

JOANA GASPERAZZO FERREIRA

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICO-CINÉTICA DE
 α -GALACTOSIDASE DE *Aspergillus terreus*

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

T

F383p
2007

Ferreira, Joana Gasperazzo, 1982-
Purificação parcial e caracterização bioquímico-cinética
de α - galactosidase de *Aspergillus terreus* / Joana
Gasperazzo Ferreira. – Viçosa, MG, 2007.
xiii, 79f. : il. ; 29cm.

Orientador: Sebastião Tavares de Rezende.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 71-79.

1. Alfa-galactosidase. 2. Cinética enzimática. 3. Enzimas
microbianas. 4. Enzimas - Biotecnologia. 5. Oligossac-
rídeos. 6. Rafinose. 7. Soja. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.756

JOANA GASPERAZZO FERREIRA

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICO-CINÉTICA DE
 α -GALACTOSIDASE DE *Aspergillus terreus*

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

APROVADA: 28 de fevereiro de 2007.

Prof^a. Juliana Lopes Rangel Fietto

Prof^a. Maria Cristina Baracat Pereira

Prof^a. Andréa de Oliveira Barros Ribon
(Co-Orientadora)

Prof^a. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Co-orientadora)

Prof. José Humberto de Queiroz
(Presidente da Banca)

Dedico este trabalho

A Deus
Aos meus pais Hélio e Jussara

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado a oportunidade de estar desenvolvendo este trabalho e de me capacitar durante todo o tempo.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola por ter me dado a oportunidade de realização do mestrado.

A Fundação e Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento da pesquisa.

Ao Prof. Sebastião Tavares de Rezende pela oportunidade, orientação durante a realização deste trabalho, apoio e amizade.

A Prof^a. Valéria Monteze Guimarães pela colaboração, sugestões e amizade.

Ao Prof. José Humberto de Queiroz pela orientação, apoio e amizade.

As co-orientadoras: Professoras Maria Goreti de Almeida Oliveira e Andréa de Oliveira Barros Ribon pelas sugestões apresentadas.

Aos amigos do laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, e análises bioquímicas: Angélica, Daniel, Juliana, Dayanny,

Pollyanna, Lílian, Ana Paula, Cristina, Solange, Ludmila e Fred, pela amizade e ajuda necessárias durante o experimento.

Aos laboratórios de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos e Análises Bioquímicas do BIOAGRO onde o experimento foi desenvolvido.

Aos funcionários do BIOAGRO pela colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao secretário Eduardo Monteiro, pela atenção e pelos e-mails.

Aos meus pais Hélio e Jussara pelo amor, atenção e apoio dedicados por toda vida.

Ao meu irmão Otávio pelo carinho e companheirismo.

Aos meus avós Geraldo, Enide e Armir pelo amor e apoio dedicados por toda vida.

As amigas e companheiras de graduação Ana Paula, Fernanda, Silvana, Cassiana e Rejane pela amizade e companheirismo.

Aos amigos da IBNV, em especial ao Pr. Marcos e a grande amiga Sorele pela amizade e apoio espiritual.

BIOGRAFIA

Joana Gasperazzo Ferreira, filha de Hélio José Santiago Ferreira e Jussara Mirtes Gasperazzo, nasceu em Vitória, Espírito Santo, no dia 7 maio de 1982.

Em abril de 2001 iniciou o curso de graduação na primeira turma do bacharelado em Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em janeiro de 2005.

Ingressou no programa de Mestrado em Bioquímica Agrícola em março de 2005, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, em março de 2007, com defesa de tese.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorvância
BSA	Albumina sérica bovina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DEAE-Sephacel	Dietil aminoetil-Sephacel
DNS	Dinitrossalicilato
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GO	Oligossacarídeos de galactose
K_{av}	Coefficiente de empacotamento molecular
kDa	Kilodalton
K_i	Constante de inibição
K_M	Constante de Michaelis-Menten
Log	Logarítimo
MM	Massa molecular
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
p/p	Peso/ peso
p/v	Peso/ volume
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio

TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade de atividade enzimática
V	Volts
v/v	Volume/volume
V_{max}	Velocidade máxima
V_o	Velocidade inicial
<i>o</i> -NP- β Gal	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
<i>o</i> -NP- β Glc	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
<i>m</i> -NP- α Gal	<i>m</i> -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo
ρ -NP- α Gal	ρ -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo
ρ -NP- α Glc	ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
ρ -NP- α Man	ρ -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo
ρ -NP- α Ara	ρ -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo
ρ -NP- β Glc	ρ -nitrofenil- β -D -glicopiranosídeo
ρ -NP- β Gal	ρ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
ρ -NP- β Xil	ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. α -Galactosidase.....	4
2.2. Estrutura tridimensional da α -galactosidase.....	6
2.3. Importância e aplicações da enzima α -galactosidase.....	8
2.4. Fontes de α -galactosidases.....	10
2.5. Fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	10
3. OBJETIVOS.....	12
1.1. Objetivo geral.....	12
1.2. Objetivos específicos.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Reagentes.....	14
4.2. Cultivo do fungo <i>Aspergillus terreus</i> para produção da enzima α -galactosidase.....	15
4.3. Determinação da atividade de α -galactosidase com diferentes substratos.....	15
4.3.1. <i>Substrato sintético p-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo (p-NP-αGal)</i>	15
4.3.2. <i>Açúcares não-redutores como substratos</i>	16
4.3.3. <i>Açúcares redutores como substratos</i>	16
4.3.4. <i>Outros substratos sintéticos</i>	17
4.3.5. <i>Polímeros naturais como substratos</i>	17
4.4. Determinação de proteína.....	17
4.5. Purificação da α -galactosidase.....	18
4.5.1. <i>Cromatografia de exclusão molecular</i>	19
4.5.2. <i>Cromatografia de interação hidrofóbica</i>	20
4.5.3. <i>Cromatografia de troca iônica</i>	20

4.6. Determinação do grau de pureza e da massa molecular da α -galactosidase.....	21
4.6.1. <i>Eletroforese</i>	21
4.6.1.2. <i>Coloração dos géis de eletroforese</i>	21
4.6.2. <i>Exclusão molecular</i>	22
4.7. Conversão das células sanguíneas tipo B em tipo O pela enzima α -galactosidase.....	23
4.8. Hidrólise de GO em leite de soja	23
4.9. Extração dos GO.....	24
4.10. Determinação do teor de GO em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	24
4.11. Caracterização bioquímica e cinética da enzima.....	25
4.11.1. <i>Efeito do pH na atividade da α-galactosidase</i>	25
4.11.2. <i>Efeito da temperatura na atividade da α-galactosidase</i>	26
4.11.3. <i>Termoestabilidade e determinação do tempo meia-vida</i>	26
4.11.4. <i>Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M ap) e velocidade máxima (V_{max})</i>	27
4.11.5. <i>Efeito de íons, açúcares e agentes redutores na atividade da α-galactosidase</i>	27
4.11.6. <i>Efeito do inibidor na atividade da α-galactosidase</i>	28
4.11.7. <i>Determinação da energia de ativação</i>	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1. Purificação da α -galactosidase de <i>Aspergillus terreus</i>	29
5.1.1. <i>Purificação enzimática</i>	29
5.1.2. <i>Estimativa da massa molecular</i>	35
5.2. Caracterização da α -galactosidase de <i>Aspergillus terreus</i>	39
5.2.1. <i>Efeito do pH</i>	39
5.2.2. <i>Efeito da temperatura</i>	40
5.2.3. <i>Análise da termoestabilidade</i>	42
5.2.4. <i>Meia-vida ($t_{1/2}$)</i>	45
5.2.5. <i>Especificidade da α-galactosidase de <i>Aspergillus terreus</i> com outros substratos</i>	47
5.2.6. <i>Constante de Michaelis-Menten (K_M ap) e velocidade máxima (V_{max} ap)</i>	50
5.2.7. <i>Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α-galactosidase de <i>Aspergillus terreus</i></i>	55
5.2.8. <i>Constante de inibição (K_i) para o açúcar galactose</i>	58
5.2.9. <i>Cálculo da energia de ativação da α-galactosidase de <i>Aspergillus terreus</i> para os substratos <i>p-NP-αGal, melibiose, rafinose e estaquiose</i>....</i>	61
5.2.10. <i>Conversão das células vermelhas sanguíneas tipo B em tipo O pela enzima α-galactosidase</i>	64
5.3. Hidrólise de oligossacarídeos de galactose em leite de soja.....	65
6. CONCLUSÕES.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

RESUMO

FERREIRA, Joana Gasperazzo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Purificação parcial e caracterização bioquímico-cinética de α -galactosidase de *Aspergillus terreus***. Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Co-Orientadores: Valéria Monteze Guimarães, Maria Goreti de Almeida Oliveira, Andréa de Oliveira Barros Ribon e José Humberto de Queiroz.

A α -galactosidase apresenta grande capacidade para hidrólise de ligações α -1,6 nos oligossacarídeos de galactose (GO) como a rafinose [O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo]. Esses açúcares estão presentes nas sementes de soja, e são responsáveis por distúrbios gastrintestinais relacionados com a ingestão de produtos derivados de soja, devido a ausência da enzima α -galactosidase na mucosa intestinal de humanos e animais monogástricos. Dessa forma, a hidrólise dos GO de produtos de soja poderá contribuir para melhorar o seu valor nutritivo. O objetivo desse trabalho foi produzir, purificar e caracterizar uma isoforma extracelular da α -galactosidase do fungo *Aspergillus terreus*, e avaliar a capacidade da enzima em promover a redução ou eliminação dos oligossacarídeos de galactose presentes em leite de soja. O fungo *A. terreus* foi cultivado em meio mineral líquido contendo farelo de trigo como fonte de carbono por 7 dias a 28 °C. O extrato enzimático foi submetido à cromatografia

em resinas de Sephacryl S-200, Phenyl-Sepharose e DEAE-Sephacel. A última etapa de purificação resultou na enzima parcialmente purificada com um fator de purificação de 26,96 vezes e um rendimento de 19,07%. A massa molecular da enzima foi estimada por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12,5%) e por cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200, de 50 kDa e 77,3 kDa, respectivamente. Atividade máxima da α -galactosidase foi determinada em pH 5,0 e 55 °C. Quando a enzima foi incubada por 6 horas no intervalo de pH 4 – 6, ela manteve mais de 90% da atividade inicial. A α -galactosidase de *A. terreus* a 50 °C perdeu 39% de sua atividade após 151 horas de incubação. Na temperatura de 55 °C a enzima conservou 33% de sua atividade após 52 horas de incubação. A 60 °C, a enzima manteve 92% da atividade inicial por 30 minutos. Na temperatura de 55 °C a meia-vida da enzima foi de 35 horas e a 60 °C de 103 minutos. Para os substratos sintéticos, a enzima demonstrou ser muito seletiva, apresentando maior afinidade pelo substrato p-NP- α Gal. A enzima hidrolisou os substratos naturais melibiose, estaquiase e rafinose, apresentando também capacidade de hidrolisar os polímeros goma guar e goma locusta. O valor de $K_{M\ ap}$ para o substrato p-NP- α Gal foi de 0,75 mM, para a melibiose de 7,39 mM, para a rafinose de 32,99 mM e para a estaquiase de 54,74 mM. A atividade enzimática foi totalmente perdida em presença de Ag^+ e parcialmente perdida quando em presença de Cu^{2+} e galactose. Na presença do substrato p-NP- α Gal a enzima foi inibida competitivamente por galactose (K_i 0,61 mM). A energia de ativação foi calculada para os substratos p-NP- α Gal (65,85 kJ/mol), melibiose (39,77 kJ/mol), rafinose (42,98 kJ/mol) e estaquiase (47,27 kJ/mol). A enzima α -galactosidase de *A. terreus* não converteu o sangue tipo B em tipo O. Após 12 horas de incubação da α -galactosidase purificada com leite de soja a 50 °C, pode-se observar que a enzima hidrolisou 100 % da rafinose e 60,3 % da estaquiase, mostrando que a α -galactosidase de *A. terreus* foi eficiente na redução de GO presentes no leite de soja.

ABSTRACT

FERREIRA, Joana Gasperazzo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2007. **Partial purification and kinetic-biochemistry characterization of α -galactosidase from *Aspergillus terreus*.** Adviser: Sebastião Tavares de Rezende. Co-Advisers: Valéria Monteze Guimarães, Maria Goreti de Almeida Oliveira, Andréa de Oliveira Barros Ribon and José Humberto de Queiroz.

The α -galactosidase has the potencial to hydrolyze α -1,6 linkages in galactose oligosaccharides (GO). These oligosaccharides are considered the major factors responsible for flatulence following ingestion of soybean and other seed legumes, due to the absence of this enzyme in the intestinal mucous membrane of men and monogastrics animals. Therefore, the most important factor for improvement of the soy nutritional value is to eliminate the GO from soy products. The aims of this work was to produce, purify and characterize one extracellular isoform of α -galactosidase from *Aspergillus terreus* and evaluate the hydrolysis of GO presents in soybean milk. The fungus *A. terreus* was cultivated in mineral medium containing wheat bran as carbon source for 7 days at 28 °C. The enzymatic extracts were submitted to the chromatography in Sephacryl S-200, Phenyl-Sepharose and DEAE-Sephacel resins. The last purification step resulted in a purification factor of 26.96 times with a recovery of

19.07 %. A molecular mass of 50 kDa was determined by SDS-PAGE while the elution of the α -galactosidase from Sephacryl S-200 showed a molecular mass of 77.3 kDa. The maximum activities of the α -galactosidase were detected in pH 5.0 at 55 °C. The enzyme maintained 90 % of its original activity after incubation in pH 4 – 6 at 40 °C. The α -galactosidase lost 39 % of its initial activity after pre-incubation for 151 hours at 50 °C. At 55 °C the enzyme maintained 33 % of this original activity after 52 hours and at 60 °C 92 % of its initial activity was maintained for 30 minutes. The half-lives at 55 and 60 °C were 35 hours and 103 minutes, respectively. The relative rate of hydrolysis of various substrates were as follows p -NP- α Gal > melibiose > m -NP- α Gal > raffinose > stachyose > locust bean gum > guar gum. The values of $K_{M, ap}$ for p -NP- α Gal, melibiose, raffinose and stachyose were 0.75, 7.39, 32.99 and 54.74 mM, respectively. The enzyme was totally inhibited by silver nitrate, and partially inhibited by Cu^{2+} and galactose. In the presence of the substrate p -NP- α Gal the enzyme showed a competitive inhibition by galactose (K_i 0,61 mM). The energy of activation for p -NP- α Gal, melibiose, raffinose, and stachyose were 65.85, 39.77, 42.98 and 47.27 kJ/mol, respectively. The α -galactosidase was not able to convert erythrocytes of group B blood cells to group O type cells. The results of treatments of soy milk at 50 °C with α -galactosidase semi-purified for 12 hours showed reduction of 100 % in the raffinose and 60.3 % in the stachyose. Therefore, it can be observed that the α -galactosidase from *A. terreus* was efficiently reduced the GO present in soy milk.

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas que possuem atividade catalítica. Elas têm um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram as reações químicas de uma maneira formidável e funcionam em soluções aquosas sob condições muito suaves de temperatura e pH. As enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico.

Devido à alta seletividade das enzimas pelo seu substrato, tais reações dispõem de poucos subprodutos, fazendo com que as enzimas sejam uma alternativa aos catalisadores químicos convencionais utilizados nas indústrias. Tal vantagem resultou em aplicações das enzimas nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (SCHIMID *et al.*, 2001).

Melhorias nos processos industriais como aumento de rendimento e redução na demanda de matéria-prima, emissões e desperdício, resultam em processos econômicos, dando vantagem aos bioprocessos sobre as tradicionais rotas químicas (SCHIMID *et al.*, 2002).

Na indústria alimentícia a catalase é utilizada para remoção de peróxidos adicionados aos alimentos como conservantes (TSUGE *et al.*, 1975). A invertase é usada na hidrólise de sacarose, obtendo-se uma mistura equimolecular de glicose e frutose, açúcar invertido (VITOLLO e YASSUDA, 1991). A invertase também é utilizada na produção de bombons com miolo parcial ou totalmente liquefeito (PARKIN, 1993), de marzipan (WALSH e

HEADON, 1994), em produtos de higiene bucal (RIBEIRO, 1997), na hidrólise de rafinose e inulina para a obtenção de melibiose e D-frutose, respectivamente (WISEMAN, 1975). Já a enzima amilase é utilizada para hidrolisar o amido até oligossacarídeos compostos por unidades de glicose (WINDISH e MHATRE, 1965). Recentemente, xaropes de frutose, um adoçante de baixa caloria e alto poder adoçante, feitos através da isomerização de xarope de glicose se tornou o principal uso de hidrolisados de amido (SAID e PIETRO, 2004).

As enzimas também estão sendo utilizadas nas indústrias têxteis, visto que os processos convencionais geram altos gastos de energia e alto consumo de água, o que contribui para a poluição do meio ambiente (KIRK *et al*, 2002). Um dos passos de maior gasto de energia e água no processamento do algodão, é a mercerização, no qual ocorre a remoção de vários componentes restantes da parede celular, o qual é realizado em condições de altas temperaturas e forte alcalinidade. Como alternativa, quando se utiliza a pectina liase nesse processo, é necessário a utilização de baixas temperaturas e menor consumo de água (TZANOV *et al.*, 2001).

As celulasas são comumente aplicadas em vários segmentos industriais, como na indústria alimentícia; cerveja e vinho; agrícola; têxtil; detergente; nutrição animal e polpa e papel (JAN e CHEN, 2003 e de GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2005). Essa enzima é uma glicoproteína capaz de romper as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 de microfibrilas da celulose resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (SAID e PIETRO, 2004). A maior produção de celulasas e hemicelulasas é proveniente das cepas de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (BHAT, 2000 e DIENES *et al.*, 2004).

Enzimas estão também sendo empregadas no tratamento de efluentes (KARAM e NICELL, 1997). As lipases têm sido utilizadas na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral (GANDHI, 1997, PANDEY *et al.*, 1999 e DE CASTRO *et al.*, 2004). Esses resíduos contêm elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio, tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica

(RAUNKJAER *et al.*, 1997). Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídeos, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (MASSE *et al.*, 2001).

As enzimas estão sendo utilizadas em diferentes processos industriais, resultando numa significativa economia de recursos, como energia e água, para beneficiamento do meio ambiente. Vê-se a importância necessária no desenvolvimento de pesquisas para produção e caracterização de enzimas de interesse biotecnológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. α -Galactosidase

A enzima α -galactosidase [α -D-Galactosil galactohidrolases (E.C. 3.2.1.22)] é uma exoglicosidase, capaz de catalisar a clivagem do terminal α -1,6 de resíduos de galactosil de vários tipos de substratos (Figura 1), incluindo oligossacarídeos lineares e ramificados, polissacarídeos e substratos sintéticos como o *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (Figura 2) (MURATA e USUI, 1997), os quais podem estar distribuídos nas formas intra ou extracelular em procaríotos e eucariotos (DEAN e SWEELEY, 1979; CALHOUN *et al*, 1985; DEY *et al*, 1983; ITOH *et al.*, 1986).

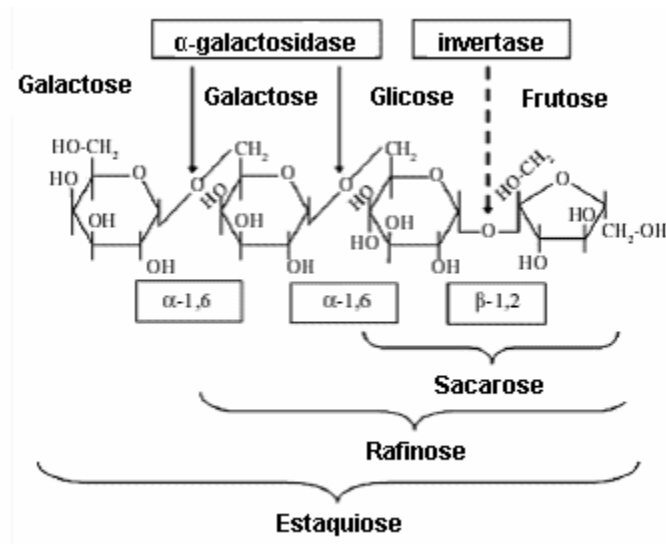


Figura 1 - Estrutura da rafinose e estaquiose e as enzimas que catalisam sua hidrólise (LeBLANC *et al.*, 2004).

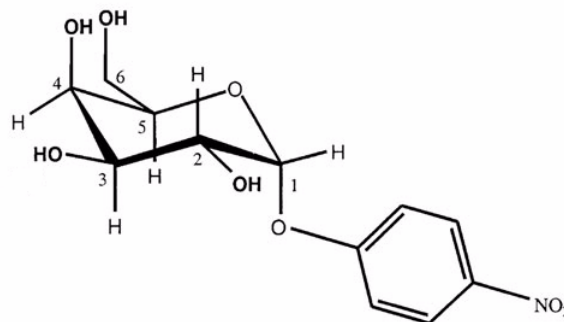


Figura 2 – Estrutura do substrato sintético p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (WEINGLASS *et al.*, 2003).

A reação catalisada pela α -galactosidase está representada na Figura 3.

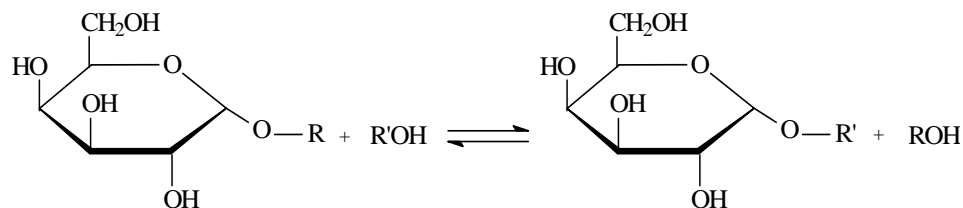


Figura 3 – Esquema da reação catalisada pela α -galactosidase.

A molécula hidroxílica acceptora, R'OH, da Figura 3 é comumente a água, embora R e R' possam ser grupos alifáticos ou aromáticos.

2.2. Estrutura tridimensional da α -galactosidase

Recentes estudos demonstraram a estrutura tridimensional da α -galactosidase de arroz (FUJIMOTO *et al.*, 2003) e α -galactosidase do fungo mesofílico *Trichoderma reesei* (GOLUBEV *et al.*, 2004).

De acordo com Golubev e colaboradores (2004), a α -galactosidase de *Trichoderma reesei* consiste de uma única cadeia polipeptídica de 417 resíduos de aminoácidos, 17 resíduos de monossacarídeos que participam da ligação entre quatro cadeias de oligossacarídeos N-ligados e 621 moléculas de água ordenadas. Em adição, duas moléculas de glicerol foram encontradas no sítio ativo da apoenzima na posição do ligante. A estrutura da proteína compreende 19 α -hélices e 16 folhas β , as quais representam 29% e 19%, respectivamente, do total de números de resíduos. A α -galactosidase dobra-se formando dois domínios. O domínio N-terminal A (resíduos 1 - 320) é um barril (β/α)₈ uma estrutura com oito fitas paralelas que se enrolam em torno de um eixo central e é circundado por oito hélices largas. O pequeno domínio C-terminal B (resíduos 320 – 417) é composto por oito fitas antiparalelas empacotadas em duas folhas em um enovelamento sanduíche contendo um motivo chave grega. β -D-galactose, Asp 132 e Asp 226 participam da catálise e dois resíduos de Trp estão envolvidos em importantes interações hidrofóbicas com o substrato. A

estrutura tridimensional da α -galactosidase de *Trichoderma reesei* e de arroz estão apresentadas na Figura 4.

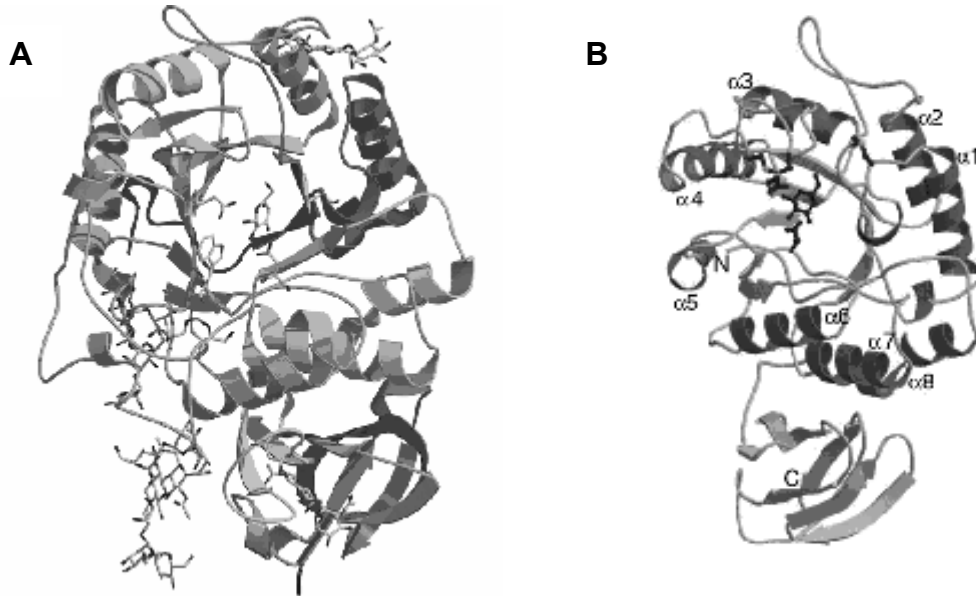


Figura 4 – A – Estrutura tridimensional da α -galactosidase de *Trichoderma reesei* (GOLUBEV *et al.*, 2004). **B –** Estrutura tridimensional da α -galactosidase de arroz (FUJIMOTO *et al.*, 2003).

De acordo com FUJIMOTO e colaboradores (2003), o modelo final para a α -galactosidase de arroz consistiu de uma única cadeia de 362 resíduos de aminoácidos com um domínio catalítico (1-278) e um domínio C-terminal (279-362). 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 barril β central do domínio catalítico. Os resíduos de aminoácidos encontrados na região do sítio catalítico foram dois ácidos aspárticos. O papel do domínio C-terminal ainda é desconhecido.

2.3. Importância e aplicações da enzima α -galactosidase

α -Galactosidases estão geralmente envolvidas na utilização metabólica de oligossacarídeos como a rafinose, estaquiase, melibiose e galactomananas, os quais estão amplamente distribuídos em forma de armazenamento em muitos organismos como em sementes, raízes e tubérculos (KANDLER e HOLF, 1980).

Em plantas, a α -galactosidase é importante para germinação das sementes (WANKHEDE *et al.*, 1977). Oligossacarídeos são fontes primárias de energia e substrato durante a germinação (JIMENÉZ *et al.*, 1985). A rafinose é armazenada nos órgãos de reserva, sendo utilizada como precursora para a síntese de outros oligossacarídeos ou hidrolisada por α -galactosidases (DEY *et al.*, 1985). As sementes maduras possuem diferentes formas de α -galactosidases (LAHUTA *et al.*, 2000), as quais atuam na hidrólise enzimática de hemicelulose, como galactoglicomananos (ZEILINGER *et al.*, 1993).

Em humanos, a α -galactosidase é uma enzima lisossomal, necessária para o metabolismo de glicosfingolípídeos. A sua deficiência resulta na doença de Fabry, a qual é uma doença hereditária ligada ao cromossomo X, caracterizada pelo acúmulo de glicosfingolípídeos neutros no terminal α -galactosil nos tecidos e fluidos (DESNICK *et al.*, 1987; MARANVILLE e 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 glicosfingolípídios, 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.

As α -galactosidases também estão envolvidas na reação de transglicosilação (DEY e PRIDHAM, 1972), reação na qual a enzima é capaz de transferir uma molécula de galactose a partir de uma melibiose para uma segunda molécula de melibiose aceptora formando uma maninotriose.

Essa enzima possui um importante papel biotecnológico e medicinal. Estudos de imobilização de α -galactosidase em náilon foram desenvolvidos com o objetivo de hidrolisar rafinose em melaço de beterraba (THIPPESWAMY e MULIMANI, 2002).

Uma importante aplicação industrial das α -galactosidases é na indústria de fabricação de açúcar (LINDEN, 1982 e GANTER *et al.*, 1988). Pequenas quantidades de rafinose e/ou estaquiose afetam negativamente a cristalização da sacarose. Porém, eles podem ser facilmente convertidos a sacarose pelo tratamento com α -galactosidases (CRUZ e PARK, 1982; MULIMANI e RAMALINGAM, 1995).

A α -galactosidase também é utilizada na indústria de leite de soja, o qual é considerado um substituto ao leite de vaca por pessoas que possuem intolerância a lactose. Entretanto, a soja contém muitos fatores antinutricionais, como a família de oligossacarídeos de rafinose (CRISTOFARO e WUHRMANN, 1974). Como a mucosa intestinal dos humanos não possui a enzima α -galactosidase, essencial para a hidrólise desses oligossacarídeos (GITZELMANN e AURICCHIO, 1965), os microrganismos existentes no trato intestinal fermentam esses açúcares, levando à produção de gases que causam a flatulência (STEGGERDA *et al.*, 1966).

As α -galactosidases de eucariotos são capazes de remover resíduos de galactose da ligação α -1,3 terminal de glucanas utilizada na conversão de sangue do grupo B para sangue do grupo O (ZHU e 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 à membrana do eritrócito, o qual é precursor das células do grupo B. Dessa forma, a 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 sanguínea.

2.4. Fontes de α -galactosidases

Muitos microrganismos, plantas e animais produzem múltiplas formas de α -galactosidases (DEY e PRIDHAM, 1972). A α -galactosidase tem sido obtida a partir de muitas espécies de fungos, dentre eles, *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 (ZAPATER *et al.*, 1990), *Aspergillus niger* (SOMIARI e BALOG, 1992), *Aspergillus fumigatus* (de REZENDE *et al.*, 2005), *Penicillium griseoroseum* e *Aspergillus terreus* (FALKOSKI *et al.*, 2006).

A produção da enzima α -galactosidase consiste no crescimento do microrganismo em meio de cultura seletivo, geralmente meio mineral líquido contendo uma fonte de carbono indutora da atividade enzimática. Açúcares como galactose, melibiose, rafinose e estaquiose já foram descritos como indutores da atividade de α -galactosidase (de REZENDE, 1998). Alguns fungos, *Aspergillus fumigatus* (de REZENDE, 1998), *Trichoderma reesei* (ZEILINGER *et al.*, 1993) e *Penicillium simplicissimum* (LUONTERI *et al.*, 1998) utilizaram a galactose como fonte de carbono. Galactomananas, como a goma guar e a goma locusta, também foram descritas como fontes de carbono. A goma guar foi utilizada para o crescimento do fungo *Aspergillus oryzae* (PRASHANTH e MULIMANI, 2005) e a goma locusta foi utilizada como fonte de carbono pelos fungos *Aspergillus niger* (ADEMARK *et al.*, 2001) e *Thermomyces lanuginosus* (PUCHART *et al.*, 2000).

2.5. Fungos do gênero *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são filamentosos e produzem esporos que são encontrados na atmosfera. 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).

Fungos, em particular do gênero *Aspergillus*, são conhecidos pela sua superprodução de variados ácidos orgânicos, entre eles, ácido cítrico, ácido glicônico e ácido itacônico (KARAFFA et al., 2001). O fungo *Aspergillus niger* IIB-6 é utilizado na produção de ácido cítrico (ALI, 2006). Os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* são capazes de produzir enzimas em grande quantidade, e essas enzimas estão envolvidas na degradação de componentes da parede celular de células vegetais (celulases, hemicelulases, pectinases, glicosidases e fitases), na degradação do amido (amilases), de lipídeos (lipases) e de proteínas (proteases e peptidases) e também na degradação de compostos fenólicos (lacases) (MacCABE et al., 2002).

O fungo *A. terreus* apresenta importante aplicação na produção da lovastatina, a qual é utilizada como no tratamento da hipercolesterolemia. Essa substância promove uma inibição competitiva da enzima HMG-CoA redutase, a qual participa da rota de biossíntese do colesterol (Figura 5).

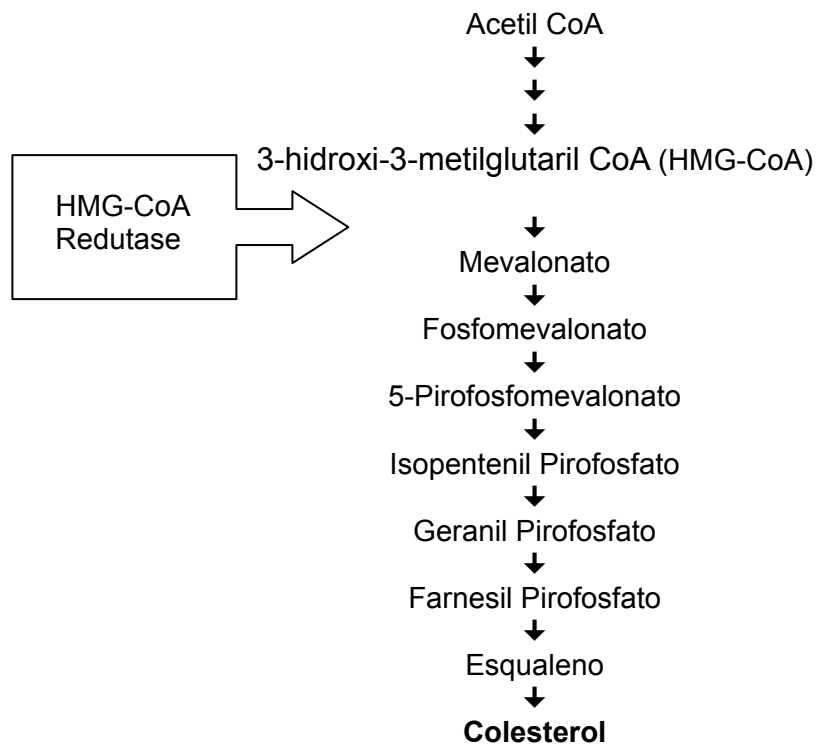


Figura 5 – Via de biossíntese do colesterol.

Estudos realizados com o *A. terreus* mostraram que a lovastatina é um produto metabólico secundário, e é secretado em grande quantidade para o meio de cultura (CASAS LOPEZ *et al.*, 2003; BIZUKOJC *et al.*, 2007). *Aspergillus terreus* também é utilizado para produção de ácido itacônico (ácido siccínico melileno) (BILLINGTON, 1969; BONNARME *et al.*, 1995), o qual é usado como monômero para fibra acrílica, como plastificantes, como aditivo para lubrificantes e na fabricação de resinas. Este fungo também apresenta importante aplicação na biorremediação, pois as cepas são capazes de absorver Cu^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} do meio (GULATI *et al.*, 1999).

Considerando a possibilidade de aplicações biotecnológicas diversas para a enzima em estudo, existe a necessidade de caracterizar bioquímica e cineticamente a enzima α -galactosidase de *A. terreus*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi produzir, purificar e caracterizar bioquímica e cineticamente uma isoforma extracelular da enzima α -galactosidase do fungo *Aspergillus terreus*, e avaliar seus potenciais biotecnológicos, especialmente visando a redução ou eliminação dos oligossacarídeos de galactose presentes em produtos derivados de soja.

3.2. Objetivos específicos

Produzir e purificar uma forma da enzima α -galactosidase produzida pelo fungo *A. terreus*;

Caracterizar bioquímica e cineticamente a enzima α -galactosidase: estabilidade da enzima em diferentes valores de pH; efeito da temperatura sobre a atividade enzimática; termoestabilidade e meia-vida; efeito de íons e outros compostos na atividade enzimática; especificidade da enzima por diferentes substratos naturais, sintéticos e polímeros; K_M ap e V_{max} ap para

diferentes substratos; determinação de possíveis inibidores; tipo de inibição e K_i e determinação da energia de ativação.

Avaliar a capacidade hidrolítica da α -galactosidase sobre os oligossacarídeos de galactose (GO) presentes no leite de soja;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1. Reagentes

ρ -Nitrofenil- α D-galactopiranosídeo (ρ -NP- α Gal), ρ -nitrofenol, rafinose, estaquiose, glicose, melibiose, galactose foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

As resinas cromatográficas Sephacryl S-200, phenyl-Sepharose e DEAE-Sepharcel foram obtidas da Amersham Biosciences.

Os açúcares sacarose e frutose, e o reagente nitrato de prata foram obtidos da Merck S. A. Indústria Química.

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

A soja utilizada para obtenção do leite de soja foi a variedade UFV TN 105.

4.2. Cultivo do fungo *Aspergillus terreus* para produção da enzima α -galactosidase

A cepa do fungo *A. terreus* foi adquirida da Fundação Tropical de Pesquisa André Toselo, Campinas, SP, Brasil.

O fungo foi repicado em meio sólido nutritivo BDA (ágar batata dextrosado), em tubo de ensaio inclinado, e incubado a 28 °C por seis dias para multiplicação de esporos. Após o crescimento, foram adicionados ao tubo 10 mL de água destilada e esterilizada. Dessa suspensão de esporos, alíquotas foram retiradas e transferidas para Erlenmeyers contendo 250 mL de meio mineral líquido e 25 g de farelo de trigo (Pró-vita), e os frascos então incubados sob agitação constante de 150 rpm a 28 °C por 168 horas. O meio mineral líquido utilizado continha 7,0 g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 2,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,1g.L⁻¹ de MgSO₄; 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura.

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

4.3.1. Substrato sintético p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p -NP- α Gal)

O ensaio padrão para a determinação da atividade de α -galactosidase foi conduzido utilizando o substrato sintético p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p -NP- α Gal). Para esse ensaio, a mistura de reação teve um volume final de 1 mL, contendo 650-750 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 (exceto para a curva de pH); 0-100 μ L de extrato enzimático e 250 μ L da solução de p -NP- α Gal 2 mM. A reação foi conduzida por 15 minutos em banho-maria a 40 °C nos ensaios de purificação e a 55 °C nos demais ensaios, e interrompida com adição de 1 mL de Na₂CO₃ 0,5 M. Os valores de absorvância obtidos a 405 nm foram convertidos em concentração de p -NP por meio de uma curva analítica construída com concentrações variando de 0 até 0,16 μ moles. A atividade de α -galactosidase foi expressa em mM.min⁻¹. A quantificação da atividade de α -galactosidase nas amostras enzimáticas foi por meio da Unidade de Atividade,

que significa a quantidade de enzima que promove a formação de 1 micromol de p-NP por minuto nas condições de ensaio acima descritas.

4.3.2. Açúcares não-redutores como substratos

Ensaio para a atividade de α -galactosidase foram realizados com os açúcares não-redutores rafinose e estaquiose, com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) (MILLER, 1956). O sistema de reação continha 100 a 300 μ L de enzima purificada, 250 μ L de solução de açúcar (sacarose, rafinose ou estaquiose) 100 mM e 600-800 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. O ensaio foi conduzido por 20 min, a 55 °C. Após esse período, foi adicionado 1,0 mL do reagente de DNS. A amostra foi fervida por 5 minutos e foi acrescentado 1,0 mL de água. A mistura da reação foi deixada em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. A quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, por meio de uma curva padrão construída com 0-20 μ moles de glicose, utilizando solução estoque de concentração 1 mg.mL⁻¹.

4.3.3. Açúcares redutores como substratos

Os ensaios da atividade de α -galactosidase contra açúcares redutores melibiose, lactose e maltose foram realizados por meio da medida de formação de glicose, pelo método da glicose oxidase (STERNBERG *et al.*, 1970), utilizando um kit comercial (Bioclim). O ensaio foi conduzido com 200-500 μ L da enzima purificada, 200 μ L de solução de açúcar redutor 100 mM e 300-600 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A reação foi conduzida por 30 minutos a 55 °C, sendo interrompida pela imersão dos tubos em banho de água fervente, por 5 minutos, e posteriormente colocados em água fria. Em cada tubo, foi adicionado 500 μ L do reativo de glicose oxidase e incubados por 15 minutos, 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 μ moles de glicose, utilizando solução estoque de concentração 1 mg.mL⁻¹.

4.3.4. Outros substratos sintéticos

Os ensaios das atividades da α -galactosidase foram idênticos ao descrito no item 3.4.1, exceto que foram utilizados os substratos sintéticos *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (*o*-NP- β Gal), 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ -NP- α Gal), ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (ρ -NP- α Glc), ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ -NP- β Glc), *m*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (*m*-NP- α Gal), ρ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ρ -NP- β Gal), ρ -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (ρ -NP- α M), *o*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*o*-NP- β Glc), ρ -nitrofenil- α -L-arabinopiranosídeo (ρ -NP- α A) e ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ -NP- β X) na concentração de 2 mM.

4.3.5. Polímeros naturais como substratos

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 μ L da enzima parcialmente purificada e 500 μ L do substrato goma guar e goma locusta 1% (p/v) tamponada em pH 5,0. As amostras foram incubadas por 4 horas a 50°C.

4.4. Determinação da concentração de proteína

Para determinar a concentração protéica do extrato enzimático, foi utilizada a metodologia descrita por BRADFORD (1976). Para o ensaio foram utilizados 200 μ L do extrato enzimático, 600 μ L de água destilada e 200 μ L do reagente de Bradford 5X. Após 15 minutos de reação, foi feita a leitura a 595 nm e os valores de absorvância foram convertidos em concentração de proteína utilizando uma curva padrão feita com 0 a 20 μ g de BSA (albumina

sérica bovina). A concentração de proteína foi expressa em mg de proteína por mL de extrato enzimático.

Para construção da tabela de purificação, as proteínas totais foram determinadas pelo método BCA (ácido bicinconínico) (SMITH *et al.*, 1985). Para o ensaio foram utilizados 100 ou 300 μ L da enzima e 1 mL do reagente BCA, em intervalos de 30 segundos e os tubos foram incubados por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, os tubos foram retirados do banho-maria em intervalos de 30 segundos e deixados por 20 minutos a temperatura ambiente. Decorridos os 20 minutos, foi feita a leitura a 562 nm a cada 30 segundos. A concentração de proteína foi expressa em mg de proteína por mL de extrato enzimático.

4.5. Purificação da α -galactosidase

A purificação parcial da enzima α -galactosidase de *A. terreus* foi feita conforme a Figura 6.

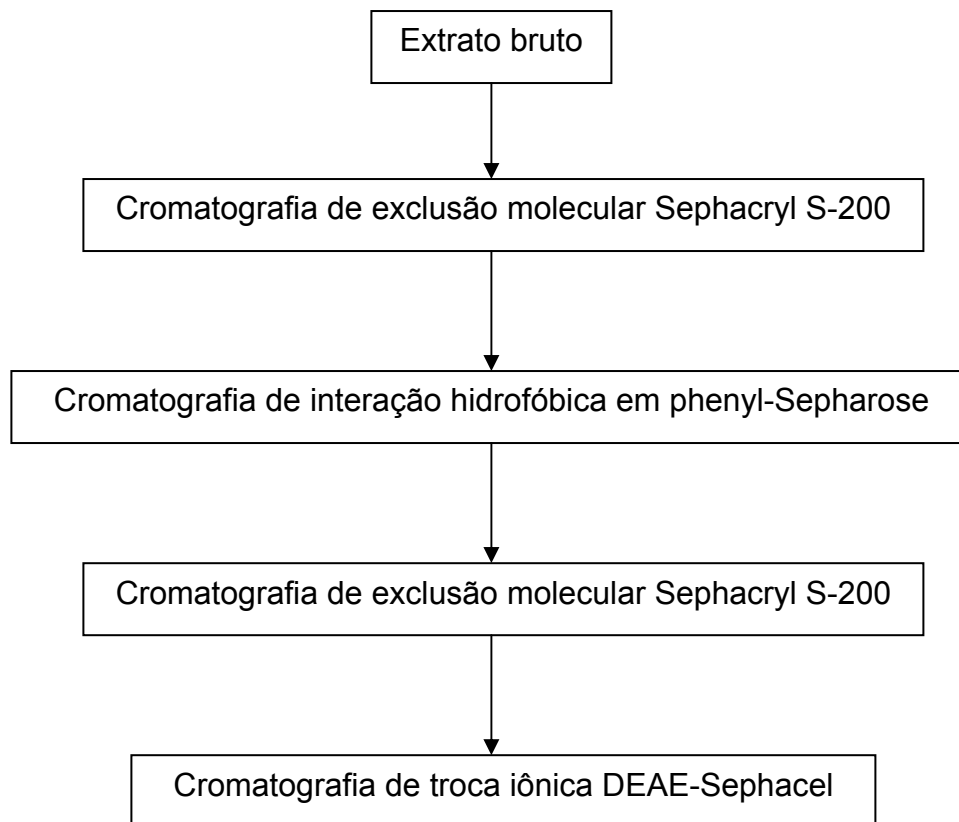


Figura 6 - Seqüência das etapas cromatográficas utilizadas na purificação da α -galactosidase de *Aspergillus terreus*.

4.5.1. Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200

O sobrenadante da cultura do *A. terreus*, cultivado por 168 horas a 28 °C em meio mineral líquido contendo farelo de trigo, foi concentrado por ultrafiltração utilizando uma membrana para filtro Amicon PM 10, e posteriormente submetido à cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-200 (87,5 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 3,5 mL. As frações com atividade de α -galactosidase foram reunidas e submetidas a cromatografia de interação hidrofóbica.

As frações que continham atividade de α -galactosidase, provenientes da cromatografia de interação hidrofóbica, foram concentradas em filtro Amicon utilizando uma membrana de celulose regenerada com poro de 10 kDa e em seguida submetidas novamente à cromatografia de exclusão molecular em resina de Sephacryl S-200 (90 x 2,5 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,5. As proteínas foram eluídas da mesma maneira que a primeira cromatografia de exclusão molecular.

4.5.2. Cromatografia de interação hidrofóbica

As frações que continham atividade de α -galactosidase, provenientes da etapa anterior de purificação, foram submetidas à cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl-Sepharose (9,5 x 1,5 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 um gradiente salino decrescente, formado por seis volumes da coluna de tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,0 contendo 1 M de sulfato de amônio e tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,0 sem sulfato de amônio. A cromatografia foi realizada a 4 °C, com fluxo de 50 mL.h⁻¹. Frações de 3,5 mL foram coletadas e as que apresentaram atividade de α -galactosidase foram então reunidas.

4.5.3. Cromatografia de troca iônica

As frações reunidas na etapa anterior de exclusão molecular, foram submetidas à cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephacel (7,5 x 1,5 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas com um gradiente salino crescente, formado por oito volumes da coluna de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0, acrescidos de 0,3 M de NaCl. A cromatografia foi realizada a 4 °C, com fluxo de 40 mL.h⁻¹. Frações de 3,5 mL foram coletadas e as que apresentaram atividade de α -galactosidase foram reunidas.

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

4.6.1. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

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 4 minutos e aplicadas no gel. A eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), contendo SDS e β -mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por LAEMMLI (1970). A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente, a 100 V, em placas do Sistema Mini-Gel da Sigma Chemical Co.

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).

4.6.1.2. Coloração dos géis de eletroforese

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

Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em solução fixadora (50% de metanol, 12% de ácido acético glacial e 38% de água destilada) por 12 horas. Posteriormente, o gel foi lavado três vezes com solução de etanol 50 %, durante 10 minutos. Em seguida, o gel foi lavado por 1 minuto com solução de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v). Depois o gel foi lavado três vezes 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 minutos 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 µL de formaldeído 37%), até visualização das bandas protéicas. A reação foi interrompida com adição de 3 mL de ácido acético glacial.

4.6.2. Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200

A massa molecular da enzima parcialmente purificada foi estimada por cromatografia de exclusão molecular usando resina Sephacryl S-200 (70 x 1,6 cm). Foi inicialmente determinado o volume vazio da coluna utilizando uma solução de dextrana azul. Posteriormente, a coluna foi equilibrada com tampão fosfato 100 mM, pH 6,5 e calibrada com os seguintes marcadores de massa molecular (Pharmacia): ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), albumina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), quimotripsinogênio (25 kDa) e ribonuclease A (13,7 kDa). Foram determinados os volumes de eluição de cada proteína marcadora e calculados o K_{av} (coeficiente de empacotamento molecular) para cada proteína pela seguinte fórmula:

$$K_{av} = (V_c - V_o) / (V_t - V_o)$$

Onde: V_c = volume da fração que apresentou maior atividade

V_o = volume vazio da coluna

V_t = Volume total da coluna

Foi aplicado 1 U da enzima purificada na resina Sephacryl S-200, sob fluxo de 30 mL.h⁻¹ e coletadas frações de 1 mL. Foram feitos ensaios com as frações coletadas para determinar a atividade enzimática, conforme descrito no item 4.3.1. Em seguida, foi calculado o valor de K_{av} para a fração que apresentou maior atividade enzimática e a MM da enzima foi estimada pela curva de calibração da coluna ($K_{av} \times \text{Log MM}$).

4.7. Conversão das células vermelhas sanguíneas tipo B em tipo O pela enzima α -galactosidase

Os eritrócitos humanos B⁺ coletados foram armazenados a 4 °C em citrato de sódio 0,105 M e determinado o seu hematócrito no laboratório da Unidade de Saúde da UFV. As células foram centrifugadas por cinco minutos a 3000 rpm em centrífuga Excelsa Baby II 206-R, sendo as hemácias separadas do plasma. As células foram então lavadas cinco vezes com tampão GCB 5X (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 GCB para um hematócrito que contenha 8% dos eritrócitos B⁺. Para essa diluição foram utilizados 2,3 mL (10 U) da enzima α -galactosidase parcialmente purificada, 1 mL de hemácia e 9,2 mL do tampão GCB. A mistura reacional foi incubada por quatro horas a 35 °C. Após a incubação, as células foram lavadas cinco vezes com tampão PBS 5X (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). Se não houver aglutinação é sinal que as células que continham o antígeno B foram convertidas em antígeno H.

4.8. Hidrólise de GO em leite de soja

Para o preparo do extrato hidrossolúvel de soja (leite de soja), foram pesadas 50 g de sementes de soja UFV TN 105, lavadas em água fervente por 5 minutos sendo adicionados 400 mL de água a 80 °C e colocadas no liquidificador por 5 minutos. O leite de soja foi filtrado e fervido por 10 minutos.

Alíquotas de 2,5 mL do leite de soja foram transferidas para Erlenmeyers de 25 mL em duplicata. Em cada Erlenmeyer foram adicionados 2,5 mL da α -galactosidase de *Aspergillus terreus* (5 U) e incubados em agitador de frascos a 100 rpm por até 12 horas a 50 °C.

Para a determinação da porcentagem de hidrólise dos GO presentes no leite de soja, essas preparações foram liofilizadas e os GO extraídos de 30 mg

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

4.9. Extração dos GO

As extrações dos GO do leite de soja tratado enzimaticamente, foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por VIANA *et al.* (2006), com modificações. Aproximadamente 30 mg das amostras liofilizadas pesadas em tubos tipo eppendorf foram usadas para o processo de extração. A fração óleo, presente nas amostras, foi retirada em 4 extrações com 1 mL de éter de petróleo a 42 °C por 5 minutos. Os açúcares foram extraídos em três etapas sucessivas de tratamento com etanol 80%, a 100 °C, por 5 minutos. Após cada extração feita com éter de petróleo ou álcool 80%, a mistura foi centrifugada em centrífuga tipo Eppendorff 5415C (14.000 rpm) por 20 minutos. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50 °C, e os açúcares ressuspendidos em 1,2 mL de etanol 80% e congelados a -20 °C. Após 24 horas, 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).

4.10. Determinação do teor de GO por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os GO extraídos do leite de soja tratados enzimaticamente com a α -galactosidase, foram analisados por CLAE em cromatógrafo Shimadizu série 10A, equipado com detector de índice de refração e coluna em aço inox (25 x 0,465 cm) contendo como fase estacionária o grupo aminopropil. Como fase móvel, foi utilizada 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 estaquiase nas concentrações de 4, 4, 8 e 8 % (p/v), respectivamente, foram feitas diluições de (2, 2,66, 4, 8, 16, 32, 64 e 128) vezes para obtenção das soluções padrão. Cada solução padrão foi injetada no CLAE 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.

4.11. Caracterização bioquímica e cinética da enzima

4.11.1. Efeito do pH na atividade da α -galactosidase

Foi determinado o pH ótimo para a atividade de α -galactosidase na fração purificada. O ensaio foi realizado com 700 μ L de tampão McIlvaine (McILVAINE, 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), 50 μ L da fração enzimática purificada diluída duas vezes e 250 μ L de p-NP- α Gal 2 mM. A mistura foi incubada a 40 °C por 15 minutos e em seguida foi adicionado 1 mL de solução 0,5 M de carbonato de sódio para o aparecimento da cor. As leituras das absorvâncias foram feitas a 405 nm.

Foi também determinada a estabilidade da enzima nos diferentes valores de pH. Para este ensaio, 110 μ L da enzima purificada e 440 μ L do tampão McIlvaine (McILVAINE, 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) foram incubados em banho-maria a 40 °C por 6 horas. Após o tempo de pré-incubação, foi realizado um ensaio enzimático utilizando 125 μ L da enzima pré-incubada, 625 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e 250 μ L de p-NP- α Gal 2 mM. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a

40 °C por 15 minutos, e em seguida foi adicionado 1 mL de solução 0,5 M de carbonato de sódio para o aparecimento da cor. As leituras das absorvâncias foram feitas a 405 nm.

4.11.2. Efeito da temperatura na atividade da α -galactosidase

A determinação da temperatura de maior atividade para a α -galactosidase foi realizada com a fração enzimática purificada. 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. Foi avaliada a temperatura de maior atividade da enzima purificada, incubando as misturas reacionais nas temperaturas que variaram de 30-65 °C, em intervalos de 5 °C.

4.11.3. Termoestabilidade e determinação da meia-vida

A termoestabilidade da enzima α -galactosidase da fração enzimática purificada foi testada nas temperaturas de 50 °C, 55 °C e 60 °C. Alíquotas da fração purificada, juntamente com tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 foram pré-incubadas em banho-maria nas temperaturas de 50 °C, 55 °C e 60 °C por variados tempos. Após cada tempo de pré-incubação foram retirados 100 μ L da enzima e realizado o ensaio com 700 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0, 50 μ L da enzima diluída duas vezes e 250 μ L de p-NP- α Gal 2 mM. A mistura foi incubada em banho-maria a 55 °C por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 0,5 M para paralisar a reação.

A meia-vida da enzima α -galactosidase foi determinada nas temperaturas de 55 °C e 60 °C. Nesse ensaio, a enzima em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 foi pré-incubada por variados tempos, ou seja, até a perda da metade da atividade enzimática inicial. Após cada tempo de pré-incubação foram retiradas 100 μ L da enzima e realizado o ensaio conforme descrito no item 4.3.1.

4.11.4. Determinação da constante de Michaelis-Menten ($K_{M\ ap}$) e velocidade máxima ($V_{max\ ap}$)

Os valores de $K_{M\ ap}$ e $V_{max\ ap}$ para os diferentes substratos foram obtidos para a α -galactosidase de *A. terreus*. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados com diferentes concentrações do substrato p -NP- α Gal, melibiose, rafinose e estaquiose. Foram utilizados 100 μ L (diluída 10X), 500 μ L, 100 μ L e 200 μ L da enzima para os ensaios com os substratos p -NP- α Gal (0,1 – 3,0 mM), melibiose (0,75 – 70 mM), rafinose (1 – 270 mM) e estaquiose (1 – 150 mM), respectivamente.

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

O efeito de alguns efetores sobre a atividade de α -galactosidase de *A. terreus* foram analisados. Para o ensaio enzimático uma mistura de reação foi formada por 450 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0; 200 μ L do efector e 100 μ L da enzima, essas amostras foram pré-incubadas a 55 °C por 30 minutos. Ao final desse tempo foram adicionados 250 μ L da solução de p -NP- α Gal 2 mM, sendo então a mistura novamente incubada a 55 °C por 15 minutos. Após o período da incubação foi adicionado 1 mL de solução 0,5 M de carbonato de sódio para paralisar a reação. As leituras das absorvâncias foram feitas a 405 nm. Foi feito um ensaio sem a presença de efetores para a comparação dos resultados.

Os efetores utilizados foram: $CaCl_2$, $MnCl_2$, SDS, NaCl, $CuSO_4$, KCl, iodoacetamina, $AgNO_3$, β -mercaptoetanol, EDTA, galactose, glicose, sacarose, melibiose e rafinose.

4.11.6. Efeito do inibidor galactose na atividade da α -galactosidase

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 com concentrações de p-NP- α Gal que variaram de 0,1 a 3,0 mM, na ausência e na presença de 0,75 e 1,5 mM do inibidor galactose. A mistura foi incubada em banho-maria a 55 °C por 15 minutos, e para paralisar a reação foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 0,5 M em cada tubo.

4.11.7. Determinação da energia de ativação

Para determinação da energia de ativação, foram utilizados uma concentração final de 0,5 mM de p-NP- α Gal, 7,4 mM de melibiose, 33 mM de rafinose e 55 mM de estaquiose. A mistura reacional foi incubada nas temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50 e 55 °C. A energia de ativação foi calculada plotando-se o gráfico V_0 em função do inverso da temperatura em Kelvin.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Purificação da α -galactosidase de *Aspergillus terreus*

5.1.1. Purificação enzimática

Após o crescimento do fungo *A. terreus* em meio mineral líquido como descrito no item 4.2, o meio filtrado contendo as enzimas secretadas pelo fungo, foi ultrafiltrado e submetido às etapas de purificação. Durante as etapas de purificação a atividade da α -galactosidase foi determinada usando o substrato p-NP- α Gal, como descrito no item 4.3.1 e a concentração de proteína determinada por absorvância a 280 nm, pelo método de Bradford e pelo método do ácido bicinconínico (item 4.4). A tabela de purificação da enzima α -galactosidase de *A. terreus* está representada na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo das etapas de purificação da enzima α -galactosidase de *Aspergillus terreus*.

Etapa	Proteína total (mg)	Atividade (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extato bruto	81,79	31,37	0,38	1,0	100
Sephacryl S-200					
F1	1,46	4,52	3,10	8,16	14,41
F2	8,79	19,65	2,23	5,87	62,64
Phenyl-Sepharose (S1)	5,55	7,0	1,26	3,31	22,31
Sephacryl S-200	2,38	6,90	2,90	7,63	21,99
DEAE-Sephacel	0,58	5,98	10,31	27,13	19,06

Na primeira etapa de purificação, o extrato bruto concentrado por ultrafiltração foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200, utilizando o tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,5 (item 4.5.1). O perfil dessa cromatografia revelou a presença de pelo menos quatro picos de atividade de α -galactosidase, sendo que dois picos de atividade foram eluídos associados. Esses picos foram denominados de F1 e F2 (Figura 7). Foi observada uma alta recuperação da enzima (62,64%), sendo um conjunto de proteínas indesejáveis eliminadas (Figura 7). A utilização da cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200 foi também relatada por DE OLIVEIRA *et al.* (2005) como um dos passos de purificação de duas α -galactosidases de semente germinada de *Platymiscium pubescens*, obtendo um fator de purificação de 26,21 vezes e rendimento igual a 49 %.

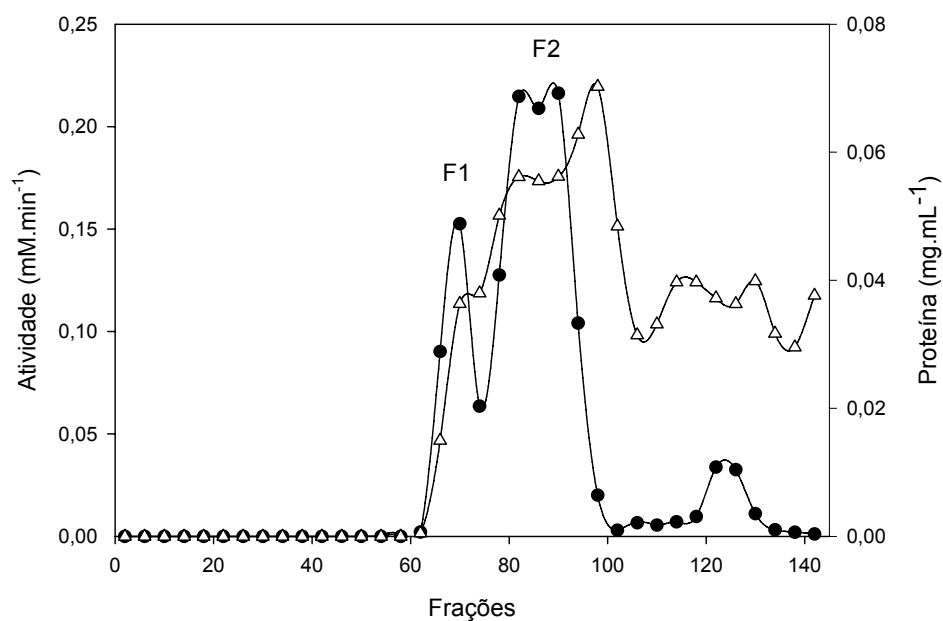


Figura 7 - Perfil cromatográfico do extrato bruto na cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-200. Atividade de α -galactosidase (●) e proteínas (Δ).

Por apresentar maior rendimento, as frações que continham atividade de α -galactosidase no pico F2 foram reunidas e posteriormente submetidas à cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl-Sepharose. O perfil dessa cromatografia está representado na Figura 8.

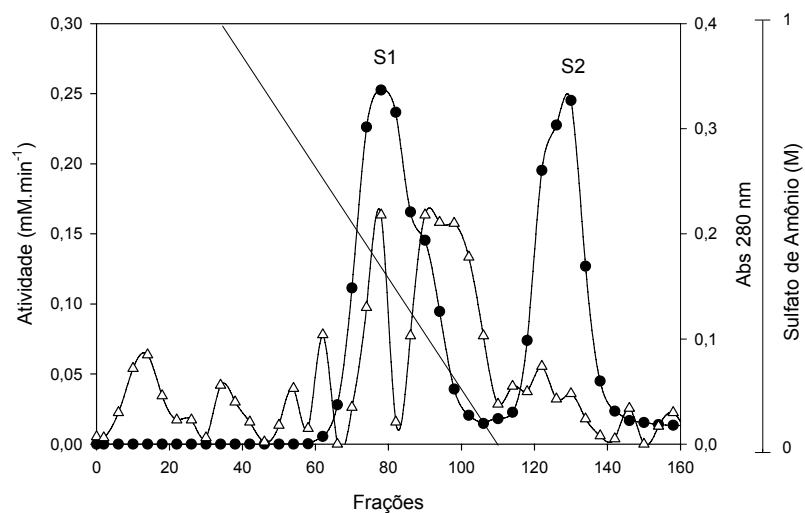


Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração enzimática contendo a α -galactosidase de *Aspergillus terreus* em resina Phenyl-Sepharose. Atividade de α -galactosidase (\bullet), proteínas (Δ) e (-) gradiente decrescente de sulfato de amônio (1 – 0 M).

O perfil de eluição da cromatografia de interação hidrofóbica apresentou dois picos com atividade de α -galactosidase, sendo o primeiro pico denominado de S1 e o segundo de S2. O primeiro pico contendo atividade de α -galactosidase (S1) foi reunido e concentrado por ultrafiltração e submetido a cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200 (Figura 9).

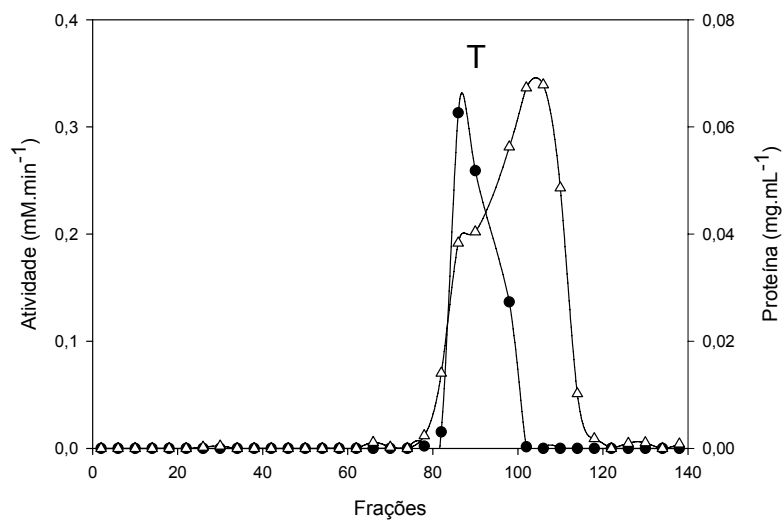


Figura 9 - Perfil cromatográfico da fração enzimática S1 da Figura 8, contendo a α -galactosidase de *Aspergillus terreus* em resina Sephacryl S-200. Atividade de α -galactosidase (●) e proteínas (△).

O perfil cromatográfico da segunda cromatografia de exclusão molecular apresentou um pico de atividade de α -galactosidase, sendo denominado de pico T. As frações foram reunidas e submetidas à cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephacel (Figura 10).

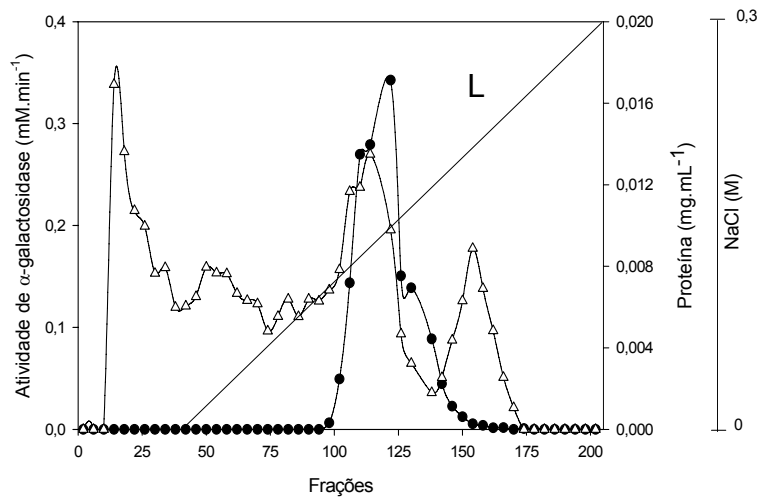


Figura 10 - Perfil cromatográfico da fração enzimática contendo a α -galactosidase de *Aspergillus terreus* em resina de DEAE-Sephacel. Atividade de α -galactosidase (●), proteínas (△) e (-) gradiente crescente de NaCl (0 - 0,3 M).

O perfil de eluição da DEAE-Sephacel apresentou um pico com atividade de α -galactosidase. Foram reunidas as frações que continham atividade de α -galactosidase, sendo denominado de pico L. A utilização da cromatografia de troca iônica foi descrita por diversos autores como uma das etapas de purificação da α -galactosidase (LUONTERI *et al.*, 1998; PUCHART *et al.*, 2000 e ADEMARK *et al.*, 2001).

Ao final do processo de purificação a enzima apresentou um fator de purificação de 27,13 e um rendimento de 19,06%. A purificação da α -galactosidase de *Lactobacillus fermentum* CRL722 apresentou um fator de purificação de 20,8 e um rendimento de 8 % (CARRERA-SILVA *et al.*, 2006).

A fração eluída da DEAE-Sephacel que apresentou atividade de α -galactosidase foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, sob condições desnaturantes. A análise eletroforética revelou a presença de uma

banda forte demonstrando que o processo de purificação produziu uma amostra enzimática com alto grau de pureza (Figura 11).

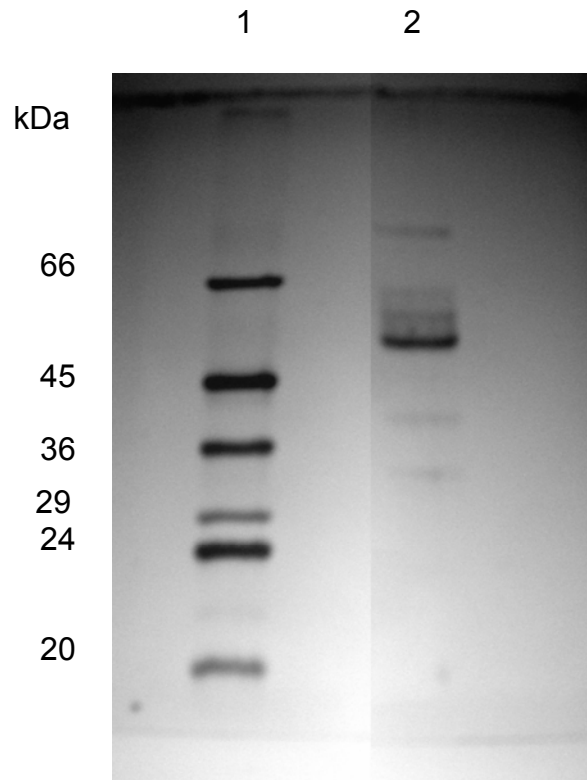


Figura 11 - Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12%), corado com prata, de amostra da α -galactosidase de *Aspergillus terreus*. 1 – Marcadores de massa molecular; 2 – fração enzimática proveniente da DEAE-Sephacel.

5.1.2. Estimativa da massa molecular

A massa molecular da enzima α -galactosidase de *A. terreus* purificada 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 12). Para a distância de 2,4 cm percorrida pela enzima foi estimado o valor da massa molecular de aproximadamente 50 kDa.

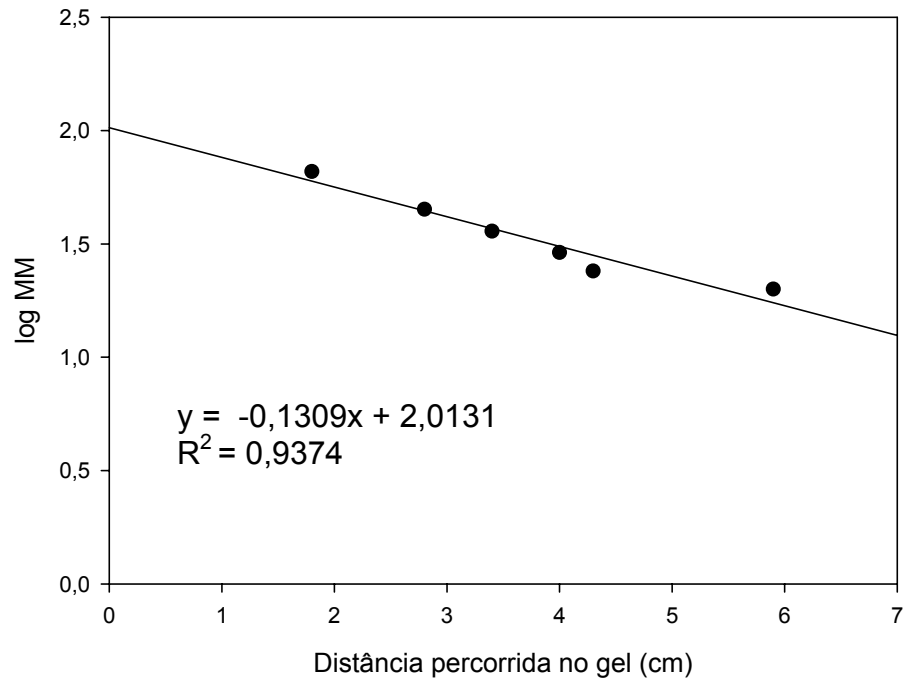


Figura 12 - Determinação da massa molecular da α -galactosidase de *Aspergillus terreus*. Marcadores de massa molecular: Albumina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (36 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), Inibidor de tripsina (20 kDa).

A massa molecular da enzima também foi estimada por cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-200 (Figura 13). O valor determinado para a massa molecular da α -galactosidase de *A. terreus* por gel filtração foi de 77,3 kDa.

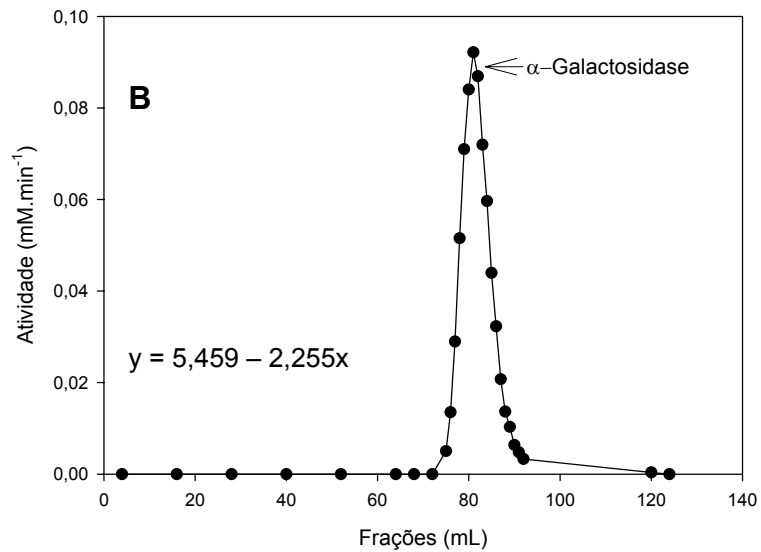
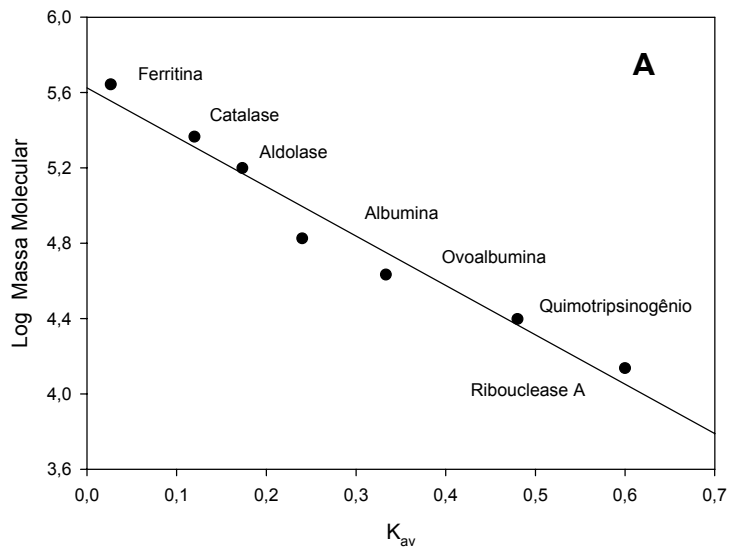


Figura 13 - Determinação da massa molecular da α -galactosidase de *Aspergillus terreus* por cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200. **A** – Curva padrão das proteínas marcadoras. **B** – Perfil de eluição da α -galactosidase na coluna de Sephacryl S-200.

Estudos com α -galactosidase de *Trichoderma reesei* RUT C-30 apresentou uma massa molecular de 50 kDa (ZEILINGER *et al.*, 1993), semelhante a massa molecular estimada para α -galactosidase de *A. terreus*. A forma I da enzima α -galactosidase de *Aspergillus niger* apresentou uma massa molecular de 94 kDa na forma desnaturada e 350 kDa em sua forma nativa. Para as formas II, III e IV apresentaram uma massa molecular igual a 64 kDa na forma desnaturada e 117 kDa na sua forma nativa (ADEMARK *et al.*, 2001). α -Galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 apresentou uma massa molecular igual a 60 kDa (VIANA *et al.*, 2006). α -Galactosidase de *Zygosaccharomyces cidri* apresentou uma massa molecular de 51,7 kDa (TURAKAINEN *et al.*, 1994). Pode-se concluir que a α -galactosidase de *A. terreus* apresentou massa molecular semelhante a várias α -galactosidasas de diferentes fontes descritas em literatura.

5.2. Caracterização da α -galactosidase de *Aspergillus terreus*

5.2.1. Efeito do pH e estabilidade sobre a atividade da α -galactosidase

A atividade da α -galactosidase de *A. terreus* foi testada na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 7,6, na temperatura de 40 °C, utilizando o substrato sintético p-NP- α Gal (Figura 14). Foram encontradas atividades superiores a 75% na faixa de pH de 3,6-5,6. A maior atividade foi encontrada em pH 5,0. Atividades inferiores a 22% foram encontradas na faixa de pH compreendida entre 6,6-7,6. Quando a enzima foi incubada por 6 horas no intervalo de pH 4 – 6, ela manteve mais de 90% da atividade inicial (Figura 14).

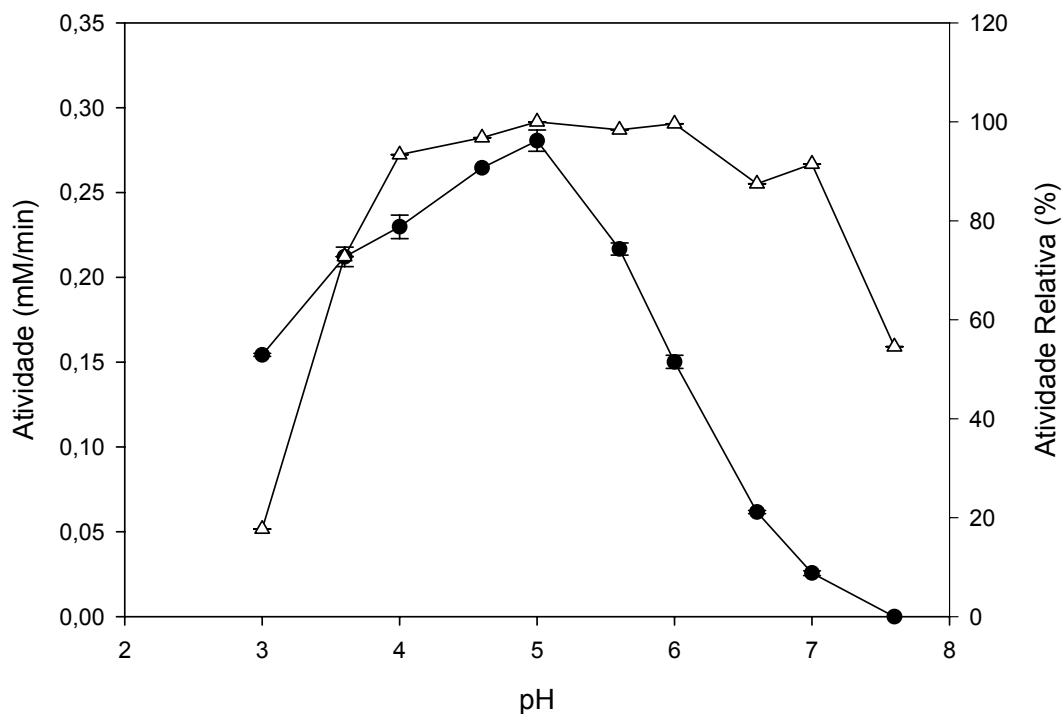


Figura 14 - Efeito da variação do pH na atividade da enzima α -galactosidase de *Aspergillus terreus* (●); estabilidade da enzima quando incubada em diferentes valores de pH por 6 horas a 40 °C (△).

Valor de maior atividade para α -galactosidase em pH 5,0 foi encontrado para α -galactosidase do fungo *Thermomyces lanuginosus* (PUCHART *et al.*, 2000) e para α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* (VIANA *et al.*, 2006). A α -galactosidase de *Aspergillus fumigatus* demonstrou pH de maior atividade igual a 4,5 (de REZENDE *et al.*, 2005). GOTE *et al.* (2006) determinaram pH de maior atividade de 6,5-7,0 para *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). A enzima perdeu 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 valores de pH 6,0-9,0. Diferentemente do encontrado com o fungo *A. terreus*, as α -galactosidasas de bactérias apresentam valores de pH maior atividade e estabilidade em condições alcalinas (ULEZLO e ZAPROMETOVA, 1982). GUIMARÃES *et al.* (2001) determinaram que o pH de maior atividade estava na faixa de 5,0-5,5 para α -galactosidase de soja. Resultado semelhante foi encontrado para α -galactosidase de semente de soja variedade CAC-1 germinada, o qual apresentou pH de maior atividade igual a 6,0 (VIANA *et al.*, 2005).

O declínio da atividade da α -galactosidase de *A. terreus* nas faixas de pH abaixo de 3 e acima de 6,0 até 7,6 pode ser devido a uma mudança conformacional não adequada da enzima.

5.2.2. Efeito da temperatura sobre a atividade da α -galactosidase

A enzima α -galactosidase de *A. terreus* foi determinada na faixa de temperatura entre 30 e 65 °C em pH 5,0, utilizando o substrato sintético p-NP- α Gal (Figura 15). Observaram-se maiores atividades entre 45 e 60 °C, sendo que a temperatura de maior atividade da enzima foi 55 °C. Em temperaturas acima de 60 °C foi observado decréscimo acentuado na atividade enzimática, sendo nula a 65 °C.

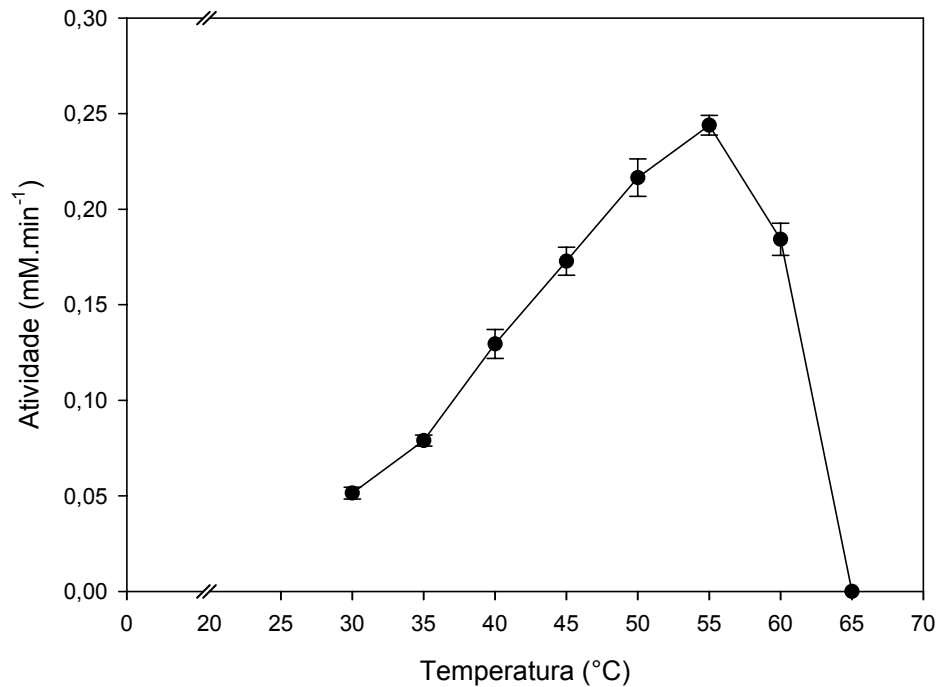


Figura 15 - Efeito da temperatura na atividade da α -galactosidase semi-purificada de *Aspergillus terreus*.

A α -galactosidase de *Aspergillus fumigatus* (DE REZENDE *et al.*, 2005), α -galactosidase de *Monascus pilosus* (WONG *et al.*, 1986) e α -galactosidase da levedura *Tolurasporea delbrueckii* IFO 1255 (ODA e TONOMURA, 1995) apresentaram maior atividade a 55 °C. O estudo de duas isoformas de α -galactosidase de semente germinada de *Platymiscium pubescens*, C1 e C2, apresentaram maior atividade a 50 e 55 °C, respectivamente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). VIANA *et al.* (2006) encontraram maior atividade a 50 °C para α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*. GUIMARÃES *et al.* (2001) determinaram a temperatura de maior atividade para duas isoformas de α -galactosidase de semente de soja germinada, P1 e P2, de 45 e 50 °C, respectivamente. Algumas α -galactosidases apresentam maiores atividades em temperaturas mais elevadas, entre 60 – 70 °C para α -galactosidase de *Humicola sp.* (KOTWAL *et al.*, 1999); para α -galactosidase de *Ganoderma*

lucidum (SRIPUAN *et al*, 2003) e α -galactosidase termoestável de *Bacillus stearothermophilus* (GOTE *et al*, 2006).

5.2.3. Análise da termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade as amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 50, 55 e 60 °C, por vários tempos (Figura 16). A α -galactosidase de *A. terreus* manteve 90% da atividade inicial quando incubada por 6 horas a 50 °C e perdeu 39% de sua atividade após 151 horas de incubação. Na temperatura de 55 °C a enzima manteve 80% da atividade original após 3 horas, conservando 33% de sua atividade após 52 horas de incubação. A 60 °C, a enzima manteve 92% da atividade inicial por 30 minutos, entretanto perdeu 69% da atividade quando incubada por 270 minutos.

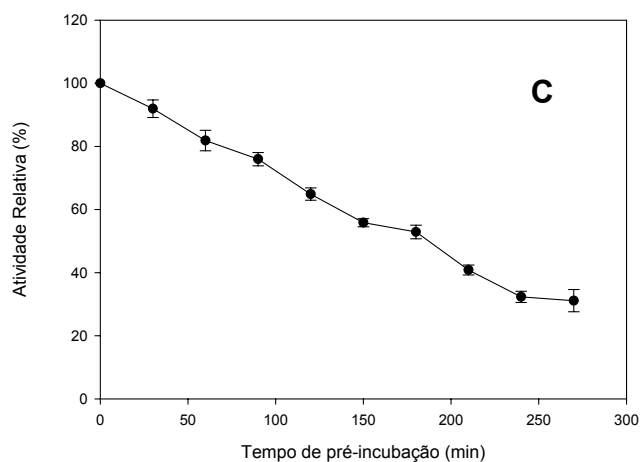
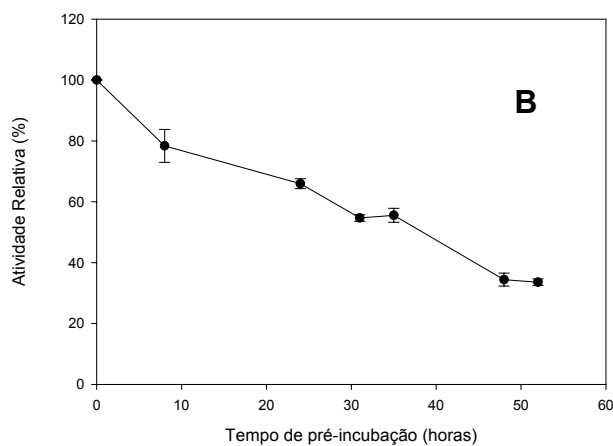
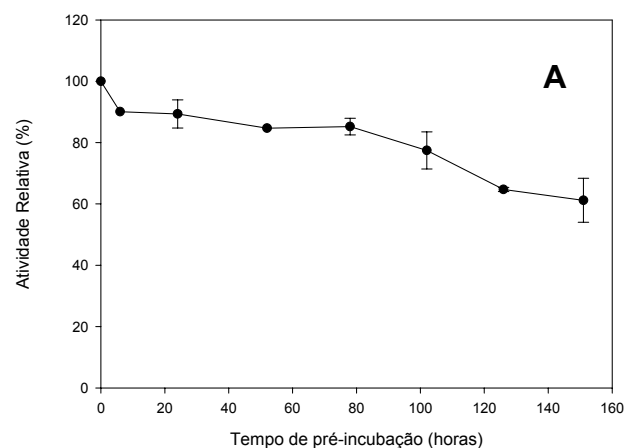


Figura 16 - Efeito da temperatura na estabilidade da α -galactosidase de *Aspergillus terreus*. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 50 °C (A), 55 °C (B) e 60 °C (C). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100%.

No estudo sobre outra isoforma da α -galactosidase de *A. terreus*, observou-se que a enzima manteve 100% da atividade durante 24 horas a 55 °C. Quando a mesma enzima foi incubada a 60 °C por 3 e 36 horas, ela manteve 100 e 40% da atividade inicial, respectivamente (FALKOSKI *et al.*, 2006). As quatro formas da enzima α -galactosidase de *Aspergillus niger* ATCC 46890, mantiveram 80% da atividade original após 21 horas de pré-incubação a 50 °C, e toda atividade foi perdida após 21 horas a 60 °C. As enzimas perderam a atividade após 1260 minutos a 60 °C (ADEMARK *et al.*, 2001). A α -galactosidase não imobilizada de *Gibberella fujikuroi* manteve 90%, 44%, e 6% da atividade original após 12, 24 e 72 horas de incubação a 55 °C, respectivamente (TIPPESWAMY e MULIMANI, 2002). DE REZENDE *et al.* (2005), em estudo de uma α -galactosidase de *Aspergillus fumigatus* observou que a enzima manteve 80% da atividade inicial após ser pré-incubada por 90 minutos a temperatura de 50 °C. A enzima α -galactosidase de *Monascus pilosus* manteve a atividade quando incubada por 20 minutos a 50 e 55 °C entretanto, quando pré-incubada a 60 °C por 20 minutos ela perde 30% de sua atividade original (WONG *et al.*, 1986). α -Galactosidase termoestável de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146) foi completamente estável quando incubada por 60 minutos a 50 °C (GOTE *et al.*, 2006). Entretanto, a α -galactosidase de semente germinada de soja quando incubada a 50 °C por 30 minutos houve a perda de 91% da atividade original. Já α -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* quando incubada por 30 minutos a 50 °C perdeu 90% da atividade inicial (FALKOSKI *et al.*, 2006). A α -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus* foi estável por 24 horas a 55 °C (REZESSY-SZABÓ *et al.*, 2007).

Comparados os valores de estabilidade térmica da literatura com os valores encontrados da α -galactosidase de *A. terreus*, observa-se que a enzima apresentou excelente estabilidade térmica, o que vem a ser um fator importante para possíveis aplicações industriais da enzima.

5.2.4. Meia-vida

Para determinação da meia-vida da α -galactosidase de *A. terreus*, os ensaios foram conduzidos por um tempo total de 52 horas na temperatura de 55 °C e 180 minutos a 60 °C. Na temperatura de 55 °C, a meia-vida da enzima foi de 35 horas (Figura 17), e a 60 °C, de 103 minutos (Figura 18).

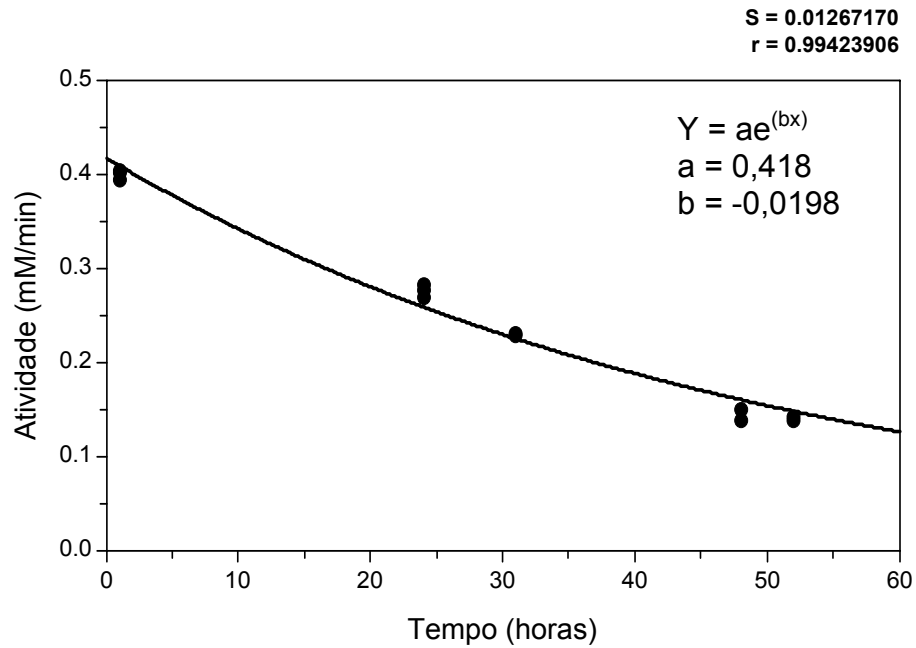


Figura 17 – Meia-vida a 55 °C da α -galactosidase de *Aspergillus terreus*.

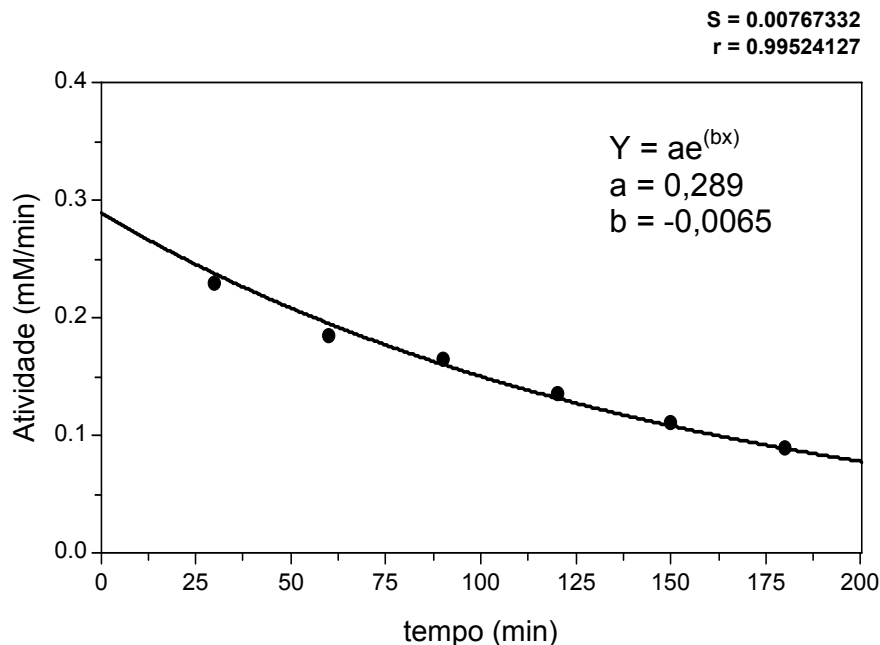


Figura 18 – Meia-vida a 60 °C da α -galactosidase de *Aspergillus terreus*.

VIANA *et al.* (2006) encontraram meia-vida a 55 °C e 60 °C da α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 de 647 e 373 minutos, respectivamente. As α -galactosidases P1 e P2 de semente germinada de soja apresentaram meia-vida de 2 horas a 40 °C (GUIMARÃES *et al.*, 2001). A α -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* apresentou meia-vida de 3 horas e 27 minutos a 45 °C (FALKOSKI *et al.*, 2006). Para α -galactosidase de *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* mostrou uma meia-vida de 1,1; 2,7; 5,1; e 234 minutos para as temperaturas 80; 77,5; 75 e 72,5 °C, respectivamente (KING *et al.*, 2002).

5.2.5. Especificidade da α -galactosidase de *Aspergillus terreus* com outros substratos

A α -galactosidase de *A. terreus* foi avaliada quanto à capacidade de hidrolisar outros substratos sintéticos, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade da α -galactosidase de *Aspergillus terreus* com substratos sintéticos

Substratos	Atividade (mM.min ⁻¹) \pm DP
o-NP- β Gal	0
o-NP- β Glc	0
m-NP- α Gal	0,02 \pm 0,0003
ρ -NP- α Ara	0
ρ -NP- α Gal	0,59 \pm 0,003
ρ -NP- α Glc	0
ρ -NP- α Man	0
ρ -NP- β Glc	0
ρ -NP- β Gal	0
ρ -NP- β Xil	0

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2 a enzima α -galactosidase de *A. terreus* demonstrou ser muito seletiva, apresentando maior especificidade para o substrato ρ -NP- α Gal e uma baixa especificidade para o substrato m-NP- α Gal. Pode-se observar que a enzima hidrolisou apenas os substratos que continham o resíduo de açúcar galactose, unidos por ligação α e nas posições *m* e *ρ* .

A enzima de *A. terreus* também foi ensaiada com substratos naturais (Tabela 3).

Tabela 3 – Atividade da α -galactosidase de *Aspergillus terreus* com substratos naturais.

Substrato	Atividade (mM.min⁻¹) \pm DP
Estaquiose	0,01 \pm 0,001
Rafinose	0,06 \pm 0,003
Sacarose	0
Melibiose	2,53 \pm 0,077
Maltose	0
Lactose	0

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 3 a enzima α -galactosidase de *A. terreus* foi ativa em ligações contendo galactose na posição α de oligossacarídeos como melibiose, rafinose e estaquiose. Apresentou maior atividade sobre a melibiose comparada com os demais substratos. A preparação enzimática também não hidrolisou os açúcares sacarose, maltose e lactose.

A enzima α -galactosidase de *A. terreus* também foi ensaiada com polímeros goma guar e goma locusta (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade da α -galactosidase de *Aspergillus terreus* com polímeros

Substrato	Concentração (%)	Atividade (mM.min⁻¹) \pm DP
Goma guar	0,5	0,002 \pm 0,0003
Goma locusta	0,5	0,003 \pm 0,0002

De acordo com as Tabelas 3 e 4, observa-se que a enzima apresentou baixa atividade sobre os substratos estaquiose, goma guar e goma locusta,

SRIPUAN *et al.* (2003) em estudo de uma α -galactosidase de *Ganoderma lucidum* verificaram que a enzima hidrolisou os substratos sintéticos *p*-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.

As α -galactosidases I e II de *Aspergillus niger* hidrolisaram os substratos naturais melibiose, rafinose e estaquiose. A α -galactosidase I não hidrolisou os polímeros goma guar e goma locusta após 24 horas de incubação. Já a α -galactosidase II hidrolisou 12 e 60% dos substratos goma guar e goma locusta, respectivamente, após 24 horas de incubação (ADEMARK *et al.*, 2001).

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).

A α -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b foi ativa sobre o substrato artificial *p*-NP- α Gal e sobre substratos naturais que contêm ligações α -galactosídicas como rafinose e estaquiose, todavia não foi ativa sobre galactomananas, como goma guar e goma locusta (REZESSY-SZABÓ *et al.*, 2007). A α -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749 hidrolisou os substratos melibiose e rafinose mais rapidamente do que a estaquiose. Isso se deve ao fato da estaquiose ter que sofrer uma dupla degalactosilação. Dessa forma, o passo limitante da reação é a liberação do primeiro resíduo de galactosil ligado a estaquiose, sendo a rafinose resultante mais rapidamente degalactosilada à sacarose (PUCHART *et al.*, 2000).

De acordo com VARBANETS *et al.* (2001), a maioria das α -galactosidases microbiológicas possuem em comum o fato de possuírem maior especificidade pelo substrato sintético *p*-NP- α Gal do que para os substratos naturais.

4.2.6. Constante de Michaelis Menten ($K_{M\ ap}$) e velocidade máxima ($V_{\max\ ap}$)

O efeito da concentração dos substratos p -NP- α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase de *A. terreus*, foi determinado pela curva de Michaelis-Menten.

O menor valor de $K_{M\ ap}$ foi para o substrato p -NP- α Gal (Figura 19), seguido pela melibiose (Figura 20), rafinose (Figura 21) e estaquiose (Figura 22).

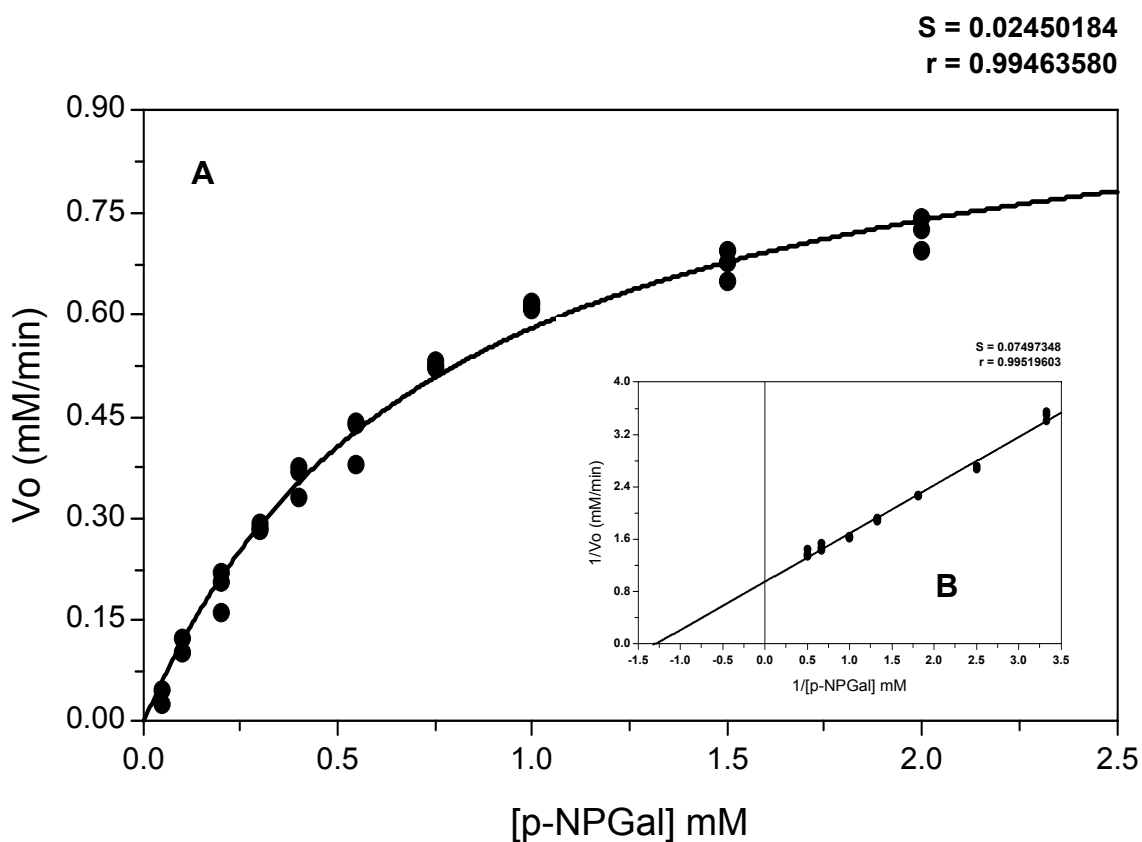


Figura 19 - A – Efeito da concentração do substrato p -NP- α Gal na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase. **B** – Duplo recíproco.

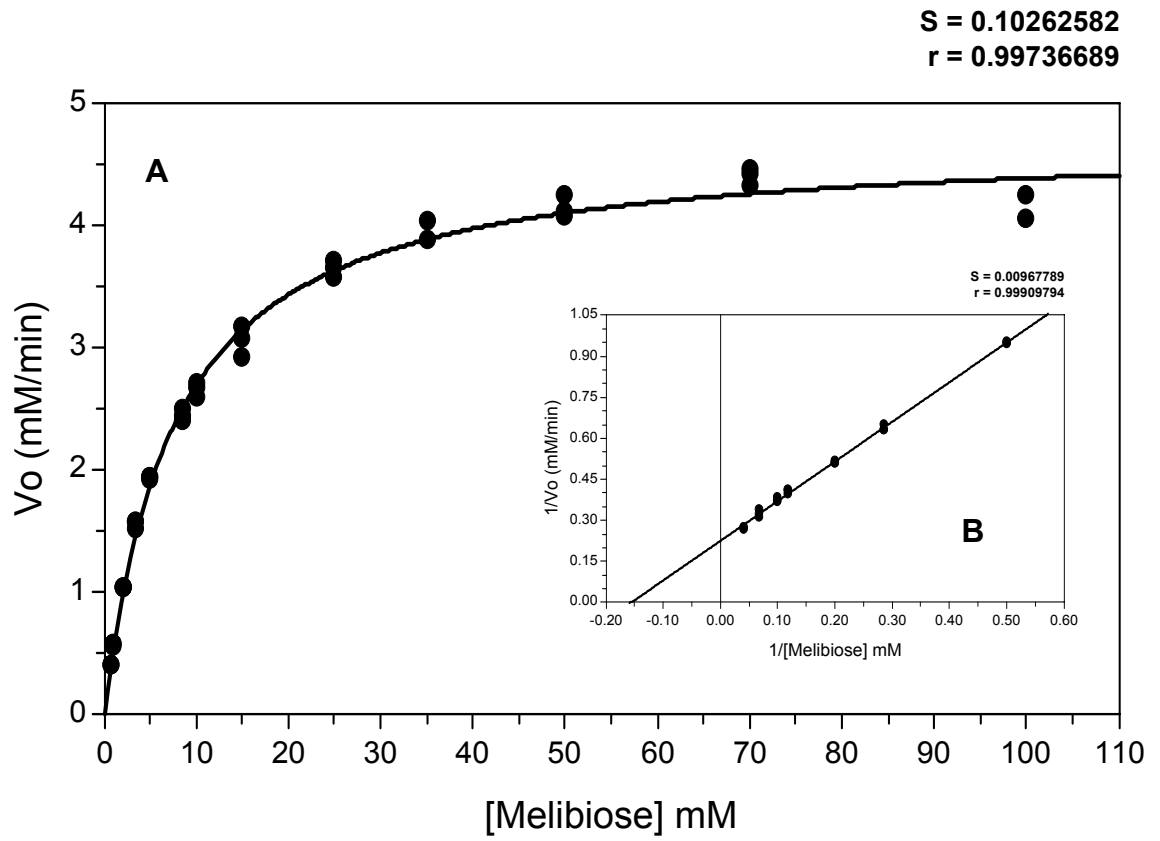


Figura 20 - A – Efeito da concentração do substrato melibiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase. **B** – Duplo recíproco.

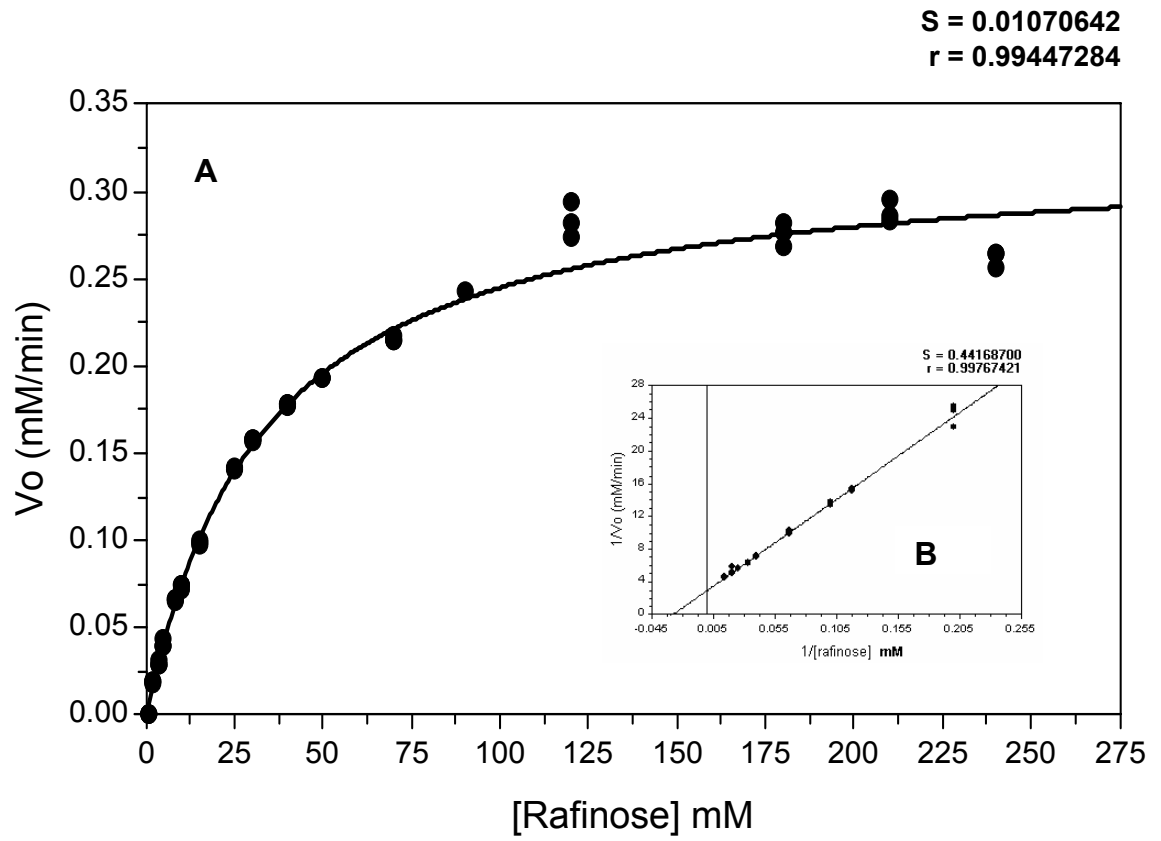


Figura 21 - A – Efeito da concentração do substrato rafinose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase. **B** – Duplo recíproco

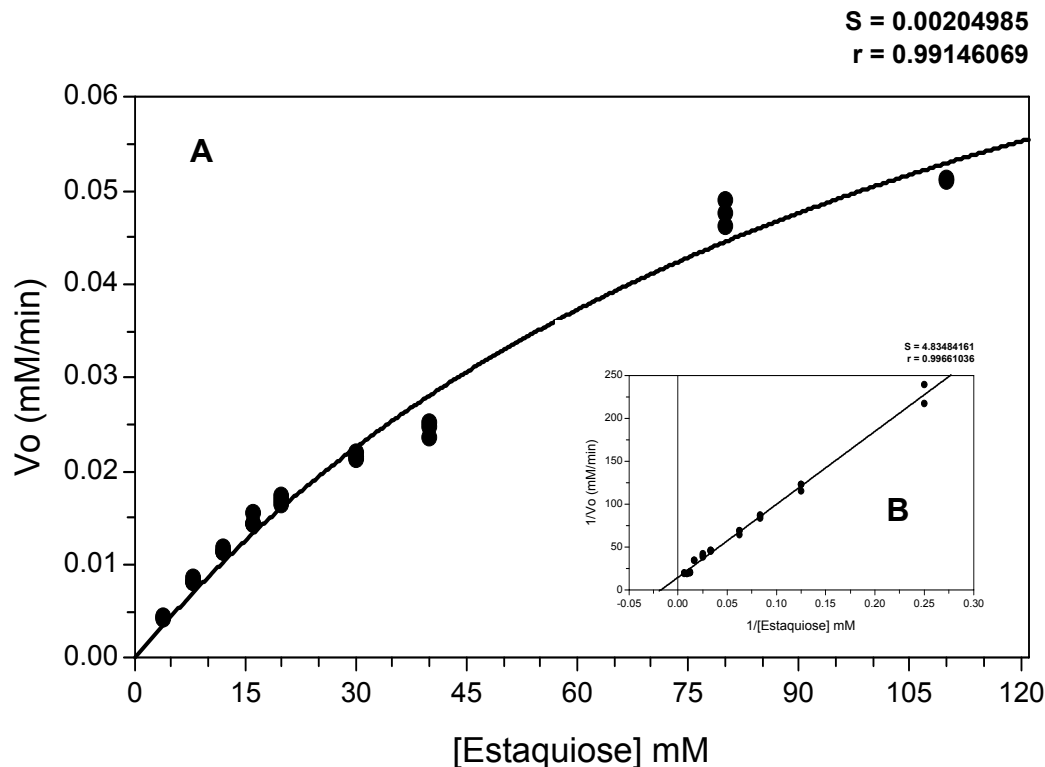


Figura 22 - A – Efeito da concentração do substrato estaquiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase. **B** – Duplo recíproco.

Os valores da constante cinética $K_{M\ ap}$ e da velocidade máxima ($V_{max\ ap}$) para cada substrato estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de $K_{M\ ap}$ e $V_{max\ ap}$, determinados pela curva de Michaelis-Menten com os substratos p -NP- α Gal, melibiose, estaquiose e rafinose.

Substratos	$K_{M\ ap}$ (mM)	$V_{max\ ap}$ *
p -NP- α Gal	0,75	1,02
Melibiose	7,39	4,72
Estaquiose	54,74	0,06
Rafinose	32,99	0,33

* Para o substrato p -NP- α Gal, V_{max} está expressa em mM de p -NP. min^{-1} ; para o substrato melibiose, V_{max} está em mM de glicose .min^{-1} e para os substratos estaquiose e rafinose, V_{max} está em mM de açúcar redutor. min^{-1} .

Os valores de $K_{M\text{ ap}}$ para o substrato p-NP- α Gal determinados para uma isoforma de α -galactosidase de *A. terreus* foi semelhante ao valor de K_M para α -galactosidase P1 (0,76 mM) de sementes germinadas de soja (GUIMARÃES *et al.*, 2001) e também ao $K_{M\text{ ap}}$ da α -galactosidase C2 (0,78 mM) de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). O K_M para p-NP- α Gal da α -galactosidase de *Monascus pilosus* (0,8 mM) também foi bem próximo ao valor encontrado para α -galactosidase de *A. terreus* (WONG *et al.*, 1986). Da mesma forma, GOTE *et al.* (2006) encontraram um K_M para p-NP- α Gal de 0,5 mM, de uma α -galactosidase termoestável de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146). FALKOSKI *et al.* (2006) determinaram o valor de $K_{M\text{ ap}}$ para o substrato p-NP- α Gal de 0,47, 1,32 e 1,89 mM para α -galactosidase de sementes de soja, *Penicillium griseoroseum* e uma outra isoforma de *Aspergillus terreus*, respectivamente.

Para o substrato melibiose, o valor de K_M encontrado por GOTE *et al.* (2006), para α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146), foi de 3,92 mM. Semelhantemente, SHABALIN *et al.* (2002) determinaram o K_M para α -galactosidase de *Trichoderma reesei* de 3,0 mM. FALKOSKI *et al.* (2006), em estudo de uma outra isoforma da α -galactosidase de *A. terreus* encontraram um $K_{M\text{ ap}}$ de 0,45 mM. O estudo de duas formas da mesma enzima em *Aspergillus niger* resultou em um K_M para melibiose de 1,0 e 0,39 mM para as formas I e II respectivamente (ADEMARK *et al.*, 2001). Já o K_M encontrado para α -galactosidase de *Penicillium* sp. 23 foi de 4,0 mM (VARBANETS *et al.*, 2001).

Para o substrato rafinose, o valor de K_M encontrado por REZESSY-SZABÓ *et al.* (2007) para α -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b foi de 1,61 mM. Para α -galactosidase do fungo *Trichoderma reesei* o K_M determinado foi 3,0 mM (SHABALIN *et al.*, 2002). GOTE *et al.* (2006), estudando α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146), encontraram o K_M igual a 4,0 mM. Estudos realizados com outra isoforma da α -galactosidase de *A. terreus* e de *Penicillium griseoroseum*, revelaram um K_M de

19,39 mM para a enzima do *A. terreus* e 20,67 mM para enzima de *P. griseoroseum* (FALKOSKI *et al.*, 2006).

Para o substrato estaquiose, a α -galactosidase de *Penicillium* sp. 23 apresentou um K_M de 3,5 mM (VARBANETS *et al.*, 2001). Já o K_M obtido para α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* foi de 9,66 mM (VIANA *et al.*, 2006). REZESSY-SZABÓ *et al.* (2007) obtiveram um K_M de 1,17 mM para α -galactosidase *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b. GOTE *et al.* (2006) em estudo de uma α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146) determinaram um K_M para a estaquiose de 2,0 mM.

Observa-se que o valor encontrado para o $K_{M\text{ ap}}$ da α -galactosidase de *A. terreus* contra o substrato p-NP- α Gal foi menor do que o $K_{M\text{ ap}}$ para os substratos melibiose, rafinose e estaquiose. De acordo com SEGEL (1979), a constante de Michaelis indica a “adequacidade” relativa de substratos alternativos para uma determinada enzima. Dessa forma pode-se concluir que a α -galactosidase de *A. terreus* apresenta uma maior afinidade pelo substrato p-NP- α Gal quando comparado com os substratos naturais testados.

4.2.7. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase de *Aspergillus terreus*

Para determinar o efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase de *A. terreus*, soluções com concentrações definidas desses compostos foram pré-incubadas com a enzima purificada por 30 min a 55°C, 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-se a atividade da enzima pré-incubada sem efetor como 100%.

De acordo com a Figura 23, a enzima perdeu toda atividade na presença de prata, e houve perda da atividade em presença de D-galactose e cobre. A inibição por prata e cobre sugere uma reação com grupos tiol e ou carboxila, amino e imidazol da histidina do centro ativo (DEY e PRIDHAM, 1972). EDTA, Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ não influenciaram na atividade enzimática, indicando o não requerimento de cátions metálicos. Iodoacetamida, SDS, 2-mercaptoetanol e

ácido galacturônico não afetaram a atividade da α -galactosidase. A não inibição da atividade enzimática por iodoacetamida sugere que não existam grupos sulfidrilas livres essenciais à catálise. A atividade da enzima não foi afetada na presença de lactose, maltose, melibiose, rafinose, manose e estaquiose. Glicose, frutose e sacarose não inibiram a atividade da enzima, sugerindo que a configuração D-galactose é requerida para a formação da ligação (GOTE *et al*, 2006).

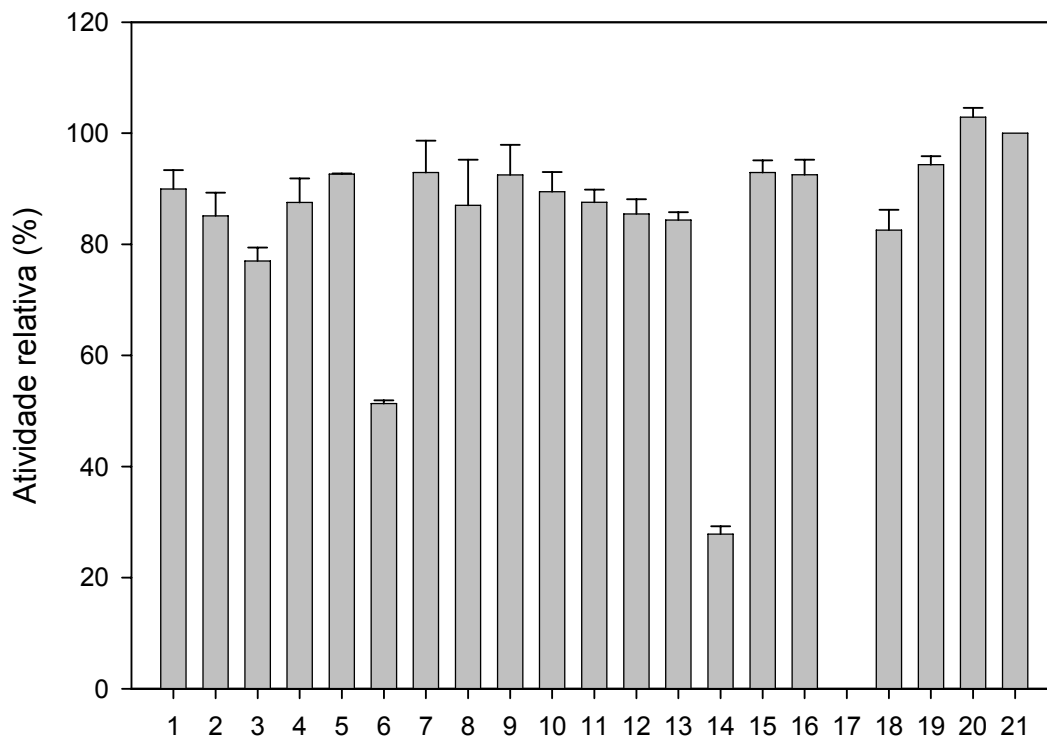


Figura 23 - Atividade relativa da α -galactosidase semi-purificada de *Aspergillus terreus* submetida aos efeitos de íons, açúcares e agentes redutores: 1- Lactose, 2- Maltose, 3- Melibiose, 4- Rafinose, 5- Manose, 6- Galactose, 7- Estaquiose, 8- Sacarose, 9- Glicose, 10- EDTA, 11- $MgCl_2$, 12- SDS, 13- $CaCl_2$, 14- $CuSO_4$, 15- KCl, 16- NaCl, 17- $AgNO_3$, 18- Iodoacetamida, 19- 2- mercaptoetanol, 20- Ácido galacturônico, 21- Controle.

α -Galactosidases de diferentes fontes tiveram perda total ou parcial de suas atividades catalíticas pela prata e pelo cobre, e não foram inibidas por EDTA, Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , iodoacetamida e 2-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); α -galactosidase de sementes de soja, de *Penicillium griseoroseum* e uma isoforma da α -galactosidase de *A. terreus* (FALKOSKI *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). A α -galactosidase termoestável de *Ganoderma lucidum* perdeu 32% de sua atividade inicial na presença de Ag^+ , foi inibida completamente por galactose (10 mM) e sua atividade mantém-se na presença de lactose, maltose e sacarose (SRIPUAN *et al.*, 2003).

GUIMARÃES *et al.* (2001) em estudo de duas formas de α -galactosidase de sementes de soja germinadas, observam uma forte inibição enzimática de ambas, quando em presença de $CuSO_4$ e SDS. Inibição por SDS também foi observada por FALKOSKI *et al.* (2006), nesse estudo as α -galactosidases de sementes de soja e de uma isoforma da α -galactosidase de *A. terreus* tiveram cerca de 50% de suas atividades inibidas, 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 completa ou parcialmente suas funções devido à perda de suas estruturas terciária e quaternária (LANTZ e CIBOROWSKI, 1994; BISCHOFF *et al.*, 1998). Este fato não foi observado para α -galactosidase em estudo neste trabalho.

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). Não foi observada inibição pela galactose em α -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* (FALKOSKI *et al.*, 2006).

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

Os dados apresentados anteriormente mostraram que a α -galactosidase de *A. terreus* foi parcialmente inibida pela galactose. Os valores de K_i para a α -galactosidase na presença desse açúcar foi determinado utilizando o substrato p -NP- α Gal.

A Figura 24 representa o gráfico da velocidade da reação de hidrólise de p -NP- α Gal pela α -galactosidase na ausência e na presença de diferentes concentrações de galactose. Para uma mesma concentração do substrato p -NP- α Gal, a velocidade da reação foi maior na ausência de galactose e diminuiu com o aumento da concentração da galactose, caracterizando-se um efeito de inibição.

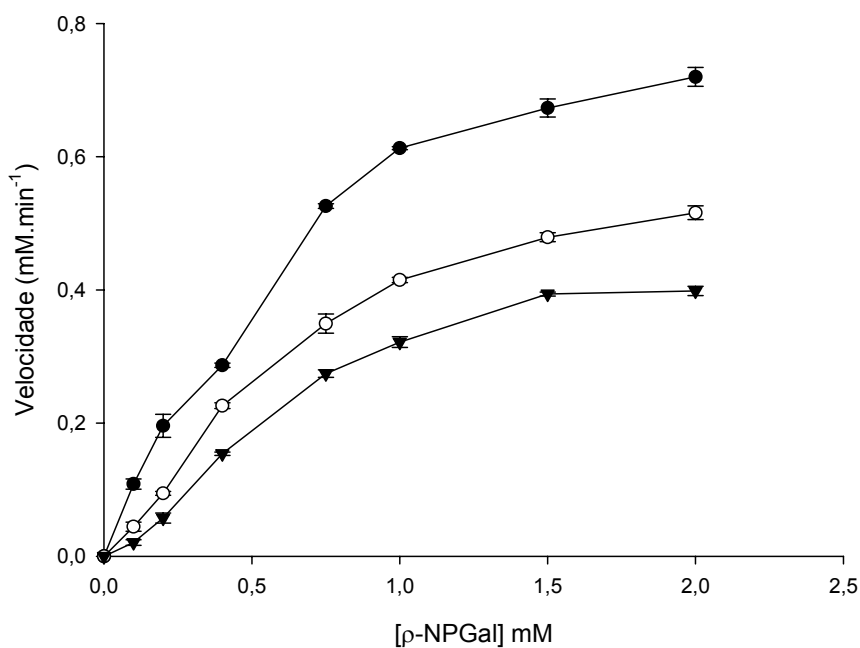


Figura 24 - Velocidade da reação em função da concentração de p -NP- α Gal na ausência de galactose (●), com 0,75 mM de galactose (○) e 1,5 mM de galactose (▼).

A Figura 25 mostra que as retas convergem para o mesmo ponto no eixo Y indicando que o valor da V_{\max} permaneceu constante, mesmo na presença do inibidor e o $K_{M\text{ ap}}$ aumentou, sugerindo uma inibição competitiva.

O valor de K_i foi determinado pelo gráfico da concentração de galactose em função de $K_{M\text{ ap}}/V_{\max\text{ ap}}$. A inibição da hidrólise do substrato $p\text{-NP-}\alpha\text{Gal}$ pela $\alpha\text{-galactosidase}$ na presença do produto inibidor galactose apresentou um valor para K_i de 0,61 mM (Figura 26).

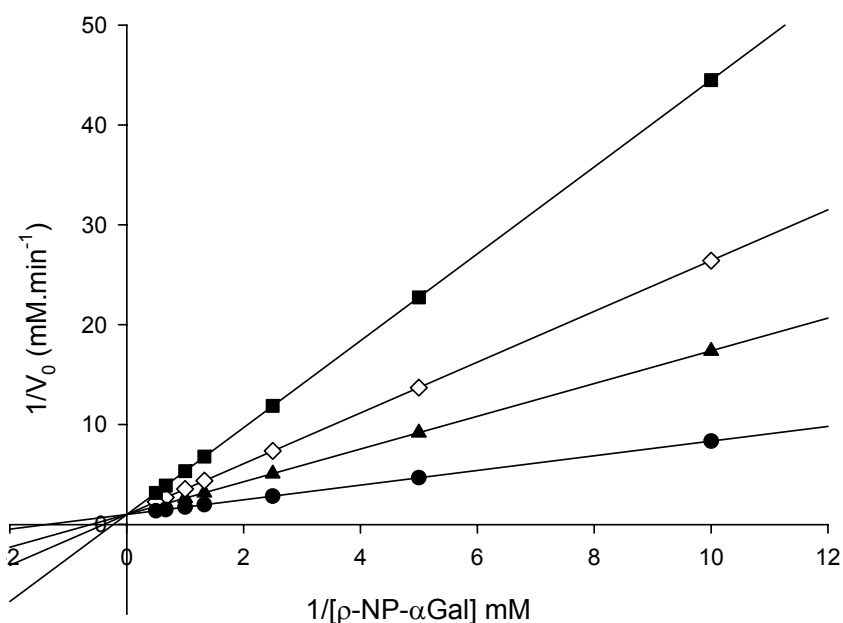


Figura 25 - Duplo recíproco. Ausência de galactose (●), 0,75 mM de galactose (▲), 1,5 mM de galactose (◇) e 3 mM de galactose (■).

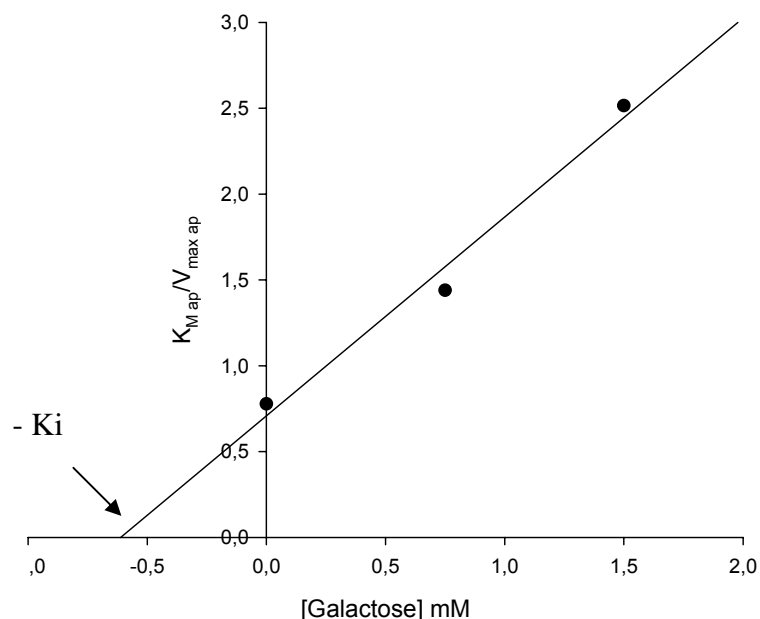


Figura 26 – Concentração de galactose em função de $K_{M,ap}/V_{max,ap}$ para determinação da K_i .

O inibidor competitivo se combina com a enzima livre de uma forma tal que impede a ligação do substrato. Isto é, o inibidor e o substrato são mutuamente exclusivos, em geral porque há uma verdadeira competição pelo mesmo sítio. Dessa forma, na presença de uma concentração de substrato muito alta (saturante), toda enzima pode ser levada à forma de complexo ES. Como conseqüência, a velocidade inicial máxima, na presença de um inibidor competitivo, é igual a V_{max} , velocidade inicial máxima na ausência do inibidor. A K_M aparente aumentará na presença de um inibidor competitivo porque, qualquer que seja a concentração do inibidor, existirá uma fração de enzima sob forma de EI, a qual não possui afinidade pelo substrato (SEGEL, 1979).

GOTE *et al.* (2006) determinaram que a atividade da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM-5146 foi inibida competitivamente pela galactose, apresentando um valor de K_i de 16,25 mM. A α -galactosidase P2 de sementes germinadas de soja foi inibida competitivamente na presença de galactose, apresentando um K_i de 0,65 mM (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

KACHURIN *et al.* (1995), em estudo de uma α -galactosidase de *Trichoderma reesei*, verificaram que a enzima era inibida competitivamente pela galactose e apresentou um K_i de 0,091 mM. 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).

4.2.9. Cálculo da energia de ativação da α -galactosidase de *Aspergillus terreus* para os substratos p-NP- α Gal, melibiose, rafinose e estaquiase

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.

Foram calculadas as energias de ativação, através do gráfico de Arrhenius, para os substratos p-NP- α Gal, melibiose, rafinose e estaquiase. Para o substrato p-NP- α Gal (Figura 27) foi encontrada uma energia de ativação igual a 15.753,05 cal/mol (65,85 kJ/mol). Para o substrato melibiose (Figura 28) a energia de ativação foi de 9.514,75 cal/mol (39,77 kJ/mol). E para os substratos rafinose (Figura 29) e estaquiase (Figura 30), a energia de ativação encontrada foi de 10.283,16 cal/mol (42,98 kJ/mol) e 11.308,49 cal/mol (47,27 kJ/mol), respectivamente.

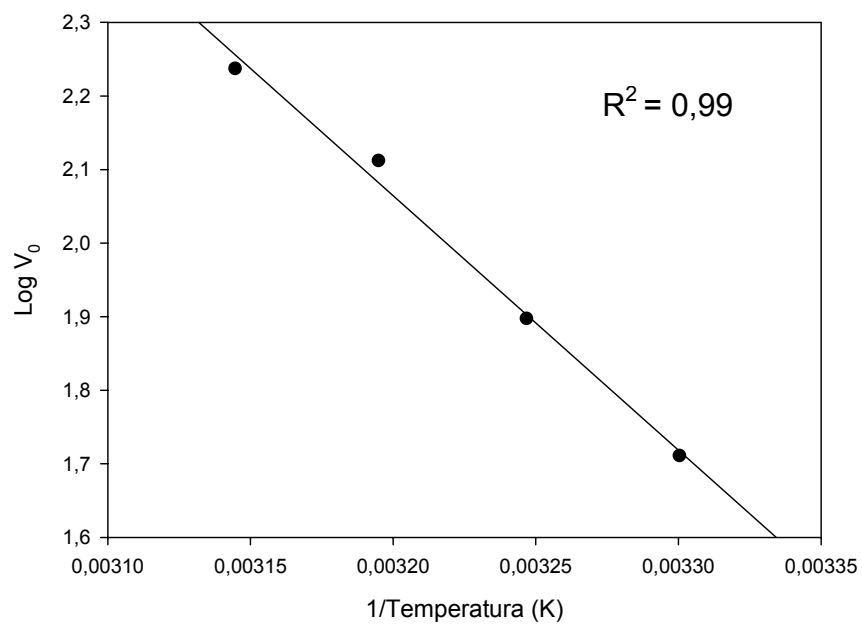


Figura 27 - Energia de ativação para o substrato p-NP- α Gal.

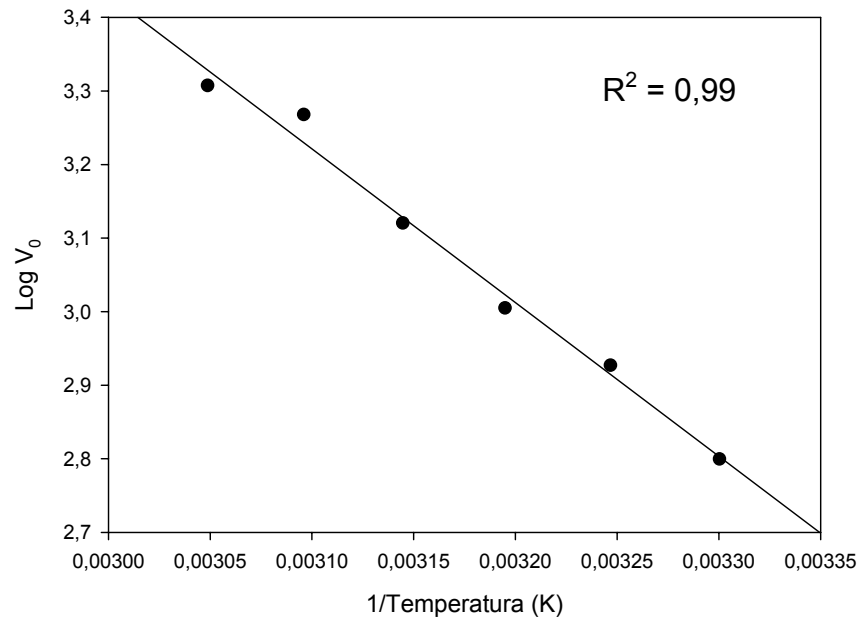


Figura 28 - Energia de ativação para o substrato melibiose.

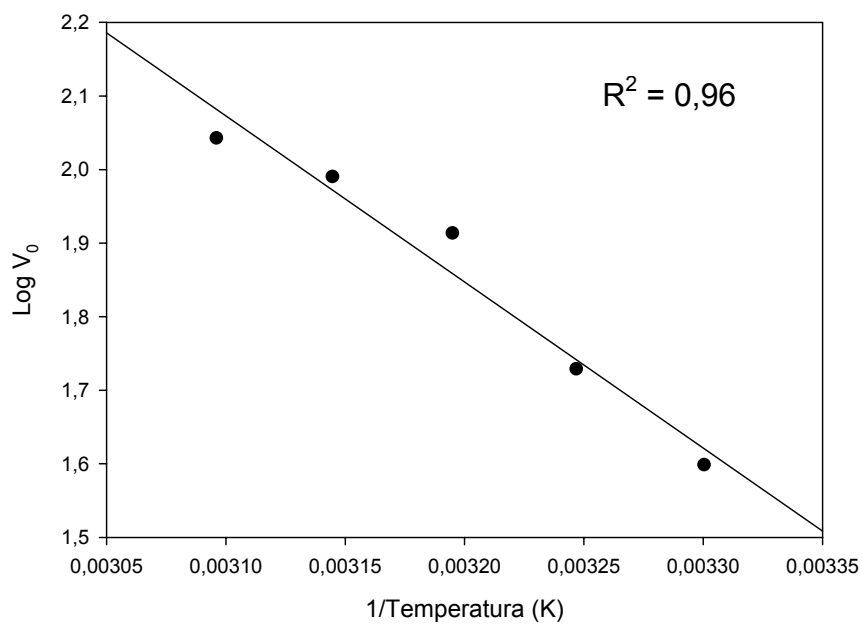


Figura 29 - Energia de ativação para o substrato rafinose.

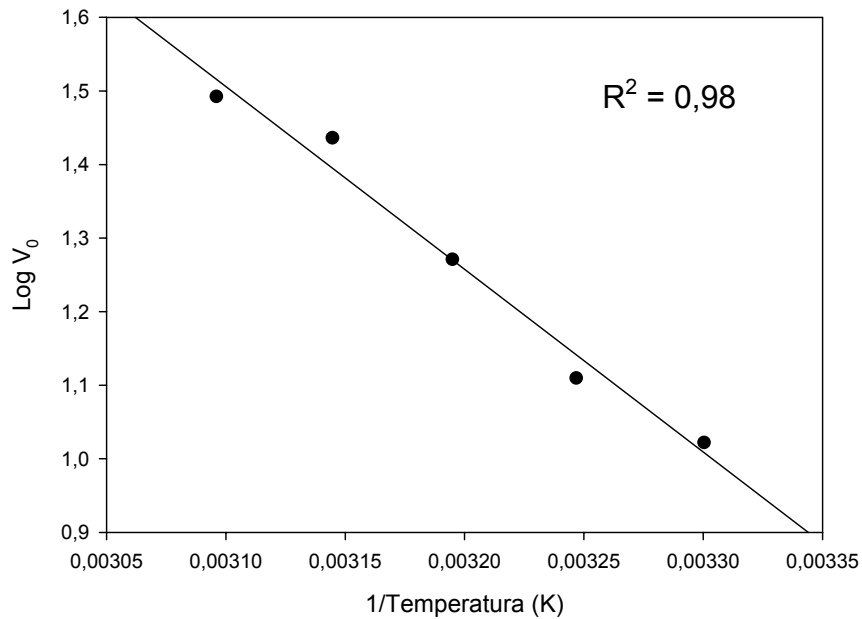


Figura 30 - Energia de ativação para o substrato estaquiose.

LUSIS e PAIGEN (1976) trabalhando com α -galactosidase de rato, determinaram a E_a para p-NP- α Gal de 16.400 cal/mol, valor semelhante ao encontrado para α -galactosidase de *Aspergillus terreus*. Para α -galactosidase purificada de *Klebsiella* sp. No. PG-2, bactéria que está presente no intestino de rato, foi encontrada uma E_a contra o substrato p-NP- α Gal de 11.856 cal/mol (SHAH e PAREKH, 1990). GOTE *et al.* (2006), estudando uma α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM-5146, determinaram a E_a para p-NP- α Gal de 59,8 kJ/mol, para melibiose de 70,6 kJ/mol, para a rafinose de 29,0 kJ/mol e para o estaquiose de 28,6 kJ/mol. DEY *et al.* (1983) caracterizaram uma α -galactosidase de semente de lentilha, e encontrou a E_a contra o substrato p-NP- α Gal de 62,1 kJ/mol.

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

Algumas α -galactosidases conseguem converter enzimaticamente células sangüíneas do grupo B em células do grupo O, porque os antígenos do grupo B diferem estruturalmente dos antígenos do grupo O somente pela adição de um resíduo terminal α -galactose (CLAUSEN e HAKOMORI, 1989).

A α -galactosidase de *A. terreus* não converteu as células sangüíneas do grupo B em células do grupo O, nas condições de ensaio utilizadas.

α -Galactosidases de semente de café verde demonstraram alta eficiência na remoção de resíduos de galactose α -ligados da superfície das células vermelhas do sangue (GOLDSTEIN *et al.*, 1982).

ZHU *et al.* (1996), estudando α -galactosidase recombinante conseguiu remover todos os antígenos B da superfície das células sangüíneas do tipo B. Todos os outros antígenos presentes na superfície da células não foram alterados, exceto o antígeno P1, o qual é o menor antígeno que também possui um resíduo α -galactosil não redutor e uma cadeia de carboidratos.

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).

Para que o sangue do tipo B seja convertido em tipo O é necessário que todos os resíduos α -galactose presentes no antígeno B sejam removidos da superfície da célula. Dessa forma, pode-se inferir que a α -galactosidase de *A. terreus* tenha removido alguns desses resíduos de α -galactose, porém não todos, não ocorrendo a transformação do sangue.

4.3. Hidrólise de oligossacarídeos de galactose em leite de soja

Devido a α -galactosidase de *A. terreus* ter capacidade de hidrolisar rafinose e a estaquiose, foi testada a capacidade dessa enzima em hidrolisar os GO presentes no leite de soja.

Nesse ensaio, foi utilizada a enzima purificada para hidrolisar os GO no leite de soja conforme o item 3.9. Posteriormente, foi feita a extração dos GO (item 3.10) e a determinação do teor de GO por cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE (item 3.11).

A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis de GO presentes no leite de soja em função do tempo de incubação da enzima. Os resultados estão apresentados na Figura 31 e os valores das porcentagens de redução dos GO estão descritos na Tabela 6.

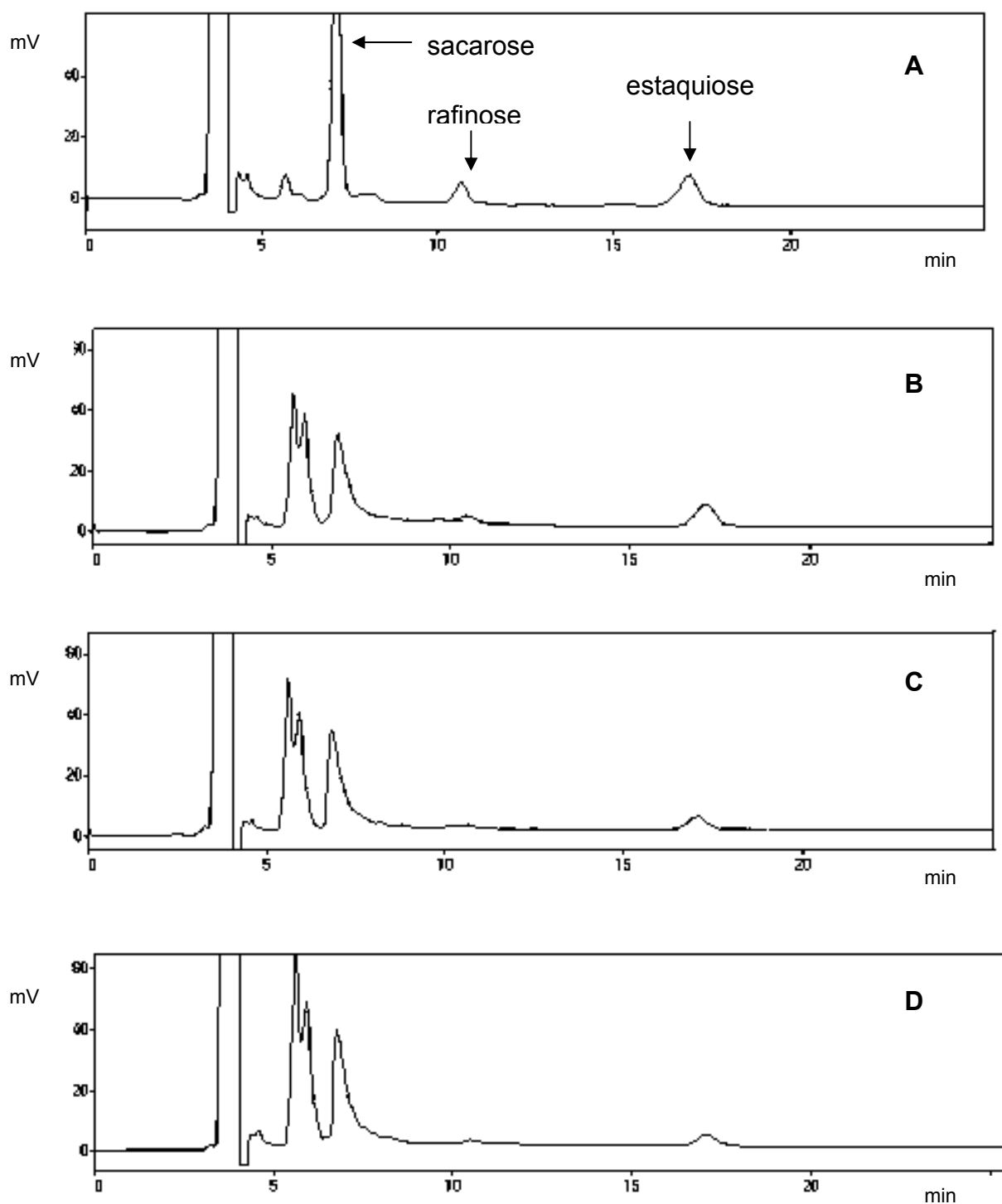


Figura 31 – Cromatograma comparativo da hidrólise de GO do leite de soja pela enzima α -galactosidase de *Aspergillus terreus*. **A** – 0 hora, **B** – 4 horas, **C** – 8 horas, **D** – 12 horas de incubação.

Tabela 6 – Porcentagem de hidrólise dos GO no leite de soja pela α -galactosidase de *Aspergillus terreus*.

Tempo de hidrólise (horas)	Redução (%)	
	Rafinose	Estaquiose
0	0	0
4	53,2	10
8	67	34,1
12	100	60,3

Os teores de rafinose e estaquiose no tempo zero foram considerados como 100%. Os demais resultados foram calculados em relação ao tempo zero. Os ensaios foram realizados em duplicata e representam as médias dos valores obtidos nas análises por CLAE.

De acordo com os dados mostrados na Tabela 6, a enzima α -galactosidase de *A. terreus* apresentou atividade sobre os GO. Foi verificado que a rafinose foi completamente hidrolisada e a estaquiose foi 60,3% hidrolisada após 12 horas de incubação do leite de soja com 5 U da enzima. Devido ao alto valor de $K_{M\ ap}$ (54,74 mM) para a estaquiose, observa-se que há necessidade de a enzima estar em contato com a estaquiose por um tempo mais longo, para que toda estaquiose seja hidrolisada. Entretanto, fica inviável incubar a enzima no leite de soja a 50 °C por mais de 12 horas, devido ao risco de crescimento de microrganismos, contaminando assim o leite de soja. Uma alternativa seria adicionar a enzima ao leite de soja no momento em que ele estivesse sendo embalado. Dessa forma, a enzima ficaria por mais tempo em contato com os GO, sendo totalmente hidrolisados, e não ocorrendo o risco de crescimento de microrganismos no leite.

Foi também observada a presença de invertase na amostra enzimática semipurificada, devido à diminuição do pico da sacarose após 12 horas de incubação. A presença da invertase não interfere sobre a aplicação desse extrato enzimático na indústria, visto que geralmente são empregadas enzimas parcialmente purificadas na indústria, devido ao alto custo comercial das enzimas puras.

A α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* após 4 horas de incubação a 60 °C hidrolisou toda rafinose e estaquiose presente no leite de soja (VIANA *et al.*, 2006). A α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi* após 3 horas de incubação hidrolisou 79% dos GO presentes no leite de soja e após 12 horas de incubação, houve uma redução de 91% dos GO (THIPPESWAMY e MULIMANI, 2002). GOTE *et al.* (2004), observaram que α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* hidrolisou toda estaquiose e 94% da rafinose do leite de soja após 2 horas de incubação a 65 °C. Uma α -galactosidase purificada de semente de soja germinada após 8 horas de incubação a 30 °C hidrolisou 73,3% da rafinose e 40,6% da estaquiose presentes no leite de soja (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

Portanto, nesse ensaio preliminar, observou-se que a enzima α -galactosidase de *A. terreus* foi capaz de hidrolisar os oligossacarídeos de galactose presentes no leite de soja, podendo ser otimizada para futuras aplicações industriais.

5. CONCLUSÕES

O fungo *A. terreus* produz em meio mineral líquido, contendo farelo de trigo como fonte de carbono, 3 formas da enzima α -galactosidase extracelular.

A α -galactosidase de *A. terreus* apresentou massa molecular de 50 kDa em condições desnaturantes e 77,3 kDa em sua forma nativa.

A α -galactosidase apresentou atividade máxima em pH 5,0 e a 55 °C.

Quando a enzima é incubada por 6 horas a 40 °C, ela mantém mais de 90% da atividade inicial no intervalo de pH 4 – 6.

A α -galactosidase de *A. terreus* a 50 °C perdeu 39% de sua atividade após 151 horas de incubação. Na temperatura de 55 °C a enzima conservou 33% de sua atividade após 52 horas de incubação. A 60 °C a enzima manteve 92% da atividade inicial por 30 minutos.

A meia-vida da enzima a 55 e 60 °C foi de 35 horas e 103 minutos, respectivamente.

A enzima apresentou maior afinidade para o substrato *p*-NP- α Gal e uma baixa hidrólise para o substrato *m*-NP- α Gal.

O valor de K_M ap para o substrato p-NP- α Gal foi de 0,75 mM, para a melibiose de 7,39 mM, para a rafinose de 32,99 mM e para a estaquiiose de 54,74 mM.

A enzima hidrolisou os substratos naturais melibiose, estaquiiose e rafinose, apresentando baixa atividade para os polímeros goma guar e goma locusta.

A atividade enzimática foi totalmente perdida em presença de Ag^+ e parcialmente inibida por Cu^{2+} e galactose.

Na presença do substrato p-NP- α Gal a enzima sofreu uma inibição competitiva pela galactose (K_i 0,61 mM).

A energia de ativação para os substratos p-NP- α Gal foi de 65,85 kJ/mol, para a melibiose de 39,77 kJ/mol, para a rafinose de 42,984 kJ/mol e para a estaquiiose de 47,27 kJ/mol.

A enzima α -galactosidase de *A. terreus* não converteu o sangue tipo B em tipo O, nas condições testadas.

A enzima mostrou ser eficiente na redução de oligossacarídeos de galactose presentes em leite de soja, podendo ser 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.
- ALI, S. Application of kaolin to improve citric acid production by a thermophilic *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 755-762, 2006.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in Biotechnonology. **Biotechnology Advances** , v. 18, p. 355-83, 2000.
- BILLINGTON, R.H. Versatile itaconic acid and its derivatives. **Chemical Process**, v. 15, p. 8–30, 1969.
- BISCHOFF, K.M.; SHI, L.; KENNELLY, P.J. The detection of enzyme activity following sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 260, p. 1-17, 1998.
- BIZUKOJC, M.; PAWLOWSKA, B.; LEDAKOWICZ, S. Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 258-268, 2007.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BONNARME, P.; GILLET, B.; SEPULCHRE, A.M.; ROLE, C.; BELOEIL, J.C.; DUCROCQ, C. Itaconate Biosynthesis in *Aspergillus terreus* , **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 3573–3578, 1995.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CALHOUN, D. H.; BISHOP, D.F.; BERNSTEIN, H.S.; QUINN, M.; HANTZOPOULOS, P.; DESNICK, R.J. Fabry disease: isolation of a cDNA clone encoding human alpha-galactosidase A. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 82, p. 7364-7368, 1985.
- CARRERA-SILVA, E.A.; SILVESTRONI, A.; LeBLANC, J.G.; PIARD, J.C.; SAVOY de GIORI, G.; SESMA, F. A thermostable α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum* CRL722: genetic characterization and main properties. **Current Microbiology**, v. 53, p. 374-378, 2006.
- CASAS LOPEZ, J.L.; SANCHEZ PEREZ, J.A.; FERNANDEZ SEVILLA, J.M.; ACIEN FERNANDEZ, F.G.; MOLINA GRIMA, E.; CHISTI, Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolic production. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, p. 270-277, 2003.
- CLAUSEN, H.; HAKOMORI, S. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. **Vox Sang**, v. 56, p. 1-20, 1989.
- CRISTOFARO, F. M.; WUHRMANN, J.J. Involvement of the Raffinose family of oligo-accharides in flatulence. **Sugar in Nutrition**, p. 313-36, 1974.
- 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 CASTRO, H. F; MENDES, A.A.; DOS SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.
- DE OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, V.M.; BORGES, E.E.L.; FIALHO, L.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; de REZENDE, S.T. Purificação e caracterização de α -galactosidases de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli. **Revista Árvore**, v. 29, p. 535-543, 2005.
- 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.
- DE REZENDE, S.T. **Teores de oligossacarídeos de rafinose em soja, purificação e caracterização de invertases e α -galactosidases de microrganismos**. Universidade de Brasília, Brasília – DF, (Tese D.S), 1998, p. 166.

- DEAN, K. J.; SWELLEY, C.C. Studies on human liver alpha-galactosidases. I. Purification of alpha-galactosidase A and its enzymatic properties with glycolipid and oligosaccharide substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 9994-10000, 1979.
- 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.; DEY CAMPILLO, E.M.; LEZICA, R.P. Characterization of a glycoprotein alpha-galactosidase from lentil seeds (*Lens culinaris*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 923-929, 1983.
- DEY, P. M. IN: PM dey, RA Dixon, eds., Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants. **New York: Academic Press**, p. 53-129, 1985.
- DEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. Biochemistry of a-galactosidases. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 36, p. 91-130, 1972.
- DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 11-21, 2004.
- FALKOSKI, D.L.; GUIMARÃES, V.M.; CALLEGARI, C.M.; REIS, A.P.; de BARROS, E.G.; de REZENDE, S.T. Processing of soybean products by semipurified plant and microbial α -galactosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 10184-10190, 2006.
- FUJIMOTO, Z.; KANEKO, S.; MOMMA, M.; KOBAYASHI, H.; MIZUNO, H. Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278. p. 313-318, 2003.
- GANDHI, N.N. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 621, 1997.
- GANTER, C.; BÖCK, A.; BUCKE, P.; MATTES, R. Production of thermostable recombinant a-galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. **Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 301-310, 1988.
- GERMAIN, D. P. Fabry disease. Clinical and genetic aspects. Therapeutic perspectives. **Revue de Médecine Interne**, v. 12, p. 1086-103, 2000.
- GITZELMANN, R.; AURICCHIO, S. The handling of soy a-galactosidase by a normal and galactosemic child. **Pediatrics**, v. 36, p. 231-235, 1965.
- 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.; BRANDÃO NETO, J.R.; NEUSTROEV, K.N.; ENEYSKAYER, E.V.; KULMINSKAYA, A.A.; SHABALIN, K.A.; SAVEL'EV, A.N.; POLICARPOV, I. Crystal Structure of α -Galactosidase from *Trichoderma reesei* and Its Complex with Galactose: Implications for Catalytic Mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 339, p. 413-422, 2004.
- GOTE, M.; UMALKAR, H.; KHAN, I.; KHIRE, J. Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1723-1729, 2004.
- GOTE, M.M.; KHAN, M.I.; GOKHALE, D.V.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M. Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1311-1317, 2006.
- GRIGOREVSKI-LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R.P.; BON, E.P.S.; COELHO, R.R.R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272-277, 2005.
- GUIMARÃES, V. M.; DE REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; DE 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.
- GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. Fermentation waste of *Aspergillus terreus*: A promising copper bio-indicator. **Current Science**, 1999.
- HOBBS, L.; MITRA, M.; PHILLIPS, R.; HAIBACH, H.; SMITH, D. Deantigenation of human type B erythrocytes with Glycine max α -D-galactosidase. **Biomed e Pharmacother**, v. 5, p. 244-250, 1995.
<http://www.ias.ac.in/currsci/nov25/articles28.htm>
- ITO, T.; UDA, Y.; NAKAGAWA, H. Purification and characterization of alpha-galactosidase from watermelon. **Journal of Biochemistry (Tokyo)**, v. 99, p. 243-250, 1986.
- JAN, H.D.; CHEN, K.S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 263-8, 2003.
- JIMÉNEZ, M. J. M.; ELÍAS, L.G.; BRESSANI, R.; NAVARRETE, D.A.; GÓMEZ-BRENES, R.; MOLINA, M.R. Estudios bioquímicos Y nutricionales de la semilla germinada de soya. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 35, 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 alpha-galactosidase from *Trichoderma reesei*. **Journal of Biochemistry**, v. 308; p. 955-964, 1995.
- KANDLER, O.; HOLF, H. Metabolism and function of oligosaccharides. **Biochemistry of plants Carbohydrates**, v. 3, p. 117-131, 1980.
- KARAFFA, L.; SANDOR, E.; FEKETE, E.; SZENTIRMAI, A. The biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 48, p.429-40, 2001.
- KARAM, J.; NICELL, J.A. Potencial Applications of Enzymes in Waste Treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 141-153, 1997.
- KING, M.R.; WHITE, B.A.; BLASCHEK, H.P.; CHASSY, B.M.; MACKIE, R.I.; CANN, I.K.O. Purification and characterization of a thermostable α -galactosidase from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5676-5682, 2002.
- KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.
- KOTWAL, S.M.; GOTE, M.M.; KHAN, M.I.; KHIRE, J.M. Induction, purification and characterization of a constitutive intracellular α -galactosidase from the thermophilic fungus *Humicola* sp. **Journal Ind. Microbial Biotechnology**, v. 23, p. 661-7, 1999
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-683, 1970.
- LAHUTA, L. B.; GORECKI, R.J.; MICHALCZYK, D.; PIOTROWICK-CIESLAK, A.I. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 3, p. 1-10, 2000.
- LANTZ, M.S.; CIBOROWSKI, P. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 563-594, 1994.
- 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.
- LINDEN, J. C. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 130-136, 1982.

- LUONTERI, E.; ALATALO, E.; SIIKA-AHO, M.; PENTILLÄ, M.; TENKANEN, M. α -Galactosidases of *Penicillium simplicissimum*: production, purification and characterization of gene encoding AGLI. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 28, p. 179-188, 1998.
- LUSIS, A.J.; PAIGEN, K. Properties of mouse alpha-galactosidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 437, p. 487-497, 1976.
- MacCABE, A.P.; OREJAS, M.; TAMAYO, E.N.; VILLANUEVA, A.; RAMÓN, D. Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Biotechnology**, v. 96, p. 43-54, 2002.
- MARANVILLE, E.; ZHU, A. The carboxyl terminus of coffee bean alpha-galactosidase is critical for enzyme activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, p. 225-230, 2000.
- MASSE, L.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 145-55, 2001.
- McILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparasions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 185-186, 1921.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1956.
- MULIMANI, V. H.; RAMALINGAM. Enzymic hydrolysis of raffinose and stachyose in soymilk by alpha-galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 36, p. 897-905, 1995.
- MURATA, T.; USUI, T Preparation of oligosaccharide units library and its utilization. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 1059-1066, 1997.
- MYAMURA, N.; ARAKI, E.; MATSUDA, K.; YOSHIMURA, R.; FURUKAWA, N.; TSURUZOE, K.; SHIROTANI, T.; KISHIKAWA, H.; YAMAGUCHI, K.; SHICHIRI, M. A carboxy-terminal truncation of human alpha-galactosidase A in a heterozygous female with Fabry disease and modification of the enzymatic activity by the carboxyl-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.
- ODA Y.; TONOMURA K. α -Galactosidase from the yeast *Torulasporea delbrueckii* IFO 1255. **Department of food science and technology** , Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima, Japan, 1995.
- PANDEY, A. B. S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, AND V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.

- PARKIN, K. **Enzymes in Food Processing**. 3^a ed., Tilak Nago Withana e Gerald Reed, San Diego, 1993.
- PRASHANTH, S.J.; MULIMANI, V.H. Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1199-1205, 2005.
- PUCHART, V.; VRSANSKA, M.; BHAT, M.K.; BIELY, P. Purification and characterization of α -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1524, p. 27-37, 2000.
- RAUNKJAER, K.; NIELSEN, P.; HVITVED-JACOBSEN, T. Acetate removal in sewer biofilms under aerobic conditions. **Water Research**., 31, p. 2727-36, 1997.
- REZESSY-SAZBÓ, J.M.; NGUYEN, Q.D.; HOSCHKE, A.; BRAET, C.; HAJÓS, G.; CLAEYSSENS, M. A novel thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: purification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1770, p. 55-62, 2007.
- RIBEIRO, R. R. **Caracterização cinética da invertase imobilizada em Dowex IX80-50**. Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, p. 62 (Tese M.S), 1997.
- SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ed. Legis Summa, Ribeirão Preto, 2004.
- SCHIMID, A.; DORDICK, J.S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, p. 258-268, 2001.
- SCHMID, A.; HOLLMANN, F.; PARK, J.B.; BÜHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Current Opinion in. Biotechnology**, v. 4, p. 359-366, 2002.
- SEGEL, I.H. **Bioquímica . Teoria e Problemas**. Cap. 4 – Enzimas, 1979.
- 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.
- SHAH, V.; PAREKH, L.J. Purification and properties of alpha-galactosidase from *Klebsiella* Sp. No. PG-2. **Indian Journal Biochem Biophysica**, v. 27, p. 103-107, 1990.
- SOMIARI, R. I.; BALOGH, E. Hidrolysis of raffinose and stachyose in cowpeal (*Vigna-Unguiculata*) flour, using alpha-galactosidase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 564-566, 1992.

- SRIPUAN, T.; AOKI, K.; YAMAMOTO, K.; TONGKAO, D.; KUMAGAI, H. Purification and characterization of thermostable α -galactosidase from *Ganoderma lucidum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 1485-1491, 2003.
- STEGGERDA, F. R.; RICHARD, E.A.; RACKIS, J.J. Effect of various soybean products on flatulence in the adult man. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 121, p. 1235-9, 1966.
- STERNBERG, D. VIJAYKUMAR, P.; REESE, E.T. Beta-glucosidase: microbiology of production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Canadian Journal Microbiology**, v. 23, p. 139-147, 1970.
- THIPPESWAMY, S.; MULINAMI, V.H. Enzymic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujiduroi*. **Process Biochemistry**, v. 38, p.635-640, 2002.
- TSUGE, H.; NATSUAKI, O.; OHASHI, K. Purification, properties and molecular feature of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Journal of Biochemistry**, v. 78, p. 835-843, 1975.
- TURAKAINEN, H.; HANKAANPAA, M.; KORHOLA, M.; AHO, S. Characterization of MEL genes in the genus *Zygosaccharomyces*. **Yeast**, v. 10, p. 733-745, 1994.
- TZANOV, T.; CALAFELL, M.; GUEBITZ, G.M.; CAVACO-PAULO, A. Biopreparation of cotton fabrics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 357-362, 2001.
- ULEZLO, I.V.; ZAPROMETOVA, O.M. Microbial α -galactosidase (a review). **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologija**, v.18, p. 3-15, 1982.
- VARBANETS, L.D.; MALANCHUK, V.M.; BUGLOVA, T.T.; KUHLMANN, R.A. *Penicillium* sp. 23 alpha-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.; MARQUES, V.M.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.C.; de BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.M.; de REZENDE, S.T. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 93, p. 665-670, 2005.
- VITOLO, M.; YASSUDA, M.T. Effect of sucrose concentration on the invertase activity of intact yeast cells (*S. cerevisiae*). **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 53-56, 1991.
- WALSH, G.; HEADON, D. Protein biotechnology. **John Wiley**, 1994.
- WANKHEDE, D. B.; SAROJA, R.; RAO, M.R. Changes in carbohydrates and the activity of alpha-galactosidase, pentosanase and lipase during germination of groundnuts (*Arachis hypogea*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 28, p. 167-172, 1977.
- WEINGLASS, A.B.; WHITELEGGE, J.P.; HU, Y.; VERNER, G.E.; FAULL, K.F.; KABACK, H.R. Elucidation of substrate binding interactions in a membrane transport protein by mass spectrometry. **The Embo Journal**, v. 22, p. 1467–1477, 2003.
- WINDISH, W. W.; MHATRE, N.S. Microbial amylases. **Advances in Applied Microbiology**, v. 7, p. 273-304, 1965.
- WISEMAN, A. Handbook of enzyme biotechnology. **Ellis Horwood**, 1975.
- WONG, H.C.; HU, C.A.; YEH, H.L.; SU, W.; LU, H.C., LIN, C.F. Production, purification and characterization of α -galactosidase from *Monascus pilosus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 1147-1152, 1986.
- ZAPATER, I. G.; ULLAH, A.H.J.; WODZINSKI, R.J. Extracellular α -galactosidase from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135, purification and characterization. **Preparative Biochemistry**, v. 20, p. 263-296, 1990.
- ZEILINGER, S.; KRISTUFEK, D.; ARRISAN-ATAC, I.; HODITS, R.; KUBICEK, C. Condition of formation, purification and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1347-1353, 1993.
- ZHU, A.; GOLDSTEIN, J. Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean α -galactosidase. **Gene (Amst.)**, v. 140, p. 227-231, 1994.
- ZHU, A.; LENG, L.; MONAHAN, C.; ZHAN, Z.; HURST, R.; LENNY, L.; GOLDSTEIN, J. Characterization of recombinant α -galactosidase for use in seroconversion from blood group B to O of human erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 327, p. 324-329, 1996.