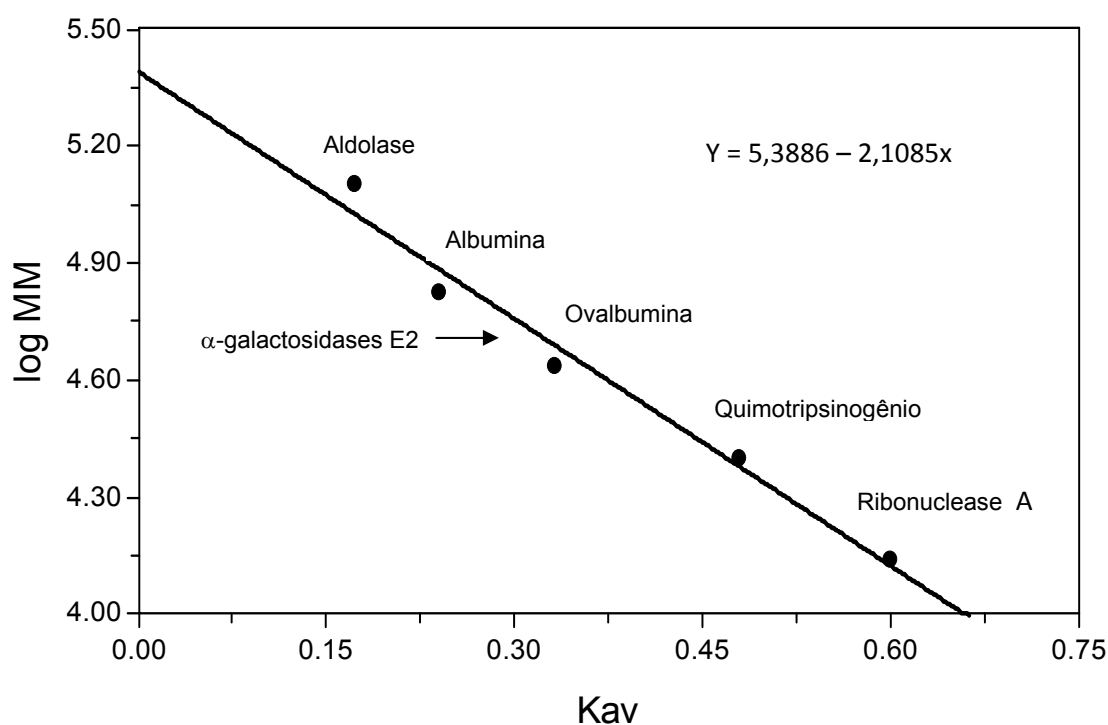


Figura 17: Determinação da massa molecular da enzima α -galactosidase E2 do fungo *Aspergillus terreus* por gel filtração em resina Sephacryl S-200. Os padrões de massa molecular utilizados (•) foram ribonuclease A (13,7 kDa), quimotripsinogênio (25 kDa), ovoalbumina (43 kDa), albumina (67 kDa) e aldolase (158 kDa).

Os resultados obtidos na filtração em gel em resina de Sephacryl S-200 nos permitiu estimar a massa molecular da α -galactosidase E2 de 51,7 kDa, valor muito próximo ao encontrado no gel SDS-PAGE. Desta forma podemos sugerir que esta enzima apresenta na sua forma nativa somente uma subunidade. Porém utilizando esta resina de gel filtração, não foi possível estimar a massa molecular da α -galactosidases E1, pois esta eluiu no volume vazio da coluna (dados não mostrados). Com isso, foi utilizado para a determinação da massa molecular da α -galactosidase E1 por gel filtração uma coluna de Sephacryl S-300, como descrito no item 3.7.3. Os resultados obtidos na filtração em gel nos permitiu estimar que a enzima α -galactosidase E1 possui uma massa molecular de 350 kDa. Ao dividirmos este valor por 72,3

(massa molecular estimada por SDS-PAGE) encontramos um valor próximo a 5, o que sugere que esta enzima poderá ser um pentâmero, formado por subunidades idênticas, quando se encontra em solução e no seu estado nativo.

Os dados obtidos para a α -galactosidase E1 de *Aspergillus terreus* também estão de acordo com aqueles obtidos por ADEMARK *et al.* (2001), que purificaram e caracterizaram quatro enzimas α -galactosidases extracelulares (α -gal I, α -gal II, α -gal III, α -gal IV) produzidas pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Neste trabalho, os autores concluíram por análise em gel filtração, que a α -gal I nativa do fungo *A. niger* é um tetrâmero de 350 kDa, sendo que suas subunidades tiveram uma massa molecular estimada em 94 kDa. A análise das demais α -galactosidases produzidas por *A. niger*, sugeriu que, quando em estado nativo, estas enzimas são dímeros com massa molecular aproximada de 117 kDa sendo que cada subunidade possui uma massa molecular aproximada de 64 kDa.

KING *et al.* (2002) estimaram a massa molecular da α -galactosidase da bactéria *Thermoanaerobacterium polysacchrolyticum* por gel filtração, encontrando uma proteína com massa molecular igual a 176 kDa em seu estado nativo. Análises da mesma proteína por SDS-PAGE sugeriram que esta enzima é um dímero, formado por duas subunidades idênticas de aproximadamente 80 kDa. Também, GOTE *et al.* (2006), trabalhando com α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM-5146 encontrou uma massa molecular determinada por SDS-PAGE e gel filtração de 79,9 e 165,9 kDa, respectivamente, sugerindo ser uma enzima de natureza dimérica. Foi determinado também a massa molecular da α -galactosidase de *Penicillium* sp. F63 CGMCC 1669 e o valor obtido pela determinação por SDS-PAGE foi de 82 kDa e por gel nativo de 330 kDa. Isso sugere que esta enzima é um tetrâmero de subunidades idênticas (MI *et al.*, 2007).

Assim como para a α -galactosidase E2 de *Aspergillus terreus*, outras enzimas com apenas uma subunidade foram estudadas na literatura. α -Galactosidases de *Penicillium purpuragenum*, *Aspergillus fumigatus* e *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749 apresentaram valores de massas moleculares próximos ao da α -galactosidase E2 de *Aspergillus terreus*, sendo estes 67, 54, e 57, respectivamente (SHIBUYA *et al.*, 1995, PUCHART *et al.*,

2000 e DE REZENDE *et al.*, 2005). Também, VIANA *et al.* (2006), trabalharam com a α -galactosidase da levedura *Debaryomyces hansenii* e determinou uma massa molecular de 60kDa. Massa molecular um pouco mais alta foi determinada para α -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b, sendo esta uma proteína monomérica de 93 kDa (REZESSY-SZABÓ *et al.*, 2007).

4.4. Caracterização das α -galactosidases E1 e E2 de *Aspergillus terreus*

4.4.1. Efeito do pH

A atividade das α -galactosidases E1 e E2 foram testadas na faixa de pH compreendida entre 3,0 a 7,6, na temperatura de 40 °C, utilizando o substrato sintético pNP α Gal. A maior atividade encontrada para a α -galactosidase E1 e E2 foi em pH 5,0 e 5,6, respectivamente (Figura 18). Quando a α -galactosidase E1 é incubada por 6 h a 40 °C, ela mantém mais de 90% da atividade inicial no intervalo de pH de 4-7. Já a α -galactosidase E2 manteve mais de 90% da atividade inicial apenas na faixa de pH de 5-6, sendo portanto menos estável a variações de pH (Figura 19).

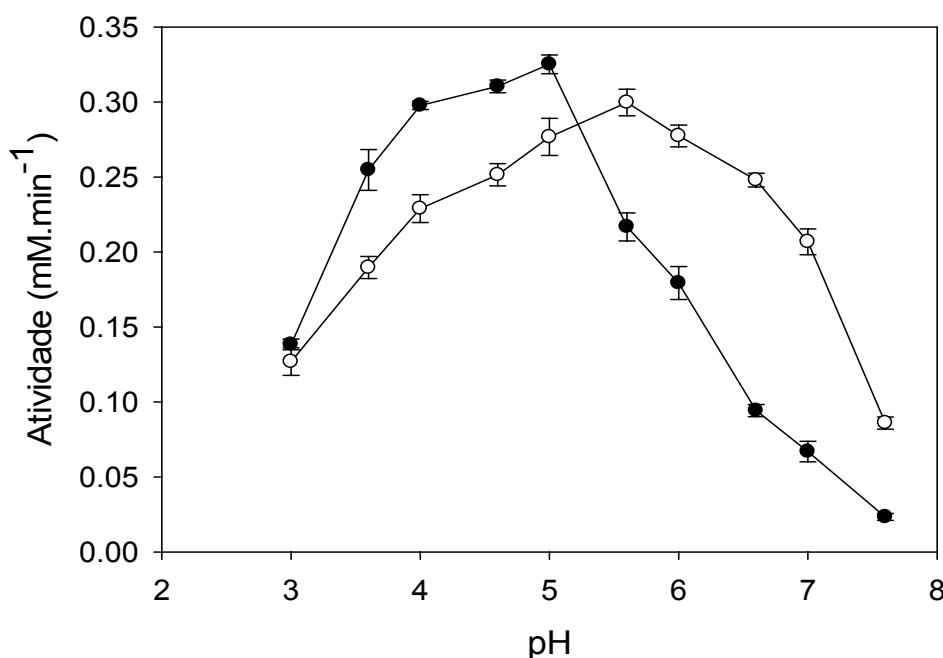


Figura 18: Efeito do pH sobre a atividade da α -galactosidase E1 (●) e E2 (○) de *A. terreus*.

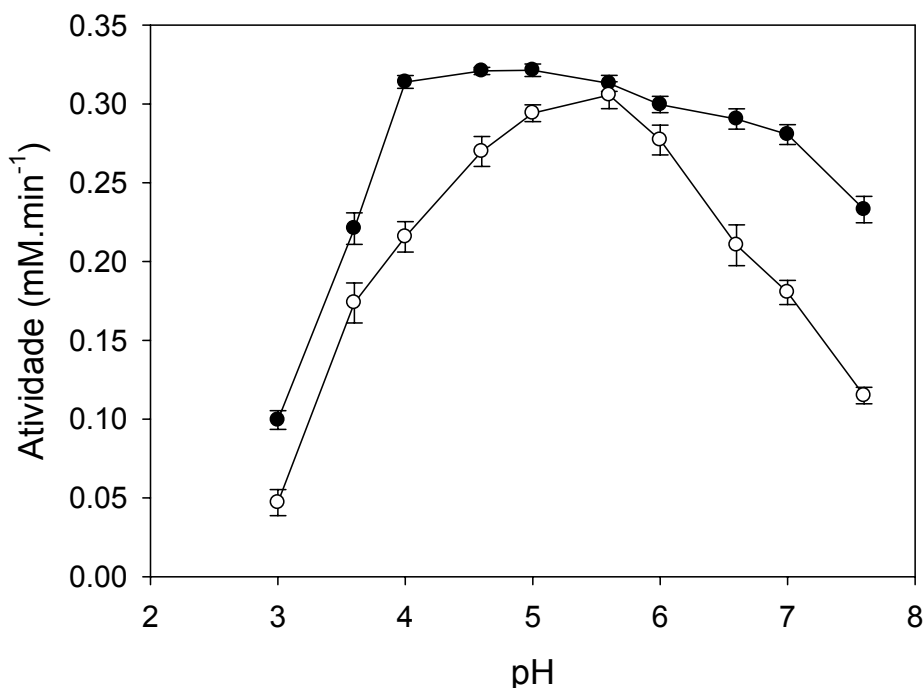


Figura 19: Efeito do pH sobre a estabilidade da α -galactosidase E1 (●) e E2 (○) de *A. terreus* quando incubada em diferentes valores de pH por 6 h a 40°C

Valores próximos aos encontrados para as α -galactosidases E1 e E2 de *Aspergillus terreus* foram obtidos para a α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi*, que apresentou maior atividade quando incubada em pH 5,8, sendo que esta enzima mantém 90% de sua atividade em um faixa de pH compreendida entre 4 e 6,3 (THIPPESWAMY & MULIMANI, 2001). PRASHANTH & MULIMANI (2005) determinaram que a α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* apresenta máxima taxa de hidrólise quando incubada em pH 4,8. Semelhantemente, a α -galactosidase de *Aspergillus fumigatus* apresentou maior atividade em pH 4,5 (DE REZENDE *et al.*, 2005).

Resultados também semelhantes aos das α -galactosidase E1 e E2 de *Aspergillus terreus* foram encontrados para as α -galactosidases dos fungos *Penicillium griseoroseum* e *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b que apresentaram atividade máxima em pH 5,0 e 5,5, respectivamente (FALKOSKI *et al.*, 2006 e REZESSY-SZABÓ *et al.*, 2007). GUIMARÃES *et al.* (2001) determinaram um pH ótimo na faixa de 5,0-5,5 para α -galactosidase de soja.

Já para α -galactosidase de sementes de soja variedade CAC-1, o pH de maior atividade foi de 6,0 (VIANA *et al.*, 2005). VIANA *et al.* (2006), estudando a α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii*, determinaram que esta enzima tem máxima atividade quando incubada em pH 5, entretanto, esta enzima foi totalmente inativa em pHs superiores a 7. *Aspergillus niger* produz três enzimas α -galactosidases (α -gal II, α -gal III e α -gal IV) que mantém mais de 70% de sua atividade máxima, após 17 horas de incubação, em uma faixa de pH entre 2 e 4,5 (ADEMARK *et al.*, 2001).

Diferentemente do encontrado com o fungo *A. terreus*, as α -galactosidases de bactérias apresentam normalmente maior atividade e estabilidade em pH mais alcalino (ULEZLO E ZAPROMETOVA, 1982). GOTE *et al.* (2006) determinaram pH ótimo de 6,5-7,0 para *Bacillus stearothermophilus* NCIM-5146. A enzima perde toda atividade em pH abaixo de 5,5 e quando a enzima foi pré-incubada por 12 horas na temperatura ambiente em diferentes valores de pH, foi observado que ela era completamente estável nos pH 6,0-9,0. Valor de pH ótimo na faixa alcalina também foi encontrado para α -galactosidase de *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*, com um pH ótimo igual a 8,0 (KING *et al.*, 2002).

Pode-se concluir que o pH influencia a velocidade de uma reação enzimática, visto que os sítios ativos das enzimas podem ser compostos por grupos ionizáveis que devem se encontrar numa forma iônica adequada para que mantenha a conformação do sítio ativo, liguem-se aos substratos, ou catalisem a reação. Além disso, os próprios substratos podem conter grupos ionizáveis e somente uma forma iônica deste substrato pode se ligar à enzima ou sofrer catálise. Dessa forma, a curva de pH não dá indicações das razões pelas quais as velocidades declinam acima e abaixo do pH ótimo. O declínio poderia resultar da constituição de uma forma iônica não adequada do substrato ou da enzima (ou de ambos), ou da inativação da enzima, ou ainda da combinação destes efeitos. Já a estabilidade de uma enzima ao pH depende de muitos fatores como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de íons metálicos contaminantes, concentração de substratos ou cofatores da enzima e da concentração da enzima (SEGEL, 1979).

Portanto, o declínio da atividade das α -galactosidases E1 e E2 de *A. terreus* em algumas faixas de pH provavelmente pode ser devido a uma constituição iônica não adequada da enzima nessas condições.

4.4.2. Efeito da temperatura sobre a atividade das α -galactosidases do fungo *A. terreus*

As enzimas α -galactosidases E1 e E2 de *A. terreus* foram ensaiadas nas faixas de temperatura de 30 a 70 e 30 a 65 °C, respectivamente, ambas em pH 5,0, utilizando o substrato sintético ρ NP α Gal (Figura,20). Foram observadas maiores atividades entre 50 e 60 °C para a α -galactosidase E1 e entre 45 e 55 °C para a α -galactosidase E2, sendo que a melhor temperatura para atividade das duas enzimas foi de 60 e 50°C, respectivamente. Na temperatura de 65 °C foi observado um decréscimo acentuado na atividade da α -galactosidase E1, sendo nula a 70 °C. Já para a α -galactosidase E2 houve um decréscimo gradual nas temperaturas de 55 e 60°C, sendo a atividade nula a 65 °C.

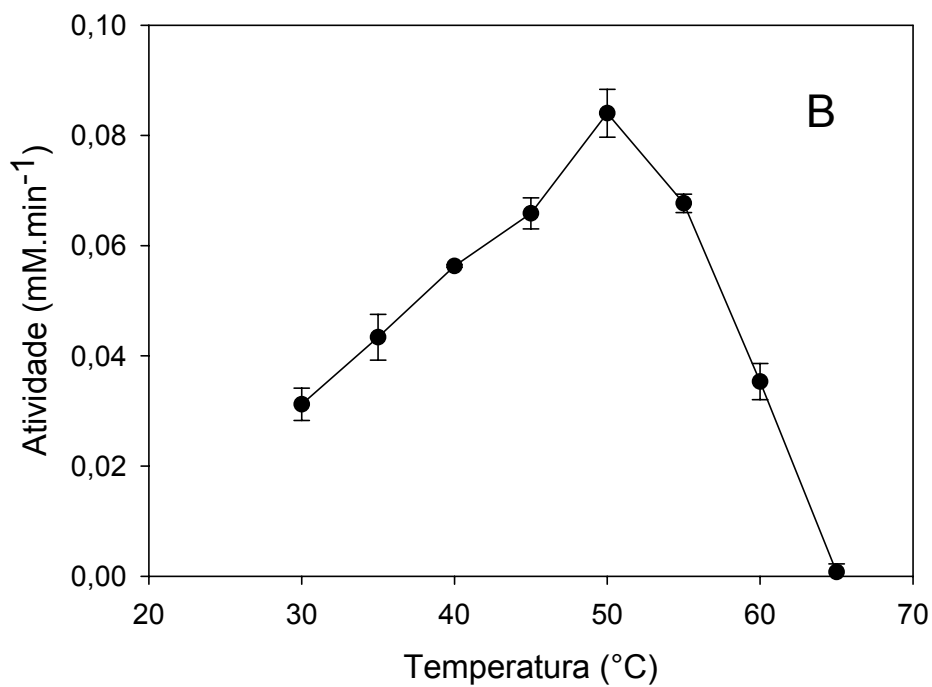
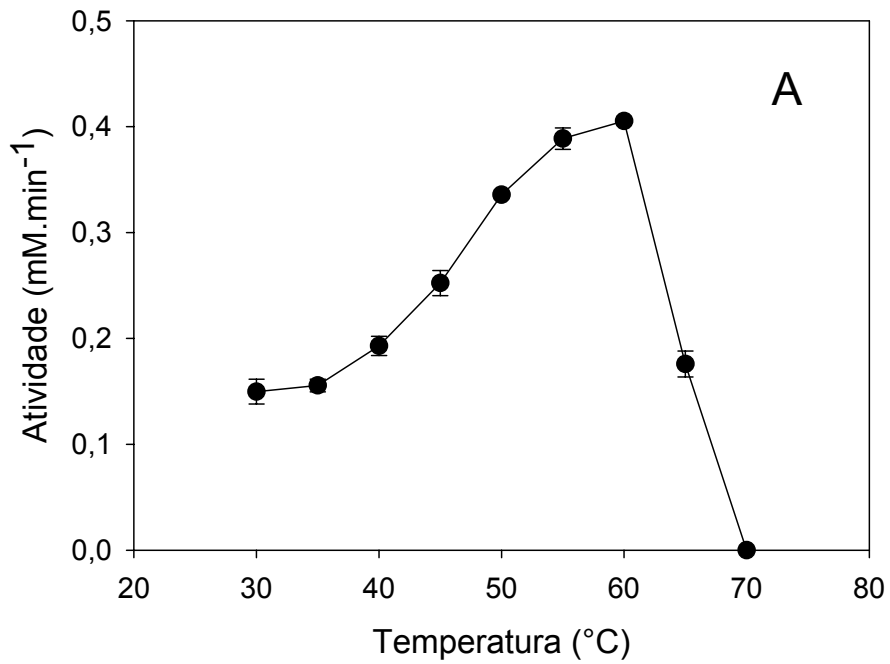


Figura 20: Efeito da temperatura sobre a atividade das α -galactosidases E1 (A) e E2 (B) do fungo *Aspergillus terreus*.

Para os ensaios de termoestabilidade, a α -galactosidase E1 foi pré-incubada nas temperaturas de 55, 60 e 65 °C e a α -galactosidases E2 a 45, 50 e 55 °C, por vários tempos (Figuras 21 e 22). A enzima α -galactosidase E1

manteve 90% de sua atividade inicial quando pré-incubada por 12 horas a 55 °C e 60% quando pré-incubada por 12 horas a 60 °C. Já a α -galactosidase E2 manteve 85% de sua atividade quando pré-incubada por 12 horas a 45 °C, mas na temperatura de 55°C manteve apenas 5 % da sua atividade quando pré-incubada por 12 horas. Isso nos mostra que a α -galactosidase E1 possui maior estabilidade térmica em relação à E2.

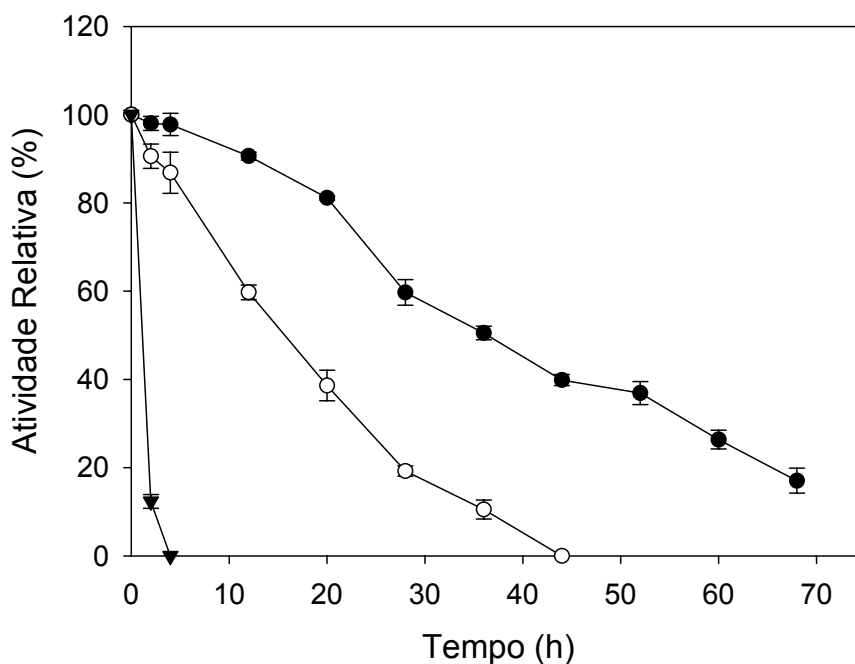


Figura 21: Efeito da temperatura na estabilidade da α -galactosidase E1 de *Aspergillus terreus*. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 55 (●), 60 (○) e 65 °C (▼). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100%.

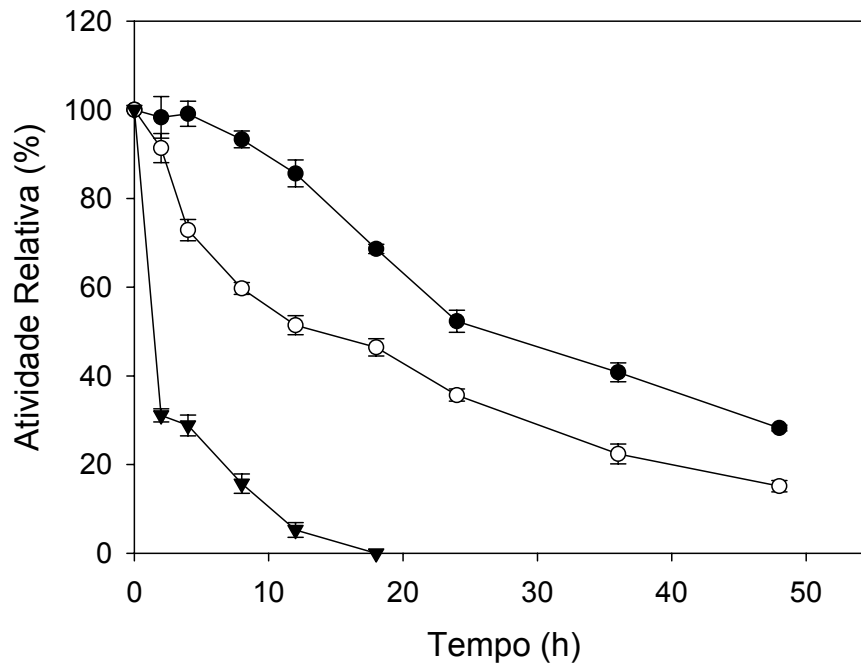


Figura 22: Efeito da temperatura na estabilidade da α -galactosidase E2 de *Aspergillus terreus*. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 45 (●), 50 (○) e 55 °C (▼). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100%.

Os valores de meia-vida das α -galactosidases do fungo *A.terreus* foram obtidos por meio de um ajuste dos dados obtidos nos experimentos de termoestabilidade a uma equação utilizando o programa Curve Expert 1.3, como descrito no item 3.12.3. Os gráficos e os coeficientes obtidos em cada regressão são mostrados nas Figuras 23 e 24.

A meia vida da α -galactosidase E1 a 55, 60 e 65 °C foi 35,9, 14,6 e 0,4 h, respectivamente (Figura 23). A α -galactosidase E2 apresentou uma meia vida a 45, 50 e 55 °C de 30,6, 12,3 e 1,5 h, respectivamente (Figura 24).

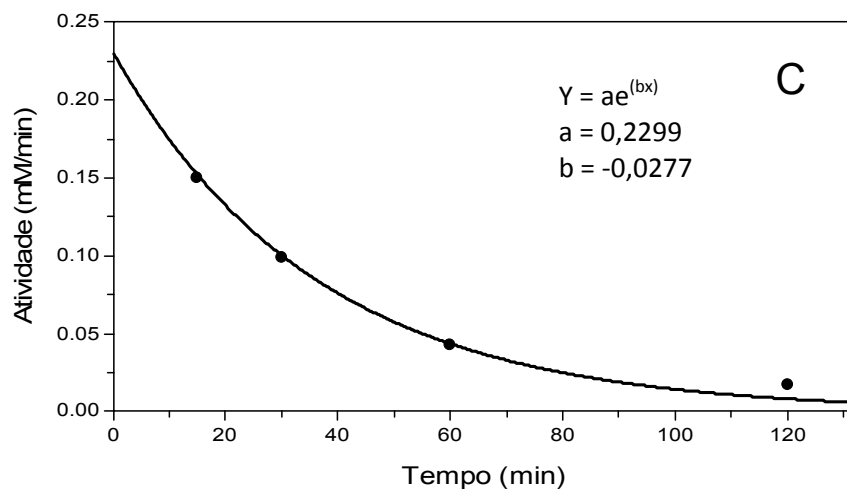
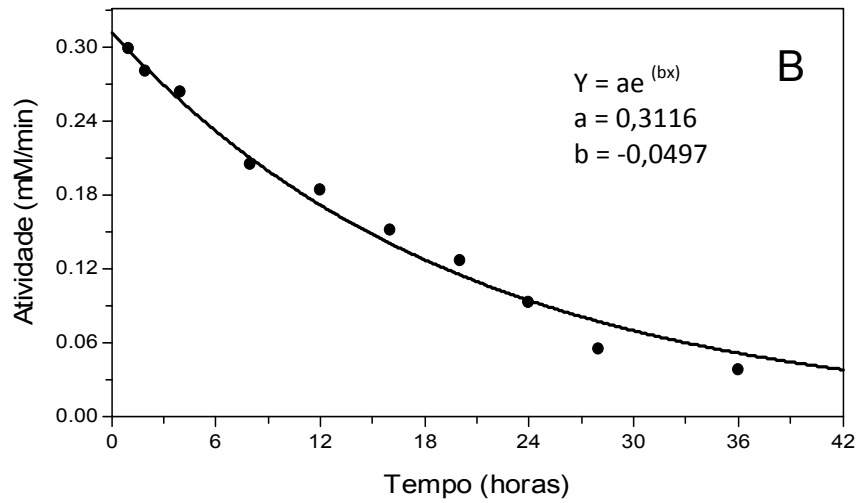
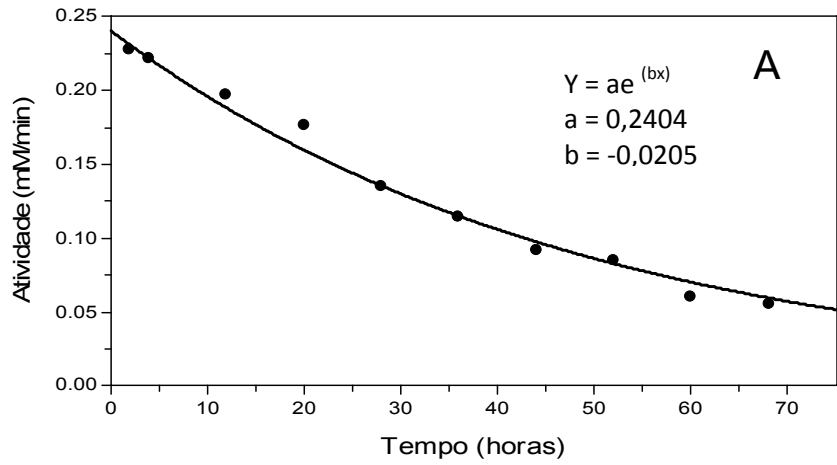


Figura 23: Estimativa da meia-vida da α -galactosidase E1 do fungo *Aspergillus terreus* a 55 (A), 60 (B) e 65°C (C).

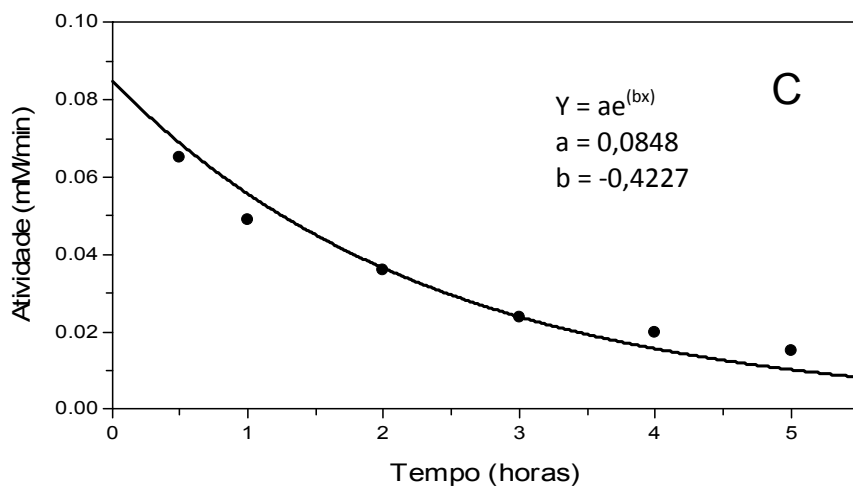
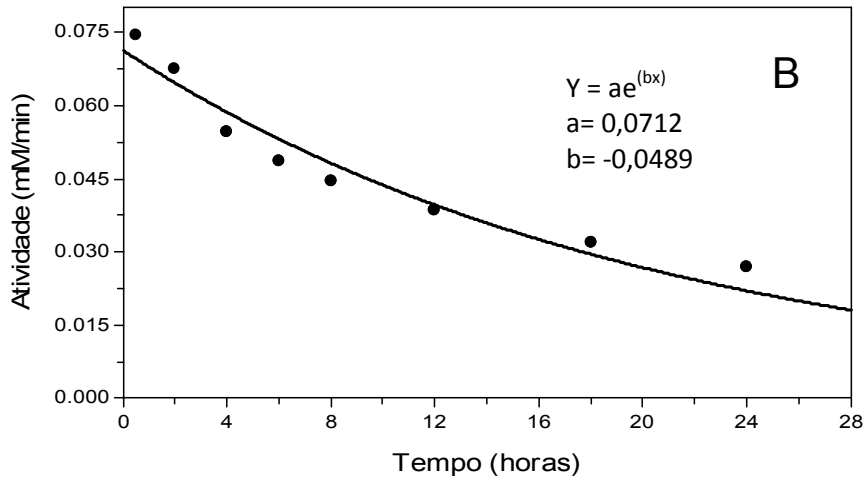
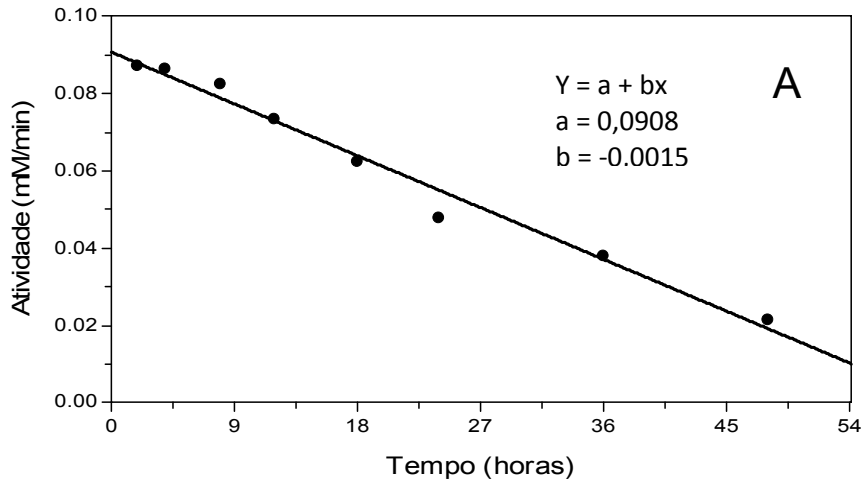


Figura 24: Estimativa da meia-vida da α -galactosidase E2 do fungo *Aspergillus terreus* a 45 (A), 50 (B) e 55 °C (C).

α -Galactosidases de diferentes variedades de soja foram estudadas por VIANA *et al.* (2005) e GUIMARÃES *et al.* (2001), sendo em ambos os trabalhos determinado que estas enzimas exibem máxima atividade quando ensaiada em uma faixa de temperatura entre 45 e 50 °C. PRASHANTH & MULIMANI (2005) determinaram que a α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* exerce sua máxima capacidade hidrolítica a 50 °C. Esta enzima também exibiu acima de 80% de sua atividade máxima quando ensaiada em uma faixa de temperatura compreendida entre 30 e 60 °C. O fungo *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b produz uma α -galactosidase que tem máxima atividade quando incubada a 65 °C, sendo ainda observado que esta enzima mantém cerca de 80% da sua atividade máxima nos ensaios realizados a 80 °C (REZESSY-SZABÓ *et al.*, 2007). GOTE *et al.* (2006) purificaram uma α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* cuja temperatura ótima para hidrólise do substrato pNP α Gal foi de 65 °C. Os autores também determinaram que esta enzima manteve 80 e 90% de sua atividade máxima quando ensaiada a 60 e 70 °C, respectivamente.

As quatro formas da enzima α -galactosidase de *Aspergillus niger* ATCC 46890, mantiveram 80% da atividade original após 21 h de pré-incubação a 50 °C, e toda atividade foi perdida após 21 h a 60°C (ADEMARK *et al.*, 2001). VIANA *et al.* (2006) verificaram que a enzima α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* reteve 100 e 20% de sua atividade inicial após 24 h de incubação a 40 e 50 °C respectivamente. Não foi detectada perda de atividade para a enzima α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* após 60 h de pré-incubação a 50 °C. A mesma enzima ainda exibiu 50 e 30% de atividade residual após 60 h de pré-incubação a 65 e 70 °C respectivamente (GOTE *et al.*, 2006). A α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi* manteve 90%, 44%, e 6% da atividade original após 12, 24 e 72 h de incubação a 55 °C, respectivamente (TIPPESWAMY & MULIMANI, 2002). DE REZENDE *et al.* (2005), em estudo com uma α -galactosidase de *Aspergillus fumigatus* observou que a enzima manteve 80% da atividade inicial após ser pré-incubada por 90 min a temperatura de 50 °C. A α -galactosidase de *Ganoderma lucidum* foi altamente estável a 70 °C e manteve 30 % da atividade original quando pré-incubada por 30 min a 80 °C (SRIPUAN *et al.*, 2003). A α -galactosidase de *Thermomyces*

lanuginosus foi estável por 24 h a 55 °C (REZESSY-SZABÓ *et al.*, 2007). Já α -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* quando incubada por 30 min a 50 °C perdeu 90% da atividade inicial (FALKOSKI *et al.*, 2006).

Comparando-se enzimas α -galactosidases de outras fontes, podemos observar que a α -galactosidase extraída do intestino do inseto *Spodoptera frugiperda* perde 60% de sua atividade após 3 h de incubação a 50 °C (GROSSMANN & TERRA, 2001). VIANA *et al.* (2005) determinaram que α -galactosidase de *Glycine max* reteve 35 e 75% de sua atividade máxima após 3 h de incubação a 45 e 40 °C respectivamente. Também OLIVEIRA (2002), descreveu uma α -galactosidases de *Platymiscium pubescens* que manteve 40% de sua atividade máxima após 3 h de incubação a 50 °C.

Estudos com α -galactosidase do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* realizados por PUCHART *et al.* (2000) mostraram que a meia-vida a 65 °C da enzima foi de 180 min. GUIMARÃES *et al.* (2001) descreveram que as α -galactosidases P1 e P2, extraídas de semente de soja germinadas (*Glycine max*), apresentaram uma meia vida de 16 e 11 min respectivamente quando incubadas a 50 °C. GOTE *et al.* (2004) estudaram uma α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* com meia-vida de 80 min a 70 °C. A meia-vida da α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii* a 50, 55, 60, 65 e 70 °C foi de 821, 647, 373, 180, e 34 min, respectivamente (VIANA *et al.*, 2006).

Comparando os valores de estabilidade térmica encontrados na literatura com os valores encontrados das α -galactosidases de *A. terreus*, observa-se que estas enzimas apresentaram uma boa estabilidade térmica, principalmente a α -galactosidase E1. Isso é um fator importante para possíveis aplicações industriais destas enzimas.

4.4.3. Parâmetros cinéticos

O efeito da concentração dos substratos ρ NP α Gal, melibiose, rafinose e estaquiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase E1 de *A. terreus*, foi determinado pela curva de Michaelis Mentem e confirmados pelo gráfico dos Duplos Recíprocos. Como foi verificada a presença da enzima invertase contaminando a amostra da α -galactosidase E2, para esta enzima foi

determinado somente o K_{Mapp} para os substratos $\rho NP\alpha Gal$ e melibiose.

Os valores das constantes cinéticas K_M e K_{Mapp} e das velocidades máximas (V_{max}) para as duas enzimas com diferentes substratos estão representados na Tabela 4.

Tabela 4: – Valores de K_M , K_{Mapp} e V_{max} obtidos para as enzimas α -galactosidases E1 e E2 de *A. terreus*, determinados pela curva de Michaelis-Menten para os substratos $\rho NP\alpha Gal$, melibiose, rafinose e estaquiose.

Substrato	α -galactosidase E1		α -galactosidase E2	
	K_M (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mM.min ⁻¹)	K_{Mapp} (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mM.min ⁻¹)
$\rho NP\alpha Gal$	0,66	0,14	0,20	0,07
Melibiose	1,92	0,07	20,14	0,01
Rafinose	27,93	0,26	---	---
Estaquiose	10,94	0,26	---	---

Segundo SEGEL (1979), a constante cinética K_M indica a “adequacidade” relativa de diferentes substratos para uma determinada enzima. Ou seja, o substrato que apresenta um menor valor de K_M para uma enzima possui uma maior afinidade aparente para esta enzima. Considerando este aspecto, tanto a α -galactosidase E1 como a E2 apresentam maior afinidade pelo substrato sintético $\rho NP\alpha Gal$ comparado aos outros substratos, sendo que a α -galactosidase E1 apresentou menor afinidade para o $\rho NP\alpha Gal$ em relação à α -galactosidase E2 com valores de K_M e K_{Mapp} encontrados de 0,66 e 0,20, respectivamente. Ao contrário disso, para o substrato melibiose a α -galactosidase E1 apresentou uma afinidade muito maior quando comparado à α -galactosidase E2. Analisando o efeito da concentração dos substratos rafinose e estaquiose sobre a α -galactosidase E1 pode ser observado que esta enzima tem uma maior afinidade pela estaquiose quando comparado à rafinose, já que os valores de K_M para esses dois substratos foram de 10,94 e 27,93, respectivamente.

Todos os parâmetros cinéticos apresentados neste trabalho foram obtidos por ajuste da equação de Michaelis-Menten ($V = (V_{max} \cdot [S]) \cdot (K_m + [S])^{-1}$)

a um conjunto de dados que relaciona Velocidade de hidrólise vs Concentração do substrato, utilizando o programa Curve Expert 1.3. Os gráficos de Michaelis-Menten para as duas enzimas com diferentes substratos estão mostrados nas Figuras 25, 26, 27, 28, 29 e 30.

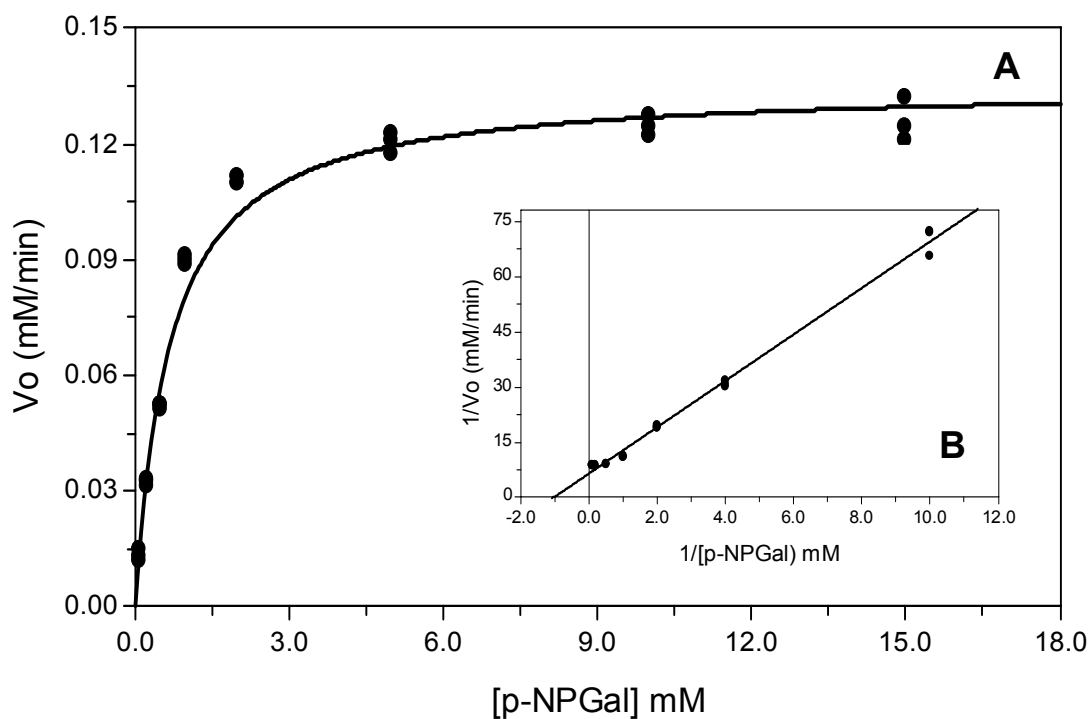


Figura 25: Efeito da concentração do substrato $p\text{NP}\alpha\text{Gal}$ na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase E1 de *Aspergillus terreus* determinada pela curva de Michaelis Menten (A) e Duplo Recíproco (B).

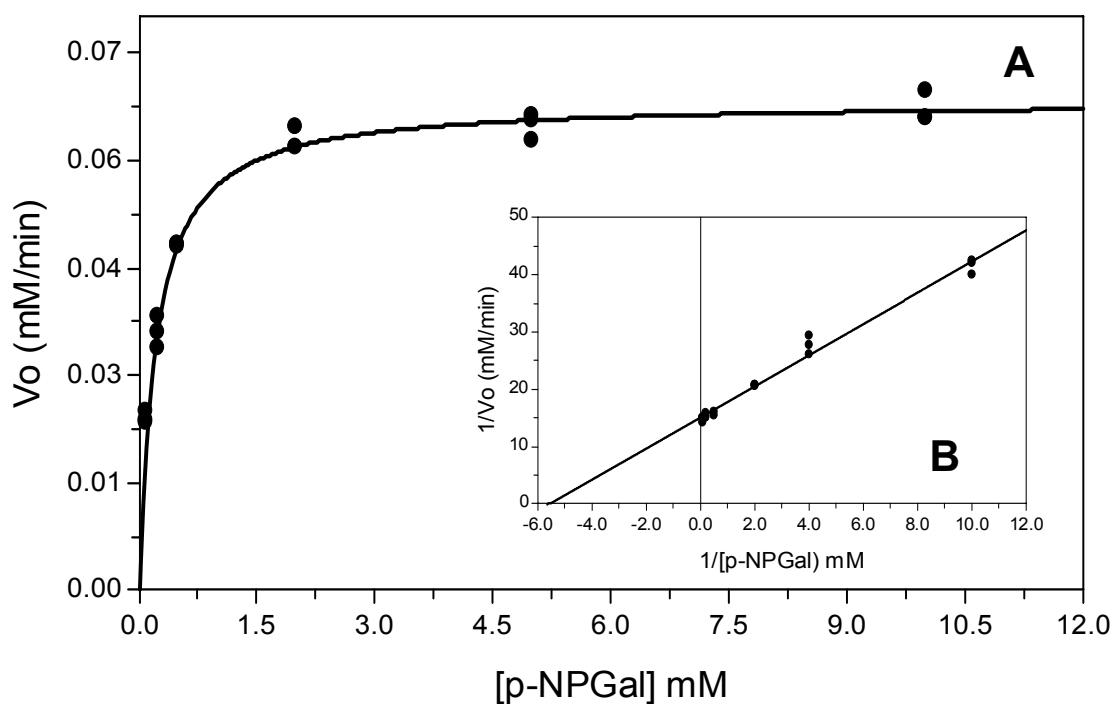


Figura 26: Efeito da concentração do substrato $pNP\alpha Gal$ na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase E2 de *Aspergillus terreus* determinada pela curva de Michaelis Menten (A) e Duplo Recíproco (B).

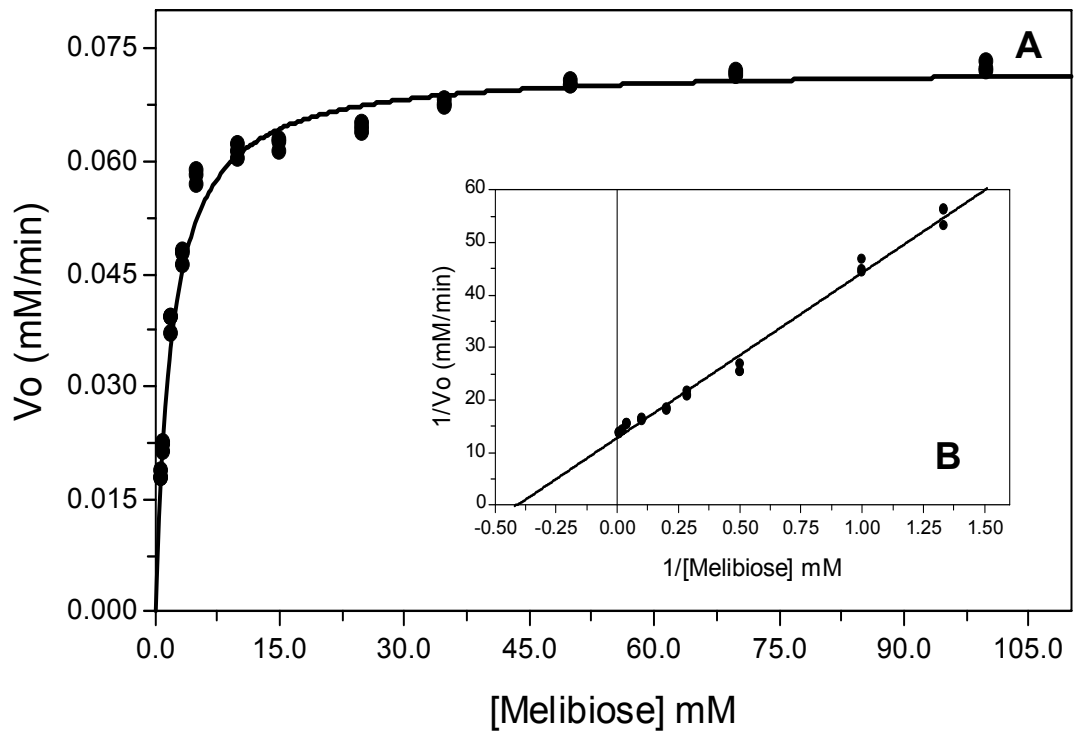


Figura 27: Efeito da concentração do substrato melibiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase E1 de *Aspergillus terreus* determinada pela curva de Michaelis Menten (A) e Duplo recíproco (B).

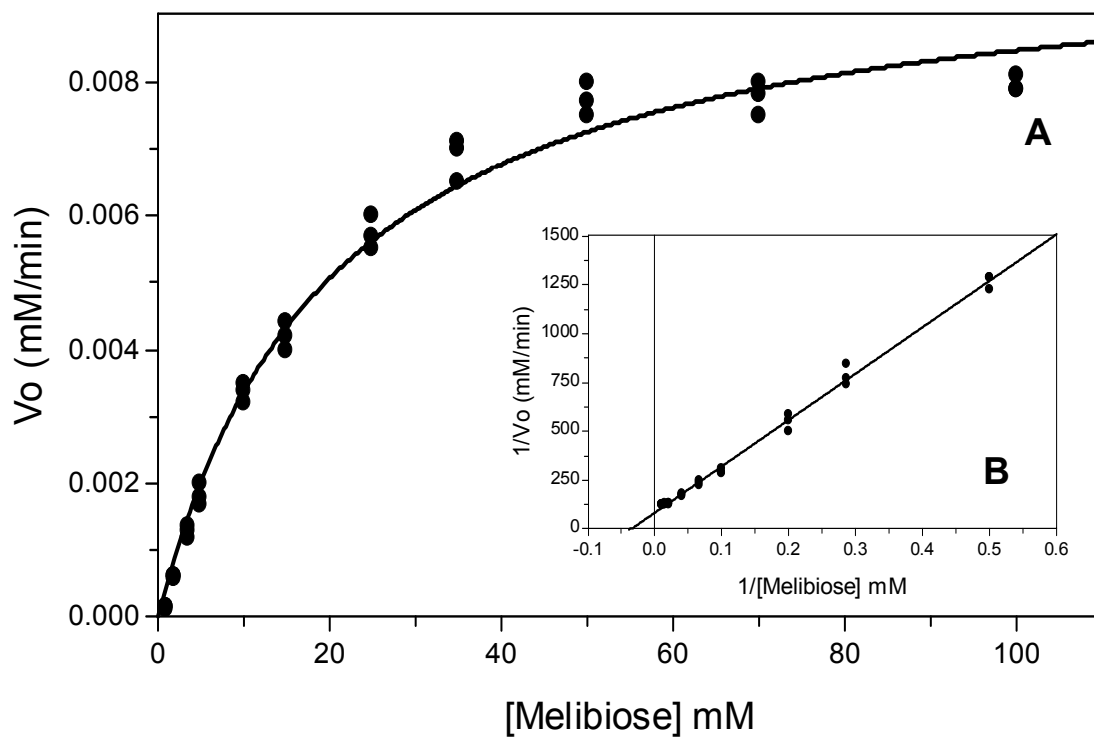


Figura 28: Efeito da concentração do substrato melibiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase E2 de *Aspergillus terreus* determinada pela curva de Michaelis Menten (A) e Duplo recíproco (B).

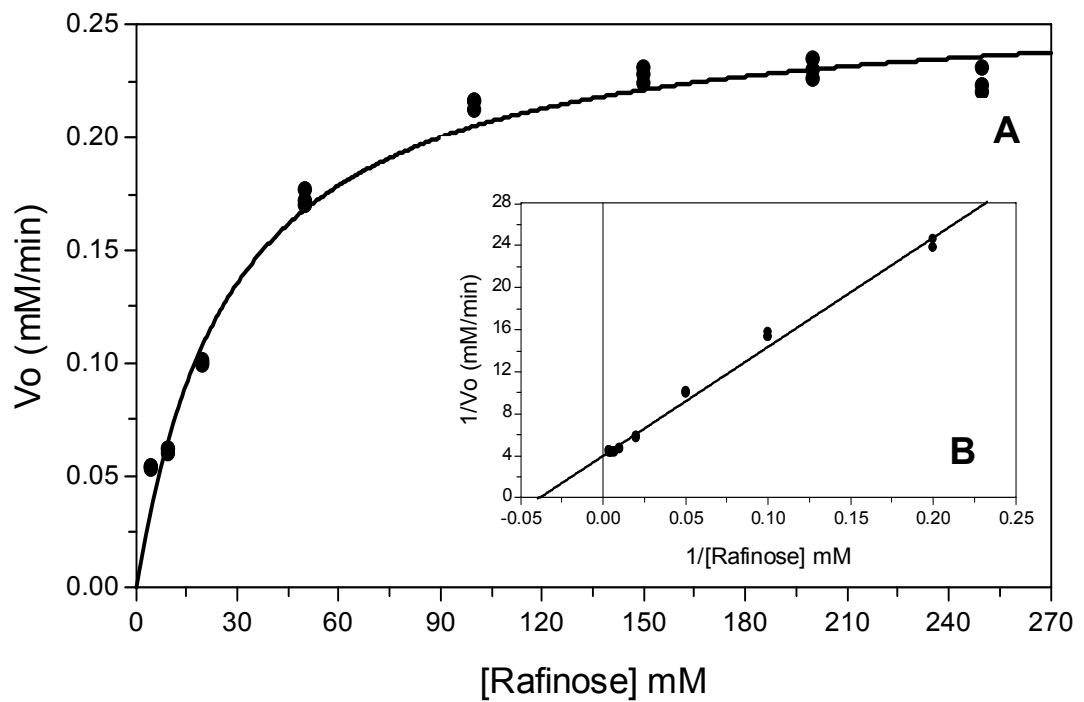


Figura 29: Efeito da concentração do substrato rafinose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase E1 de *Aspergillus terreus* determinada pela curva de Michaelis Menten (A) e Duplo recíproco (B).

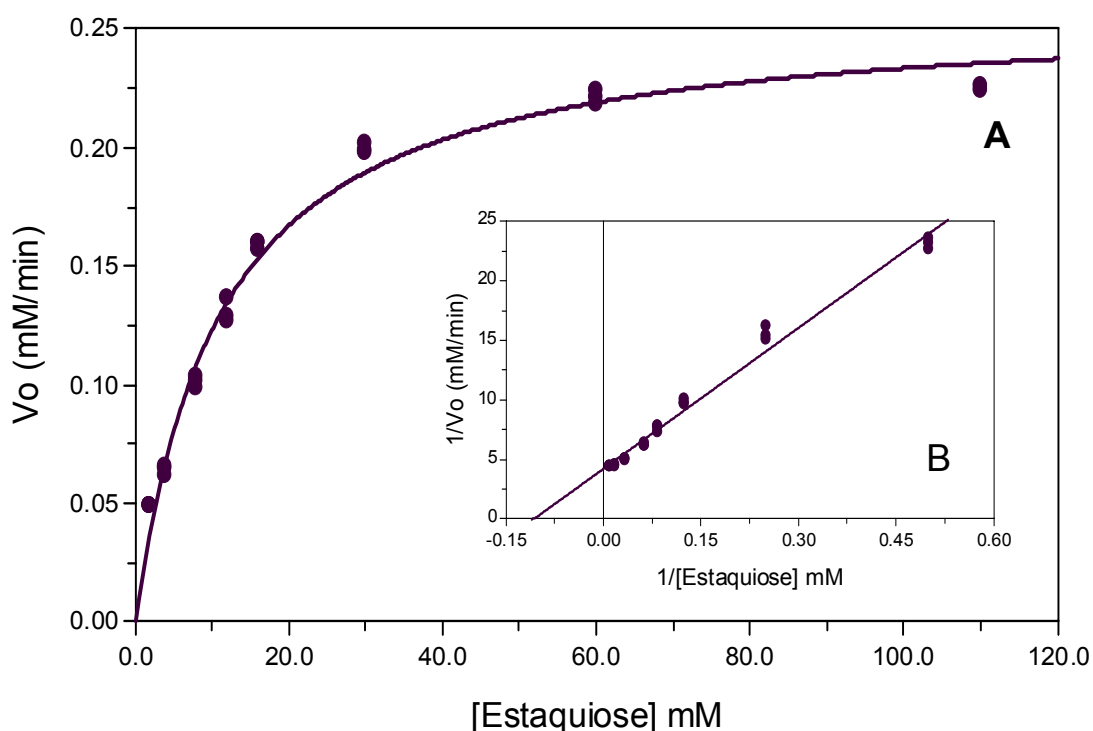


Figura 30: Efeito da concentração do substrato estaquiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase E1 de *Aspergillus terreus* determinada pela curva de Michaelis Menten (A) e Duplo recíproco (B).

α -Galactosidases de diferentes fontes normalmente apresentam uma maior afinidade pelo substrato sintético ρ NP α Gal quando comparado a substratos naturais. Valores de K_M semelhantes aos das α -galactosidases de *Aspergillus terreus* foram determinados por ADEMARK *et al.* (2001), que purificaram e caracterizaram quatro α -galactosidases de *Aspergillus niger* (α -gal I, α -gal II, α -gal III e α -gal IV) e verificaram que o K_M destas enzimas para o substrato ρ NP α Gal foi de 1,4, 0,22, 0,27 e 0,24 mM respectivamente. SRIPUAN *et al.* (2003), estudando α -galactosidase de *Ganoderma lucidum*, encontraram valor da K_M para ρ NP α Gal de 0,4 mM. Já a α -galactosidase de *Trichoderma reesei* apresentou um K_M de 0,05 mM, para o substrato ρ NP α Gal (SHABALIN *et al.*, 2001).

Considerando-se os demais substratos, verificamos que a α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (PRASHANTH & MULIMANI, 2005)

apresentou um K_M de 0,83 e 5,5 mM para os substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ e rafinose, respectivamente. GOTE *et al.* (2006) descreveram que a α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM 5146 apresenta um K_M de 0,5, 3,92, 4,0 e 2,0 mM para os substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, melibiose, rafinose e estaquiose, respectivamente. VIANA *et al.* (2005) descreveram que a α -galactosidase semi-purificada de *Glycine max* possui uma K_{Mapp} de 0,33 mM para o $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, 0,42 mM para melibiose e 6,01 mM para rafinose. SHABALIN *et al.* (2002) investigaram a comportamento cinético da α -galactosidase de *Thichoderma reesei*, determinando que os valores de K_M desta enzima para os substratos melibiose, rafinose e estaquiose são respectivamente 3, 11 e 5 mM. REZESSY-SZABÓ *et al.* (2007) também estudaram parâmetros cinéticos determinando o efeito da concentração dos substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, rafinose e estaquiose sobre a atividade da α -galactosidase do fungo *Thermomyces lanuginosus*, sendo encontrados valores similares de K_M de, respectivamente, 1,13, 1,61 e 1,17 mM. A α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii* apresentou valores de K_M iguais a 0,30, 2,01, 16,0 e 9,66 mM para os substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, melibiose, rafinose e estaquiose, respectivamente (VIANA, *et al.*, 2006). Também, semelhantemente aos valores de K_M encontrados para as α -galactosidases E1 e E2 de *Aspergillus terreus*, FALKOSKI *et al.* (2007) determinou para a α -galactosidase do fungo *Penicillium griseoroseum* um K_{Mapp} de 1,32, 2,06 e 20,67 mM para os substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, melibiose e rafinose, respectivamente.

O valor absoluto de K_M para um determinado substrato varia essencialmente de acordo com a origem da enzima. Isto pode ser exemplificado, comparando-se os valores de K_M discrepantes encontrados para o substrato rafinose, quando diferentes α -galactosidases são avaliadas. Para este substrato, o valor da K_M da α -galactosidase de *Pycnoporus cinnabarinus* é de 2,16 mM (LAZO *et al.*, 1977). Entretanto, valores de 9,6, 135 e 197 mM foram determinados para as α -galactosidases de *Streptomyces sp.*, *Saccharomyces carlsbergensis* e *Streptococcus mutans*, respectivamente (OHTACARA *et al.*, 1984; OISHI & AINDA, 1976 e ADUSE-OPUKO *et al.*, 1991).

4.4.4. Especificidade das α -galactosidases E1 e E2 fungo *A. terreus* com outros substratos

As enzimas α -galactosidases E1 e E2 foram avaliadas quanto à capacidade em hidrolisar alguns substratos sintéticos, naturais e polímeros. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 5.

Ao avaliarmos os resultados obtidos nos ensaios com substratos sintéticos, podemos observar que ambas as enzimas demonstraram ser muito seletivas, apresentando maior especificidade para o substrato p -NP- α -Gal e uma baixa especificidade para o substrato o -NP- α -Gal sendo a taxa de hidrólise da enzima α -galactosidases E1 para o substrato p -NP- α -Gal cerca de 25 vezes maior do que para o substrato o -NP- α -Gal. Para a enzima α -galactosidases E2, esta relação foi de 26 vezes.

Quando ensaiadas na presença de substratos naturais foi observado que as duas enzimas foram ativas em ligações contendo galactose na posição α de oligossacarídeos como melibiose, rafinose e estaquiose. Observamos que a α -galactosidase E1 hidrolisou em ordem de preferência estaquiose, rafinose e melibiose. A amostra de α -galactosidase E2, além de hidrolisar os açúcares citados, hidrolisou também a sacarose e para esta amostra enzimática a ordem de preferência foi rafinose, sacarose, estaquiose e melibiose. Isso demonstra que temos a enzima invertase contaminando esta amostra. Foi observado que ambas enzimas não hidrolisaram os açúcares maltose e lactose.

As enzimas α -galactosidases E1 e E2 de *A. terreus* também foram ensaiadas com polímeros goma guar e goma locusta na concentração final de 0,5% (p/v). De acordo com a tabela, observa que a enzima apresentou baixa especificidade pelos polímeros.

Tabela 5: Atividade das enzimas α -galactosidase E1 e E2 do fungo *Aspergillus terreus*

sobre substratos sintéticos, naturais e polímeros.

Substratos	Concentração ^a	Atividade ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) \pm DP	
		α -galactosidase E1	α -galactosidase E2
Sintéticos			
ρ -NP- α -Gal	0,5	50,2 \pm 1,51	48,1 \pm 1,33
ρ -NP- α -Gal	0,5	0,00	0,00
<i>m</i> -NP- α -Gal	0,5	0,00	0,00
ρ -NP- β -Gal	0,5	0,00	0,00
<i>o</i> -NP- α -Gal	0,5	1,98 \pm 0,04	1,85 \pm 0,06
<i>o</i> -NP- β -Glu	0,5	0,00	0,00
ρ -NP- α -Glu	0,5	0,00	0,00
ρ -NP- β -Glu	0,5	0,00	0,00
ρ -NP- α -Man	0,5	0,00	0,00
ρ -NP- α -Ara	0,5	0,00	0,00
ρ -NP- β -Xil	0,5	0,00	0,00
Rafinose	15	60,3 \pm 1,44	72,4 \pm 2,12
Estaquiose	10	125 \pm 3,72	64,5 \pm 1,41
Sacarose	10	0,00	69,1 \pm 1,15
Melibiose	5	30,6 \pm 0,92	4,5 \pm 0,25
Maltose	10	0,00	0,00
Lactose	10	0,00	0,00
Goma guar	0,5	2,6 \pm 0,09	1,3 \pm 0,06
Goma locusta	0,5	3,8 \pm 0,08	1,8 \pm 0,05

^a Concentração em mM, exceto para goma guar e goma locusta (%) (p/v).

OLIVEIRA (2002) descreveu que as duas α -galactosidasas extraídas de sementes germinadas de *Platymiscium pubescens* apresentam especificidade absoluta para galactosídeos α -D ligados. SRIPUAN *et al.* (2003) em estudo com uma α -galactosidase de *Ganoderma lucidum* verificou que a enzima hidrolisou os substratos sintéticos ρ -NP- α -Gal e *o*-NP- α -Gal, e mais fracamente o substrato *m*-NP- α -Gal. Os substratos naturais, como melibiose, rafinose e estaquiose foram bons substratos para essa enzima.

GUIMARÃES *et al.* (2001), avaliaram a especificidade das α -galactosidasas P1 e P2 extraídas de sementes de *Glycine max* e determinaram que a enzima P2 apresenta especificidade restrita à substratos contendo α -D-galactose em sua estrutura. Entretanto, uma preparação enzimática contendo a α -galactosidase P1 foi capaz de hidrolisar os substratos ρ -NP- α -Gal e ρ -NP- β -Gal, sendo que a taxa de hidrólise do substrato ρ -NP- α -Gal foi cerca de 18 vezes superior àquela determinada para o substrato ρ -NP-

β -Gal. Resultados parecidos foram encontrados para enzima α -galactosidase semipurificada de sementes de soja da variedade Monarca, estudada por FALKOSKI (2006), que demonstrou especificidade quase absoluta para a galactose em posição α , porém, apresentou uma atividade enzimática muito baixa (4,53 %) na presença do substrato p -NP- β -Gal. α -Galactosidase de *Aspergillus fumigatus* não hidrolisou os substratos sacarose e rafinose, mas conseguiu hidrolisar a melibiose. Entretanto, a afinidade da enzima pela melibiose foi muito menor do que a afinidade pelo p -NP- α -Gal (DE REZENDE *et al.*, 2005). Também VIANA *et al.* (2006) determinaram que a α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* tem sua atividade restringida à hidrólise de substratos contendo D-galactosídeos α -ligados. Esta enzima hidrolisou preferencialmente p -NP- α -Gal, estaquiase, rafinose, porém apresentou especificidade mais baixa por melibiose e pelos polímeros goma guar e goma locusta. Já a α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* hidrolisou os galacto-oligossacarídeos na seguinte ordem de preferência: estaquiase, melibiose e rafinose (GOTE *et al.*, 2006).

Resultados semelhantes aos da α -galactosidase E1 e E2 foram observados em α -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b que foi ativa sobre o substrato artificial p -NP- α -Gal e sobre substratos naturais que contem ligações α -galactosídicas como rafinose e estaquiase, todavia hidrolisou fracamente galactomananas, como goma goma guar e goma locusta (REZESSY-SZABÓ *et al.*, 2007).

4.4.5. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade das α -galactosidases do fungo *A. terreus*

Os efeitos de íons, agentes redutores e açúcares sobre a atividade das enzimas α -galactosidases do fungo *A. terreus* foram avaliados. Soluções com concentrações definidas desses compostos foram pré-incubadas com as enzimas α -galactosidases E1 e E2 por 15min a 50 e 60°C, respectivamente, e posteriormente o ensaio foi realizado conforme o item 3.12.5. A concentração final dos efetores foi de 2 mM e a atividade relativa foi calculada considerando a atividade da enzima pré-incubada sem efetor como 100%. Os resultados

obtidos podem ser observados na Tabelas 6.

Não foram detectadas alterações significativas nas atividades das α -galactosidases E1 e E2 quando estas enzimas foram pré-incubadas com EDTA, $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl, NaCl, β -mercaptoetanol, lactose, maltose sacarose, glicose e frutose. Uma vez que a atividade enzimática praticamente não sofreu alteração pela presença de EDTA, pode-se sugerir que provavelmente as α -galactosidases E1 e E2 não dependem de íons metálicos para suas atividades catalíticas (VIANA, 2006). As atividades destas duas enzimas foram totalmente inibidas na presença de $CuSO_4$, $HgCl_2$, $AgNO_3$ e SDS. Alguns efetores interferiram diferentemente nas atividade das α -galactosidases E1 e E2. Por exemplo, o $ZnSO_4$ inibiu totalmente a atividade da α -galactosidase E1 e apenas parcialmente a α -galactosidase E2. Da mesma maneira a galactose não inibiu a atividade da α -galactosidase E1 e inibiu parcialmente a atividade da α -galactosidase E2. Também, melibiose, rafinose e estaquiose inibiram parcialmente a atividade da α -galactosidase E1 e a atividade da α -galactosidase E2 não foi afetada por esses açúcares.

Tabela 6: Atividade relativa das enzimas α -galactosidases E1 e E2 do fungo *Aspergillus terreus* submetidas aos efeitos de íons, agentes redutores e

açúcares.

Efetor	Atividade Relativa (%) \pm DP	
	α -galactosidase E1	α -galactosidase E1
Controle	100 \pm 1,5	100 \pm 1,9
EDTA	94 \pm 2,7	88 \pm 1,1
MgCl ₂	93 \pm 1,8	101 \pm 0,9
CaCl ₂	96 \pm 1,0	102 \pm 1,3
CuSO ₄	0	0
KCl	99 \pm 0,3	100 \pm 0,7
NaCl	98 \pm 0,7	98 \pm 1,8
HgCl ₂	0	0
AgNO ₃	0	0
ZnSO ₄	0	52 \pm 0,9
β -mercaptoetanol	97 \pm 3,2	94 \pm 2,1
SDS	0	0
Lactose	94 \pm 0,5	99 \pm 1,7
Maltose	91 \pm 0,4	94 \pm 2,4
Melibiose	38 \pm 0,7	94 \pm 0,8
Rafinose	65 \pm 1,5	98 \pm 1,7
Manose	87 \pm 1,1	94 \pm 0,7
Galactose	96 \pm 1,4	52 \pm 0,6
Estaquiose	72 \pm 0,8	95 \pm 0,9
Sacarose	92 \pm 1,0	99 \pm 1,5
Glicose	88 \pm 1,9	94 \pm 2,1
Frutose	98 \pm 1,3	98 \pm 1,7

A concentração final de todos os efetores foi de 2mM.

Inibição por SDS também foi observada por FALKOSKI *et al* (2006), nesse estudo a α -galactosidase de semente de soja teve cerca de 50% de sua atividade inibida, e a α -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* apresentou 100% de inibição. O detergente aniônico SDS é um agente desnaturante de proteínas, e na sua presença muitas proteínas perdem completamente ou parcialmente suas funções devido à perda de sua estrutura terciária e quaternária (LANTZ & CIBOROWSKI, 1994; BISCHOFF *et al.*, 1998).

KING *et al.* (2002), analisando o efeito de íons sobre a atividade da α -galactosidase de *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*, descreveram que a enzima foi completamente inibida quando ensaiada na presença de 1 mM do íon Zn⁺².

α -Galactosidases de diferentes fontes tiveram sua atividade catalítica inibidas totalmente ou parcialmente pelos íons Cu⁺² e Ag⁺, e não foram inibidas por EDTA, Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, Na⁺ e β -mercaptoetanol. Entre elas temos, a α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM-5146 (GOTE *et al.*, 2006);

α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* (VIANA *et al.*, 2006) e uma α -galactosidase *Penicillium griseoroseum* (FALKOSK *et al.*, 2006).

A atividade da α -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b foi completamente perdida com 10 mM de AgNO_3 , e o Cu^{2+} demonstrou uma fraca inibição enzimática (REZESSY-SZABÓ *et al.*, 2007). De acordo com SRIPUAN *et al.* (2003), a α -galactosidase de *Ganoderma lucidum* apresentou uma redução na atividade original de 32 % pela adição de Ag^+ . Outros íons metálicos como Al^{+3} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , K^{+1} e Na^{+1} e reagentes como β -mercaptoetanol e EDTA, não afetaram a atividade da enzima, enquanto que a enzima foi completamente inibida por galactose e parcialmente por lactose. Os açúcares maltose e sacarose não afetaram a atividade da enzima.

De acordo com KANG *et al.* (2002), a α -galactosidase de *Oryzae sativa* foi totalmente inibida na presença de 1 mM do íon Hg^{+2} . Por outro lado, observou-se que a presença, em mesmas concentrações, dos íons Cu^{+2} e Ag^{+2} reduziu a atividade enzimática em 7 e 46% respectivamente.

Segundo GOTE *et al.* (2004) o íon Hg^{+2} é um forte inibidor de grupos tióis. Desta maneira, o fato de muitas α -galactosidases serem inibidas por este íon, pode estar relacionado com a oxidação de grupos sulfidrilas presentes nos sítios ativos destas enzimas. DEY & PRIDHAM (1969) descrevem também, que íons Hg^{+2} possuem alta afinidade por grupos carboxil e imidazol de histidina, sugerindo que a blindagem destes grupos pelos íons Hg^{+2} podem causar a perda de atividade em α -galactosidases quando eles se encontram no sítio ativo destas enzimas.

DEY & PRIDHAM (1972) afirmam que galactose é um poderoso inibidor da atividade de enzimas α -galactosidases. Esta afirmativa pode ser confirmada quando observamos que as α -galactosidases produzidas por *Bacillus stearothermophilus* (GOTE, *et al.*, 2006), *Debaryomyces hansenii* (VIANA, *et al.*, 2006), *Aspergillus niger* (SCIGELOVA & CROUT, 2000) e *Glycine max* (VIANA *et al.*, 2005) foram inibidas na presença de galactose, assim como a α -galactosidase E2 de *Aspergillus terreus*. Entretanto, podemos observar que, a presença de galactose não interferiu na atividade da enzima α -galactosidase de *P. griseoroseum* (FALKOSKI *et al.*, 2006), da mesma maneira que não

afetou a atividade da α -galactosidase E1. Resultado semelhante foi encontrado por KING *et al.* (2002) para a α -galactosidase de *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*, cuja inibição na presença de 75 mM de galactose foi de apenas 16%. O autor ainda afirma que, o fato de uma enzima α -galactosidase ser fracamente inibida na presença de galactose constitui-se em uma vantagem para a aplicação industrial desta enzima. Os açúcares galactose e melibiose inibiram a atividade da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM-5146 (GOTE *et al.*, 2006); de *Debaryomyces hansenii* (VIANA *et al.*, 2006) e de duas formas da α -galactosidase de sementes germinadas de soja (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

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

Os resultados obtidos anteriormente mostraram que a α -galactosidase E2 de *A. terreus* foi parcialmente inibida pela galactose. Foi então determinado o valor de K_i para a enzima na presença desse açúcar utilizando o substrato ρ NP α Gal.

O gráfico da velocidade da reação de hidrólise de ρ NP α Gal pela α -galactosidase na ausência e na presença de diferentes concentrações de galactose está mostrado na Figura 31. Para uma mesma concentração do substrato ρ NP α Gal, a velocidade da reação é maior na ausência de galactose e diminui com o aumento da concentração da galactose, caracterizando um efeito de inibição.

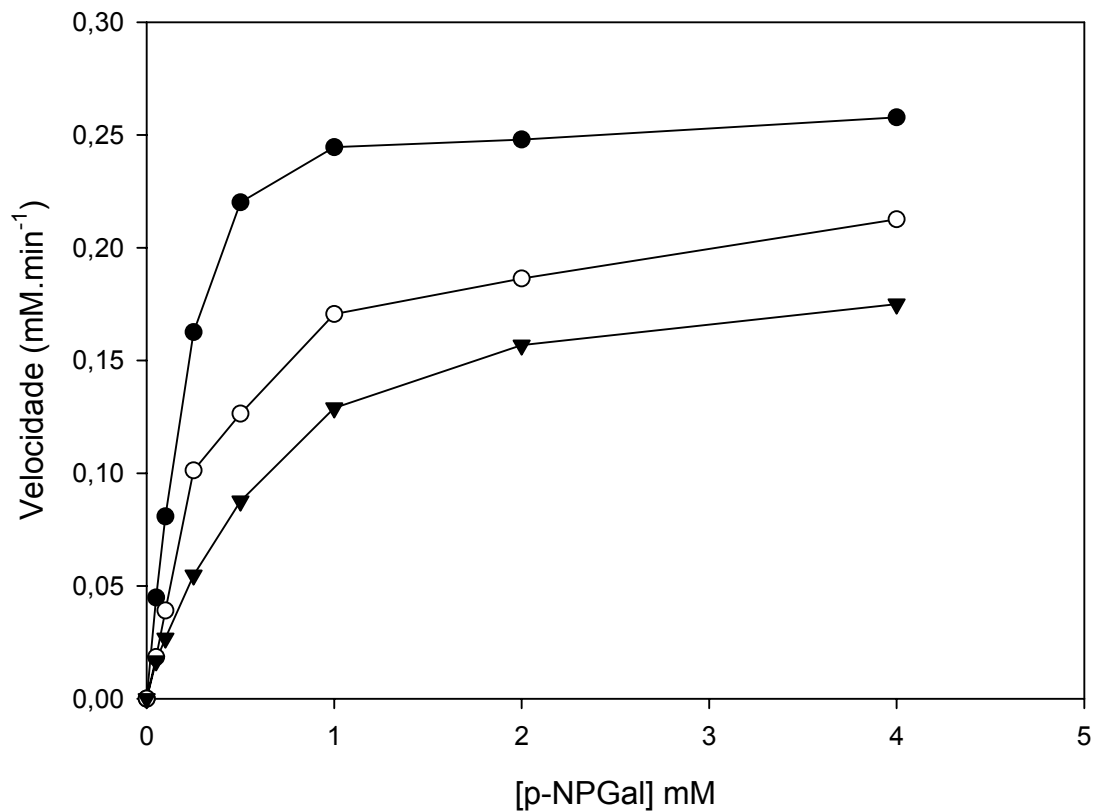


Figura 31: Gráfico da velocidade da reação em função da concentração de $pNP\alpha Gal$ na ausência de galactose (●), com 1,5 mM de galactose (○) e 3,0 mM de galactose (▼).

A Figura 32 mostra que as retas convergem para o mesmo ponto no eixo Y indicando que o valor da V_{max} permanece constante, mesmo na presença do inibidor e o K_M aumenta, sugerindo uma inibição competitiva. O tipo de inibição e o valor de K_i foram determinados pelo gráfico dos recíprocos. A inibição da hidrólise do substrato $pNP\alpha Gal$ pela α -galactosidase na presença do produto inibidor galactose mostrou ser do tipo competitiva com valor de K_i de 0,76 mM (Figura 33).

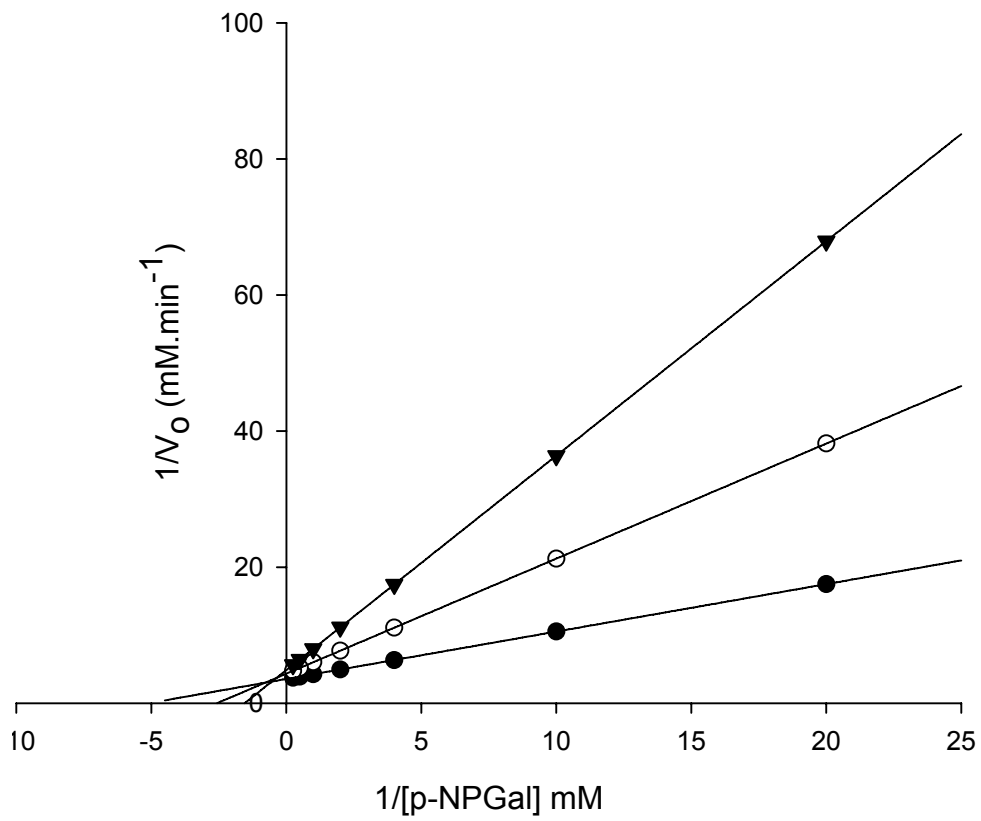


Figura 32: Gráfico de Lineweaver-Burk. Ausência de galactose (●), 1,5 mM de galactose (○) e 3,0 mM de galactose (▼).

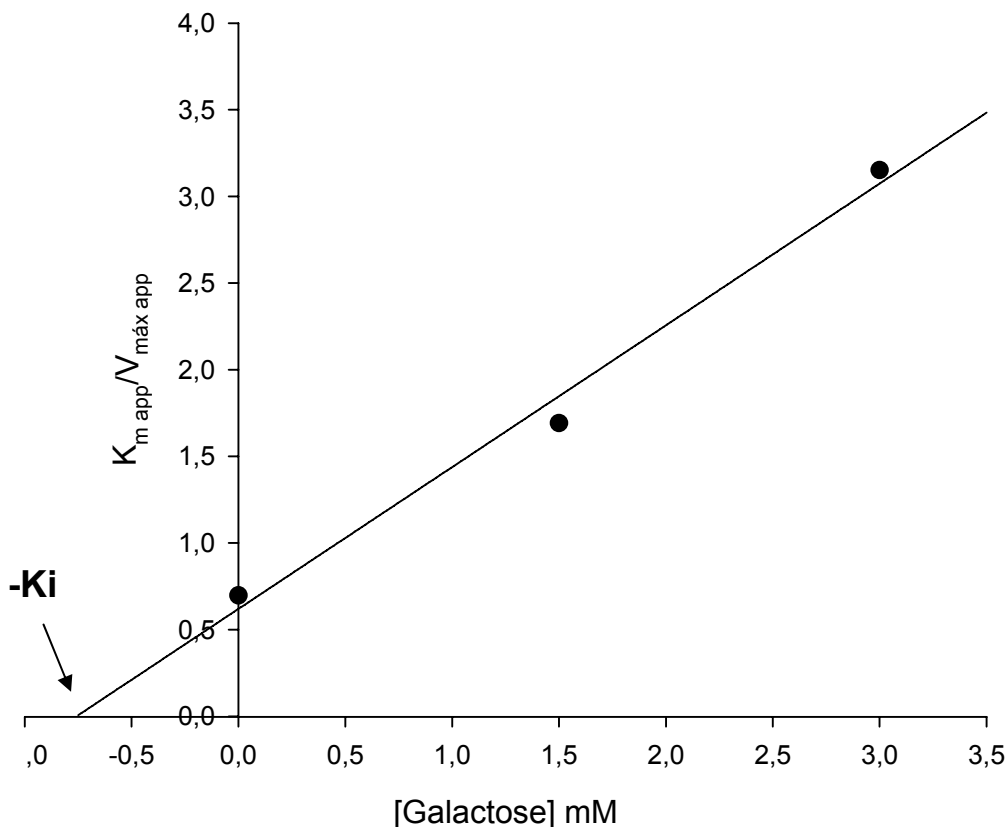


Figura 33: K_{Mapp} vs. [Galactose] para determinação de K_i .

Assim como para a α -galactosidase E2 de *Aspergillus terreus*, GUIMARÃES *et al.* (2001) determinaram que a atividade da α -galactosidase P2 de sementes de soja em germinação com o substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ foi inibida competitivamente na presença do inibidor galactose, com o valor de K_i de 0,67 mM. Da mesma maneira, GOTE *et al* (2006) estudando α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM-5146 verificaram que esta enzima é inibida competitivamente pela galactose, apresentando um valor de K_i de 16,25 mM. KACHURIN *et al.* (1995) em estudo com uma α -galactosidase de *Trichoderma reesei*, verificou que a enzima era inibida competitivamente pela galactose e apresentava um K_i de 0,091 mM. Já a α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 sofreu uma inibição não competitiva em presença da galactose, apresentando um K_i de 2,7 mM (VIANA *et al.*, 2006).

4.4.7. Determinação da energia de ativação para as α -galactosidases do fungo *A. terreus*

Energia de ativação (E_a) é a quantidade de energia necessária para que uma molécula de substrato, alcance o estado de transição, para que então venha se tornar uma molécula de produto. O estado de transição representa um ponto intermediário onde as ligações do substrato são modificadas o suficiente para possibilitar a sua conversão em produto. A velocidade da reação depende do número de moléculas de substrato que alcançam o estado de transição por unidade de tempo (SEGEL, 1979). As enzimas atuam aumentando a velocidade das reações, diminuindo a energia de ativação.

Utilizando a equação do Duplo recíproco, foram calculados os valores de $V_{m\acute{a}x}$ da enzima α -galactosidase E1 de *Aspergillus terreus* para os substratos ρ NP α Gal, melibiose, rafinose e estaquiose nas temperaturas de 35, 45, 50, 55, 60 e 65 °C. Para a enzima α -galactosidase E2 foram calculados os valores de $V_{m\acute{a}x}$ para os substratos ρ NP α Gal e melibiose nas temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55, °C).

A energia de ativação (E_a) das α -galactosidases para hidrólise destes substratos foi estimada pelo gráfico de Arrhenius, que correlaciona $\text{Log } V_{m\acute{a}x}$ vs $1.T^{-1}$ (K^{-1}), mostrado nas Figuras 34, 35 e 36.

Para o substrato ρ NP α Gal foi encontrada uma energia de ativação igual a 51,17 e 36,71 kJ/mol para as α -galactosidases E1 e E2, respectivamente. Para o substrato melibiose a energia de ativação para a α -galactosidase E1 foi de 53,83 kJ/mol e para a E2 foi 39,83 kJ/mol. Para os substratos rafinose e estaquiose, a energia de ativação encontrada foi de 55,18 e 42,81 kJ/mol, respectivamente, para a α -galactosidases E1.

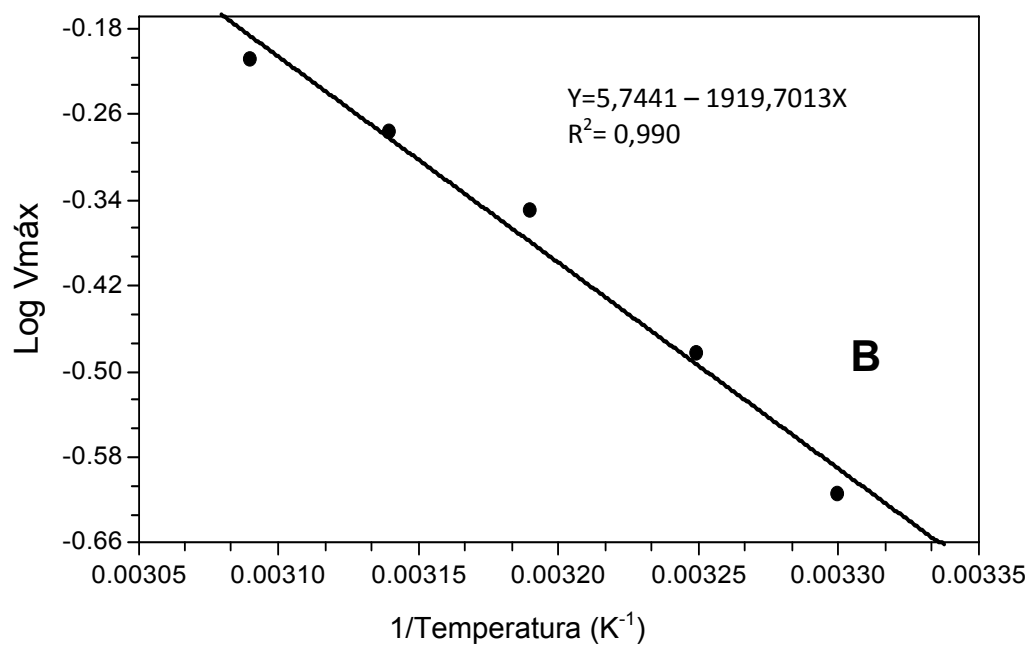
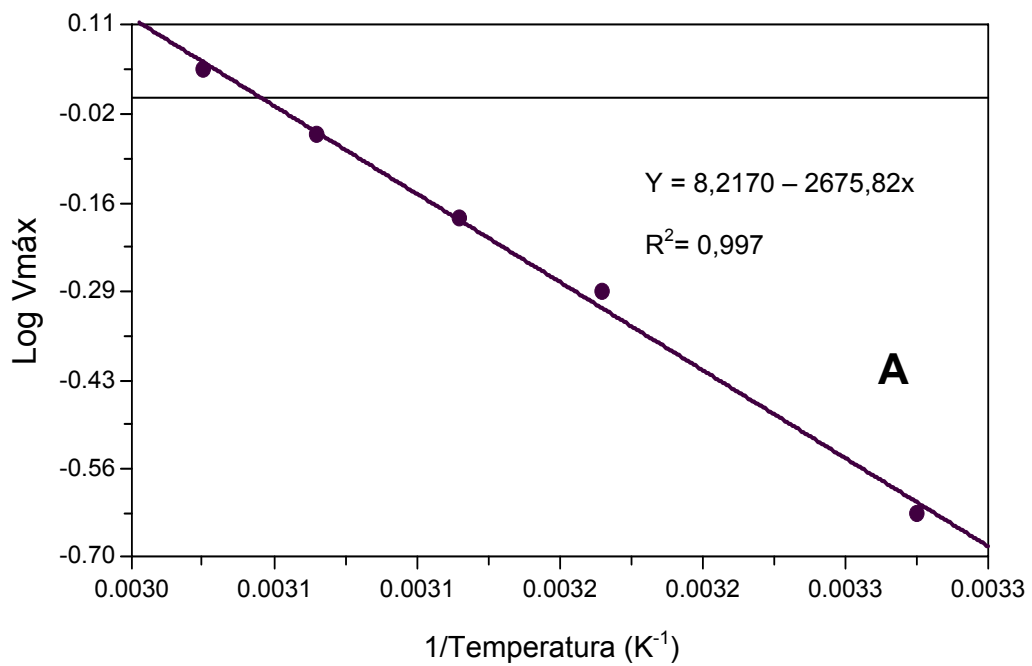


Figura 34: Energia de ativação das enzimas α -galactosidasas E1 (A) e E2 (B) de *Aspergillus terreus* para o substrato ρ NP α Gal.

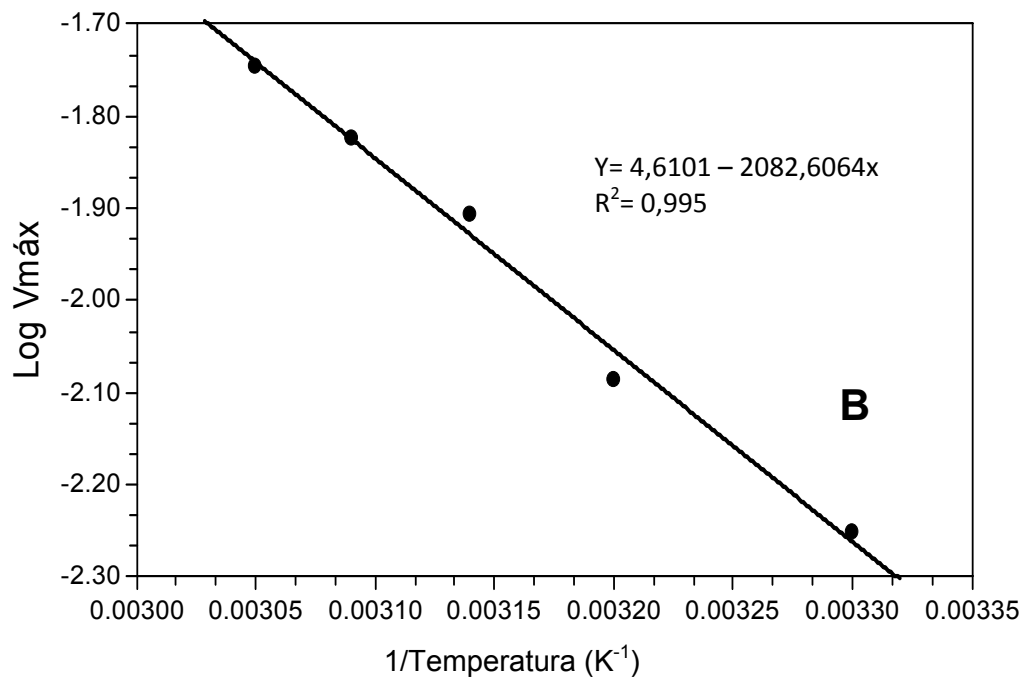
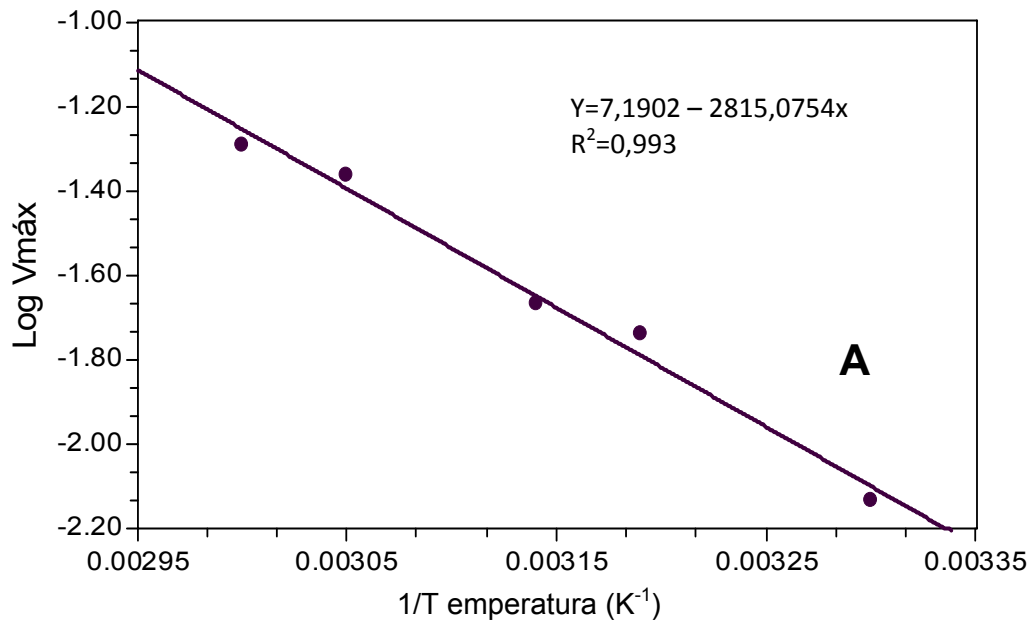


Figura 35: Energia de ativação das enzimas α -galactosidasas E1 (A) e E2 (B) de *Aspergillus terreus* para o substrato melibiose.

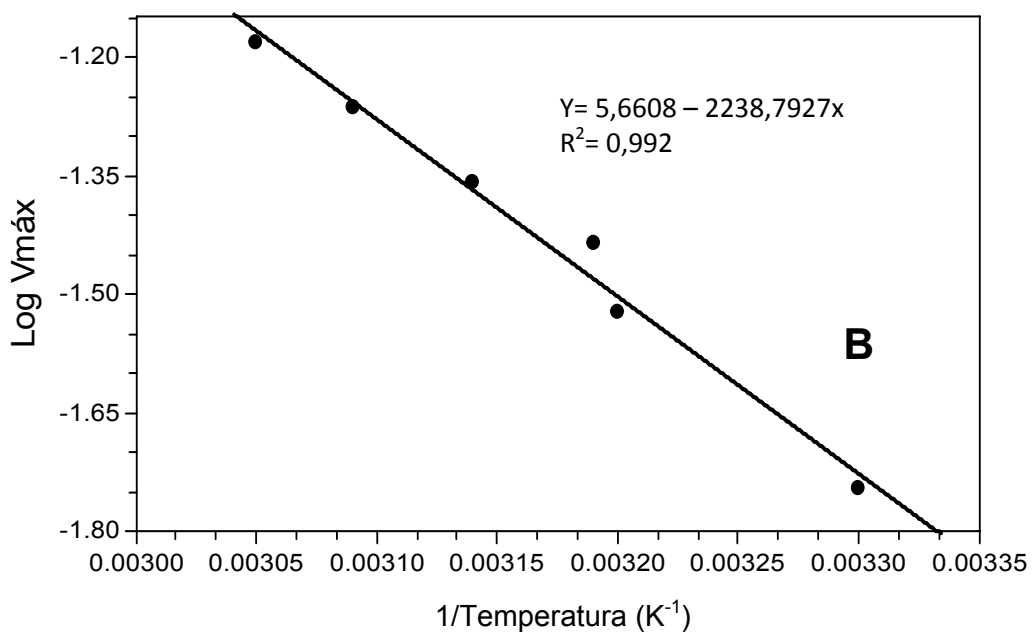
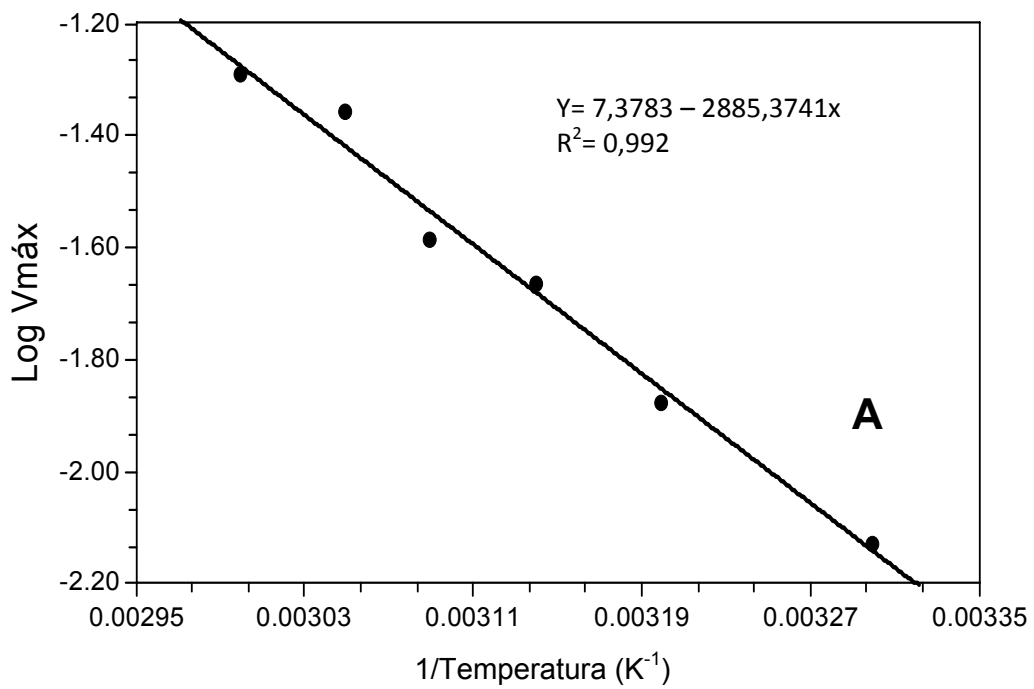


Figura 36: Energia de ativação da enzima α -galactosidases E1 de *Aspergillus terreus* para os substratos rafinose (A) e estaquiose (B).

DEY *et al.*(1983) caracterizou uma α -galactosidase de sementes de lentilha, e encontrou a E_a para o substrato ρ NP α Gal de 62,1 kJ/mol. Recentemente, GOTE *et al.* (2006) descreveram que a E_a da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* para os substratos ρ NP α Gal, rafinose e melibiose foram respectivamente de 97,8, 61,6 e 35,6 KJ.mol⁻¹.

4.5. Conversão das células vermelhas sangüíneas tipo B em tipo O pela enzima α - galactosidase

As células sangüíneas tipo B foram tratadas separadamente com as α -galactosidases E1 e E2 de *Aspergillus terreus* como descrito no item 3.8. Após o procedimento as células foram lavadas cinco vezes com tampão PBS e tratadas com o antisoro monoclonal anti-B (HOBBS *et al.*, 1995). Como houve aglutinação tanto para as amostras contendo a α -galactosidase E1 como para aquelas contendo a α -galactosidase E2 indica que as células que continham o antígeno B não foram convertidas em antígeno H. Portanto, essas enzimas não foram capazes de converter sangue tipo B em sangue tipo O.

α -Galactosidases de sementes de café verde (α -GAL)³ demonstrou alta eficiência na remoção de resíduos de galactose α -ligados da superfície das células vermelhas do sangue (GOLDSTEIN *et al.*, 1982). α -Galactosidase de sementes de soja *Glicine Max* hidrolisou o resíduo terminal α -D-galactosil do antígeno B convertendo-o em antígeno H (HOBBS *et al.*, 2005).

4.6. Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em extrato desengordurado de soja

A capacidade das enzimas α -galactosidases E1 e E2 de *Aspergillus terreus* na hidrólise de RO no extrato desengordurado de soja foi avaliada como no item 3.9, seguido da extração de RO (item 3.10) e análise de RO por CLAE (item 3.11). A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes no extrato desengordurado de soja, em função do tempo de incubação com a enzima. Como controle, o extrato desengordurado foi incubado com igual volume de água destilada, em substituição à enzima purificada, nas mesmas condições.

Os resultados de hidrólise obtidos para a enzima α -galactosidase E1,

nos tempos de 0, 4, 8 e 12 h, podem ser observados nos cromatogramas comparativos que estão mostrados na Figura 37 e pelas concentrações dos açúcares rafinose e estaquiose presentes na farinha de soja desengordurada em função do tempo de incubação com as enzimas, mostrados na Tabela 7. Foi verificado que após 4 h de incubação, mais de 50 % da estaquiose foi hidrolisada, ao passo que os teores de rafinose tiveram um acréscimo de 73%. A estaquiose foi totalmente hidrolisada após 12 horas de incubação, porém a rafinose ainda permaneceu 24 % a mais que o teor inicial. As análises referentes à rafinose revelam um acúmulo deste açúcar durante as primeiras 4h de incubação. Tal fenômeno pode ser justificado pelo fato da rafinose ser um dos produtos da hidrólise da estaquiose. Como já foi descrito anteriormente, a α -galactosidases E1 apresenta uma maior afinidade pelo substrato estaquiose (menor valor de K_M) quando comparado à rafinose. Este fato também possivelmente contribuiu para uma hidrólise mais lenta da rafinose, favorecendo assim o seu acúmulo e a impossibilidade de hidrolisar significativamente este oligossacarídeo nas 12 h de tratamento. Entretanto fica inviável incubar a enzima no extrato desengordurado de soja por mais de 12 h, devido ao risco de crescimento de microrganismos, contaminando assim este derivado de soja. Uma alternativa seria adicionar a enzima ao extrato desengordurado de soja no momento em que estiver sendo embalado. Desta forma a enzima ficaria mais tempo em contato com os RO, sendo estes possivelmente hidrolisados sem correr o risco de contaminação por microrganismos.

Tabela 7: Concentração dos açúcares rafinose e estaquiose presentes no extrato desengordurado de soja em função do tempo de incubação com as enzimas α -galactosidases E1 e E2 de *Aspergillus terreus*.

Tempo de incubação(h)	Concentração de açúcares (%) ± DP			
	α-galactosidases E1		α-galactosidases E2	
	Rafinose	Estaquiose	Rafinose	Estaquiose
0	1,37±0,17	2,56±0,20	1,38±0,15	2,53±0,18
4	2,38±0,45	1,25±0,03	1,21±0,07	2,11±0,12
8	2,22±0,21	0,67±0,10	1,50±0,13	2,1±0,07
12	1,7±0,18	0,0	1,14±0,08	1,92±0,16

Os resultados foram calculados a partir de cromatogramas obtidos pela análise por CLAE

Os resultados de hidrólise obtidos para a enzima α-galactosidases E2, nos tempos de 0, 4, 8 e 12 h, podem ser observados nos cromatogramas comparativos que estão mostrados Figura 38. Podemos observar que a amostra contendo a α-galactosidases E2 apresenta pequena capacidade de hidrolisar tanto a rafinose como estaquiose. Ao final de 12 h de incubação do extrato desengordurado de soja com esta amostra, apenas 18 e 25 % dos açúcares rafinose e estaquiose foram hidrolisados, respectivamente. Foi também observado a possível presença da invertase nesta amostra, já que praticamente toda a sacarose presente foi hidrolisada. A presença da invertase não interfere sobre a aplicação deste extrato enzimático na indústria para hidrólise de RO, visto que a hidrólise completa dos RO a açúcares simples depende tanto da α-galactosidase como também da invertase (GUIMARÃES *et. al.*, 2006). Outro fator importante é que para diminuir custos geralmente são empregadas enzimas parcialmente purificadas na indústria, uma vez que o custo comercial das enzimas puras é muito alto.

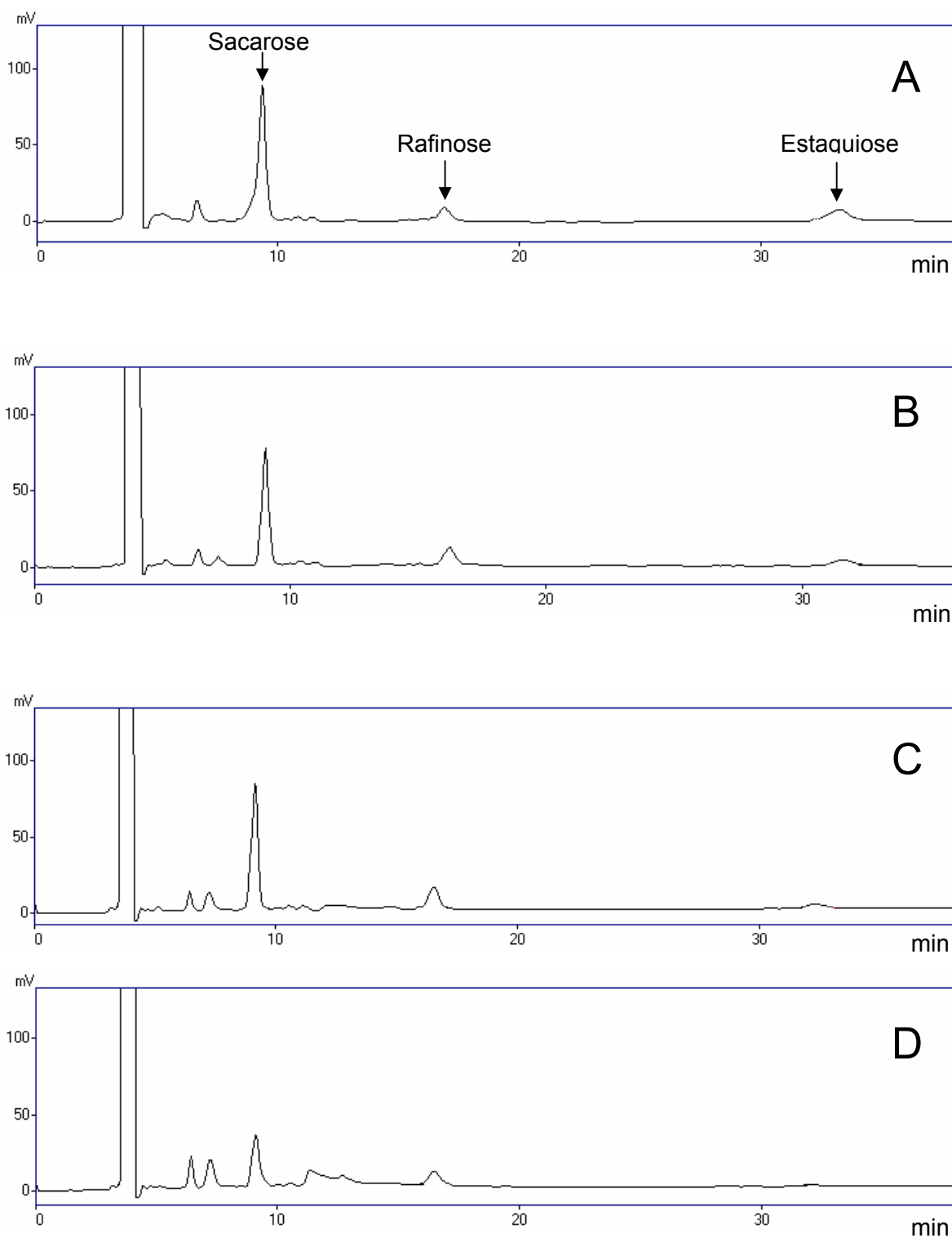


Figura 37: Cromatogramas comparativos da hidrólise dos açúcares solúveis no extrato desengordurado de soja em função do tempo de incubação com a enzima α -galactosidase E1 nos tempos 0h (A), 4h (B), 8h (C) e 12h (D).

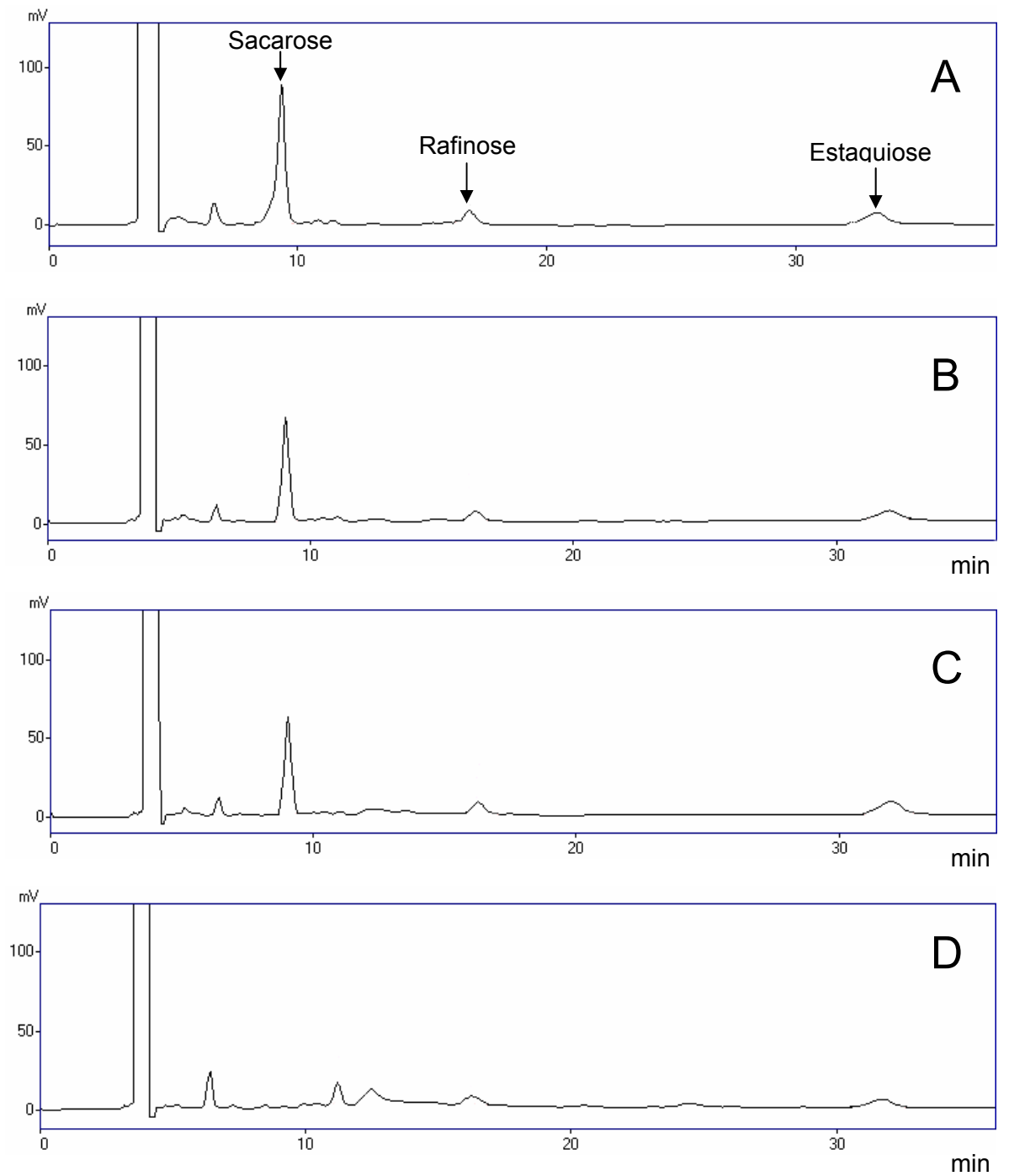


Figura 38: Cromatogramas comparativos da hidrólise dos açúcares solúveis no extrato desengordurado de soja em função do tempo de incubação com a enzima α -galactosidase E2 nos tempos 0h (A), 4h (B), 8h (C) e 12h (D).

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. Também, VIANA *et al.* (2005) analisaram o emprego da α -galactosidase semipurificada de *Glycine max* para redução dos teores de RO em derivados de soja. Neste trabalho os autores incubaram 5 U da enzima α -galactosidase com 10 mL contendo uma solução de farinha de soja desengordurada (10% p/v), observando uma hidrólise de 89 e 72 % da rafinose e estaquiose, respectivamente, após 6 h de incubação.

A α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi* após 12 h de incubação hidrolisou 91 % dos RO presentes no leite de soja (THIPPESWAMY & MULIMANI, 2002). GOTE *et al.* (2004) avaliaram o potencial de hidrólise de RO em leite de soja pela enzima α -galactosidase purificada de *Bacillus stearothermophilus* utilizando uma relação de 1 U de enzima para 1 mL de leite de soja, obtendo uma hidrólise de 100 e 94 % da estaquiose e rafinose respectivamente, em ensaios realizados a 65 °C. Após tratamento do leite de soja por 12 h com a α -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, 93 % da rafinose presente foi hidrolisada (PRASHANT & MULIMANI, 2005)

FALKOSKI *et al.* (2006), analisando α -galactosidases de várias fontes, observou que após incubação por 4 h a 40 °C, a α -galactosidase do fungo *Penicillium griseoroseum* hidrolisou 100 e 72 % da estaquiose e rafinose presentes no extrato desengordurado de soja, respectivamente.

Uma alta eficiência hidrolítica foi verificada por VIANA *et al.* (2007) quando avaliou a capacidade de hidrólise da α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* sobre os RO presentes no leite e no melão de soja. Foi observado que após 4 h de tratamento no leite de soja esta enzima hidrolisou 100% da estaquiose e rafinose presentes. No melão de soja, após incubação da enzima por 6 h houve redução de 100 e 50 % de estaquiose e rafinose, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos para as α -galactosidases de *Aspergillus terreus*, podemos observar que a α -galactosidase E1 foi capaz de hidrolisar totalmente a estaquiose e parcialmente a rafinose, enquanto a hidrólise destes

substratos pela α -galactosidase E2 foi mais lenta. Portanto, preferencialmente a α -galactosidase E1 pode ser otimizada para futuras aplicações industriais.

5. CONCLUSÕES

- O fungo *Aspergillus terreus* crescido em meio mineral líquido por 168 horas contendo farelo de trigo como fonte de carbono, produz várias formas extracelulares da α -galactosidase.
- O processo de purificação resultou em uma α -galactosidase purificada e outra parcialmente purificada, chamadas α -galactosidases E1 e E2, respectivamente.
- A enzima α -galactosidase E1 apresentou massa molecular aparente aproximada de 350 kDa por gel filtração e 72,3 por SDS-PAGE, o que sugere que esta enzima é possivelmente um pentâmero, formado por subunidades idênticas.
- A α -galactosidase E2 apresentou massa molecular de 51,7 KDa, por gel filtração e 51,5 kDa por SDS-PAGE. Desta forma podemos sugerir que esta enzima apresenta na sua forma nativa somente uma subunidade.

- A maior atividade encontrada para as α -galactosidases E1 e E2 foi em pH 5,0 e 5,6 e nas temperaturas de 60 e 50°C, respectivamente.
- Quando a α -galactosidase E1 é incubada por 6 h a 40 °C, ela mantém mais de 90% da atividade inicial no intervalo de pH de 4-7. Já a α -galactosidase E2 manteve mais de 90% da atividade inicial apenas na faixa de pH de 5-6, sendo portanto menos estável a variações de pH.
- A enzima α -galactosidase E1 foi mais termoestável, comparada com a α -galactosidase E2, mantendo 90% de sua atividade inicial quando pré-incubada por 12 h a 55 °C enquanto que a α -galactosidase E2 manteve apenas 5 % da sua atividade quando pré-incubada nas mesmas condições.
- A meia vida da α -galactosidase E1 a 55, 60 e 65 °C foi 35,9, 14,6 e 0,4 h, respectivamente. A α -galactosidase E2 apresentou uma meia vida a 45, 50 e 55 °C de 30,6, 12,3 e 1,5 h, respectivamente.
- O valor de K_M da α -galactosidase E1 para os substratos $pNP\alpha Gal$, melibiose, rafinose e estaquiose foram 0,66, 1,92, 27,93 e 10,94, respectivamente. Para a α -galactosidase E2 estes valores foram 0,20 e 20,14 para os substratos $pNP\alpha Gal$ e melibiose, respectivamente.
- As α -galactosidases E1 e E2 demonstraram ser seletivas, apresentando maior especificidade para a galactose em posição α .
- As α -galactosidases E1 e E2 hidrolisaram o substrato $pNP\alpha Gal$, melibiose, rafinose e estaquiose, apresentando baixa especificidade para os polímeros goma guar e goma locusta.
- As atividades das duas enzimas foram totalmente inibidas na presença

de CuSO_4 , HgCl_2 , AgNO_3 e SDS.

- Melibiose, rafinose e estaquiose inibiram parcialmente a atividade da α -galactosidase E1 e a atividade da α -galactosidase E2 não foi afetada por esses açúcares.
- A galactose não inibiu a atividade da α -galactosidase E1 e inibiu parcialmente a atividade da α -galactosidase E2.
- Na presença do substrato $p\text{NP}\alpha\text{Gal}$ a α -galactosidase E2 foi inibida competitivamente por galactose (K_i 0,76 mM).
- Foi encontrado para as α -galactosidases E1 e E2 uma energia de ativação de, respectivamente, 51,17 e 36,71 kJ/mol para o $p\text{-NP-}\alpha\text{-Gal}$ e 53,83 e 39,83 kJ/mol para a melibiose. Para os substratos rafinose e estaquiose, a energia de ativação encontrada foi de 55,18 e 42,81 kJ/mol, respectivamente, para a α -galactosidase E1 .
- As α -galactosidases E1 e E2 não foram capazes de converter o sangue tipo B em tipo O.
- A enzima α -galactosidase E1 mostrou ser mais eficiente na hidrólise dos RO em extrato desengordurado de soja quando comparado à α -galactosidase E2, podendo ser preferencialmente empregada em futuras aplicações industriais

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*. Purification, characterization and substrate specificities. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.441-448, 2001.
- ADUSE-OPOKU, J.; TAO, L.; FERRETTI, J.; RUSSELL, R. Biochemical and genetic analysis of *Streptococcus mutans* α -galactosidase. **Journal of Genetic Microbiology**, v.137, p.754-764, 1991.
- ALANI, S.R.; SMITH, D.M.; MARKAKIS, P. α -Galactosidases of *Vigna unguiculata*. **Phytochemistry**, v.28, p.2047-2051, 1989.
- ALI, S. Application of kaolin to improve citric acid production by a thermophilic *Aspergillus niger*. **Applied microbiology and biotechnology**, v.73, p.441-448, 2001.
- BELLAVER, C.; SNIZEK, J.P.N. Soybean processing and its implications on swine and poultry feeding. Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR. **Anais**, p.183-

199, 1999.

BIRK, Y. Protein protease inhibitors of plant origin and their significance in nutrition. Workshop on Antinutritional Factors of Legumes, **Anais**, Wageningen, 1989.

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

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BALANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.42, p. 98-101, 2007.

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.

CHEN, X.; CAO, Y.; DING, Y.; LU, W.; LI, D. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* β -mannanase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v.128, 452-461, 2007.

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

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

DE LUMEN, B.O. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legume. **Food Structure**, v.11, p.33-46, 1992.

- DE REZENDE, S.T. Teores de oligossacarídeos de rafinose em soja, purificação e caracterização de invertases e α -galactosidases de microrganismos. Brasília, DF: UnB, 157p. (**Tese D.S.**), 1998.
- DE REZENDE, S.T., GUIMARÃES, V.M.; RODRIGUES, M.C.; FELIX, C.R. Purification and Characterization of an α -galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.195-202, 2005.
- DESJARDINS, M.L.; ROY, D.; GOULET, J. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.299-307, 1990.
- DESNICK, R.J.; BERNSTEIN, H.S.; ASTRIN, K.H.; BISHOP, D.F. Fabry disease: molecular diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. **Enzyme**, v.38, p.54-64, 1987.
- DEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. Biochemistry of α -galactosidase. **Advances in Enzymology**, v.36, p.91-130, 1972.
- DEY, P. M.; DEL CAMPILO, E.M.; LEZICA, R.P. Characterization of a glycoprotein α -galactosidase from lentil seeds (*Lens culinaris*). **The Journal of Biological Chemistry**, v.258, p.923-929, 1983.
- DEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. Substrate specificity and kinetic properties of α -galactosidase from *Vicia faba*. **Biochemistry Journal**, v.115, p.47-54, 1969.
- DEY, P.M. In: Methods in plant biochemistry. **London: Academic Press**, p.189-218, 1990.
- DUFFUS, C.M.; SLAUGHTER, J.C. **Seeds and their uses**. New York: John Wiley and Sons, 200p, 1980.
- ENEYSKAYA, E.V.; GOLUBEV, A.M.; KACHURIN, A.M.; SAVEL'EV, A.N.;

- NEUSTROEV, K.N. Transglycosylation activity of α -D-galactosidase from *Trichoderma reesei*. An investigation of the active site. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 83-91, 1998.
- FALKOSKI, D.L.; GUIMARÃES, V.M.; CALLEGARI, C.M.; REIS, A.P.; DE REZENDE, S.T. Processing of soybean products by semipurified plant and microbial alpha-galactosidases. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v.27, p.10184-90, 2006.
- FUJIMOTO, Z.; KANEKO, S.; MOMMA, M.; KOBAYASHI, H.; MIZUNO, H. Crystal Structure of Rice α -Galactosidase Complexed with D-Galactose. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.20313-20318, 2003.
- GARRO, M.S.; DE VALDEZ, G.F.; OLIVER, G.; DE GIORI, G.S. Purification of α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Biotechnology**, v.45, p.103-109, 1996.
- GERMAIN, D.P. La maladie de Fabry. Aspects cliniques et génétiques. Perspectives thérapeutiques. **Rev Méd Interne**, v.21, p.1086-1103, 2000.
- GOLDSTEIN, J.; SIVIGLIA, G.; HURST, R.; LENNY, L.; REICH, L. Group B erythrocytes enzymatically converted to group O survive normally in A, B and O individuals. **Science**, v.215, p.168-170, 1982.
- GOLUBEV, A.M.; NAGEM, R.A.P.; NETO, J.R.B.; NEUSTROV, K.N.; ENEYSKAYA, E.V.; KULMINSKAYA, A.A.; SHABALIN, K.A.; SAVEL'EV, A.N.; POLIKARPOV, I. Crystal Structure of α -Galactosidase from *Trichoderma reesei* and Its Complex with Galactose: Implications for Catalytic Mechanism. **Journal Molecular Biology**, v.339, p.413-422, 2004.
- GOTE, M.M.; KHAN, M.I.; GOKHALE, K.B.; BASTAWDE, J.M. Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). **Process Biochemistry**, v.41,

p.1311-1317, 2006.

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

GROSSMAN, G.A.; TERRA, W.R. α -Galactosidases from the larval midgut of *Tenebrio molitor* and *Spodoptera frugiperda*. **Comparative Biochemistry**, v.128, p.109-122, 2001.

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.

HOBBS, L.; MITRA, M.; PHILLIPS, R.; HAIBACH, H.; SMITH, D. Deatigenation of human type B erythrocytes with *Glicine max* α -D-galactosidase. **Biomed e Pharmacother**, v.5, p. 244-250, 1995.

JIMÉNEZ, M.J.M.; ELÍAS, L.G.; BRESSANI, R.; NAVARRETE, D.A.; GÓMEZ-BRENES, R.; MOLINA, M.R. Estudios bioquimicos y nutricionales de la semilla germinada de soya. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.35, n.3, p.480-490, 1985.

KACHURIN, A.M.; GOLUBEV, A.M.; GEISOW, M.M.; VESELKINA, O.S.; ISAEVA-IVANOVA, L.S.; NEUSTROEV, K.N. Role of methionine in the active site of α -galactosidases from *Trichoderma reesei*. **Journal of Biochemstry**, v.308, p.955-964, 1995.

KHARE, S.K.; KRISHNA, J. MUNISHWAR, N.G. Entrapment of wheat phytate in polyacrylamide gel and its application in soymilk phytate hydrolysis. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.19, p.193-198, 1994.

- KIM, W.D.; KOBAYASHI, O.; KANEKO, S. SAKAKIBARA, Y.; PARK, G.G.; KUSAKABE, I.; TANAKA, H.; KOBAYASHI, H. α -Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) cells. **Phytochemistry**, v.61, p.621-630, 2002.
- KING, M.R.; WHITE, B.A.; BLASCHEK, B.M; MACKIE, R.I.; CANN, I.K.O. Purification and characterization of a thermostable α -galactosidase from *Thermoanaerovacterium polysaccharolyticum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.5676-5682, 2002.
- KOBAYASHI, H.; SUZUKI, H. Studies on the decomposition of raffinose by α -galactosidase of mold II. Formation of mold pellet and its enzyme activity **Journal of Fermentation Technology**, v. 50, p.625-632, 1972.
- 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 soymilk hydrolysis. **Process Biochemistry**, v.33, p.337-343, 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-683, 1970.
- LANTZ, M.S.; CIBOROWSKI, P. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. **Methods Enzimol**, v. 235, p. 563-594, 1994.
- LAZO, P.S.; OCHOA, A.G.; GASCÓN, S. α -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*: cellular localization and purification of the external enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v.77, p.375-382, 1976.
- LEBLANC, J.G.; SILVESTRONI, A.; CONNES, C.; JUILLARD, V.; DE GIORI, G.S.; PIARD, J.G.; SESMA, F. Reduction of non-digestible oligosaccharides in

soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce α -galactosidase. **Genetics and Molecular Research**, v.3, p. 432-440, 2004.

LIENER, J.E. Trypsin inhibitors: Concern for human nutrition or not? **Journal Nutrition**, v.116, p.920-923, 1986.

LIMA, A.W. O; ANGNES, L. Biocatálise em meios-aquo-restritos: Fundamentos e Aplicações Analíticas. **Química nova**, v.22, p.229-243, 1999.

LIU, Y.; WU, S.; WANG, J.; YANG, L.; SUN, W. Cloning, expression, purification and characterization of a novel epoxide hidrolase from *Aspergillus niger* SQ-6. **Protein Expression and Purification**, v. 50, p.625-632, 2007.

MARANVILLE, E.; ZHU, A. The carboxyl terminus of coffee bean α -galactosidase is critical for enzyme activity. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.373, p.225-230, 2000.

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

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

MI, S.; MENG, K.; WANG, Y.; BAI, Y.; YUAN, T.; LUO, H.; YAO, B. Molecular cloning and characterization of a novel α -galactosidase gene from *Penicillium* sp. F63 CGMCC 1669 and expression in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1373-1380, 2007.

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

MONTEIRO, M.R.P. Avaliação bioquímica e nutricional do extrato hidrossolúvel obtido de farinha de soja desengordurada e emulsificada. Viçosa, MG: UFV, p.

56 (**Tese M.S**), 2000.

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

MULIMANI, V.H.; RAMALINGAM. Enzymic hydrolysis of raffinose and stachyose in soymilk by α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. *Biochemistry and molecular Biology*, v.36, p. 897-905, 1995.

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

MYAMURA, N.; ARAKI, E.; MATSUDA, K., YOSHIMURA, R., FURUKAWA, N.; TSURUSOE, K.; SHIROTANI, T.; KISHIKAWA, H.; YAMAGUCHI, K.; SHICHIRI, M. A carboxi-terminal truncation of human α -galactosidase A in a heterozygous female with Fabry disease and modification of the enzymatic activity by the caboxil-terminaldomain. Increased, reduced, or absend enzyme activity depending on number of amino acid residues deleted. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, p. 1809-1817, 1996.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J.; YOUNG, M.M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 80-85, 2006.

OHTACARA, A.; MITSUTOMI, M.; UCHIDA, Y. Purification and enzymatic properties of α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.48, p.1319-1327, 1984.

OLIVEIRA, G. Purificação parcial de caracteização bioquímico-cinética da α -galactosidase de sementes de tamboril da mata (*Platymiscium pubescens*). Viçosa-UFV, 63p, (**Tese, MS**), 2002.

PAES, M.C.D. Princípios básicos de nutrição e uso da soja na alimentação

humana. **EMBRAPA-CNPSO**, Londrina, PR, p.52, 1994.

PRASHANTH, S.J.; MULIMANI, V.H. Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* galactosidase immobilized in calcium alginate. **Process Biochemistry**, v.40, p.1199-1205, 2004.

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.; BIELY, P. Glycosylation of internal sugar residues of oligosaccharides catalyzed by α -galactosidase from *Aspergillus fumigates*. **Biochimica e Biophysica Acta**, v. 1726, p. 206-216, 2005.

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

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore. Williams and Wilkins. p. 686, 1999.

REZESSY-SZABÓ, J.M.; NGUYEN, Q.D.; HOSCHKEA.; BRAET, C.; HAJÓS, G.; CLAEYSSSENS, M. A novel thermoestable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: Purification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1770, p. 55.62, 2007.

RICHARDSON, M. Protein inhibitors of enzymes. **Food Chemistry**, v.6, p.235-253, 1981.

RIOS, S.; PEDREGOSA, A.M.; MONISTROL, I.F.; LABORDA, F. Purification and molecular properties of an α -galactosidase synthesized and secreted by *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v.112, p.35-42, 1993.

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. **Nathrung**, v.41, p.18-21, 1997.

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

SCIGELOVA, M.; CROUT, D.H.G. Purification of α -galactosidase from *Aspergillus niger* for application in the synthesis of complex oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis**, v.8, p. 175-181, 2000.

SEGEL, I. H. **Bioquímica. Teoria e Problemas**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 527p, 1979.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M.G.B.; NETO, A.G.; UETANABARO, A.P.T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, v.35, p.91-98, 2006.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações, São Paulo: Edunicamp, 517p, 1996.

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

SHANKAR, S.K.; MULIMANI, V.H. α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 958-961, 2007.

SHIVANNA, B.D.; RAMAKRISHNA, M.; RAMADOSS, C.S. Purification and properties of the anionic form of α -galactosidase from germinating guar (*Cyamopsis tetragonolobus*). **Plant Science**, v.72, p.173-180, 1990.

- SIMERSKÁ, P.; KUZMA, M.; MONTI, D.; RIVA, S.; MACKOVÁ, M.; KREN, V. Unique transglycosylation potential of extracellular α -D-galactosidase from *Talaromyces flavus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 128-134, 2006.
- SIMERSKÁ, P.; MONTI, D.; CECHOVÁ, I.; PELANTOVÁ, H.; MACKOVÁ, M.; BEZOUSKA, K.; RIVA, S.; KREN, V. Induction and characterization of an unusual α -D-galactosidase from *Talaromyces flavus*. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 61-71, 2007.
- SOMIARI, R.I.; BALOGH, E. Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.311-316, 1995.
- SPANGENBERG, P.; ANDRÉ, C.; DION, M.; RABILLER, C.; MATTES, R. Comparative study of new α -galactosidases in transglycosylation reactions. **Carbohydrate Research**, v.329, p.65-73, 2000.
- SRIPUAN, T.; KAZUHIRO, A.; YAMAMOTO, K.; TONGKAO, D.; KUMAGAI, H. Purification and characterization of thermostable α -galactosidase from *Ganoderma lucidum*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.67, p.1485-1491, 2003.
- STEGGERDA, F.R.; DIMMICK, J.F. Effect of bean diet on concentration of carbon dioxide in flatus. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.19, p.120-124, 1966.
- STENBERG, D.; VIJAYKUMAR, P.; REESE, E.T. β -glucosidase: microbiology of production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Canadian Journal Microbiology**, v.23, 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 of Clinical Nutrition**, v.69, p.135-139, 1999.
- SUGIMOTO, H.; VAN BUREN, J.P. Removal of oligosaccharides from soymilk by enzyme from *Aspergillus saitoi*. **Journal Food Science**, v.35, p.655, 1970.
- THANANUNKUL, S.; TANAKA, M.; CHICHESTER, C.O.; LEE, T.C. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of α -galactosidase within polyacrylamide gel. **Journal of Food Science**, v.41, p.173-175, 1976.
- THIPPESWAMY, J.S.; MULIMANI, V.H. Enzymatic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujiduroi*. **Process Biochemistry**, v.38, p.635-640, 2002.
- ULEZLO, I.V.; ZAPROMELOVA, O.M. Microbial α -galactosidase (a review). **Applied Biochemistry Microbiology**, v.18, p.1-12, 1982.
- VARBANETS, L.D.; MALANCHUK, V.M.; BUGLOVA, T.T.; KUHLMANN, R.A. *Penicillium* sp.23 α -galactosidase: purification and substrate specificity. **Carbohydrate Polymers**, v.44, p.357-363, 2001.
- VERDOES, J.C.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 195-205, 1995.
- VIANA, P.A.; DE REZENDE, S.T.; FALKOSKI, D.L.; LEITE, T.A.; JOSÉ, I.C.; MOREIRA, M.A.; GUIMARÃES, V.M. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidase. **Food Chemistry**, 2006.
- VIANA, P.A.; DE REZENDE, S.T.; MARQUES, V.M.; TREVIZANO, L.M.;

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

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

ZAPATER, I.G.; ULLAH, A.H.J.; WODZINSKI, R.J. Extracellular α -galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. **Preparative Biochemistry**, v.20, p.263-296, 1990.

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