

POLLYANNA AMARAL VIANA

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICO - BIOQUÍMICA E APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS DE α -GALACTOSIDASES DE
Debaryomyces hansenii UFV-1**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

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

T

V614c Viana, Pollyanna Amaral, 1976-
2005 Caracterização cinético-bioquímica e aplicações
biotecnológicas de α -galactosidades de *Debaryomyces
hansenii* UFV-1 / Pollyanna Amaral Viana. – Viçosa :
UFV, 2005.
xx, 170f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientadora: Valéria Monteze Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 150-164

1. Hidrólise. 2. α -galactosidades - Purificação.
3. *Debaryomyces hansenii*. 4. Indução enzimática.
5. Cinética enzimática. 6. Enzimas imobilizadas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.793

POLLYANNA AMARAL VIANA

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICO - BIOQUÍMICA E APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS DE α -GALACTOSIDASES DE
Debaryomyces hansenii UFV-1**

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

Aprovada em: 01 de fevereiro de 2005.

Prof^a. Flávia Maria Lopes Passos
(Conselheira)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Prof. Sebastião Tavares de Rezende
(Conselheiro)

Prof. Marcelo Matos Santoro

Prof^a. Valéria Monteze Guimarães
(Orientadora)

Dedico este trabalho

À Deus,
Aos meus pais, Adalberto e Eliane,
Aos meus irmãos, Giulliano e Dagoberto,
Ao meu namorado Germano.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar e abençoar a minha vida, da minha família e de todas as pessoas que estão ao meu redor. Obrigada Senhor!

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

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

Especialmente agradeço, à professora Valéria Monteze Guimarães, pela orientação na realização deste trabalho e na minha formação profissional, pelo apoio, paciência, dedicação, confiança e principalmente, pelo carinho e amizade.

Ao Professor Sebastião Tavares de Rezende pelos ensinamentos, colaboração, sugestões e amizade.

Às conselheiras e professoras Flávia Maria Lopes Passos e Maria Goreti de Almeida Oliveira, pelas críticas e valiosas sugestões apresentadas.

À D^{ra}.Virgínia Maria Chaves - Alves pelo apoio e ajuda durante o desenvolvimento inicial do meu trabalho.

A todos os demais professores pelos conhecimentos, que contribuíram para minha formação profissional.

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

Ao Aloísio Nunes Cordeiro, pela concessão dos materiais utilizados durante os experimentos.

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

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

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

Ao Laboratório de Análises Bioquímicas do BIOAGRO, pela contribuição em algumas análises, especialmente, à Inês Chamel José, pela paciência e ajuda.

Ao Laboratório de Proteínas do BIOAGRO, especialmente ao amigo João Paulo da Silva Castro, pela disponibilidade e ajuda na realização dos géis.

Ao Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do BIOAGRO, pela disponibilidade de realizar parte da minha tese.

Aos professores Marcelo Matos Santoro e Marcelo Bemquerer pela ajuda e oportunidade de trabalhar no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas – Laboratório Prof. Marcos Mares-Guia do ICB-UFMG, Belo Horizonte, MG.

Ao Jamil Silvano de Oliveira pela atenção e ajuda nas análises realizadas no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas – Laboratório Prof. Marcos Mares-Guia do ICB-UFMG, Belo Horizonte, MG.

Às minhas estagiárias e amigas Larissa Mattos Trevizano e Virgínia Martins Marques, pela ajuda, apoio, dedicação, carinho e amizades.

Ao amigo Daniel Luciano Falkoski, pelos ensinamentos, amizade, apoio e ajuda necessários à realização deste trabalho.

À amiga Angélica Pataro Reis pelo carinho, amizade e apoio durante os meus experimentos.

Ao Agenor Valadares e à Luciana Xavier pelo apoio, ajuda, preocupação e amizade.

Aos estagiários Thiago de Almeida Leite e Juliana Barbosa Coutinho, pela contribuição durante o final do meu trabalho.

Aos meus pais, Adalberto Rigueira Viana e Eliane Amaral Viana, pelo amor, carinho, orações, bons exemplos, dedicação, preocupação e apoio em todos os dias da minha vida.

Aos meus irmãos, Giulliano Amaral Viana e Dagoberto Amaral Viana, pela amizade e confiança.

À minha querida avó Alayde Teixeira Amaral, pelo carinho, preocupação e pelas orações.

Aos meus queridos avós, (*in memorian*) Acir Vieira Viana e Jandira Rigueira Viana, pelo carinho e dedicação.

Ao Germano Carneiro da Costa, pelo amor, carinho, apoio, incentivo e principalmente por fazer parte da minha vida.

Aos meus sogros e amigos, Lincoln Medeiros da Costa e Tânia Carneiro da Costa, pelo carinho, conselhos, preocupação e pelas orações.

Enfim, agradeço a todos aqueles que passaram pela minha existência, iluminaram os meus passos e contribuíram para que eu me tornasse um ser humano melhor.

BIOGRAFIA

Pollyanna Amaral Viana, filha de Adalberto Rigueira Viana e Eliane Amaral Viana, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 29 de junho de 1976.

Em outubro de 2000, graduou-se em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

No período de novembro de 2000 a fevereiro de 2003, trabalhou na indústria Massas Portuense Ltda., em Astolfo Dutra, Minas Gerais.

Em março de 2003, iniciou o Curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, no dia 01 de fevereiro de 2005, com defesa de tese.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Absorbância
APTS	3-Aminopropiltriétoxissilano
BSA	Albumina sérica bovina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DEAE-Sepharose	Diétil aminoetil-Sepharose
DNS	Dinitrossalicilato
DP	Desvio padrão
E	Enzima
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
kDa	Kilodalton
K _i	Constante de inibição
K _M	Constante de Michaelis-Menten
I	Inibidor
log	Logaritmo
MM	Massa molecular
o-NP-βGal	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
o-NP-βGlc	o-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
P	Produto
p-NP-αGal	p-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo
p-NP-βGal	p-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
p-NP-αGlc	p-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo
p-NP-βXil	p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo
p-NP-αMan	p-nitrofenil-α-D-manopiranosídeo
p-NP-αAra	p-nitrofenil-α-D-arabinopiranosídeo
p-NP	p-nitrofenol
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PVDF	Difluoreto de polivinila
rpm	Rotação por minuto

RO	Oligossacarídeos de rafinose
S	Substrato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade de atividade enzimática
v/v	Volume/volume
Vo	Velocidade inicial
V _{max}	Velocidade máxima
V	Volts

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xv
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS GERAIS	4
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Importância da soja e seus derivados na alimentação	6
2.2. Fatores antinutricionais presentes na soja	9
2.3. Processos para redução de RO em produtos de soja	12
2.4. Mecanismo de ação e estrutura de α -galactosidases.....	14
2.5. α -Galactosidases de leveduras	19
2.6. Aspectos gerais da produção de enzimas de microrganismos	21
2.7. Considerações sobre a levedura <i>Debaryomyces hansenii</i> ...	23
2.8.Regulação da expressão de α -galactosidases em microrganismos.....	25
2.9. Imobilização enzimática.....	26
2.9.1. Principais métodos de imobilização	27

2.9.1.1. Ligação cruzada	27
2.9.1.2. Adsorção física em suporte.....	28
2.9.1.3. Ligação iônica	28
2.9.1.4. Ligação covalente.....	29
2.9.1.5. Encapsulamento ou aprisionamento	30
2.9.1.6. Combinação de métodos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Reagentes	32
3.2. Microrganismo	33
3.3. Manutenção da cultura	33
3.4. Determinação da Relação Massa Celular Seca <i>versus</i> Absorbância	33
3.5. Meios de cultura, fontes e tempos para produção de α - galactosidases de <i>Debaryomyces hansenii</i>	34
3.6. Crescimento de <i>Debaryomyces hansenii</i>	34
3.7. Permeabilização das células de <i>Debaryomyces hansenii</i>	35
3.8. Purificação das α -galactosidases de <i>Debaryomyces hansenii</i>	35
3.8.1. α -Galactosidase extracelular.....	35
3.8.1.1. Cromatografia de filtração em gel	36
3.8.1.2. Cromatografia de troca-iônica.....	36
3.8.2. α -Galactosidase intracelular.....	37
3.8.2.1. Extração da α -galactosidase intracelular.....	37
3.8.2.2. Purificação da α -galactosidase intracelular.....	38
3.8.2.3. Crioprecipitação.....	38
3.8.2.4. Cromatografia de filtração em gel	38
3.8.2.5. Cromatografia de troca-iônica.....	39
3.9. Determinação da atividade das α -galactosidases.....	39
3.9.1. Com o substrato sintético p-NP- α Gal	39
3.9.2. Com açúcares redutores	40
3.9.3. Com açúcares não-redutores.....	40

3.9.4. Com outros substratos sintéticos	41
3.9.5. Com polímeros	41
3.10. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das α -galactosidases	42
3.10.1. Eletroforese	42
3.10.2. Coloração dos géis de eletroforese.....	42
3.11. Caracterização enzimática	43
3.11.1. Efeito do pH.....	43
3.11.2. Efeito da temperatura.....	43
3.11.3. Análise de termoestabilidade	44
3.11.4. Efeito do pH na estabilidade e atividade da α -galactosidase extracelular	45
3.11.5. Meia-vida das α -galactosidases.....	45
3.11.6. Determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_M) e das velocidades máximas (V_{max})	45
3.11.7. Determinação das especificidades das α -galactosidases para diversos substratos	46
3.11.8. Determinação da constante de inibição (K_i) das α - galactosidases	46
3.11.9. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade das α -galactosidases	47
3.11.10. Seqüenciamento do N-terminal da α -galactosidase extracelular de <i>Debaryomyces hansenii</i>	47
3.12. Determinação do teor protéico nos extratos enzimáticos...	48
3.13. Imobilização da α -galactosidase extracelular	49
3.14. Hidrólise de RO em produtos derivados de soja	50
3.15. Hidrólise de RO no melaço de soja.....	51
3.16. Extração de RO	52
3.17. Determinação do teor de oligossacarídeos por CLAE	52

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
Parte 1: Condição fisiológica para síntese de α -galactosidases de <i>Debaryomyces hansenii</i>	
4.1.1. Massa celular e atividade de α -galactosidase extracelular da cultura de <i>Debaryomyces hansenii</i> em diferentes meios e fontes de carbono	55
4.1.2. Atividade de α -galactosidase intracelular de <i>Debaryomyces hansenii</i>	62
Parte 2: Purificação e caracterização da α -galactosidase extracelular de <i>Debaryomyces hansenii</i>	
4.2.1. Purificação da α -galactosidase extracelular produzida pela levedura <i>Debaryomyces hansenii</i>	67
4.2.2. Determinação da massa molecular	71
4.2.3. Caracterização enzimática.....	72
4.2.3.1. Efeito do pH	72
4.2.3.2. Efeito da temperatura.....	74
4.2.3.3. Análise da termoestabilidade	75
4.2.3.4. Efeito do pH na estabilidade e atividade da α - galactosidase extracelular.....	77
4.2.3.5. Meia-vida da α -galactosidase	79
4.2.3.6. Constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max})	83
4.2.3.7. Especificidade da α -galactosidase extracelular purificada de <i>Debaryomyces hansenii</i> com outros substratos.....	87
4.2.3.8. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase extracelular purificada de <i>Debaryomyces hansenii</i>	91
4.2.3.9. Constante de inibição (K_i) para os açúcares galactose e melibiose.....	93
4.2.3.10. Seqüenciamento do N-terminal da α -galactosidase extracelular de <i>Debaryomyces hansenii</i>	97

Parte 3: Purificação e caracterização da α -galactosidase intracelular de <i>Debaryomyces hansenii</i>	
4.3.1. Purificação da α -galactosidase intracelular produzida pela levedura <i>Debaryomyces hansenii</i>	101
4.3.2. Determinação da massa molecular.....	104
4.3.3. Caracterização enzimática.....	105
4.3.3.1. Efeito do pH.....	105
4.3.3.2. Efeito da temperatura.....	106
4.3.3.3. Análise da termoestabilidade.....	107
4.3.3.4. Meia-vida da α -galactosidase intracelular.....	109
4.3.3.5. Constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max}).....	111
4.3.3.6. Especificidade da α -galactosidase intracelular purificada de <i>Debaryomyces hansenii</i> com outros substratos.....	115
4.3.3.7. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase intracelular purificada de <i>Debaryomyces hansenii</i>	117
4.3.3.8. Constante de inibição (k_i) para os açúcares galactose e melibiose.....	119
Parte 4: Imobilização e caracterização parcial da α -galactosidase extracelular de <i>Debaryomyces hansenii</i>	
4.4.1. Imobilização da α -galactosidase extracelular de <i>Debaryomyces hansenii</i>	125
4.4.2. Efeito do pH na atividade da α -galactosidase extracelular imobilizada.....	127
4.4.3. Efeito da temperatura na atividade da α -galactosidase extracelular imobilizada.....	129
4.4.4. Análise de termoestabilidade.....	131
Parte 5: Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em produtos de soja pelas α -galactosidas de <i>Debaryomyces hansenii</i>	

4.5.1.Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (RO) em produtos derivados de soja pelas α -galactosidases de <i>Debaryomyces hansenii</i>	134
4.5.1.1.Extrato desengordurado de soja (Leite de soja)	134
4.5.1.2.Melaço de soja	143
5. CONCLUSÕES	148
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
7. APÊNDICE	165
Apêndice A	165
Apêndice B	166
Apêndice C	169

RESUMO

VIANA, Pollyanna Amaral, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Caracterização cinético - bioquímica e aplicações biotecnológicas de α -galactosidases de *Debaryomyces hansenii* UFV-1.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães. Conselheiros: Flávia Maria Lopes Passos, Maria Goreti de Almeida Oliveira, Maurílio Alves Moreira e Sebastião Tavares de Rezende.

Diversas pesquisas têm demonstrado o potencial de α -galactosidases para o processamento de produtos alimentícios à base de leguminosas. A soja, uma fonte concentrada de isoflavonas, tem sido utilizada na prevenção e tratamento de câncer e osteoporose. Além disso, o leite de soja é considerado um substituto de baixo custo para o leite de vaca, como suplemento nutritivo para crianças intolerantes à lactose. Em contrapartida, leguminosas contêm muitos fatores antinutricionais, sendo um deles os oligossacarídeos de rafinose (RO), que são os principais fatores responsáveis por distúrbios gastrintestinais relacionados com a ingestão de produtos derivados de soja. As mucosas intestinais de humanos e de animais monogástricos não possuem a enzima α -galactosidase, essencial para a hidrólise de ligações α -1,6 nos RO. Portanto, a eliminação dos RO dos produtos de soja contribui para melhorar o seu valor nutritivo. Esses galacto-oligossacarídeos são extremamente termoestáveis e, práticas tradicionais como

embebição, cozimento e germinação são incapazes de eliminá-los completamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a hidrólise de RO presente no extrato desengordurado de soja e nos produtos de soja, melaços leve e pesado utilizando α -galactosidases extra e intracelulares purificadas de *Debaryomyces hansenii*, além da enzima extracelular imobilizada. *Debaryomyces hansenii* foi cultivada em meio mineral com extrato de levedura (MME), contendo galactose como fonte de carbono, por 36 h a 30 °C. Após este período, o meio de cultura foi centrifugado, o sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima extracelular e as células como fonte da enzima intracelular. Os extratos enzimáticos foram submetidos à cromatografia de filtração em gel Sephadex G-150 e posteriormente, à cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose, pH 5,5. As frações protéicas com atividade de α -galactosidase foram eluídas com um gradiente de NaCl de 0 a 1 M. As enzimas extra e intracelulares apresentaram fatores de purificação de 16,7 e 289 vezes, respectivamente, com um rendimento de 58 e 45 %, respectivamente. Atividades máximas das α -galactosidases extra e intracelulares foram detectadas em pH 5,0, a 60 e 55 °C, respectivamente. A enzima extracelular manteve 80 % da atividade original após pré-incubação por 3 h a 60 °C, enquanto que, a enzima intracelular manteve 85 % da atividade original por 6 h a 55 °C. Os valores da K_M para p-NP- α Gal, melibiose, estaquiose e rafinose para a enzima extracelular foram 0,30, 2,01, 9,66 e 16,0 mM, respectivamente, e para a enzima intracelular foram 0,32, 2,12, 10,8 e 32,8 mM, respectivamente. As α -galactosidases apresentaram especificidade absoluta para galactose em posição α , hidrolisando p-NP- α Gal, estaquiose, rafinose, melibiose e os polímeros goma de alfarroba e goma guar. As α -galactosidases foram completamente inibidas por sulfato de cobre. A enzima extracelular foi completamente inibida por nitrato de prata, enquanto que, a atividade da enzima intracelular foi reduzida em 70 %. Na presença do substrato p-NP- α Gal a enzima extracelular apresentou inibição não-competitiva por galactose (K_i 2,7 mM) e melibiose (K_i 1,2 mM). A enzima intracelular apresentou inibição do tipo acompetitiva por galactose (K_i 0,70 mM) e inibição competitiva por melibiose (K_i 0,98 mM). O N-terminal da α -galactosidase extracelular foi determinado por seqüenciamento automático (YENGLNLVPQMGWN), apresentando similaridade com α -galactosidases de outros microrganismos. A α -galactosidase extracelular

foi imobilizada em suporte insolúvel (sílica modificada) e apresentou maior estabilidade comparada à enzima livre, mantendo 94 % de sua atividade original por 16 h a 70 °C. Os resultados dos tratamentos do leite de soja a 60 °C com a α -galactosidase extracelular purificada, com as células permeabilizadas contendo a enzima intracelular e com a enzima extracelular imobilizada, por 2, 2 e 4 h, respectivamente, mostraram redução de 100 % de estaquiose. Houve 100 % de redução de rafinose, com a enzima extracelular e com as células permeabilizadas, após 2 e 4 h, respectivamente. O tratamento do leite de soja com a enzima extracelular imobilizada por 10 h, promoveu redução de 63 % de rafinose. Após tratamento com a α -galactosidase extracelular a 60 °C, os produtos melaços leve e pesado, mostraram 100 % de redução de estaquiose após 2 h de incubação e rafinose foi reduzida em 60 e 50 %, respectivamente. Portanto, observa-se que as α -galactosidas de *Debaryomyces hansenii* foram eficientes na redução dos RO presentes em produtos derivados de soja, sendo indicadas para a utilização industrial no processamento desses açúcares.

ABSTRACT

VIANA, Pollyanna Amaral, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2005. **Kinetic - biochemical characterization and biotechnological applications of *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidases.** Advisor: Valéria Monteze Guimarães. Committee members: Flávia Maria Lopes Passos, Maria Goreti de Almeida Oliveira, Maurílio Alves Moreira and Sebastião Tavares de Rezende.

Several researches have demonstrated the potential of α -galactosidases in the processing of legume derived food. Soybean is a concentrated source of isoflavones, which has been used in prevention and treatment of cancer and osteoporosis. Besides, soy milk is considered a substitute for cow milk, as well as a nutritional supplement for lactose intolerant children. On the other hand, there are many antinutritional features in legume. The raffinose oligosaccharides (RO) are the main responsible for gastric and intestinal diseases related to the ingestion of soy products. The intestinal mucous membrane of men and monogastrics animals does not have the α -galactosidase enzyme, which is essential for hydrolysis of the α -1,6 linkages in the RO. Therefore, the most important factor for improvement of soy nutritional value is to eliminate the RO from soy products. These galacto-oligosaccharides are extremely thermostable and traditional practices like embebibition, cooking and germination are unable to eliminate them completely. The

present work aims to evaluate the hydrolysis of RO present in the fat free soybean extract and in the soybean molasses, using purified extra and intracellular α -galactosidases from *Debaryomyces hansenii* and the immobilized extracellular enzyme. The *Debaryomyces hansenii* was cultivated in mineral medium with yeast extract (MME), which contained galactose as carbon source for 36 h at 30 °C. Following the centrifugation of the culture medium, the supernatant was used as extracellular enzyme source and the cells as intracellular enzyme source. The enzymatic extracts were submitted to the chromatography of gel filtration Sephadex G-150 followed by the ion exchange chromatography DEAE-Sepharose, pH 5.5. The protein fractions with α -galactosidase activity were eluted with NaCl gradient from 0 to 1 M. The extra and intracellular enzymes presented purification factors of 16.7 and 289 times, respectively, with a recovery of 58 and 45 %, respectively. The maximum activities of the extra and intracellular α -galactosidases were detected in pH 5.0 at 60 and 55 °C, respectively. The extracellular enzyme maintained 80 % of its original activity after a pre-incubation for 3 h at 60 °C, while the intracellular enzyme maintained 85 % of its original activity for 6 h at 55 °C. The values of K_M for p -NP- α Gal, melibiose, stachyose and raffinose for the extracellular enzyme were 0.30, 2.01, 9.66 e 16.0 mM, respectively, and for the intracellular enzyme were 0.32, 2.12, 10.8 e 32.8 mM, respectively. The α -galactosidases presented absolute specificity for galactose in α position, hydrolysing p -NP- α Gal, stachyose, raffinose, melibiose and the polymers locust bean gum and guar gum. The α -galactosidases were completely inhibited by copper sulphate. The extracellular enzyme was completely inhibited by silver nitrate, while the intracellular enzyme activity was reduced in 70 %. In the presence of substrate p -NP- α Gal the extracellular enzyme presented a non-competitive inhibition by galactose (K_i 2.7 mM) and melibiose (K_i 1.2 mM), the intracellular enzyme showed a competitive inhibition by galactose (K_i 0.70 mM) and competitive inhibition by melibiose (K_i 0.98 mM). The N-terminal of the extracellular α -galactosidase was determined by automatic sequencing (YENGLNLVPQMGWN), presenting some similarity with α -galactosidases of other organisms. The extracellular α -galactosidase was immobilized in insoluble support (modified silica) and presented greater stability than the free enzyme, maintaining 94 % of its original activity for 16 h at 70 °C. The results of the treatments of soy

milk at 60 °C with purified extracellular α -galactosidase, permeable cells containing the intracellular enzyme and immobilized extracellular enzyme, for 2, 2 and 4 h, respectively, showed reduction of 100 % in the amount of stachyose. There was 100 % reduction in the amount of raffinose by the extracellular enzyme and by permeable cells, after 2 and 4 h, respectively. The treatment of the soy milk with the immobilized extracellular enzyme for 10 h promoted reduction of 63 % in raffinose amount. After a treatment with extracellular α -galactosidase the light and heavy molasses products showed 100 % reduction of stachyose after incubation for 2 h at 60 °C, and the raffinose was reduced to 60 and 50 %, respectively. Therefore, it can be observed that α -galactosidases of *Debaryomyces hansenii* were efficient in reducing the RO presents in soy derived products, and they are appropriate to industrial use in the processing of these sugars.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max.* L) é uma espécie pertencente à família das leguminosas sendo considerada excelente fonte de proteína de uso na nutrição animal e humana (GUIMARÃES *et al.*, 2001) apresentando características similares às dos produtos protéicos de alto valor nutritivo, como o leite de vaca, pelo fato de conter quantidade suficiente de quase todos os aminoácidos essenciais em suas proteínas (COSTA; MIYA, 1972). Os grãos de soja se caracterizam por conter muito pouco ou nenhum amido, cerca de 20 % de óleo e 40 % de proteína (SGARBIERI, 1996). O leite de soja ou extrato hidrossolúvel é visto como um substituto de baixo custo ao leite de vaca, sendo uma alternativa alimentar para populações intolerantes à lactose (KHARE; KRISHNA, 1994). A soja tem grande potencialidade no combate à desnutrição devido à sua composição, fornecendo energia, proteínas e outros nutrientes essenciais ao organismo, como potássio, fósforo, ferro, lecitina e vitamina E (PAES, 1994). Em consequência, a demanda pela soja e seus produtos derivados tem crescido de maneira vertiginosa e a área destinada ao seu cultivo no mundo, vem aumentando a cada ano. A produção mundial total de soja é de 190 milhões de toneladas por metro quadrado (USDA, 2003).

Contudo, existem fatores que limitam o consumo de soja e seus derivados. Dentre estes fatores destacam-se o baixo teor de aminoácidos essenciais como a metionina, proteínas pouco digeríveis, palatabilidade, o “beany-flavor” derivado da degradação de hidroperóxidos de ácidos graxos

poliinsaturados, pela ação catalítica das lipoxigenases e a presença de açúcares não digeríveis (Oligossacarídeos de Rafinose - RO) capazes de produzir a flatulência, resultante do metabolismo anaeróbico desses açúcares (DE LUMEN, 1992; PRICE; WYATT; FENWICK, 1988). Os açúcares não digeríveis são fermentados no intestino grosso por bactérias anaeróbicas, com a produção de gases como CO₂, H₂ e CH₄. A ingestão de soja e de alguns de seus derivados pode resultar, além de flatulência, em náuseas, desconforto e diarreia. Os principais causadores desses sintomas são os açúcares rafinose e estaquiose (WAGNER *et al.*, 1976).

Vários processos são pesquisados com a finalidade de reduzir ou eliminar os RO nos produtos derivados de soja. A eliminação dos RO nas sementes de soja e em seus derivados poderá ser conseguida pela manipulação genética de plantas alterando a síntese de um ou mais componentes importantes da via metabólica que conduz a síntese dos RO ou, pela hidrólise enzimática dos RO presentes nos extratos hidrossolúveis dos grãos de soja e/ou derivados protéicos (GUIMARÃES, 2001).

A degradação dos oligossacarídeos necessita da ação de α -galactosidase e de invertase. A invertase (EC 3.2.1.26; β -D-frutofuranosídeo frutohidrolases) hidrolisa sacarose em D-glicose e D-frutose e ocorre em muitos microrganismos e plantas (HIRAYAMA; SUMI; HIDAKA, 1989). A hidrólise das ligações α -1,6 glicosídicas presentes nos RO, nos polissacarídeos da parede das células e nas glicoproteínas de reserva é catalisada pela enzima α -galactosidase (KONTOS; SPYROPOULOS, 1996), produzindo D-galactose e sacarose livres, açúcares facilmente hidrolisados e absorvidos. De acordo com a especificidade de substratos, as α -galactosidases podem ser divididas em dois grupos, sendo que, o primeiro contém α -galactosidases ativas somente em oligossacarídeos com baixo grau de polimerização como a melibiose, a rafinose, a estaquiose e pequenos fragmentos de galacto(glico)mananas. Estas enzimas são ativas em substratos artificiais como aril α -galactosídeos. O segundo grupo contém α -galactosidases ativas em substratos poliméricos que, similarmente às enzimas do primeiro grupo, atacam oligossacarídeos curtos, principalmente de polímeros degradados, bem como α -galactosídeos artificiais (PUCHART *et al.*, 2000).

A redução dos níveis de RO das sementes de soja e de seus derivados conduzirá à eliminação dos sintomas indesejáveis causados pela ingestão dos mesmos e conseqüentemente, ampliará a aceitação e o consumo de tais produtos.

De muitas maneiras, os microrganismos são pacotes de enzimas e as indústrias estão aumentando o uso dessas moléculas isoladas de microrganismos, para obtenção de vários produtos. A demanda para tais enzimas é alta porque as mesmas são específicas e não produzem resíduos tóxicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

A identificação de fontes de α -galactosidases com potencial para aplicações biotecnológicas, principalmente para a redução dos teores de RO em soja e seus derivados tem sido obtida por meio de várias pesquisas. A α -galactosidase ocorre amplamente em plantas, microrganismos e animais, sendo que algumas delas têm sido purificadas e caracterizadas (KIM *et al.*, 2002). Microrganismos têm a vantagem de alta produção de enzimas e dentre eles, os fungos, inclusive as leveduras, produzem α -galactosidases mais susceptíveis para aplicações tecnológicas, principalmente por ter localização extracelular, pH ótimo ácido e estabilidade térmica. Portanto, há um grande interesse por α -galactosidases de leveduras, com a finalidade de aplicação em processos industriais.

Estudos sobre a localização e caracterização das α -galactosidases foram realizados com as leveduras *Saccharomyces carlsbergensis* (LAZO; OCHOA; GASCÓN, 1977), *Candida javanica* (CAVAZZONI; ADAMI; CRAVERI, 1987), *Candida guilliermondii* (HASHIMOTO *et al.*, 1993), *Saccharomyces cerevisiae* (JOHNSON; CARLSON, 1992), *Zygosaccharomyces cidri* (TURAKAINEM; KORHOLA; AHO, 1991), *Torulaspota delbruekii* IFO 1255 (ODA; TONOMURA, 1995), entre outras. Purificação e caracterização de α -galactosidases de diferentes fontes têm sido relatadas e de acordo com sua origem, suas propriedades diferem acentuadamente. A levedura *Debaryomyces hansenii* é amplamente encontrada em diversos alimentos industrializados, sendo considerada não patogênica e, estudos têm demonstrado sua capacidade de secretar várias enzimas de interesse industrial.

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

1.1. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais deste trabalho foram estabelecer as melhores condições de cultivo da levedura *Debaryomyces hansenii* para otimização da produção das α -galactosidases extra e intracelulares, purificar, caracterizar bioquímica e cineticamente estas enzimas e avaliar os seus potenciais biotecnológicos, especialmente visando a redução ou eliminação dos oligossacarídeos de rafinose presentes em produtos derivados de soja.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⇒ Definir as condições para produção das enzimas α -galactosidases extra e intracelulares de *Debaryomyces hansenii*.
- ⇒ Isolar e purificar as α -galactosidases.
- ⇒ Caracterizar bioquímica e cineticamente as α -galactosidases: efeitos de pH, temperatura, termoestabilidade, estabilidade em diferentes valores de pH, efeito de íons e outros compostos na atividade enzimática, determinação da meia-vida da enzima, da especificidade por diferentes substratos naturais, sintéticos e polímeros, dos valores de K_M e V_{max} para diferentes substratos, determinação de possíveis inibidores, do tipo de inibição e da constante de inibição.
- ⇒ Caracterizar molecularmente as α -galactosidases: seqüenciamento do terminal amínico.

- ⇒ Imobilizar a α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* em sílica modificada por grupos aminas.
- ⇒ Avaliar potencialidades para aplicações biotecnológicas das α -galactosidases purificadas e da enzima extracelular imobilizada.
- ⇒ Estabelecer as condições ideais (pH, temperatura, quantidade de enzima, tempo de hidrólise) para o processamento dos oligossacarídeos de rafinose presentes nos produtos de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da soja e seus derivados na alimentação

Leguminosas e seus derivados, juntamente com sementes de cereais constituem a maior parte da dieta humana. A produção de leguminosas é menor comparada à de cereais, entretanto, a sua contribuição na dieta humana é maior do que sua produção relativa (DE LUMEN, 1992). As leguminosas constituem a maior fonte de proteínas da dieta humana em vários países, mesmo apresentando baixos teores de metionina e lisina, que são aminoácidos essenciais (TOENIessen, 1985).

As proteínas de soja diferem significativamente das de cereais em muitas de suas propriedades químicas e físicas. A soja não contém proteínas solúveis em álcool (prolaminas) semelhantes à gliadina do trigo, nem proteínas semelhantes à glutenina, proteínas que formam o glúten do trigo. Por este motivo, as proteínas e a farinha de soja não possuem as propriedades do trigo de formar massa visco-elástica. Além de conter cerca de 40 % de proteína em seus grãos, de elevado valor nutritivo, a soja constitui uma excelente fonte de proteína para a alimentação humana e animal. A soja é uma espécie da família das leguminosas, com origem na China, sendo um dos produtos mais antigos cultivados pelo homem, embora o seu potencial para uso na alimentação humana e animal tenha sido evidenciado somente após a Segunda Guerra Mundial. A soja pode ser considerada como um dos principais alimentos para a

população do futuro, devido às suas qualidades nutricionais, facilidade de adaptação a quase todas as regiões, alta produção e facilidade de cultivo (BELLAVAR; SNIZEK, 1999).

A soja constitui um dos produtos de maior importância na economia brasileira ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, sendo considerado responsável pela produção de mais de 49 milhões de toneladas por safra (EMBRAPA SOJA, 2003). A soja apresenta em sua constituição proteínas de alta qualidade e elevada quantidade de energia. O grão de soja possui alto teor de lipídeos (15-25 %) e um conteúdo de proteínas (30-45 %), com uma composição de aminoácidos adequada à alimentação. Apresenta também, carboidratos (20-35 %) e cerca de 5 % de cinzas (MOREIRA, 1999).

A soja é um alimento rico em minerais como magnésio, fósforo, ferro, cobre, zinco e potássio, porém, o aproveitamento desses minerais pode ser prejudicado devido a fatores antinutricionais como os taninos (MONTEIRO, 2000). Em termos de vitaminas a soja apresenta algumas deficiências como no caso das vitaminas A, D e B₁₂, no entanto, quando verde é boa fonte de riboflavina, niacina e ácido ascórbico, o mesmo ocorrendo com as vitaminas E, K, tiamina e ácido fólico quando madura. Os grãos de soja, como a maioria das espécies de leguminosas, contêm proteínas tóxicas e de ação antinutricional, tendo que, por esse motivo, receber tratamento térmico adequado antes de ser usada na alimentação (SGARBIERI, 1996).

A soja possui uma fração protéica altamente significativa, utilizada principalmente na fabricação de ração para a alimentação animal. A forma mais utilizada na produção animal é como farelo, resultante da extração do óleo, sendo também largamente empregado pelas indústrias de ração (LIMA; ANGNES, 1999). No Brasil, o óleo de soja representa acima de 50 % de todos os óleos e gorduras dos produtos alimentícios (MOREIRA, 1999). A fração de óleo é utilizada também na indústria de alimentos para produção de margarina, óleo de cozinha, agentes emulsificantes e vários outros produtos. Aproximadamente 83 % da produção mundial de soja são utilizadas para extração de óleo destinado, principalmente ao consumo humano, sendo o farelo resultante utilizado na fabricação de ração animal (LIMA; ANGNES, 1999). Os produtos protéicos de soja se enquadram em três categorias

básicas: farinhas com cerca de 50 % de proteínas; concentrados protéicos (70 %) e isolados protéicos de soja (90-97 %). Eles podem ser processados em produtos texturizados de soja, sendo utilizados em panificadoras como clarificadores de farinhas e agentes de melhoria das características de panificação e conservação (MOREIRA, 1999). A farinha integral apresenta composição muito semelhante à soja integral. O valor nutritivo da proteína das farinhas integrais é de 80-90 % do valor da caseína. A farinha de soja desengordurada e “grits” de soja têm sido as principais formas de utilização da proteína de soja na indústria de alimentos. Já o concentrado protéico de soja, seu método de preparo consiste na extração da farinha de soja desengordurada por vários processos, os quais removem componentes solúveis como a sacarose, rafinose, estaquiose, minerais e outros, elevando o conteúdo de proteína até 70 % ou mais. A eficiência nutritiva da proteína é a mesma que a da farinha e, a solubilidade da proteína reduz devido à desnaturação pela ação do álcool ou calor. O isolado protéico de soja deve conter acima de 95 % de proteínas e apresentar um valor protéico inferior ao da farinha ou do concentrado protéico de soja (SGARBIERI, 1996).

O leite de soja, extrato hidrossolúvel é um dos produtos protéicos de soja, podendo ser comparável ao leite de vaca em conteúdo de proteínas e gorduras, que tem obtido alta aceitabilidade em programas de nutrição infantil (MOREIRA, 1999). De acordo com Desjardins; Roy; Goulet (1990), o leite de soja é rico em proteínas de alta qualidade e não contém colesterol e lactose, apenas pequenas quantidades de ácidos graxos saturados. O leite de soja é uma alternativa para as pessoas portadoras de certas intolerâncias ao leite de origem animal e a algumas deficiências genéticas, como a ineficiência em metabolizar a lactose (DE LUMEN, 1992). Adicionalmente, devido à alta produção de soja nos países tropicais, sua utilização na alimentação dos animais, como suínos na fase de aleitamento representa uma alternativa econômica bastante atrativa (DUFFUS; SAUGHTER, 1980).

Algumas substâncias presentes em concentrações importantes na soja (estrógenos não esteróides naturais) parecem possuir efeitos positivos na prevenção e tratamento do câncer (POSADA, 1998). Cândido; Campos (1995) citaram em seu trabalho que, Xu; Li; He (1994), avaliando a ingestão de isoflavonas, relataram que a menor incidência de câncer de mama e de

sintomas adversos na menopausa em mulheres orientais pode estar associada ao consumo de soja em sua dieta. As atividades fitoestrogênicas destes compostos carecem de maior investigação, porém, existe um sinal de que as pessoas com amplo consumo de produtos de origem vegetal, assim como a soja têm menor incidência de câncer de cólon, próstata, mama, endométrico e cérvix.

2.2. Fatores antinutricionais presentes na soja

O uso da soja integral na alimentação de suínos e aves e na alimentação humana tem sido limitado pela necessidade de tratamentos para inativação de vários componentes antinutricionais presentes. Destacam-se os inibidores de proteases, lectinas, taninos, proteínas alergênicas e pouco digeríveis, as lipoxigenases, os oligossacarídeos de rafinose (RO) e outros (BELLAVAR; SNIZEK, 1999).

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

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

Outro fator antinutricional importante na soja refere-se ao alto teor de oligossacarídeos de rafinose (RO) encontrado em suas sementes, sendo os segundos carboidratos solúveis mais abundantes nas plantas (DEY, 1990). Os oligossacarídeos são considerados como fonte primária de energia e substratos para a síntese de outros compostos, durante a germinação

(JIMÉNEZ *et al.*, 1985). O endosperma de leguminosas armazena principalmente dois tipos de carboidratos de reserva: oligossacarídeos de rafinose (RO), os quais são armazenados nos vacúolos, e galactomananas, armazenadas na parede celular. Os RO ocorrem no endosperma e embrião de sementes de leguminosas e são quebrados durante a germinação, resultando no acúmulo temporário de galactose e sacarose nesses tecidos (DEY, 1980; SARAVITZ; PHARR; CARTER, 1987). De acordo com Dey (1985), a via metabólica de síntese dos RO pode ser representada da seguinte forma:

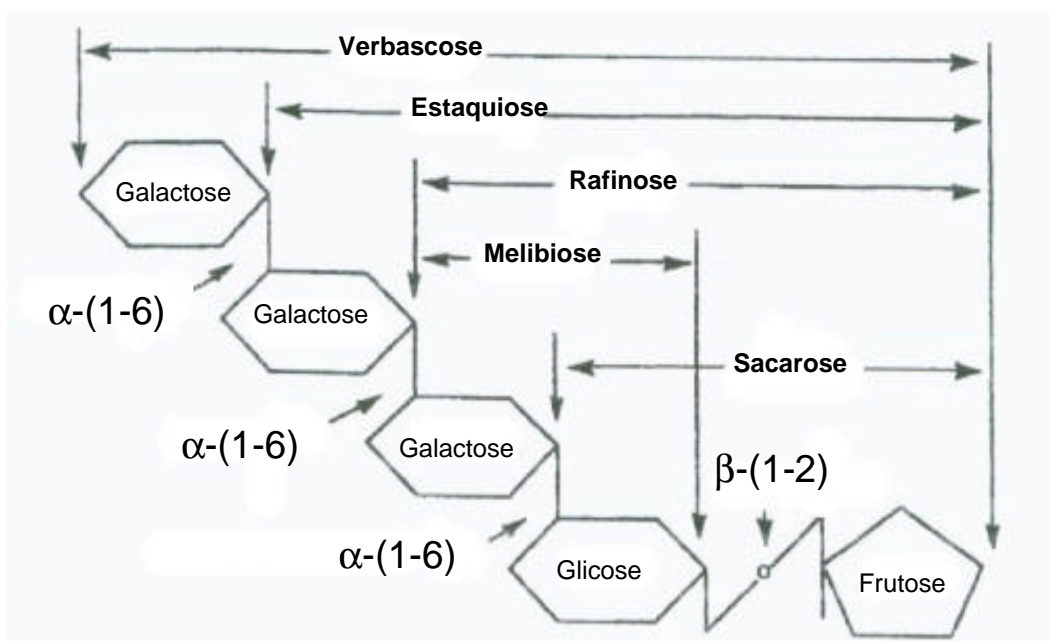


Figura 1 – Estruturas dos açúcares envolvidos na síntese dos RO.

Um esquema da via de síntese dos oligossacarídeos, bem como as enzimas envolvidas, está representado na Figura 2 (SUAREZ *et al.*, 1999).

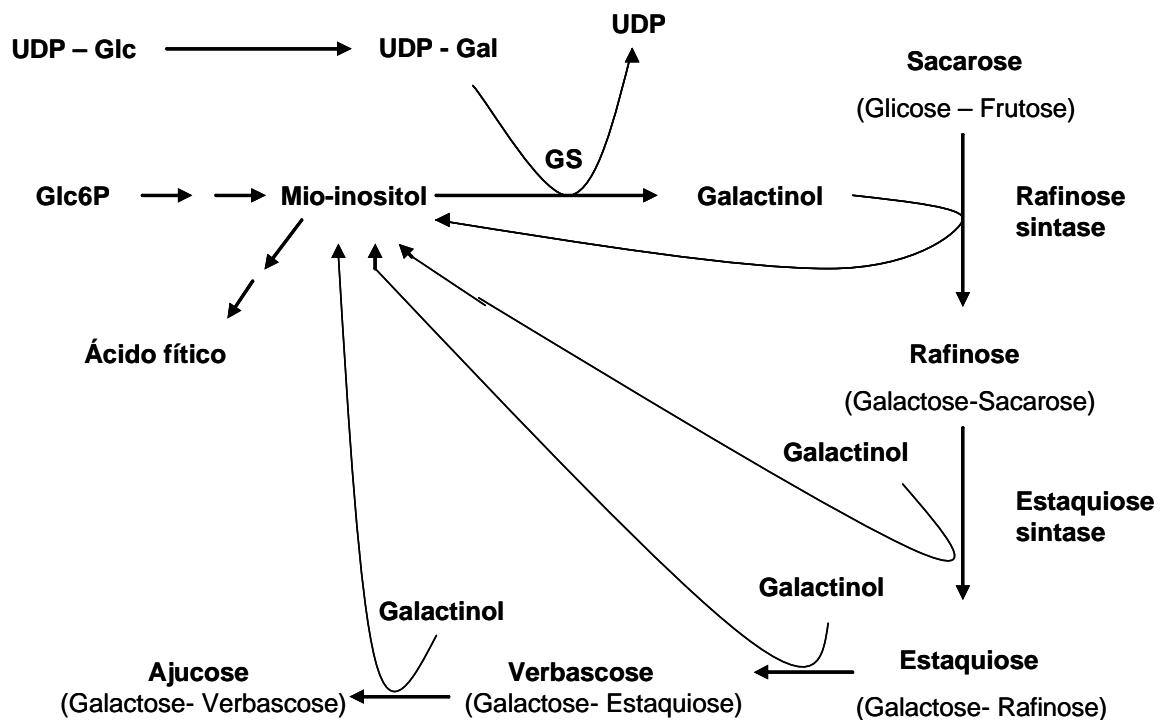


Figura 2 – Esquema da via metabólica de síntese dos RO: UDP-Glc: uridina difosfato-glicose; UDP-Gal: uridina difosfato-galactose; UDP: uridina difosfato; Glc6P: glicose 6 fosfato; GS: galactinol sintase.

De acordo com a Figura 2 a primeira reação é catalisada pela galactinol sintase (UDP-galactose: mio-inositol galactosil transferase, GS), que requer Mg^{+2} para sua atividade, produzindo galactinol a partir de UDP-galactose e mio-inositol (LIU; ODEGARD; DE LUMEN, 1995). Subseqüentemente à primeira reação, sintases específicas catalisam a síntese de cada oligossacarídeo da série, por meio da transferência do galactinol para a sacarose, a rafinose, a estaquiose e a verbascose, com a produção de α -1,6-galactosídeos, tri, tetra, penta e hexassacarídeos de rafinose (RIBEIRO, 2001). A rafinose ocorre em plantas superiores, nas folhas, caules e órgãos de reserva. Ocorre um acúmulo na concentração de rafinose com a perda de água nas sementes maduras (DEY, 1985). A estaquiose é um dos mais abundantes tetrassacarídeos em plantas, reconhecida como o maior açúcar de reserva e transporte em leguminosas. Estaquiose é sintetizada a partir de rafinose em uma reação catalisada pela estaquiose sintase (galactinol: rafinose 6- α -D-galactosil transferase), na qual o galactinol serve como doador de galactose. Verbascose e ajucose são os penta e hexassacarídeos, respectivamente, que

coexistem com rafinose e estaquiose na maioria das leguminosas, estando presentes em órgãos de reserva (DEY, 1985, 1990). Em sementes de soja madura, sacarose, estaquiose e rafinose representam mais de 99 % (p/p) dos açúcares solúveis presentes. A ingestão de soja pode resultar em flatulência, náuseas, desconforto e diarreia, devido ao alto conteúdo dos oligossacarídeos de rafinose (WAGNER *et al.*, 1976). A mucosa do intestino delgado de humanos e de outros animais monogástricos (aves e suínos) é desprovida das α -1,6-galactosidases, enzimas necessárias à conversão dos RO em açúcares mais simples. Desta forma, 100 % dos RO não são degradados, sendo conduzidos ao intestino grosso, onde as bactérias anaeróbias possuem os sistemas enzimáticos necessários para a fermentação desses açúcares, o que resulta em liberação de grandes quantidades de gases, como CO₂, H₂ e CH₄, fenômeno conhecido como flatulência intestinal, que está associado com cólicas, diarreia, dispepsia e constipação (STEGGERDA; DIMMICK, 1966; SUAREZ *et al.*, 1999). Wiggins (1994) determinou que a presença de altas concentrações desses açúcares na dieta alimentar pode resultar na retenção de fluidos, aumentando a taxa do fluxo digestivo, afetando a utilização e absorção de nutrientes e em alguns casos, causando até mesmo diarreia. Pelo fato da capacidade da soja e de outras leguminosas causarem flatulência em humanos, os produtos derivados de soja têm sido descritos como indutores de problemas digestivos em animais (COON *et al.*, 1990). Portanto, os RO presentes na soja e outras leguminosas assumem papel restritivo ao consumo desses grãos como fonte protéica.

2.3. Processos para redução de RO em produtos de soja

Objetivando eliminar ou reduzir os conteúdos de rafinose e estaquiose em produtos de soja, alguns testes têm sido realizados, como embebição das sementes (KAWAMURA; TADA, 1967), embebição e germinação (KIM; SMITH; NAKAYAMA, 1973), processos de fermentação (MITAL; STEINKRAUS, 1975) e, extração dos RO com água (KU *et al.*, 1976). Esses oligossacarídeos estáveis ao calor não são eliminados por cozimento. Várias pesquisas sugerem que a conversão enzimática dos RO presentes no leite de soja e outros

derivados parece ser a estratégia mais eficiente para reduzir os RO e aumentar seu valor nutricional (CRUZ; PARK, 1982).

A hidrólise dos RO pode ser catalisada pelas α -galactosidases (α -D-galactosídeo galactohidrolase; EC 3.2.1.22) invertases ou ambas. As α -galactosidases hidrolisam ligações α -1,6 produzindo galactose e sacarose e, as invertases hidrolisam ligações α -1,2, produzindo melibiose e frutose ou glicose e frutose. A utilização de α -galactosidases fúngicas para o tratamento enzimático do leite de soja foi proposta por Sugimoto; Van Bauren (1970), que usaram preparações comerciais de α -galactosidase de *Aspergillus saitoi*, verificando a hidrólise de todos os oligossacarídeos após 3 h, no pH natural do leite de soja. De acordo com Tortora; Funke; Case (2002), para a maioria das finalidades industriais, as enzimas devem ser imobilizadas na superfície de algum suporte sólido e então, manipuladas de forma que possam converter um fluxo contínuo de substrato em produto, sem perda da enzima. Thananunkul *et al.* (1976), utilizaram micélios de *Mortierella vinacea* imobilizados em gel de poliácridamida como fonte de α -galactosidase para a remoção dos RO do leite de soja, reduzindo 80 % dos teores desses açúcares.

Posteriormente, Mulimani; Thippeswamy; Ramalingam (1997); Mulimani; Devendra (1998); avaliaram a capacidade de hidrólise dos RO do leite de soja pela α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi*. O efeito de α -galactosidases extracelulares produzidas por *Lactobacillus plantarum* na qualidade nutricional do leite de soja e derivados também foi avaliado por Sanni; Onilude; Ogundoye (1997). Estudos da produção de α -galactosidases pelo fungo *Humicola* sp. e sua aplicação na hidrólise dos RO em leite de soja foram realizados por Kotwal *et al.* (1998). Scalabrini *et al.* (1998) testaram a fermentação do leite de soja por cepas de *Bifidobacterium* e avaliaram a capacidade de redução dos RO. A utilização de α -galactosidases de *Cyamopsis tetragonoloba* para redução dos RO também foi avaliada por Mulimani; Thippeswamy; Ramalingam (1997) concluindo que o tratamento de farinha de soja com extrato bruto contendo α -galactosidase foi eficiente na redução de rafinose e estaquiase. Também Guimarães *et al.* (2001) obtiveram expressiva redução dos RO do leite de soja pelo tratamento com α -galactosidase purificada de sementes de soja germinadas.

O uso de enzimas α -galactosidasas para a redução dos teores de RO trata-se de uma alternativa interessante e mais vantajosa que os métodos citados, uma vez que, os tratamentos enzimáticos são extremamente específicos, causando uma menor alteração nas proporções dos demais componentes dos derivados de soja.

2.4. Mecanismo de ação e estrutura de α -galactosidasas

α -Galactosidasas foram primeiramente designadas como melibiases por apresentarem atividade hidrolítica sobre o dissacarídeo melibiose. A alteração do nome da enzima para α -galactosidase deu-se a partir de estudos da sua especificidade de ação usando vários açúcares contendo resíduos terminais não redutores de α -D-galactosil (DEY; PRIDHAM, 1972).

A α -galactosidase (α -D-galactosídeo galactohidrolase, EC 3.2.1.22) é uma hexoglicosidase que catalisa a hidrólise de ligações α -1,6 de resíduos de α -galactosídeos em oligossacarídeos simples como estaquiose, rafinose, melibiose, em polissacarídeos como galactomananas e em substratos sintéticos como, p-NP- α Gal (ADEMARK *et al.*, 2001). α -Galactosidase está envolvida no metabolismo de galactose, glicerolipídeos, esfingolipídeos e globosídeos. Devido a esta capacidade, as α -galactosidasas podem ser utilizadas em produtos de soja para hidrolisar os RO em açúcares digeríveis e assim, moderar as propriedades causadoras de flatulência (PORTER; HERMANN; LADISCH, 1991).

Galactomananas são os maiores polissacarídeos de armazenamento em sementes de algumas leguminosas, que consistem de ligações β -1,4 entre manoses e ligações α -1,6 entre grupos galactosil (MÉIER; REID, 1982). São completamente hidrolisados durante a germinação em seus monossacarídeos constituintes, manose e galactose, que são absorvidos para o crescimento do embrião e subseqüentemente usados para vários processos metabólicos no embrião. A completa hidrólise enzimática de galactomananas requer α -galactosidase, endo β -mananase e exo β -mananase (MÉIER; REID, 1982).

A enzima α -galactosidase, dependendo da fonte vegetal, possui maior afinidade por um dos substratos, oligossacarídeos de rafinose ou

galactomananas. As α -galactosidases de leveduras são utilizadas para degradação e modificação de galactomananas como, goma guar e goma de alfarroba (DEY; PATEL; BROWNLEADER, 1993; ZEILINGER *et al.*, 1993).

α -Galactosidases intra e extracelulares ocorrem em microrganismos, plantas e animais (KOBATASHI; SUZUKI, 1972). Muitas análises bioquímicas de α -galactosidase têm sido conduzidas utilizando como substratos, p-NP- α Gal, melibiose, rafinose e estaquiase. A atividade das enzimas produzidas por *Candida guilliermondii* e *Pseudomonas fluorescens* (HASHIMOTO *et al.*, 1991, 1995) diminui com o aumento do número de unidades de açúcar dos substratos.

Essas enzimas catalisam a seguinte reação:

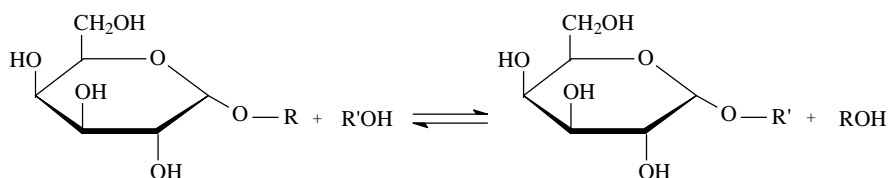


Figura 3 – Reação de hidrólise da ligação glicosídica, catalisado pela α -galactosidase, sobre um substrato contendo resíduo α -galactosil.

A molécula acceptora hidroxílica, R'OH, na Figura 3, normalmente é a água, entretanto, R e R' podem ser grupos alifáticos ou aromáticos. Esta enzima pode catalisar reações de hidrólise de vários α -D-galactosídeos naturais e sintéticos, bem como moléculas mais complexas como oligo e polissacarídeos. Entretanto, a taxa de hidrólise dos substratos depende de fatores como: a estrutura do anel que deve ser piranosídico e da configuração dos grupos -H e -OH nos átomos de carbono 1, 2, 3 e 4 que devem ser similares a α -D-galactose. Dentre os substratos sintéticos o p-NP- α Gal é o mais usado na determinação da atividade hidrolítica de α -galactosidases. Estudos cinéticos usando desoxi derivados do p-NP- α Gal indicaram que a presença dos grupos hidroxil (-OH) dos carbonos 3 e 4 é essencial para que esses compostos atuem como substratos para as α -galactosidases de sementes de café, *Mortierella vinacea* e *Aspergillus niger* (HAKAMATA; NISHIO; OKU, 2000). Outro substrato também utilizado é o 6-bromo-2-naftil- α -

D-galactopiranosídeo. Dentre os substratos naturais destacam-se o galactinol, melibiose, rafinose, estaquiose, verbascose e homólogos maiores (PORTER; HERMANN; LADISH, 1991).

Apesar de serem insuficientes os conhecimentos sobre a química e cinética de enzimas de várias fontes, estudos cinéticos sobre o mecanismo de ação da α -galactosidase de *Vicia faba* indicam que a hidrólise de substratos aril glicosídeos pode ser atribuída à presença de grupos ácido e básico no sítio ativo da enzima. Esses grupos foram identificados como carboxil (desprotonado) e imidazol (protonado). Com base nesses resultados um mecanismo de ação em duas etapas foi proposto para a α -galactosidase de amêndoa doce (DEY; PRIDHAM, 1972). Segundo esse mecanismo, a ligação glicosídica terminal da galactose presente no substrato é clivada pela ação conjunta dos grupos carboxil e imidazol da enzima. Em seguida, ocorre a reação com uma molécula aceptora ($R'OH$) que pode ser a água ou um álcool alifático, resultando na hidrólise ou transferência dos produtos. Neste mecanismo, a configuração do carbono anomérico é mantida (DEY; PRIDHAM, 1972) conforme representado na Figura 4.

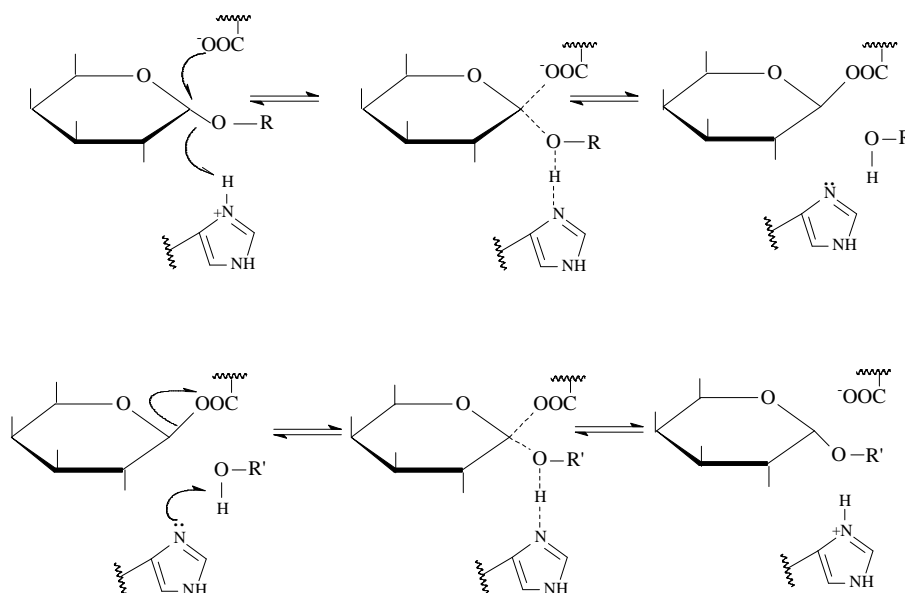


Figura 4 – Mecanismo de ação em duas etapas postulado por Dey (citado por DEY; PRIDHAM, 1972) para a α -galactosidase de amêndoa doce.

Baseado em experimentos de modificação química e estudos cinéticos da α -galactosidase de côco, um novo mecanismo de ação foi proposto (MATHEW; BALASUBRAMANIAM, 1987). Esses estudos indicaram a presença de dois grupos carboxil, tirosina e triptofano e a ausência do grupo imidazol no sítio ativo da α -galactosidase ou próximo dele. No mecanismo de ação proposto, o produto permanece com a mesma configuração do substrato. (Figura 5). Entretanto, análises cinéticas e de inibição utilizando α -galactosidases de *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium* sp. 23 indicam a participação de um grupo imidazol de um resíduo de histidina na ação catalítica dessas enzimas (MALANCHUCK; BUGLOVA; VARBANETS, 2001).

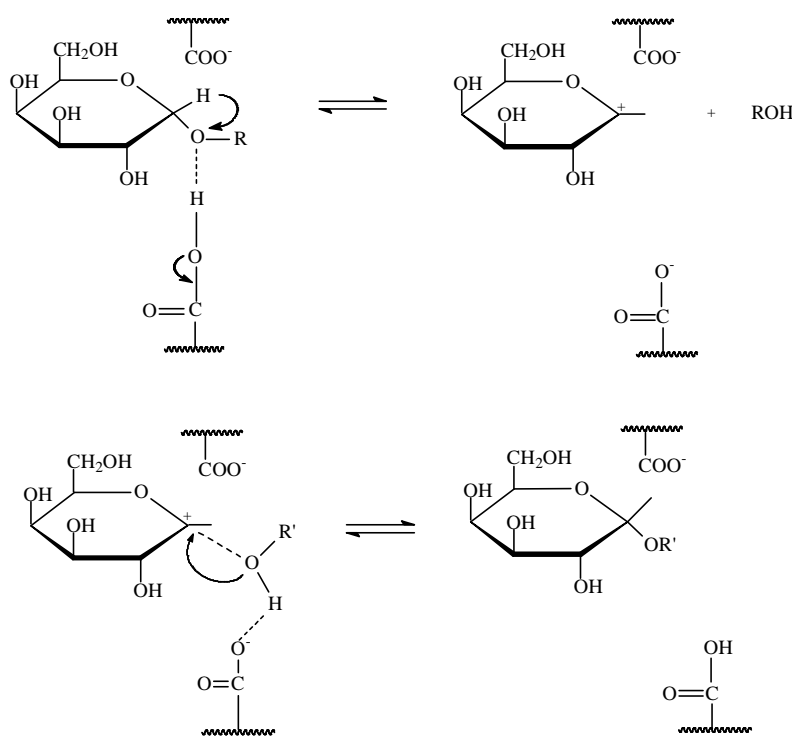


Figura 5 – Mecanismo de ação para a α -galactosidase de côco sugerido por Mathew; Balasubramaniam, 1987.

Estudos com α -galactosidases de sementes de café demonstraram que o terminal carboxílico desta enzima é crítico para a sua atividade. A deleção de três ou mais resíduos de aminoácidos no C-terminal resulta na perda completa da atividade enzimática, sugerindo que o C-terminal da α -galactosidase tem um

papel importante na conformação total da enzima e pode afetar diretamente a conformação correta do sítio ativo (MARANVILLE; ZHU, 2000).

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

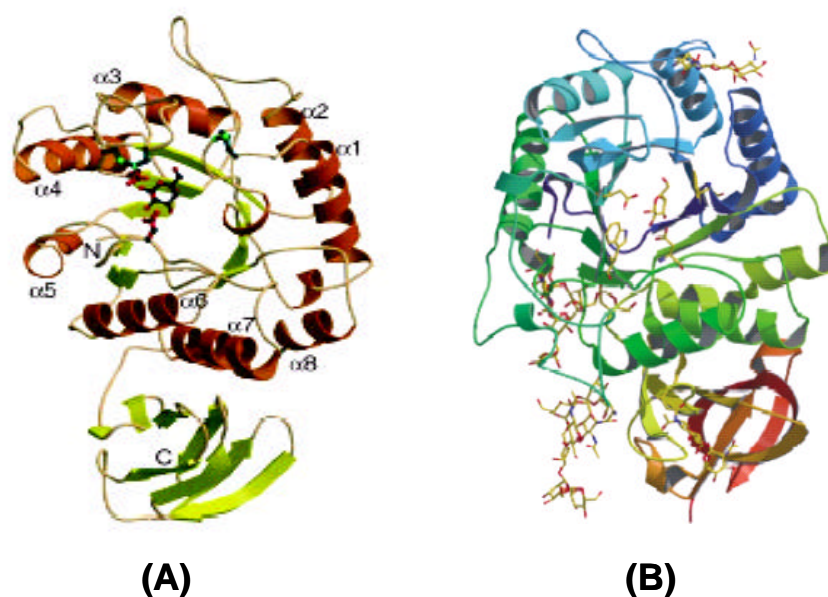


Figura 6 – Estruturas das α -galactosidases de arroz (A) e de *Trichoderma reesei* (B) complexadas com D - galactose.

2.5. a-Galactosidases de leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, caracteristicamente esféricos ou ovais. Da mesma forma que os fungos filamentosos, as leveduras são amplamente distribuídas na natureza (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

A α -galactosidase é largamente distribuída em muitos microrganismos e tem sido selecionada, purificada e caracterizada a partir de fungos (ADYA; ELBEIN, 1977; ZAPATER; ULLAH; WODZINSKI, 1990; DEY; PATEL; BROWNLEADER, 1993; KOTWAL, *et al.*, 1999; PUCHART *et al.*, 2000; ISHIGURO *et al.*, 2001; ADEMARK *et al.*, 2001), leveduras (LAZO; OCHOA; GASCÓN, 1976; CHURCH; MEYER, 1980; CAVAZZONI; ADAMI; CRAVERI, 1987) e bactérias (DELENTE *et al.*, 1974; GARRO *et al.*, 1993, 1994; GOTE *et al.*, 2003). A produção dessa enzima consiste no crescimento do microrganismo em meio de cultura seletivo, geralmente meio 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. Outras fontes de carbono mais complexas como galactomananas e até farelo de trigo também induziram a atividade da α -galactosidase (DE REZENDE, 1998). Dentre as leveduras que produzem a α -galactosidase destacam-se as dos gêneros *Torulaspota*, *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*. Uma grande vantagem do uso de leveduras é que muitas delas são classificadas como GRAS (“generally regarded as safe”), especialmente *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*. Organismos com status GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações industriais na indústria de alimentos e farmacêuticas (HENSING *et al.*, 1995).

De acordo com Johnson; Carlson (1992), algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* hidrolisam melibiose em glicose e galactose, pela ação da α -galactosidase, que está localizada no espaço periplasmático e/ou parede celular, assim como a invertase. Segundo os mesmos autores, a α -galactosidase e a invertase são capazes de hidrolisar açúcares do lado de fora da membrana da célula. Parte da enzima é secretada no meio de cultura, no

caso de *Saccharomyces cerevisiae*. Turakainen *et al.* (1994) clonaram e seqüenciaram um gene MEL, que codifica a α -galactosidase de *Zygosaccharomyces cidri*, cuja expressão também foi induzida por galactose.

Torulaspota delbrueckii IFO 1255 contém atividade suficiente de enzimas para fermentar melibiose e galactose eficientemente para o seu crescimento. A sua α -galactosidase é uma glicoproteína e possui uma estrutura oligomérica, semelhante à de *Saccharomyces cerevisiae* (RUOHOLA *et al.*, 1986) e provavelmente semelhante à de *Zygosaccharomyces cidri* (TURAKAINEN; KORHOLA; AHO, 1991). Por outro lado, as enzimas extracelulares de *Candida javanica* (CAVAZZONI; ADAMI; CRAVERI, 1987) e *Candida guilliermondii* (HASHIMOTO *et al.*, 1993) não são glicosiladas. Isto sugere que a oligomerização de glicoproteínas tem função em sua retenção dentro do espaço periplasmático da parede celular e pode ser uma característica comum de linhagens de certas leveduras (ROUWENHORST *et al.*, 1990).

α -Galactosidase também foi purificada a partir de extrato livre de células de *Torulaspota delbrueckii* IFO 1255 em etapas semelhantes ao procedimento usado para invertase de *Torulaspota pretoriensis* YK-1 (ODA; TONOMURA, 1994). As α -galactosidasas obtidas a partir de diferentes linhagens microbiológicas, raramente são livres de invertase e dissacarídeos (CAVAZZONI; ADAMI; CRAVERI 1987). Lazo; Ochoa; Gascón (1976) não separaram invertase da α -galactosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, mas conseguiram reduzir a atividade da invertase para 1 % por armazenamento da mesma em baixas temperaturas por 20 dias. A α -galactosidase é uma enzima utilizada para remover rafinose e estaquiase em leite de soja e soro de soja (CRUZ; BATISTELA; WOSACKI, 1981), reduzir o conteúdo de rafinose do açúcar da beterraba e é também utilizada na síntese de galacto-oligossacarídeos (MISTSUTOMI; HONDA; OHTAKARA, 1991). α -Galactosidase extracelular tem sido utilizada como modelo para o estudo do processo de secreção de proteína em *Aspergillus nidulans* (RIOS *et al.*, 1993, 1994). Pela mesma razão, a enzima tem sido pesquisada em *Saccharomyces cerevisiae* (JOHNSON; CARLSON, 1992).

Pouco se conhecia sobre as propriedades moleculares de α -galactosidases de leveduras, sobre os fatores que controlam a sua síntese e, poucos dados tinham sido relatados sobre a sua localização e função na célula (DE LA FUENTE; SOLS, 1962). De acordo com Friis; Ottolenghi (1959), a α -galactosidase é uma enzima extracelular em levedura. Segundo Lazo; Ochoa; Gascón (1976), a atividade da α -galactosidase de *Saccharomyces carlsbergensis* pode ser encontrada fora da membrana da célula e há evidência que melibiose é clivada em duas unidades de monossacarídeos, antes de entrar na célula (DE LA FUENTE; SOLS, 1962). A α -galactosidase de *Saccharomyces carlsbergensis* é uma enzima que está localizada principalmente fora da membrana da célula, sendo secretada no meio de cultura. A forma solúvel da α -galactosidase localizada dentro da célula parece ter as mesmas características da forma extracelular (LAZO; OCHOA; GASCÓN, 1976).

2.6. Aspectos gerais da produção de enzimas de microrganismos

De acordo com Azevedo (1985), as enzimas já eram utilizadas pelo homem no processamento de alimentos desde a mais remota antigüidade, muito embora ele tivesse pouco ou nenhum conhecimento sobre os fenômenos que ocorriam. A singularidade desses compostos decorre do elevado grau de especificidade pelo substrato em condições moderadas, sob as quais atuam. As condições fisiológicas, a temperatura, a pressão, o pH e a concentração enzima-substrato são muito moderados quando comparadas às condições normalmente exigidas para obtenção da mesma velocidade da reação com a maioria dos catalisadores não-enzimáticos. Em anos mais recentes, segundo o mesmo autor, cresceu o conhecimento sobre as propriedades das enzimas e seus mecanismos de atuação e que proporcionaram técnicas mais adequadas para isolar e purificar enzimas individuais, além de maiores facilidades de recuperar esses catalisadores, possibilitando sua reutilização em diversas configurações de reatores. Portanto, como resultado desse desenvolvimento, um maior número de utilizações potenciais de enzimas na medicina, indústria e em técnicas analíticas foi conduzido.

Engenharia enzimática é o nome que se dá a esse campo de atividades e que envolve a produção, isolamento, recuperação e purificação da enzima (WINGARD, 1972). A maioria das enzimas isoladas em escala industrial é extracelular e seu isolamento é mais simples do que as enzimas intracelulares.

Independentemente de se estar interessado na produção de enzima intracelular ou extracelular, há diversos tipos de manipulações que podem ser utilizados para aumentar a produção de uma determinada enzima (AZEVEDO, 1985). Dentre eles destacam-se a padronização das condições ótimas de cultivo, a concentração de células no inóculo e avaliação da sua viabilidade, tempo e temperatura de crescimento, pH do meio e velocidade de agitação da cultura.

De acordo com Tortora; Funke; Case (2002), no Brasil, apesar dos investimentos na formação de recursos humanos e em pesquisas, o desenvolvimento da tecnologia enzimática é ainda atrasado. Porém, alguns fatores importantes fazem com que a produção de enzimas para as empresas brasileiras torne economicamente viável, dentre eles, grande disponibilidade e variedade de recursos naturais e resíduos da agroindústria a serem transformados por tecnologia enzimática em produtos de maior valor agregado e, processos industriais biocatalizados que apresentam menos impacto ambiental e menor consumo de energia.

Diversas enzimas são amplamente utilizadas em diferentes indústrias. No entanto, a enzima de interesse neste estudo é a α -galactosidase, que possui grande importância e aplicação na indústria. Segundo Burrows (1979), o xarope de beterraba é amplamente utilizado para a produção comercial de leveduras e a α -galactosidase é utilizada na indústria de beterraba para melhorar o valor de melado. As α -galactosidases isoladas de diferentes microrganismos, plantas e mamíferos podem ser usadas para redução dos oligossacarídeos de rafinose, açúcares não digeríveis, de numerosos produtos agrícolas (SHABALIN *et al.*, 2002).

Algumas α -galactosidases de eucariotos são capazes de remover resíduos de galactose da ligação α -1,3 terminal de glucanas, o que apresenta um potencial uso médico em terapia de transfusão, na conversão de sangue grupo B para O (ZHU; GOLDSTEIN, 1994).

Outra aplicação industrial de α -galactosidases é na usina açucareira, onde pequenas quantidades de rafinose e/ou estaquiose são convertidas em sacarose. Os açúcares rafinose e estaquiose afetam a cristalização da sacarose (KOBAYASHI; SUZUKI, 1972).

Na indústria de papel, a extração de lignina das fibras de madeira é um passo essencial no branqueamento da polpa e tem sido realizado pela ação de α -galactosidases, em substituição a tratamentos químicos altamente poluentes (PAICE; JURASEK, 1984).

Em indústrias alimentícias, as α -galactosidases são usadas para melhorar a digestibilidade da soja e seus derivados (MOREIRA, 1999).

No lisossomo humano, a α -galactosidase degrada glicolipídeos, glicoproteínas e oligossacarídeos. A doença de Fabry é uma desordem genética causada pela atividade defeituosa da α -galactosidase A lisossomal. Esta é uma doença multisistêmica severa caracterizada por manifestações clínicas como colapso renal e problemas cardíacos e neurológicos progressivos causando a morte em humanos. Mais recentemente, novas estratégias terapêuticas vêm sendo propostas para o tratamento da doença de Fabry utilizando-se a enzima α -galactosidase A humana recombinante (BLOM *et al.*, 2003).

Uma outra aplicação das α -galactosidases é para a degradação e modificação de galactomananas como, goma guar e goma de alfarroba (DEY; PATEL; BROWNLEADER, 1993; ZEILINGER *et al.*, 1993).

2.7. Considerações sobre a levedura *Debaryomyces hansenii*

Debaryomyces hansenii é uma levedura que utiliza xilose, apresentando um grande interesse industrial na produção de xilitol/etanol (PARAJÓ; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J., 1995; ROSEIRO; PEITO; AMARAL-COLLAÇO, 1991). A fermentação da xilose e subsequente produção de etanol têm sido estudadas em várias outras espécies de leveduras, incluindo, *Pichia stipitis*, *Candida shehatai* e *Pachysolen tannophilus*, tendo maior produtividade comparado com *Saccharomyces cerevisiae*, quando substratos a base de glicose são utilizados (HAHN-HAGERDAL; JEPSSON; PRIOR, 1994; PRIOR;

KILLIAN; DU PREEZ, 1989; VAN DIJKEN; SHEFFERS, 1986; VAN ZYL *et al.*, 1989; VAN ZYL; PRIOR; BRANDT, 1993).

Debaryomyces hansenii é uma espécie de levedura capaz de utilizar misturas de pentoses e hexoses (glicose-manose, xilose-arabinose, glicose-xilose), como fonte única de carbono (NOBRE; LUCAS; LEÃO, 1999). Estudos foram realizados sobre os efeitos de sais, como KCl, NaCl e LiCl no crescimento de *Debaryomyces hansenii* e comparados com *Saccharomyces cerevisiae*, consideradas leveduras halotolerantes sendo observado que, *Debaryomyces hansenii* foi mais tolerante ao Na⁺ do que *Saccharomyces cerevisiae* pois, alto conteúdo de Na⁺ em *Debaryomyces hansenii* não afetou significativamente o seu crescimento (HARO *et al.*, 1993; PRISTA *et al.*, 1997). Essa levedura é provavelmente halofílica em ambientes naturais, onde a concentração de K⁺ é normalmente menor do que a de Na⁺.

Debaryomyces hansenii é a espécie de levedura mais freqüente encontrada em produtos fermentados ricos em proteínas como, salsichas e queijos (COOK, 1995; ENCINAS *et al.*, 2000; PETERSEN; WESTALL; JESPERSEN, 2002). Como já mencionado anteriormente, possui alta tolerância ao sal e capacidade de crescimento em baixas temperaturas, comparada com *Saccharomyces cerevisiae*. Estas duas espécies metabolizam ácidos orgânicos e aminoácidos, regulando a acidez de produtos fermentados e também possuem atividades lipolíticas e proteolíticas, contribuindo assim para o desenvolvimento do flavor (COOK, 1995; DURA; FLORES; TOLDRÁ, 2002; OLESEN; STAHNKE, 2000; SORENSEN; SAMUELSEN, 1996). Estudos foram feitos sobre a purificação e caracterização de uma enzima proteolítica (prolil aminopeptidase) de *Debaryomyces hansenii*, obtendo uma contribuição potencial no papel da fermentação de carnes (BOLUMAR *et al.*, 2002).

A levedura *Debaryomyces hansenii* tem sido estudada e explorada do ponto de vista de seu potencial biotecnológico, sendo utilizada em pesquisas para produção de etanol, de xilitol a partir de xilose, de proteases e de enzimas α -galactosidases extra e intracelulares.

Apesar de serem relatados na literatura vários estudos com α -galactosidases de leveduras, não foi encontrado nenhum estudo relacionado à

purificação e caracterização de α -galactosidases de *Debaryomyces hansenii*. Entretanto, Dujon *et al.* (2004) estudando a evolução de microrganismos, realizaram o seqüenciamento do genoma de várias leveduras e a partir da seqüência de nucleotídeos, deduziram a seqüência de diversas proteínas, inclusive de uma α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii*.

2.8. Regulação da expressão de α -galactosidases em microrganismos

Estudos da regulação da atividade de α -galactosidase foram realizados em *Streptococcus pneumoniae* caracterizando-se um sistema de utilização de rafinose. *Streptococcus pneumoniae* possui uma região formada por oito genes envolvidos na regulação e metabolismo de rafinose. Os genes *raf R* (ativador) e *raf S* (repressor) estão transcritos como um operon e seus produtos regulam o promotor secundário (P_A) relacionado à expressão de *aga*, um gene estrutural para α -galactosidase. A expressão de *aga* é induzida na presença de rafinose e reprimida na presença de sacarose no meio de cultura (ROSENOW; MANIAR; TRIAS, 1999). Muito baixa atividade de α -galactosidase foi detectada nas células de *Streptococcus pneumoniae* crescidas em meio contendo somente glicose e sacarose como fontes de carbono, porém, a atividade foi aumentada 500 vezes quando no meio estava presente o açúcar rafinose, na concentração de 0,2 %. Outros açúcares foram testados, porém, não induziram a atividade de α -galactosidase, sugerindo, portanto que, rafinose foi o único açúcar capaz de induzir a expressão do gene *aga*.

Burkardt *et al* (1978) demonstraram a presença de plasmídeos conjugados para utilização de rafinose em *Escherichia coli*, o plasmídeo pRSD2, que forma a base do modelo atual de utilização de rafinose. *Escherichia coli* contendo plasmídeos *raf* é capaz de utilizar rafinose pela atividade de três enzimas, a rafinose permease, que transporta rafinose para o interior da célula, a α -galactosidase e a sacarose hidrolase (invertase). Os genes estruturais *raf A* (*agal*), *raf B* (*raf* permease) e *raf D* (invertase) formam um único operon controlado negativamente pelo gene repressor (*raf R*). O gene da rafinose permease (*raf B*), exibe 50 % de identidade com o gene da lactose permease (*lac y*), em *E. coli*. e o gene que codifica para invertase (*raf D*) contém regiões

de identidade com invertase de *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. (ASLANIDIS; SCHIMID; SCHIMITT, 1989).

De acordo com o modelo atual proposto por Aslanidis; Schmitt (1990), a rafinose intracelular é inicialmente hidrolisada por uma α -galactosidase, em galactose e sacarose. A sacarose posteriormente é clivada em glicose e frutose, por uma invertase.

Segundo Barnett (1992), algumas cepas de leveduras têm a capacidade de utilizar melibiose, como *Saccharomyces cerevisiae var uvarum*, *carlsbergensis* e *oleaginosus*. A α -galactosidase é codificada pelo gene MEL, para melhorar a utilização de rafinose presente no xarope de beterraba, que é utilizado para propagação comercial de leveduras. (GANSENT-RAMIREZ; CODON; BENITEZ, 1995). Estudos realizados por Melcher; Xu (2001) mostraram que a regulação dos genes GAL de *Saccharomyces cerevisiae* é determinada por uma proteína ativadora (Gal4) e por uma repressora (Gal80). A dimerização da proteína repressora em Gal80-Gal80 parece estabilizar a interação Gal4-Gal80 no DNA, resultando numa repressão completa dos genes GAL com sítios de ligações múltiplos de Gal4. Entretanto, os genes GAL, sob o controle de um simples sítio de ligação Gal4 não estabiliza multímeros de Gal80, resultando na ativação transcricional.

2.9. Imobilização enzimática

Enzimas são geralmente muito menos resistentes que os catalisadores industriais comuns e requerem um cuidado consideravelmente superior na sua manutenção. A atividade enzimática é influenciada por fatores ambientais, como temperatura, pH do meio e concentração do substrato. Desta forma muitas enzimas ativas estáveis têm sido imobilizadas de modo a tornar possível seu uso da mesma forma que os catalisadores sólidos nas reações químicas (LIMA; ANGNES, 1999). Definem-se como enzimas imobilizadas aquelas que estão fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser utilizadas repetida e continuamente (CHIBATA, 1978).

Dentre as vantagens das enzimas imobilizadas destacam-se, a possibilidade de sua reutilização, os processos podem ser operados

continuamente e controlados com facilidade, os produtos da reação catalisada pela enzima são facilmente separados desta, ocorre minimização dos problemas de efluentes e manuseamento de materiais e, em alguns casos ocorre melhoria das propriedades enzimáticas, como atividade e estabilidade (PEREIRA, 1999).

Atualmente a imobilização enzimática pode ser feita de diferentes formas, como em partículas, em membranas (as enzimas são imobilizadas por aprisionamento dentro de uma membrana semipermeável), em tubos (enzimas em tubos são produzidas usando nylon e tubos de poliacrilamida como suporte) e em filtros (as enzimas são imobilizadas pelo aprisionamento em fibras para formar fibras enzimáticas). Contudo, as enzimas imobilizadas são mais encontradas na forma de partículas devido à facilidade de manuseio e aplicação (HARTMEIER, 1998).

2.9.1. Principais métodos de imobilização

Existem vários métodos para a imobilização enzimática, cuja aplicabilidade dependerá da solubilidade da enzima, estabilidade, condições ótimas de ação (pH e temperatura) e tipo de substrato.

2.9.1.1. Ligação cruzada

Este procedimento consiste na utilização de reagentes bifuncionais que reagem com a enzima ou proteína formando um composto pouco solúvel em água. Na reação entre a enzima e os reativos formam-se ligações cruzadas intermoleculares, com a obtenção de macromoléculas pouco solúveis em água.

Dentre os reativos bifuncionais usados podemos citar o glutaraldeído, o ácido bisdrazobenzido 2,2-dissulfônico, entre outros (MILAGRES, 1996).

A vantagem deste método é que os reagentes bifuncionais ou multifuncionais podem ser usados para preparar em um único procedimento enzimas imobilizadas que são quase proteínas puras (FABER, 1997).

2.9.1.2. Adsorção física em suporte

A adsorção é o método mais simples de imobilização de enzimas em suportes insolúveis em água (Figura 7). Na adsorção as enzimas são mantidas na superfície dos suportes por forças físicas, Van der Waals. No entanto outras forças adicionais poderão estar envolvidas na interação entre o suporte e a enzima, principalmente interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações heteropolares (PEREIRA, 1999).

As vantagens desta técnica se referem a sua simplicidade de execução e pouca influência exercida na conformação da enzima devido a não utilização de ligações não fisiológicas da enzima com reagentes químicos. No entanto a fragilidade das ligações adsortivas exige um maior cuidado na manutenção das condições ideais de temperatura, pH e força iônica, a fim de evitar a dessorção (XU; LI; HE, 1995).

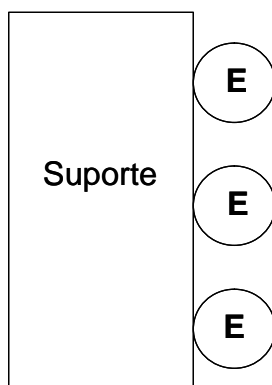


Figura 7 – Representação esquemática da ligação de uma enzima a um suporte por adsorção.

2.9.1.3. Ligação iônica

A ligação iônica difere da adsorção física pela força da ligação da enzima ao suporte. As forças iônicas são mais fortes que no caso da adsorção física (Figura 8).

A ligação iônica ou heteropolar baseia-se na atração eletrostática entre grupos positivamente carregados do material do suporte e da enzima. As proteínas possuem grupos aminas e carboxilas e, dependendo do valor do pH

do meio, podem apresentar-se positivas ou negativamente carregadas. Sendo assim, as proteínas carregadas positivamente podem aderir a suportes que estejam carregados negativamente.

Ao se usar ligações iônicas para imobilização enzimática, a manutenção do pH e força iônica correta deve ser preservada afim de não destruir o sistema (PEREIRA, 1999).

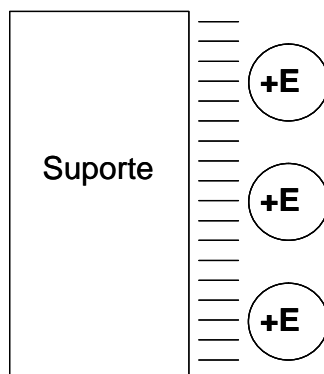


Figura 8 – Representação esquemática da ligação iônica de uma enzima a um suporte polianiónico.

2.9.1.4 Ligação covalente

A imobilização de enzimas em suporte insolúvel é feita através de ligações covalentes de grupos funcionais não ativos da enzima e grupos reativos (hidroxila, amina, fenólico) ligados à superfície do suporte (Figura 9).

Como exemplo de suporte tem-se ágar-ágar, celulose, colágeno, pérolas de vidro e sílica gel (MILAGRES, 1996).

Uma desvantagem freqüente encontrada na imobilização por ligação covalente é que ela provoca um grande “stress” na enzima. A imobilização necessariamente brusca conduz normalmente a alterações consideráveis na conformação, resultando numa perda significativa da atividade catalítica (BOSLEY; PEILOW, 1997). Como vantagem deste processo de imobilização, tem-se menor suscetibilidade a problemas decorrentes de variações de pH, força iônica, solvente e temperatura (MILAGRES, 1996).

A conexão entre o suporte e a enzima pode se dar de forma direta ou por meio de uma ligação intercalada de diferentes comprimentos chamada espaçadores. O uso de espaçadores proporciona um maior grau de mobilidade

de modo que a atividade enzimática pode, sob certas circunstâncias, ser maior do que se estivesse unida diretamente ao suporte (HARTMEIER, 1998).

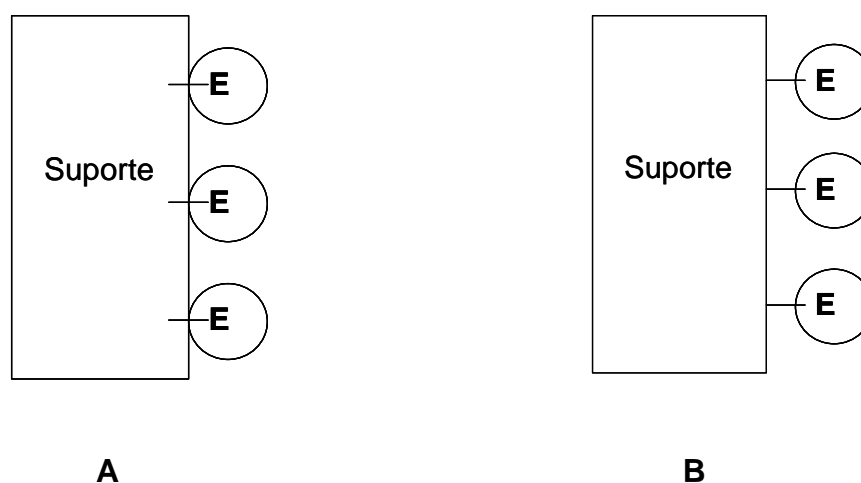


Figura 9 – Representação esquemática da ligação covalente de uma enzima a um suporte sem (A) e com (B) espaçador.

2.9.1.5. Encapsulação ou aprisionamento

As enzimas imobilizadas pelos métodos de encapsulação e aprisionamento ficam localizadas dentro de uma matriz polimérica ou membrana sendo este processo de mera retenção física da proteína (Figura 10). As condições usadas nas reações químicas de polimerização são relativamente severas resultando na perda da atividade enzimática. Portanto, cuidados especiais devem ser tomados na seleção das condições mais adequadas para a imobilização de enzimas por estes métodos (CHIBATA; WINGARD, 1983). Neste processo a enzima é imobilizada nos espaços intersticiais de uma ligação cruzada de um polímero insolúvel em água como, poliacrilamida e o polivinilálcool (CHIBATA, 1978) ou microencapsulada em membranas poliméricas semipermeáveis (CHIBATA; WINGARD, 1983). Nestes dois processos a matriz deve permitir o livre trânsito do substrato, de forma que este entre em contato com a enzima, seja hidrolisado ou transformado e posteriormente liberado (MILAGRES, 1996).



Figura 10 – Ilustração da imobilização de enzimas por encapsulamento.

2.9.1.6. Combinação de métodos

Em algumas situações, quando se deseja obter enzimas imobilizadas com maior atividade ou aumentar a resistência mecânica dos suportes, é recomendável a utilização de uma combinação de métodos para a imobilização de enzimas. Por exemplo, pode-se melhorar a estabilidade da enzima imobilizada por adsorção promovendo-se uma ligação cruzada entre as moléculas da enzima com o glutaraldeído (ZANIN; MORAES, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1. Reagentes

Os reagentes maltose, melibiose, gentiobiose, rafinose, estaquiose, galactose, p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p -NP- α Gal), iodoacetamida, ácido bicinconínico, solução de 4 % (p/v) $CuSO_4$ foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

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

As resinas Sephadex G-150 e DEAE-Sepharose foram obtidas da Amersham Pharmacia Biotech.

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

Os produtos derivados da soja, melaço leve e pesado foram fornecidos por Comércio e Indústrias Brasileiras COIMBRA S/A, Orlândia – SP – Brasil.

3.2. Microrganismo

A cepa de *Debaryomyces hansenii* utilizada, classificada como UFV-1, pertence à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos-BIOAGRO-UFV. A levedura foi isolada de ambiente de laticínios da região da Zona da Mata, Minas Gerais e, segundo testes bioquímicos foi verificada sua habilidade em assimilar o açúcar melibiose.

3.3. Manutenção da cultura

A levedura mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em glicerol e YPD (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona e 2 % de glicose), foi ativada em meio YPD sólido (1,5 % ágar), incubada em geladeira B.O.D, por 24 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. As placas foram mantidas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e este estoque foi repicado, mensalmente e utilizado para padronização do inóculo.

3.4. Determinação da Relação Massa Celular Seca versus Absorbância

A levedura *D. hansenii* foi pré-ativada em 10 mL do meio YPD líquido e incubada em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick, 200 rpm, por 12 h, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. As células pré-ativadas com absorbância a 600 nm inicial entre 0,08 e 0,1 foram inoculadas em 100 mL do mesmo meio e incubadas por 14 h, em frascos erlenmeyer de 250 mL, nas mesmas condições descritas acima. Após este período, as células foram separadas por centrifugação a 4000 g , por 5 min a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e usadas para o preparo da suspensão em 5 mL de água destilada estéril. Dessa suspensão, foram retiradas 4 alíquotas de 1 mL, as quais foram mantidas por 48 h a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, para a determinação da massa seca. Uma amostra de 1 mL da mesma suspensão foi utilizada para realização das seguintes diluições: 1×10^{-2} , 2×10^{-2} , 3×10^{-2} , 4×10^{-2} , 5×10^{-2} e 6×10^{-2} em duplicata. Nas amostras diluídas foram determinadas a absorbância a 600 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU série 600. A regressão linear entre absorbância e massa celular seca (mg/mL) permitiu a determinação da massa celular seca correspondente a uma unidade de absorbância a 600 nm (WHITE; HEGEMAN, 1998).

Uma unidade de absorvância a 600 nm equivale a $(0,533 \pm 0,118)$ mg/mL de massa celular seca (Apêndice A).

3.5. Meios de cultura, fontes e tempos para produção de α -galactosidases de *Debaryomyces hansenii*

Os meios de cultura utilizados para o crescimento da levedura *D. hansenii* foram:

- Meio YP : 1 % (p/v) de extrato de levedura e 2 % (p/v) de peptona.
- Meio mineral (MM): contém por litro de água destilada, 0,62 g de KH_2PO_4 , 2 g de K_2HPO_4 , 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- Meio mineral (MME): contém por litro de água destilada, 0,62 g de KH_2PO_4 , 2 g de K_2HPO_4 , 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 5 g de extrato de levedura.
- Meio mínimo YNB (Base de nitrogênio para levedura): sem aminoácidos, com sulfato de amônio 0,5 % (p/v).

Os açúcares utilizados como fonte de carbono, glicose, sacarose, lactose, galactose, melibiose e rafinose foram individualmente utilizados na concentração de 1 % (p/v). Os controles continham apenas o meio de cultura, isentos de açúcar.

Os tempos de incubação testados para produção das α -galactosidases pelo microrganismo foram 0, 12, 27, 36 e 48 h.

3.6. Crescimento de *Debaryomyces hansenii*

A levedura *D. hansenii* mantida em placas a 4 °C foi ativada em YPD líquido, em erlenmeyers de 250 mL, incubada em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick, 200 rpm, por 12-15 h, a 30 °C. Após este período, o meio foi centrifugado a 4000 g, por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com água peptonada 0,1 % (p/v). Posteriormente, as células de *D. hansenii* foram inoculadas (volume equivalente a A_{600} inicial de 0,1) nos meios de cultura, contendo as diferentes fontes de carbono, sendo incubados nas mesmas condições descritas acima. Nos tempos 0, 12, 27, 36 e

48 h de crescimento, amostras de 3 mL foram coletadas em tubos tipo eppendorff e congeladas, para posteriores análises de crescimento (A_{600}) e determinação da atividade enzimática.

O crescimento da levedura foi estimado pela medida da absorbância em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de onda de 600 nm e convertido em massa celular seca a partir da relação: $1 A_{600} = 0,533$ mg/mL de massa celular seca.

3.7. Permeabilização das células de *Debaryomyces hansenii*

Amostras de 1 mL da cultura de *D. hansenii* foram centrifugadas a 25900 g, por 5 min, a 4 °C e o precipitado foi ressuspenso em 0,45 mL de solução de etanol 50 % (v/v). Após 30 segundos de agitação, foram retiradas frações de 100 µL para determinação da atividade de α -galactosidase intracelular, conforme descrito no item 3.9.1.

3.8. Purificação das α -galactosidases de *Debaryomyces hansenii*

A levedura *D. hansenii* foi ativada conforme descrito no item 3.6 e as células obtidas após centrifugação a 4000 g, por 5 min, a 4 °C foram inoculadas no meio mineral com extrato de levedura (MME) contendo 1 % (p/v) de galactose. Após incubação em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick, 200 rpm, por 36 h, a 30 °C, a cultura foi centrifugada nas mesmas condições já descritas. O sobrenadante posteriormente liofilizado e contendo as enzimas secretadas, foi utilizado como fonte da α -galactosidase extracelular. As células foram utilizadas como fonte da α -galactosidase intracelular.

3.8.1. α -Galactosidase extracelular

O sobrenadante da cultura contendo a α -galactosidase extracelular foi liofilizado em liofilizador Edwards Super Modulyo, para redução do volume em aproximadamente 10 vezes e submetido às etapas cromatográficas.

A α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* foi purificada de acordo com o fluxograma abaixo.

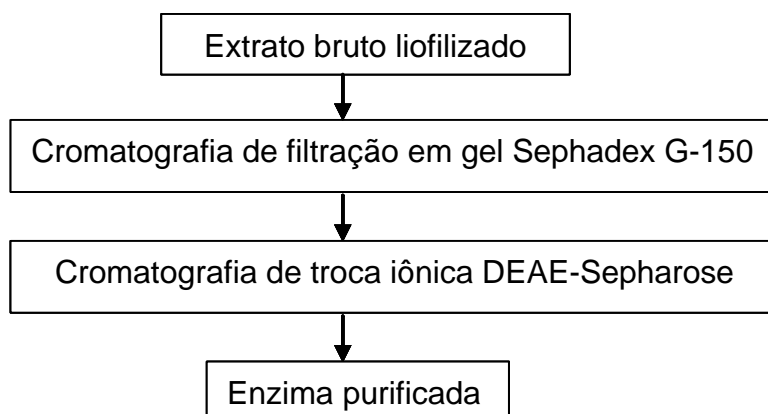


Figura 11 - Seqüências das etapas cromatográficas utilizadas na purificação da α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*.

3.8.1.1. Cromatografia de filtração em gel

A amostra enzimática concentrada por liofilização foi submetida à cromatografia de filtração em gel em uma coluna (87,5 x 2,5 cm) de Sephadex G-150 equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,5. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão a 4 °C, com fluxo contínuo de 20 mL/h e coletadas em frações de 3,5 mL. As frações com atividade de α -galactosidase foram reunidas.

3.8.1.2. Cromatografia de troca-iônica

A amostra contendo as frações reunidas com atividade de α -galactosidase, proveniente da filtração em gel, foi submetida à cromatografia de troca-iônica, em uma coluna (14,5 x 1,9 cm) de DEAE-Sepharose, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,5. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, seguido por um gradiente salino crescente formado pelo tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e o mesmo tampão contendo 1 M de NaCl. Todo o procedimento foi conduzido a 4 °C, com fluxo de 40 mL/h. Frações de 3,1 mL foram coletadas e aquelas que apresentaram atividade de α -galactosidase foram reunidas.

3.8.2. α -Galactosidase intracelular

3.8.2.1. Extração da α -galactosidase intracelular

A α -galactosidase intracelular de *D. hansenii* foi extraída de acordo com o fluxograma abaixo:

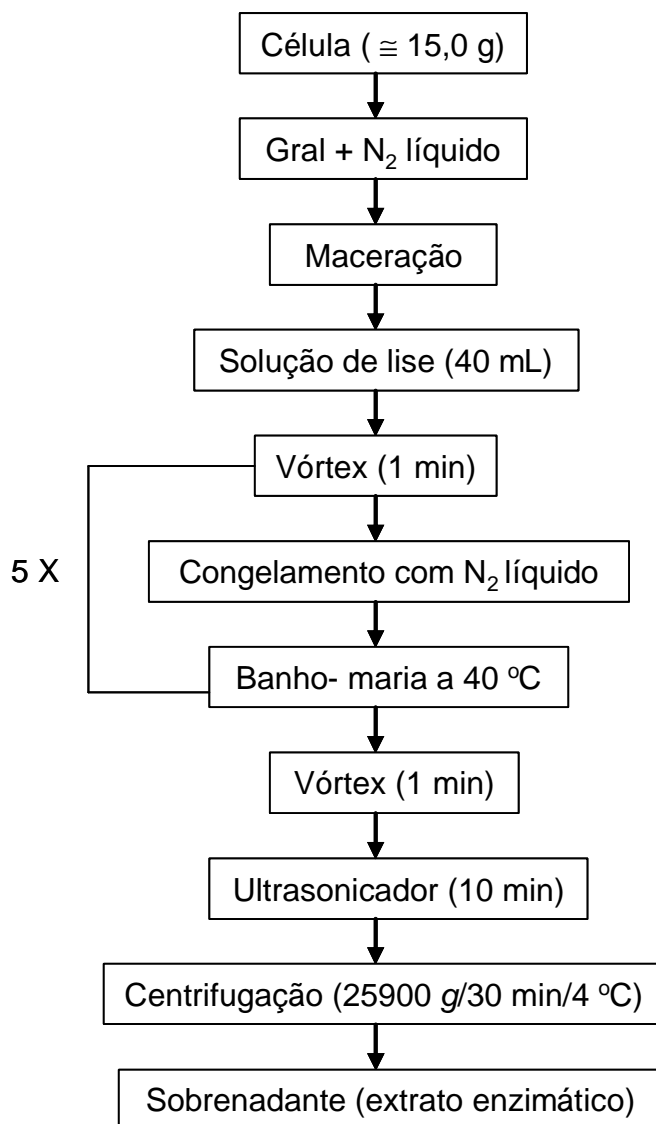


Figura 12 - Seqüência das etapas de extração da α -galactosidase intracelular de *Debaryomyces hansenii*.

A solução de lise foi preparada com tampão acetato de sódio $0,1$ M e Triton X-100 $0,25$ % (p/v).

3.8.2.2. Purificação da α -galactosidase intracelular

A α -galactosidase intracelular de *D. hansenii* foi purificada de acordo com o fluxograma abaixo:

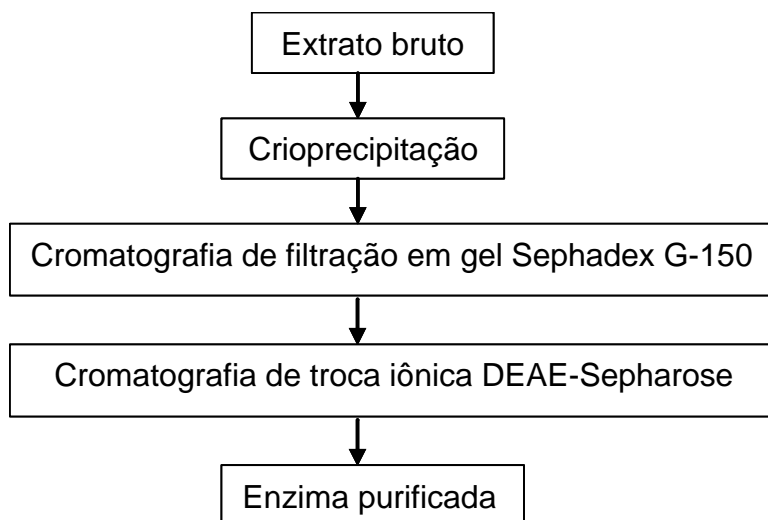


Figura 13 - Seqüência das etapas cromatográficas utilizadas na purificação da α -galactosidase intracelular de *Debaryomyces hansenii*.

3.8.2.3. Crioprecipitação

O extrato enzimático foi congelado a -20°C durante 24 h. Após este período, a amostra descongelada foi centrifugada a 25900 g, por 30 min, a 4°C e o sobrenadante foi utilizado na etapa seguinte de purificação.

3.8.2.4. Cromatografia de filtração em gel

A amostra enzimática proveniente da etapa de crioprecipitação foi submetida à cromatografia de filtração em gel em uma coluna (87,5 x 2,5 cm) de Sephadex G-150 equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,5. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, a 4°C com fluxo contínuo de 20 mL/h e coletadas frações de 3,5 mL. As frações com atividade de α -galactosidase foram reunidas.

3.8.2.5. Cromatografia de troca-iônica

A amostra proveniente da filtração em gel foi submetida à cromatografia de troca-iônica, em uma coluna (14,5 x 1,9 cm) de DEAE-Sepharose, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,5. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, seguido por um gradiente salino crescente formado por tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e o mesmo tampão contendo 1 M de NaCl. Todo o processo foi realizado a 4 °C, com fluxo de 40 mL/h. Frações de 3,1 mL foram coletadas e aquelas que apresentaram atividade de α -galactosidase foram reunidas.

3.9. Determinação da atividade das α -galactosidases

3.9.1. Com o substrato sintético p-NP- α Gal

Para os ensaios das atividades das α -galactosidases extra e intracelulares com o substrato sintético p-NP- α Gal, as misturas de reações continham 650 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250 μ L de solução p-NP- α Gal 2 mM e 0-100 μ L do extrato enzimático. As reações foram conduzidas por 15 min, em banho-maria a 40 °C nos ensaios de purificação ou a 60°C, nos demais ensaios para a enzima extracelular ou a 55 °C para a enzima intracelular e interrompidas pela adição de 1 mL de solução de Na₂CO₃ 0,5 M. Os valores de absorbância obtidos a 410 nm foram transformados em μ moles de p-NP, utilizando uma curva padrão construída com 0-0,2 μ moles de p-NP a partir de uma solução estoque de concentração 2 μ moles/mL. Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de p-NP por min, nas condições de ensaio.

No caso da α -galactosidase imobilizada, uma fração de 2 mL contendo a enzima imobilizada com 3 mL de solução de p-NP- α Gal 2 mM preparada em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, foi incubada em banho-maria a 60 °C, por 10 min.

Após este período, para a medida da atividade da enzima a 410 nm, a mistura da reação continha 900 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 100 µL do extrato enzimático e 1 mL de solução de Na₂CO₃ 0,5 M.

3.9.2. Com açúcares redutores

Para os ensaios das atividades das α-galactosidases extra e intracelulares com açúcares redutores, melibiose, maltose, gentiobiose, lactose e D-manose, a glicose liberada da reação foi determinada por meio do método da glicose oxidase (STERNBERG; VIJAYKUMAR; REESE, 1970). O ensaio foi conduzido com 500-860 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 40-300 µL de solução de açúcar redutor 10 mM (melibiose) ou 100 mM (maltose, lactose e D-manose) ou 30 mM (gentiobiose) e 100 µL de extrato enzimático. A reação foi conduzida por 30 min a 60 °C (para a enzima extracelular) ou a 55 °C (para a enzima intracelular) sendo interrompida pela imersão dos tubos em banho de água fervente, por 5 min, sendo depois colocadas em água fria. Da mistura da reação foram coletados 150 µL de cada tubo e adicionado 1 mL do reativo de glicose oxidase e incubados por 15 min a 37 °C. A concentração de glicose formada foi estimada espectrofotometricamente a 505 nm por uma curva padrão construída com 0-0,01 µmoles de glicose, utilizando-se uma solução estoque de concentração 1 mg/mL.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de glicose por min, nas condições de ensaio.

3.9.3. Com açúcares não-redutores

Para os ensaios com os substratos sacarose, rafinose e estaquiose, as atividades das α-galactosidases extra e intracelulares foram determinadas medindo-se a quantidade de açúcar redutor produzida com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) pelo método de Miller (1956). A mistura de reação continha 700-800 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 100-150 µL de solução de substrato sacarose ou estaquiose (100 mM), rafinose (100 mM) para a enzima extracelular ou 300 mM para a enzima intracelular e 100 µL de

extrato enzimático. O ensaio foi conduzido por 30 min a 60 °C (para a enzima extracelular) ou a 55 °C (para a enzima intracelular). Após este período, foi adicionado 1 mL do reagente DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e deixadas em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Os valores de absorbância obtidos a 550 nm foram transformados em μ moles de glicose, utilizando uma curva padrão construída com 0-2 μ moles de glicose, a partir de uma solução estoque de concentração 2 mg/mL.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por min, nas condições de ensaio.

3.9.4. Com outros substratos sintéticos

Os ensaios das atividades das α -galactosidases extra e intracelulares foram idênticos ao descrito no item 3.9.1, exceto que foram utilizados os substratos p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (p -NP- β Gal), p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (p -NP- α Glc), p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (p -NP- β X), p-nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo (p -NP- α A), p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (p -NP- α M), o-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (o -NP- β Glc) e o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (o -NP- β Gal).

3.9.5. Com polímeros

Ensaio para atividades das α -galactosidases extra e intracelulares também foram realizados com polímeros, como goma de alfarroba e goma guar como substratos, com o uso do reagente dinitrossalicilato (MILLER, 1956), como descrito no item 3.9.3. O ensaio foi conduzido por 60 min, a 60 °C (enzima extracelular) ou a 55 °C (enzima intracelular) sendo constituído de 100 μ L do extrato enzimático, 500 μ L de solução do polímero a 2 % (p/v) e 400 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0.

3.10. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das α -galactosidases

3.10.1. Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), contendo SDS e β -mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). Os minigéis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30 % (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 mol/L, pH 8,8, para o gel separador e tampão Tris/HCl 0,5 mol/L, pH 6,8, para o gel empilhador, persulfato de amônio 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e, N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED). As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 80 V, em placas do Sistema Mini-Gel da Sigma Chemical Co. As amostras submetidas à eletroforese foram, anteriormente, precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 50 %, lavadas com acetona gelada e adicionadas ao tampão de amostra desnaturante 3 vezes concentrado (0,19 M Tris/HCl, pH 6,8, 2,3 % p/v de SDS, 1 % v/v de glicerol, 5 % v/v de β -mercaptoetanol e azul de bromofenol), fervidas durante 5 min e aplicadas no gel (LAEMMLI, 1970).

Os marcadores de massa molecular foram os seguintes: BSA (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Pepsina (34,7 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), β -Lactoalbumina (18,4 kDa) e Lisozima (14,3 kDa). As massas moleculares das frações protéicas foram estimadas correlacionando-se, por meio de uma curva padrão, os perfis de migração das proteínas-padrão (distância percorrida no gel) com o logaritmo da massa molecular.

3.10.2. Coloração dos géis de eletroforese

As proteínas presentes nos géis foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum; Beier; Gross, (1987).

Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em 50 mL de solução fixadora (metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12:38 em volume) por no mínimo 2 h, seguido de 3 lavagens de 10 min com solução de etanol 50 %. Os géis foram lavados por 1 min, em solução de

tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v). Os géis foram rapidamente lavados com água destilada e incubados, por 15 min, em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37 µL de formaldeído 37 % (v/v) e lavados 3 vezes, por 20 segundos, com água destilada. Posteriormente, os géis foram tratados com a solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 50 µL de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas protéicas. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético.

3.11. Caracterização enzimática

3.11.1. Efeito do pH

Para a determinação dos valores de pH ótimos das atividades das α -galactosidases extra e intracelulares, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.9.1, exceto que, o ensaio foi realizado em diferentes valores de pH, utilizando-se tampões McIlvaine (McLLVAINE, 1921), na faixa de 3,0 a 8,0.

O pH ótimo da α -galactosidase extracelular imobilizada foi realizado pela mistura de 2 mL da enzima imobilizada, 1 mL da solução de p-NP- α Gal 6 mM, em diferentes tampões McIlvaine, na faixa de 4,0 a 8,0 e, incubados em banho-maria a 60 °C por 10 min. A atividade da enzima imobilizada foi determinada como descrito no item 3.9.1.

3.11.2. Efeito da temperatura

Para a determinação das temperaturas ótimas das α -galactosidases extra e intracelulares, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.9.1, exceto o ensaio que foi conduzido em várias temperaturas compreendidas entre 25 e 80 °C.

Para a determinação da temperatura ótima da α -galactosidase extracelular imobilizada, 2 mL da enzima imobilizada e 3 mL de solução de p-NP- α Gal 2 mM preparada em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, foram adicionados em um béquer de 50 mL e incubado em banho-maria por

diferentes temperaturas (40 a 90 °C) por 10 min. A atividade da enzima imobilizada foi determinada como descrito no item 3.9.1.

3.11.3. Análise de termoestabilidade

As estabilidades térmicas das α -galactosidases extra e intracelulares foram testadas em várias temperaturas. Alíquotas (0-100 μ L) das enzimas purificadas juntamente com a solução tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, foram pré-incubadas nas temperaturas de 40, 50, 55, 60, 65 e 70 °C (para a enzima extracelular) ou 40, 55 e 65 °C (para a enzima intracelular), por 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 360 720, 1080, 1440 e 2880 min. Após cada tempo de pré-incubação, 250 μ L do substrato p-NP α -Gal 2 mM foi adicionado e os ensaios para as atividades das α -galactosidases foram conduzidos como descrito no item 3.9.1, porém, as reações foram conduzidas nas temperaturas de pré-incubação.

A estabilidade térmica da α -galactosidase imobilizada foi realizada nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C por 0, 30, 90, 210, 390, 960,1440 e 2220 min. Para determinar a estabilidade térmica, 2 mL da enzima imobilizada e 3 mL de água destilada foram adicionados em um béquer de 50 mL e incubado em banho-maria nas temperaturas e tempos descritos acima. Após cada tempo a água destilada foi descartada e adicionados no mesmo béquer, 3 mL de solução de p-NP- α Gal 2 mM preparada em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A atividade da α -galactosidase imobilizada foi determinada como descrito no item 3.9.1, porém, as reações foram conduzidas nas temperaturas de pré-incubação.

Também foi determinada a estabilidade das enzimas extra e intracelulares durante 3 meses e, da enzima extracelular imobilizada durante 5 meses, na temperatura de 4 °C. As atividades das enzimas foram determinadas conforme descrito anteriormente.

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

O efeito do pH na estabilidade da α -galactosidase foi testado incubando-se a enzima na faixa de pH 3,0 a 8,0 por 30 min a 60 °C.

Após o período de incubação, a atividade da enzima foi conduzida como descrito no item 3.9.1.

3.11.5. Meia-vida das α -galactosidases

O ensaio para determinar a meia-vida das enzimas, ou seja, o tempo necessário para que a atividade enzimática seja reduzida pela metade, foi feito utilizando-se 0-100 μ L das enzimas purificadas e 650 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. As misturas foram pré-incubadas nas mesmas temperaturas e tempos utilizados na determinação das termoestabilidades. Após cada tempo de pré-incubação, foram adicionados 250 μ L do substrato p-NP α -Gal 2 mM e os ensaios para as atividades das α -galactosidases foram conduzidos nas temperaturas de pré-incubação, como descrito no item 3.9.1.

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

Para obtenção dos valores de K_M e V_{max} , os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando-se concentrações crescentes dos substratos, p-NP- α Gal, rafinose, estaquiase e melibiose. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos como descrito no item 3.9.1, porém, por 30 min e concentrações de 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,75; 0,9 e 1 mM para p-NP- α Gal. As atividades das enzimas com o substrato rafinose nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 60; 70 e 80 mM para a enzima extracelular e, nas concentrações de 5; 10; 20; 30; 40; 60; 70 ; 80; 90 e 120 mM para a enzima intracelular; com o substrato estaquiase nas concentrações de 2,5; 5; 8; 10; 15; 20; 25 e 30 mM, foram medidas pela formação de açúcar redutor com o uso do reagente dinitrossalicilato (MILLER,

1956), como descrito no item 3.9.3. Com o substrato melibiose utilizaram-se as concentrações de 0,15; 0,3; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 30 e 40 mM, sendo as atividades das enzimas determinadas pela formação de glicose livre utilizando-se o método da glicose oxidase (STENBERG; VIJAYKUMAR; REESE, 1970), como descrito no item 3.9.2.

Os valores de K_M e V_{max} foram calculados pela curva de velocidade em função da concentração de substrato, Curva de Michaelis-Menten, pelo programa Curve Expert, versão 1.3 para Windows (HYAMS, 1997).

3.11.7. Determinação das especificidades das α -galactosidases para diversos substratos

Ensaio enzimáticos foram realizados com diversos substratos sintéticos, naturais e polímeros com o objetivo de determinar a especificidade das enzimas extra e intracelulares purificadas.

As atividades das α -galactosidases foram estimadas com outros substratos sintéticos, além do p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p -NP- α Gal), como p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (p -NP- β Gal), p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (p -NP- α Glc), p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (p -NP- β X), p-nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo (p -NP- α A), p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (p -NP- α M), o-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (o -NP- β Glc) e o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (o -NP- β Gal). Os ensaios foram realizados como descrito no item 3.9.4.

As atividades das α -galactosidases também foram estimadas com os açúcares redutores lactose, maltose, melibiose e gentiobiose, como descrito no item 3.9.2, açúcares não redutores como estaquiose, rafinose e sacarose como descrito no item 3.9.3 e, polímeros como goma de alfarroba e goma guar, conforme descrito no item 3.9.5.

3.11.8. Determinação da constante de inibição (K_i) das α -galactosidases

Os valores de K_i foram determinados pelo gráfico de Dixon (1953) para os inibidores galactose e melibiose, com as enzimas extra e intracelulares

purificadas e o substrato p-NP- α Gal. Os ensaios das atividades enzimáticas com p-NP- α Gal foram realizados nas mesmas condições descritas no item 3.9.1, na ausência ou presença de 0,5; 1 e 2 mM de galactose ou 0,25; 0,5 e 1 mM de melibiose para a enzima extracelular ou 0,5; 1 e 2 mM para a enzima intracelular, com concentrações de p-NP- α Gal que variaram de 0,05 a 1 mM.

3.11.9. Efeitos de íons, agentes redutores e açúcares nas atividades das α -galactosidases

Os efeitos de íons, agentes redutores e açúcares na atividade das α -galactosidases extra e intracelulares, foram analisados utilizando-se 480 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 0-100 μ L das enzimas purificadas e 200 μ L de soluções 10 mM de cada um dos seguintes compostos: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), cloreto de magnésio, iodoacetamida, nitrato de prata, cloreto de sódio, dodecil sulfato de sódio (SDS), cloreto de potássio, sulfato de cobre, cloreto de cálcio, β -mercaptoetanol, rafinose, maltose, sacarose, melibiose, D-glicose, D-galactose, lactose, gentiobiose, estaquiose e D-manose. As misturas foram pré-incubadas em banho-maria por 20 min, a 60 °C (para a enzima extracelular) ou a 55 °C (para a enzima intracelular) e em seguida, foram adicionados 250 μ L do substrato p-NP- α Gal 2 mM e os ensaios padrão das atividades foram conduzidos conforme descrição no item 3.9.1.

3.11.10. Seqüenciamento do N-terminal da α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*

As análises de seqüenciamento da α -galactosidase extracelular foram realizadas no equipamento PPSQ-21/23, marca SHIMADZU, no Laboratório de Estudos de Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas do ICB-UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

A degradação de Edman é uma técnica utilizada para determinação da estrutura primária da proteína, que identifica resíduos de aminoácidos a partir do N-terminal da proteína. O procedimento consiste de 3 etapas de reações:

- 1- Reação de acoplamento: fenilisotiocianato (PITC) é acoplado ao amino-terminal da proteína em condições básicas e produz uma proteína feniltiocarbamil (PTC).
- 2- Reação de clivagem: o ácido trifluoroacético (TFA) cliva uma ligação peptídica dando um aminoácido 2-anilino-5-tiazolinona (ATZ) a partir da proteína PTC. Um aminoácido ATZ é extraído pelo uso de um solvente orgânico e o extraído prossegue para reação de conversão. Após a remoção de um aminoácido N-terminal da estrutura da proteína, a proteína remanescente revelará outro aminoácido N-terminal da proteína.
- 3- Reação de conversão: o aminoácido instável ATZ é convertido para um aminoácido estável, feniltiohidantoína (PTH) pela solução de ácido trifluoroacético.

O aminoácido PTH obtido pela Degradação de Edman é separado por cromatografia líquida de alta eficiência e os dados são calculados automaticamente.

Em uma alíquota de 4 mL da enzima purificada foi adicionado 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50 % e a mistura foi deixada no gelo por 30 min. Após este tempo, a mistura foi centrifugada em centrífuga tipo Eppendorff 5415C, 14000 rpm, por 5 min, descartado o sobrenadante, sendo adicionada acetona gelada e novamente centrifugado nas mesmas condições descritas. O sobrenadante foi descartado e o precipitado utilizado para fazer um gel eletroforético como descrito no item 3.10.1. Após a corrida, o gel foi utilizado para transferência ('Western blotting') da proteína para uma membrana de PVDF (Difluoreto de polivinila) de 20 x 20 cm, com tamanho dos poros de 0,45 µm. A transferência durou 14 h e foi realizada a 40 V. A banda correspondente á enzima α -galactosidase foi recortada e picotada em pedaços, colocados em tubos tipo eppendorff, para a realização do seqüenciamento automático.

3.12. Determinação do teor protéico nos extratos enzimáticos

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

Na solução contendo as proteínas (0-100 μ L) foi misturado 1 mL do reagente de Bradford e a absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm, por uma curva padrão construída com 0-20 μ g de albumina sérica bovina (BSA). O reagente de Bradford concentrado 5 vezes foi preparado misturando-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95 % (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85 % (v/v). Após solubilização, o volume foi completado para 200 mL e agitado por 30 min, filtrando-se a solução em papel Whatman n^o1. Este método baseia-se no desenvolvimento da cor em função da ligação da proteína com o pigmento Coomassie Brilliant Blue G-250.

Os teores protéicos nas preparações enzimáticas da α -galactosidase intracelular foram determinados pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA) conforme descrito por Smith *et al.* (1985). Nos tubos contendo a solução com as proteínas (0-100 μ L) foi adicionado em intervalos de 30 segundos, 1 mL do reagente de trabalho (Reagente A: Solução de ácido bicinconínico - 50 mL e Reagente B: solução de 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 1 mL). A mistura foi agitada rapidamente e em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C, por exatos 30 min. Após este período, os tubos foram retirados em intervalos de 30 segundos e deixados 20 min em temperatura ambiente. As leituras foram efetuadas em intervalos de 30 segundos em espectrofotômetro a 562 nm, conforme curva padrão construída com 0,24 % (p/v) de BSA.

3.13. Imobilização da α -galactosidase extracelular

O método de imobilização utilizado foi o de ligação covalente em sílica gel modificada por grupos aminas. A etapa de modificação do suporte foi realizada no Laboratório de Eletroquímica da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. Neste processo, 20 g de sílica com granulometria de 150 Å foram adicionadas a um balão volumétrico de 3 bocas juntamente com 200 mL de tolueno 99 % e 3 mL de solução do agente modificador 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS). A reação foi conduzida a 80 °C pelo tempo de 12 h, sob agitação constante, em um agitador mecânico. Em uma das bocas do

balão volumétrico foi instalado um condensador, a fim de permitir que o material evaporado retornasse ao meio reacional evitando desta forma, a necessidade de reposição do solvente. Após as 12 h de reação, a sílica gel modificada com grupos amina (SMA) foi filtrada e lavada com 200 mL do solvente tolueno e posteriormente, com 400 mL de etanol. Após a lavagem e total eliminação do etanol, a SMA foi disposta em papel de filtro sobre vidro-relógio e deixada secar em temperatura ambiente pelo tempo de 2 h. Finalizando o processo, SMA foi submetida a secagem em estufa com temperatura controlada, à 40 °C, por 45 min.

Durante o processo de imobilização da enzima α -galactosidase extracelular foram adicionados 50 mL de uma solução de glutaraldeído 5 % a 1 g de SMA e agitados por 1 min para ocorrer a reação dos grupos aldeído com os grupos amina existentes na superfície da SMA. Após a reação, o glutaraldeído foi descartado e a SMA submetida a 5 lavagens em água destilada. Imediatamente foi adicionada à SMA, uma quantidade da solução enzimática da α -galactosidase correspondente a 20 U e a mistura foi submetida à agitação por 10 min para permitir a ligação covalente da enzima com os grupos aldeído. A SMA agora contendo a α -galactosidase imobilizada (SMAg) foi lavada com água destilada 5 vezes e armazenada em tampão fosfato 100 mM, pH 5,0, a 4 °C.

3.14. Hidrólise de RO em produtos derivados de soja

Para o preparo do extrato hidrossolúvel de soja (leite de soja), foram pesadas 50 g de sementes de soja, lavadas em água fervente por 5 min sendo adicionados 400 mL de água à 80 °C e, colocados no liquidificador por 5 min. O leite de soja foi filtrado e fervido durante 10 min.

Alíquotas de 5 mL do leite de soja foram transferidas para erlenmeyers de 25 mL em triplicata. Em cada erlenmeyer foram adicionados 2 mL da enzima α -galactosidase extracelular purificada (10,5 U) e incubados em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick, 100 rpm, por 2, 4 e 6 h, a 60 °C.

Para a hidrólise dos RO no leite de soja, também foram utilizadas células de *D. hansenii* (5 g) permeabilizadas com 15 mL de etanol 50 % (v/v), conforme

descrição no item 3.7. Amostras de 2 mL (10,5 U) das células permeabilizadas foram adicionadas em erlenmeyers de 25 mL em triplicata, contendo 5 mL do leite de soja. As misturas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente e após o período de incubação foram centrifugadas a 25900 g, por 30 min, a 4 °C, descartando-se a biomassa e o leite foi usado para determinação da porcentagem de hidrólise dos RO.

Para a hidrólise dos RO no leite de soja com a enzima imobilizada foram adicionados em erlenmeyers de 125 mL, 1 g de sílica contendo 40 U da enzima imobilizada e 25 mL de leite de soja. A mistura foi incubada nas mesmas condições descritas anteriormente, porém, nos tempos 2, 4, 6, 8 e 10 h.

Para a determinação da porcentagem de hidrólise dos RO presentes no leite de soja, essas preparações foram liofilizadas e os RO extraídos de 20-30 mg do pó obtido. Os teores de RO determinados nos extratos tratados com as enzimas foram comparados àqueles das amostras não tratadas.

3.15. Hidrólise de RO no melão de soja

A enzima α -galactosidase extracelular purificada foi utilizada para hidrólise de RO no melão de soja. Os produtos, melão leve e pesado foram diluídos em água na proporção de 1:5 (p/v), homogeneizados em agitador magnético por 10 min. Alíquotas de 5 mL dos produtos melão leve e pesado foram transferidas em triplicata para erlenmeyers de 25 mL. Em cada erlenmeyer foram adicionadas 10,5 U da enzima α -galactosidase extracelular purificada e incubados em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick, 100 rpm, por 2, 4 e 6 h, a 60 °C. Para a determinação das porcentagens de hidrólise dos RO presentes nos produtos melão leve e pesado, essas preparações foram liofilizadas, pesadas (20 mg) em tubos tipo eppendorff, adicionado 1 mL de etanol 80 % e colocado no vortéx por 10 segundos. Tais soluções contendo os açúcares solúveis foram armazenadas na temperatura de -20 °C. Após 24 h, as soluções foram centrifugadas em centrífuga tipo Eppendorff 5415C, 14.000 rpm, por 20 min, passando por filtro Milipore de 0,45 micra de diâmetro e armazenados a -20 °C, para posterior análise por CLAE.

Os teores de RO determinados nos produtos melão leve e pesado tratados com a enzima foram comparados àqueles das amostras não tratadas.

3.16. Extração de RO

A extração de RO no leite de soja antes e após o tratamento enzimático foi conduzida como descrita por Saravitz;; Pharr; Carter (1987), com modificações. Aproximadamente 20-30 mg das amostras liofilizadas pesadas em tubos tipo eppendorff foram usadas para o processo de extração dos açúcares solúveis. A fração óleo, presente nas amostras foi retirada em 4 extrações com 1 mL de éter de petróleo a 42 °C, por 5 min. Os açúcares foram então extraídos em 3 etapas de tratamento com etanol 80 %, a 100 °C, por 5 min. Após cada extração feita com éter de petróleo ou álcool 80 %, a mistura foi submetida à centrifugação em centrífuga do tipo Eppendorff 5415C, 14.000 rpm, por 20 min. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50 °C, os açúcares foram ressuspensos em 1 mL de etanol 80 % e congelados a - 20 °C. Após 24 h, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições já descritas, passadas em filtro Millipore de 0,45 micra de diâmetro e armazenadas a - 20 °C, para posterior análise por CLAE.

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

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

O método foi padronizado para determinação quantitativa dos açúcares solúveis presentes nos produtos derivados da soja. A partir de uma solução estoque formada pela mistura dos açúcares frutose, sacarose, rafinose e estaquiose nas concentrações de 4, 4, 8 e 8 % (p/v), respectivamente, foram feitas diluições para obtenção das soluções padrão. Cada solução foi injetada no cromatógrafo líquido para obtenção das curvas, correlacionando a área do pico com a concentração do açúcar na solução. As retas foram obtidas por

regressão linear. Um volume de 20 μL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo e cada açúcar presente foi identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenções e concentrações dos açúcares nas soluções padrão. Todos os cálculos foram feitos pelo computador acoplado ao sistema de CLAE, equipado com o programa LC-10 versão 2.2 para Windows.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte 1

Condição fisiológica para síntese de
 α -galactosidases de *Debaryomyces hansenii*

4.1.1. Massa celular e atividade de α -galactosidase extracelular da cultura de *Debaryomyces hansenii* em diferentes meios e fontes de carbono

As massas celulares da cultura de *D. hansenii* e as atividades da α -galactosidase extracelular nos sobrenadantes dos meios YP, MME e MM, estão apresentadas nas Figuras 14, 15 e 16, respectivamente.

No meio de cultura contendo extrato de levedura e peptona (YP), *D. hansenii* cresceu em todas as fontes testadas até 36 h, diminuindo em seguida, até 48 h (Figura 14A). A massa celular máxima foi encontrada no tempo de 36 h, na presença de lactose (8,45 mg/mL), 1,6 vezes maior em relação a melibiose, que promoveu menor crescimento. Em relação à atividade de α -galactosidase extracelular (Figura 14B) foi verificado que todos os açúcares induziram a síntese dessa enzima, destacando-se lactose e rafinose nos tempos 27 e 36 h. Com 27 h de cultivo, lactose e rafinose foram responsáveis por 8 e 6 vezes mais atividades em relação ao controle, respectivamente. Entretanto, com 48 h de cultivo, lactose e galactose induziram 7 e 6 vezes mais atividades em relação ao controle. O açúcar melibiose induziu menores atividades enzimáticas até 36 h, comparável ao controle.

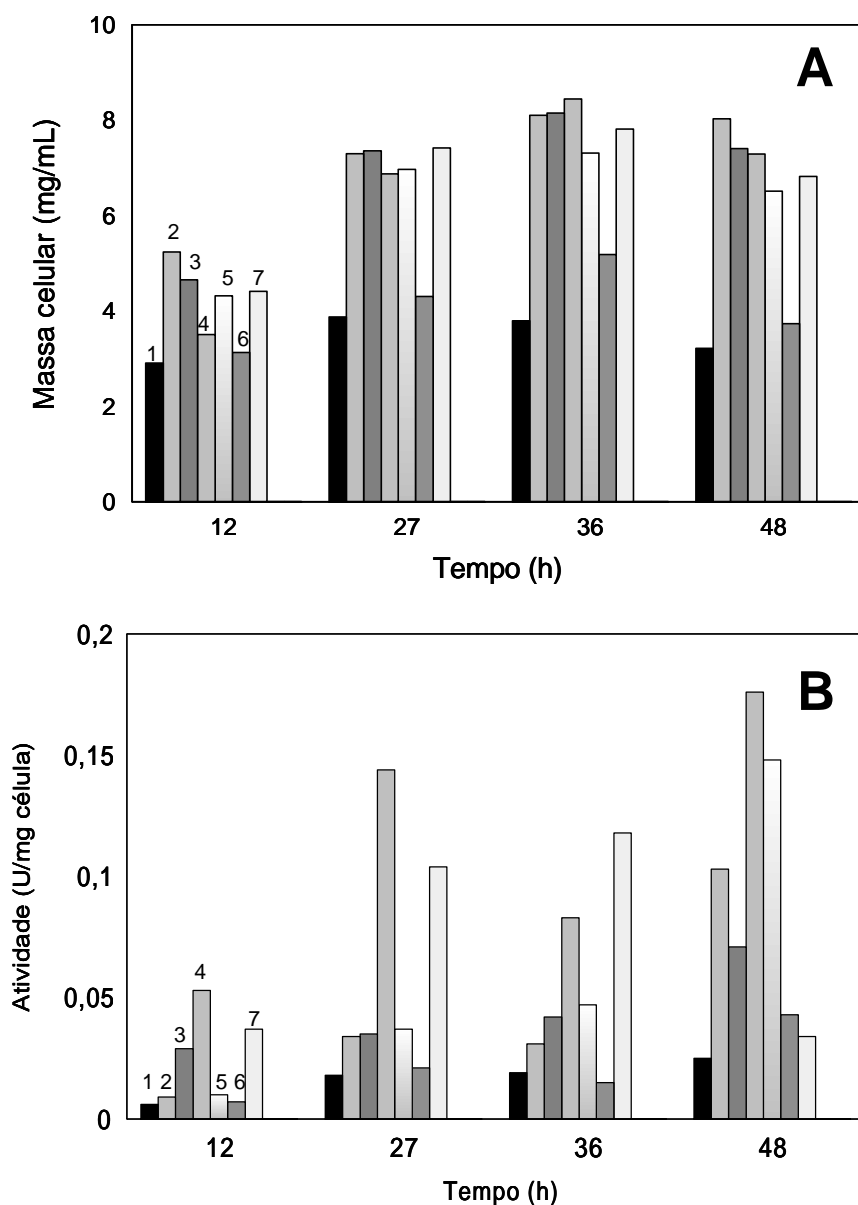


Figura 14 - Massa celular **(A)** e atividade da α -galactosidase extracelular **(B)** da cultura de *Debaryomyces hansenii* em meio YP, sem açúcar (1), com glicose (2), com sacarose (3), com lactose (4), com galactose (5), com melibiose (6) e com rafinose (7).

Segundo Oda; Tonomura (1995), a levedura *Torulasporea delbrueckii* IFO 1255 cultivada em meio YP com melibiose ou galactose (2 %), sintetizou a enzima α -galactosidase extracelular, atingindo atividade máxima após 16 h, na presença de melibiose (0,394 U/mL) e galactose (0,254 U/mL). No caso de *D. hansenii*, resultado semelhante ao descrito acima foi obtido quando a levedura foi cultivada por 27 h, na presença de 1 % de galactose (0,260 U/mL).

Contrariamente, melibiose (1 %) induziu menor atividade enzimática (0,089 U/mL) (Apêndice B). Yoshida *et al.* (1997) mostraram que várias espécies de leveduras dentre elas, *Debaryomyces castelli* IFO 1359 e *Debaryomyces nepalensis* IFO 1429 produziram α -galactosidases extracelulares quando cultivadas em meio YP contendo galactose (1 %). A linhagem IFO 1359 apresentou maior atividade enzimática (1,60 U/mL) comparada à linhagem IFO 1429 (0,602 U/mL). A atividade da α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 foi de 0,968 U/mL (Apêndice B), atividade intermediária, comparada às espécies de *Debaryomyces* descritas acima. Turakainen *et al.* (1994) clonaram e seqüenciaram um gene MEL que codifica a α -galactosidase, em *Zygosaccharomyces cidri*, cuja expressão também foi induzida por galactose. O presente resultado confirma que a galactose pode ser utilizada como fonte para a indução da síntese de α -galactosidases extracelulares em leveduras.

No meio de cultura contendo sais minerais e extrato de levedura (MME), foi observado também crescimento de *D. hansenii* em todos os açúcares testados até 27 h, diminuindo em seguida, até 48 h (Figura 15A). A massa celular máxima foi encontrada no tempo de 27 h, na presença de lactose (6,11 mg/mL), seguido de rafinose (5,50 mg/mL). *D. hansenii* cresceu em lactose, induzindo atividade de α -galactosidase, embora esse açúcar não seja um α -galactosídeo (Figuras 14, 15 e 16). Tal fato não é considerado surpresa, visto que trabalhos realizados por Rhom; Lechner; Bräuer (1992); Jakobsen; Narvhus (1996); Fleet (1999); Gadaga; Mutukumira; Narvhus (2000) constataram a presença dos gêneros *Candida*, *Pichia* e *Debaryomyces* em ambientes relacionados a laticínios, que cresciam em lactose como fonte de carbono. Em relação à atividade de α -galactosidase extracelular (Figura 15B), o açúcar lactose induziu maior atividade enzimática em todos os tempos testados, sendo que em 48 h, a atividade foi 7 vezes maior comparada ao controle e à glicose. No tempo de 36 h, os açúcares que mais induziram a atividade da α -galactosidase extracelular, comparados ao controle foram lactose (4,0 vezes), melibiose (2,6 vezes), rafinose (2,4 vezes) e galactose (2,0 vezes). O açúcar glicose não induziu atividade da enzima nos tempos testados.

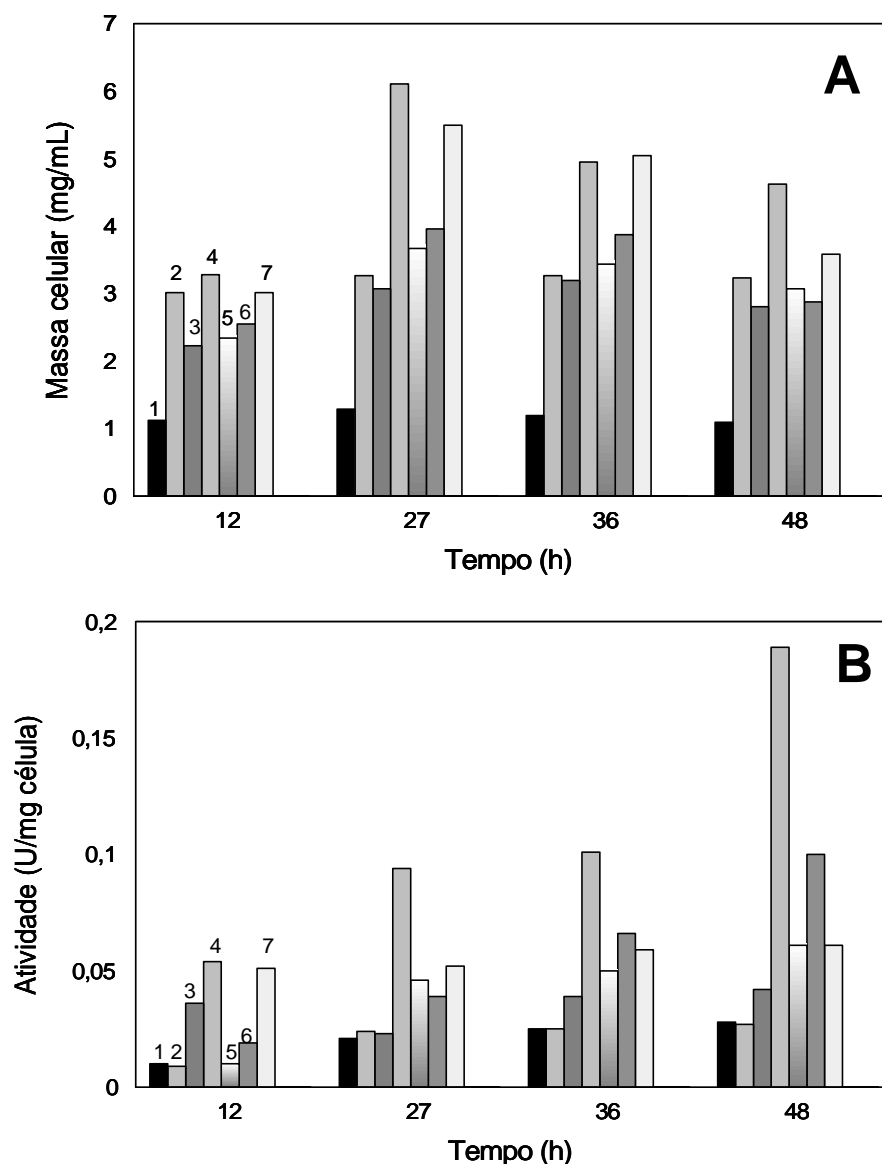


Figura 15 - Massa celular **(A)** e atividade da α -galactosidase extracelular **(B)** da cultura de *Debaryomyces hansenii* em meio MME, sem açúcar (1), com glicose (2), com sacarose (3), com lactose (4), com galactose (5), com melibiose (6) e com rafinose (7).

Lazo; Ochoa; Gascón (1976) em estudos realizados com as leveduras *Saccharomyces carlsbergensis* IFO 1317 e IFO 1323 quantificaram α -galactosidases extracelulares, tendo como indutor o açúcar galactose. A linhagem IFO 1323 cultivada em meio contendo extrato de levedura e galactose (1 %), produziu α -galactosidase com atividade de 1,6 U/mg proteína após 72 h, enquanto que a linhagem IFO 1317 produziu 6,0 U/mg de proteína na presença de teores maiores de galactose. Valores maiores de atividades

foram determinados para a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii*, 8,30 U/mg de proteína após 36 h e 6,47 U/mg de proteína após 48 h (Apêndice B). Segundo Flórez *et al.* (1981), a síntese de enzimas hidrolíticas de células de leveduras pode se encontrar sob vários tipos de mecanismos de controle, incluindo repressão e indução. Segundo os autores, a α -galactosidase era conhecida há longo tempo, como uma enzima sintetizada somente quando a melibiose estivesse presente no meio de cultura. Entretanto, os autores relataram que além de melibiose, a galactose livre ou presente em α -galactosídeos também induzem a síntese desta enzima.

No meio de cultura contendo apenas sais minerais (MM), as maiores massas celulares foram encontradas em 27 h de cultivo, na presença de melibiose (4,3 vezes), rafinose (3,1 vezes) e lactose (2,2 vezes), comparadas ao açúcar glicose (Figura 16A). Massa celular e atividade de α -galactosidase extracelular não foram detectadas no meio de cultura isento de açúcar (controle). Quanto à atividade da α -galactosidase extracelular, com 12 h de cultivo foram observadas maiores atividades, principalmente, na presença dos açúcares lactose e melibiose, 5,4 e 4,6 vezes, respectivamente, comparados ao açúcar glicose. Maior atividade enzimática foi detectada no tempo de 48 h, na presença de lactose (0,566 U/mg célula), seguido de rafinose (0,240 U/mg célula), de acordo com a Figura 16B.

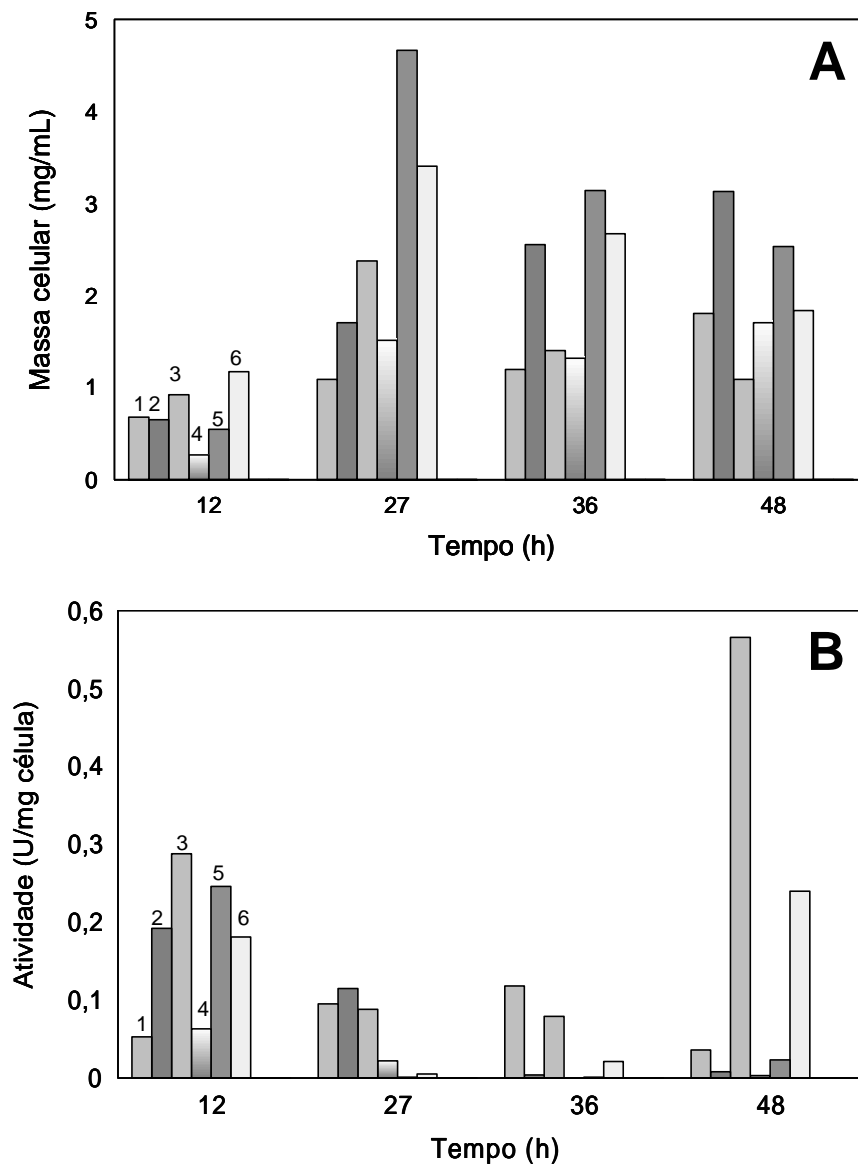


Figura 16 - Massa celular **(A)** e atividade da α -galactosidase extracelular **(B)** da cultura de *Debaryomyces hansenii* em meio MM, com glicose (1), com sacarose (2), com lactose (3), com galactose (4), com melibiose (5) e com rafinose (6).

No meio de cultura contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e sem aminoácidos (YNB), *D. hansenii* cresceu na presença de todos os açúcares testados, atingindo crescimento máximo na presença de sacarose, 2,5 vezes maior comparado a rafinose, no tempo de 27 h (Figura 17). Massa celular e atividade de α -galactosidase extracelular não foram detectadas no meio de cultura isento de açúcar (controle). Embora a levedura tenha crescido

na presença dos açúcares testados, esses não induziram a atividade da α -galactosidase extracelular.

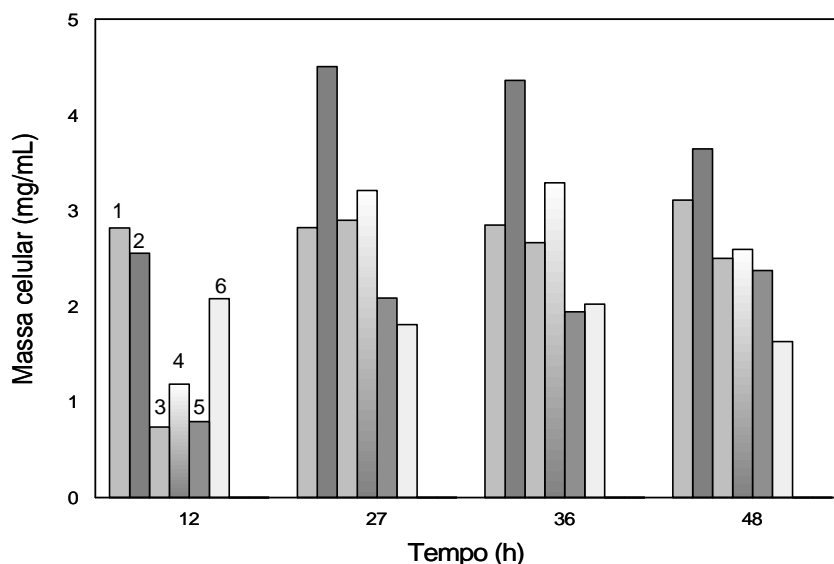


Figura 17 - Massa celular da cultura de *Debaryomyces hansenii* em meio YNB, com glicose (1), com sacarose (2), com lactose (3), com galactose (4), com melibiose (5) e com rafinose (6).

Segundo Nobre; Lucas; Leão (1999), a levedura *D. hansenii* foi capaz de utilizar hexoses e pentoses como fontes de carbono, sendo que, na presença de hexoses (glicose e galactose) foram obtidos maiores valores de crescimento. Em nossos estudos, *D. hansenii* foi capaz de crescer em diferentes meios de cultura contendo hexoses, dissacarídeos e trissacarídeos. Quando cultivada no meio YP foram obtidas maiores massas celulares (Figura 14A), provavelmente devido a sua composição, uma vez que é o meio mais rico em nutrientes, comparado aos demais meios utilizados. Os meios YP e MME apresentaram maiores massas celulares e atividades de α -galactosidase extracelulares, comparados aos meios MM e YNB, possivelmente por conter em suas formulações, extrato de levedura (Figuras 14 e 15).

O açúcar lactose foi o que induziu maior atividade da α -galactosidase extracelular nos diferentes meios, enquanto, glicose foi um dos açúcares que induziu menor atividade enzimática. Rafinose, melibiose e galactose também induziram a atividade da α -galactosidase extracelular.

4.1.2. Atividade de α -galactosidase intracelular de *Debaryomyces hansenii*

As atividades da α -galactosidase intracelular determinadas por meio da permeabilização das células de *D. hansenii* com etanol 50 %, conforme descrito no item 3.7 e cultivadas nos meios YP, MME e MM, estão apresentadas nas Figuras 18, 19 e 20, respectivamente.

No meio YP houve indução da atividade da α -galactosidase intracelular em todos os açúcares testados (Figura 18). Maior atividade foi detectada em 48 h de cultivo, na presença de galactose, 2,8 vezes comparada ao controle, seguido de lactose ou rafinose. Resultado semelhante foi encontrado para a enzima extracelular de *D. hansenii*, entretanto, esses açúcares induziram em média, 5 vezes mais atividade de α -galactosidase intracelular comparada a extracelular.

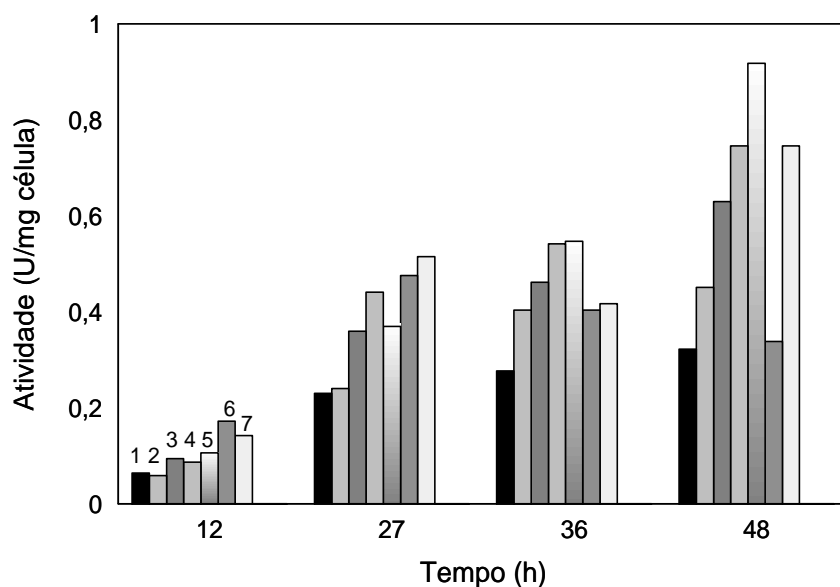


Figura 18 – Atividade da α -galactosidase intracelular da cultura de *Debaryomyces hansenii* em meio YP, sem açúcar (1), com glicose (2), com sacarose (3), com lactose (4), com galactose (5), com melibiose (6) e com rafinose (7).

No meio mineral com extrato de levedura (MME), a galactose foi o açúcar que induziu maior atividade da α -galactosidase intracelular (0,671 U/mg célula) nos tempos 12, 27 e 36 h. Com 27 h de cultivo, galactose induziu o triplo da atividade comparada ao controle e em 36 h, 2,2 vezes mais (Figura 19). A atividade máxima da enzima intracelular foi detectada na presença de lactose, no tempo 48 h, similar ao resultado obtido para a α -galactosidase extracelular. Porém o valor de atividade da enzima intracelular foi 4 vezes maior comparado ao da enzima extracelular. O açúcar melibiose foi o menor indutor da atividade da enzima intracelular até 36 h de crescimento (0,185 U/mg célula), comparável ao açúcar glicose (0,025 U/mg célula) no caso da enzima extracelular.

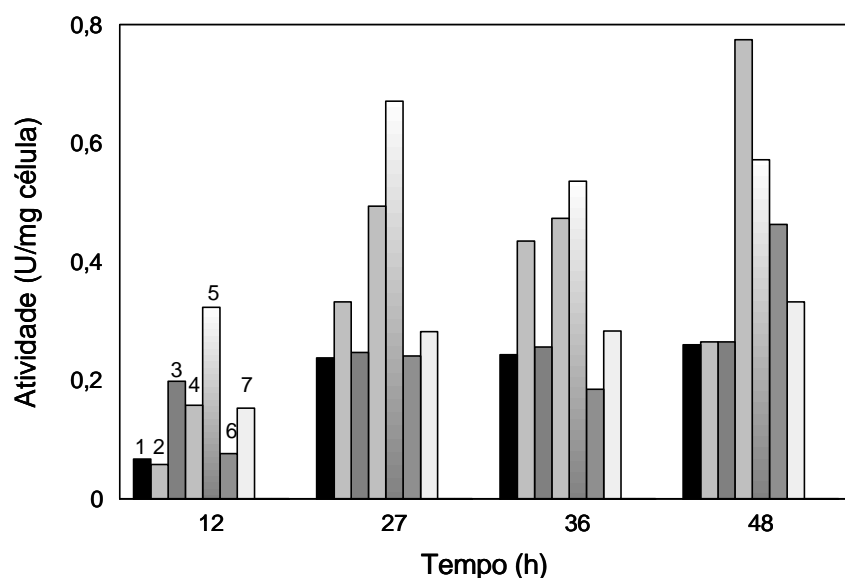


Figura 19 – Atividade da α -galactosidase intracelular da cultura de *Debaryomyces hansenii* em meio MME, sem açúcar (1), com glicose (2), com sacarose (3), com lactose (4), com galactose (5), com melibiose (6) e com rafinose (7).

No meio mineral MM maiores atividades da α -galactosidase intracelular foram detectadas nas células cultivadas na presença de lactose e rafinose, nos tempos 36 e 48 h (Figura 20). O meio contendo lactose promoveu aumento na atividade enzimática até 36 h, diminuindo em seguida até 48 h, enquanto que, o açúcar rafinose, induziu um aumento na atividade da enzima, atingindo o

máximo em 48 h (1,64 U/mg célula). No caso da α -galactosidase extracelular, a lactose foi o maior indutor da atividade enzimática no tempo 48 h (0,566 U/mg célula), seguido do açúcar rafinose (0,240 U/mg célula).

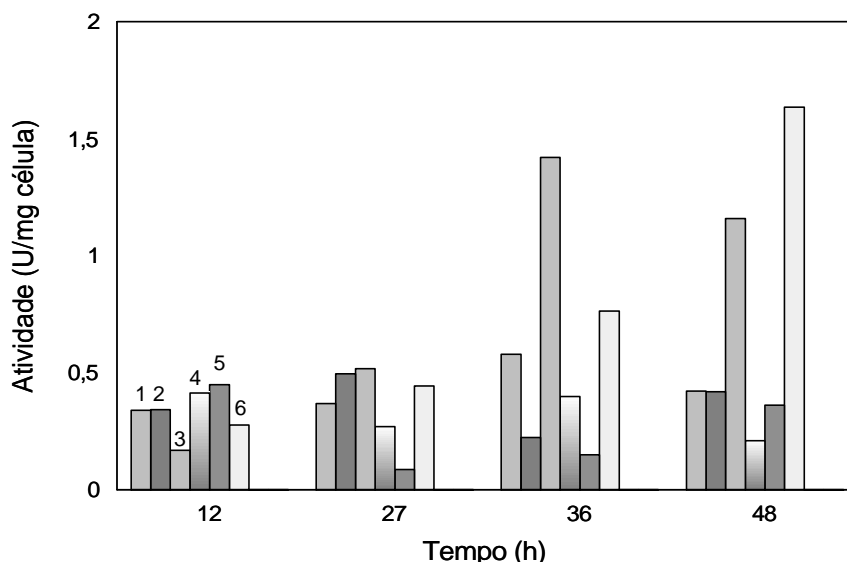


Figura 20 – Atividade da α -galactosidase intracelular da cultura de *Debaryomyces hansenii* em meio MM, com glicose (1), com sacarose (2), com lactose (3), com galactose (4), com melibiose (5) e com rafinose (6).

Visando a produção e purificação das α -galactosidases extra e intracelulares de *D. hansenii*, com base nos resultados obtidos, foram selecionados para o crescimento da levedura e conseqüente produção das enzimas α -galactosidases, o meio mineral com extrato de levedura (MME) e galactose como fonte de carbono. Embora o meio YP tenha promovido maiores massas celulares e atividades das enzimas, é o meio mais rico em proteínas, o que poderia dificultar o processo de purificação. Dessa forma, o meio MME foi selecionado, por ser um meio intermediário comparado aos demais testados e ter favorecido a síntese das α -galactosidases.

A galactose induziu a síntese das α -galactosidases de *D. hansenii*, tendo sido utilizada para a indução dessas enzimas em outras leveduras, observado em dados da literatura (LAZO; OCHOA; GASCÓN, 1976; FLÓREZ *et al.*, 1981; ODA; TONOMURA, 1995; YOSHIDA *et al.*, 1997; NOBRE; LUCAS; LEÃO,

1999). Embora os açúcares lactose e rafinose tenham sido os maiores indutores da atividade das α -galactosidases, a lactose não foi utilizada pelo fato de induzir a enzima β -galactosidase intracelular, o que poderia dificultar o processo de purificação. O açúcar rafinose não foi utilizado devido ao seu alto custo, podendo encarecer o experimento.

Após seleção do meio de cultura e da fonte de carbono, foram medidas as atividades das enzimas nos diferentes tempos testados, observando-se atividade considerável, de 8,30 U/mg de proteína para a α -galactosidase extracelular, no tempo 36 h (Apêndice B).

Com base nos resultados, para os experimentos seguintes, *D. hansenii* foi cultivada em meio mineral com extrato de levedura (MME), contendo galactose (1 %) como fonte de carbono, incubada sob agitação constante, por 36 h, a 30 °C. Nessas condições, foi observada maior atividade da enzima α -galactosidase intracelular, de 0,536 U/mg célula (Apêndice C).

PARTE 2

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA α -GALACTOSIDASE EXTRACELULAR DE *Debaryomyces hansenii*

4.2.1. Purificação da α -galactosidase extracelular produzida pela levedura *Debaryomyces hansenii*

Após o crescimento da cultura de *D. hansenii* em meio mineral com extrato de levedura (MME), como descrito no item 3.8, o meio foi centrifugado e o sobrenadante contendo as enzimas secretadas pela levedura, foi liofilizado (item 3.8.1) e submetido ao processo representado na Figura 11, para purificação da α -galactosidase extracelular. Durante as etapas de purificação a atividade de α -galactosidase foi determinada utilizando o substrato p-NP- α Gal, como descrito no item 3.9.1 e o teor protéico determinado pelo método de Bradford, conforme descrição no item 3.12. Um esquema das etapas de purificação da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo das etapas de purificação da α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*.

Etapas de purificação	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato bruto liofilizado	7,45	88,3	11,85	1	100
Filtração em gel (Sephadex G-150)	0,57	58,5	103	8,69	66,2
Troca-iônica (DEAE-Sepharose)	0,26	51,6	198	16,7	58,4

1 U: 1 μ mol de p-NP formado por minuto

Na primeira etapa de purificação da α -galactosidase extracelular, o extrato bruto liofilizado foi ressuspendido em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,5 e submetido à cromatografia de filtração em gel, em coluna de Sephadex G-150 (item 3.8.1.1). Foi observado um aumento de 8,69 vezes na atividade específica da enzima e um rendimento de 66,2 % (Tabela 1).

O perfil da cromatografia de filtração em gel está representado na Figura 21, que revelou a presença de apenas um pico protéico com atividade de α -galactosidase, eluído inicialmente. A maior parte das proteínas foi eluída em um terceiro pico, que não apresentou atividade de α -galactosidase. A utilização da cromatografia de filtração em gel foi relatada por alguns autores em protocolos de purificação de α -galactosidasas de várias fontes (LAZO; OCHOA; GASCÓN, 1976; ADEMARK *et al.*, 2001).

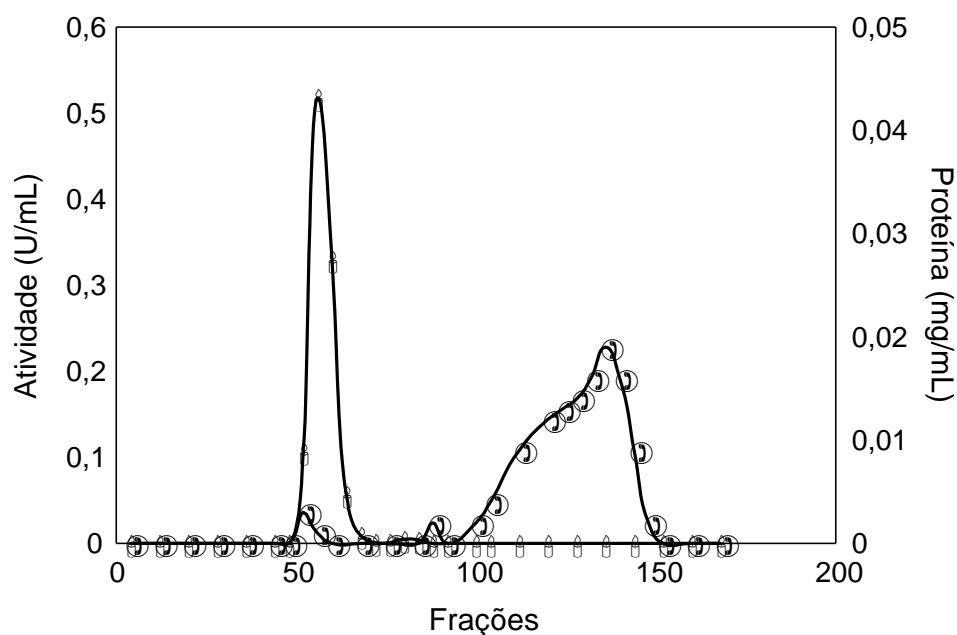


Figura 21 - Perfil cromatográfico da filtração em gel, em coluna de Sephadex G-150, do extrato enzimático contendo a α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*. Atividade de α -galactosidase (Δ); proteínas (\circ).

As frações contendo a atividade enzimática foram reunidas e posteriormente submetidas à cromatografia de troca-iônica, em coluna de DEAE-Sepharose. O perfil da cromatografia de troca-iônica está representado na Figura 22.

O perfil da eluição da cromatografia de troca-iônica também revelou a presença de apenas um pico protéico com atividade de α -galactosidase, que foi eluído com aproximadamente 0,5 M de NaCl. Resultado semelhante foi obtido

por Puchart *et al.* (2000), purificando a α -galactosidase do fungo *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749. A utilização da cromatografia de troca-iônica foi relatada por vários autores em protocolos de purificação parcial ou total de α -galactosidasas de diversas fontes (LUONTERI *et al.*, 1998; KOTWAL *et al.*, 1999, PUCHART *et al.*, 2000; ADEMARK *et al.*, 2001, SRIPUAN *et al.*, 2003).

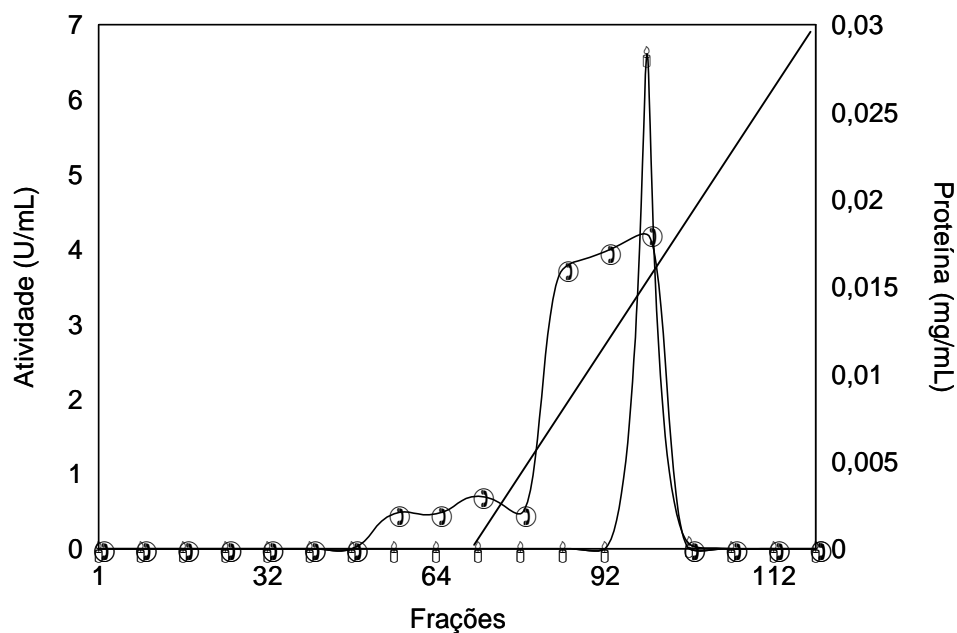


Figura 22 - Perfil cromatográfico da fração enzimática contendo a α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* proveniente da cromatografia de filtração em gel, em cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-Sepharose. Atividade de α -galactosidase (\odot); proteína (\square); gradiente de NaCl de 0 a 1 M (—).

Ao final do processo, a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* apresentou um fator de purificação de 16,7 vezes, com um rendimento de 58,4 % (Tabela 1). Lazo, Ochoa; Gascón (1976), purificando a α -galactosidase extracelular de *Saccharomyces carlsbergensis*, obtiveram um fator de purificação de 20,7 vezes, com um rendimento de 29,6 %. Maior fator de purificação foi obtido por Oda; Tonomura (1995), que no processo de purificação da α -galactosidase extracelular de *Torulaspora delbrueckii*,

encontraram um valor de 496 vezes, com um rendimento de 46,5 %. Também Ishiguro *et al.* (2001), após cromatografia de Sepharose FF da α -galactosidase recombinante de *Thermus* sp. linhagem T2 expressa em *E. coli*, obtiveram um rendimento de 53,2 %.

Para confirmação das etapas de purificação da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii*, as frações que apresentaram atividade enzimática, eluídas das colunas de Sephadex G-150 e DEAE-Sepharose, foram submetidas à eletroforese, em gel de poliacrilamida 12,5 %, sob condições desnaturantes. O perfil de migração das proteínas presentes nessas amostras está apresentado na Figura 23.

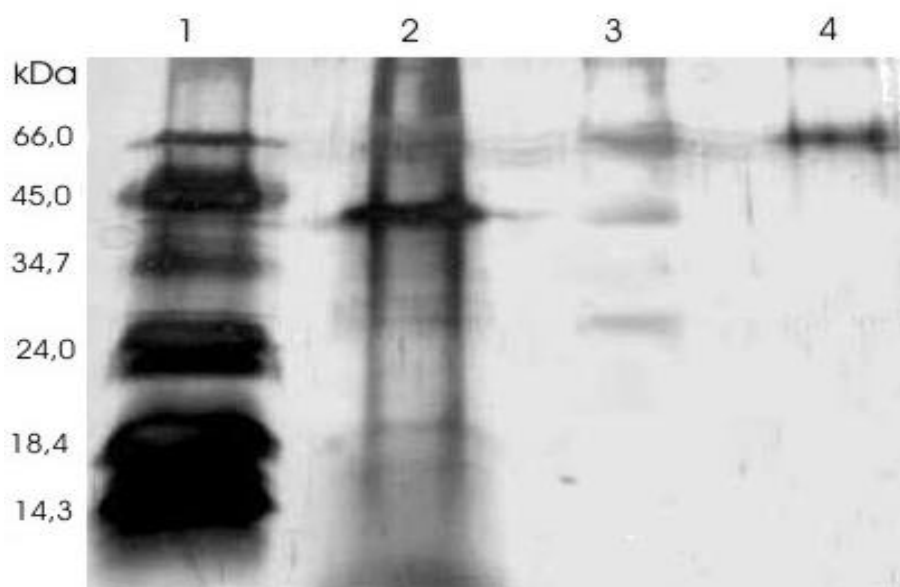


Figura 23 – Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12,5 %) corado com prata de amostras de α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*. 1- marcadores de massa molecular; 2- sobrenadante da cultura de *D. hansenii*; 3- fração enzimática proveniente da cromatografia de filtração em gel; 4- fração enzimática proveniente da cromatografia de troca-iônica.

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida indicou a presença de várias espécies protéicas no sobrenadante da cultura de *D. hansenii* (Figura 23 -linha 2). Menor número de bandas protéicas foi visualizado na fração enzimática proveniente da cromatografia de filtração em gel (Figura 23- linha 3)

e a presença de apenas uma banda protéica foi observada na fração enzimática proveniente da cromatografia de troca-iônica (Figura 23 - linha 4), confirmando o alto grau de pureza da enzima.

4.2.2. Determinação da massa molecular

A massa molecular da enzima α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii* 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 23). Para a distância de 1,3 cm percorrida pela enzima α -galactosidase foi calculado o valor da massa molecular de aproximadamente $(58,8 \pm 0,03)$ kDa (Figura 24).

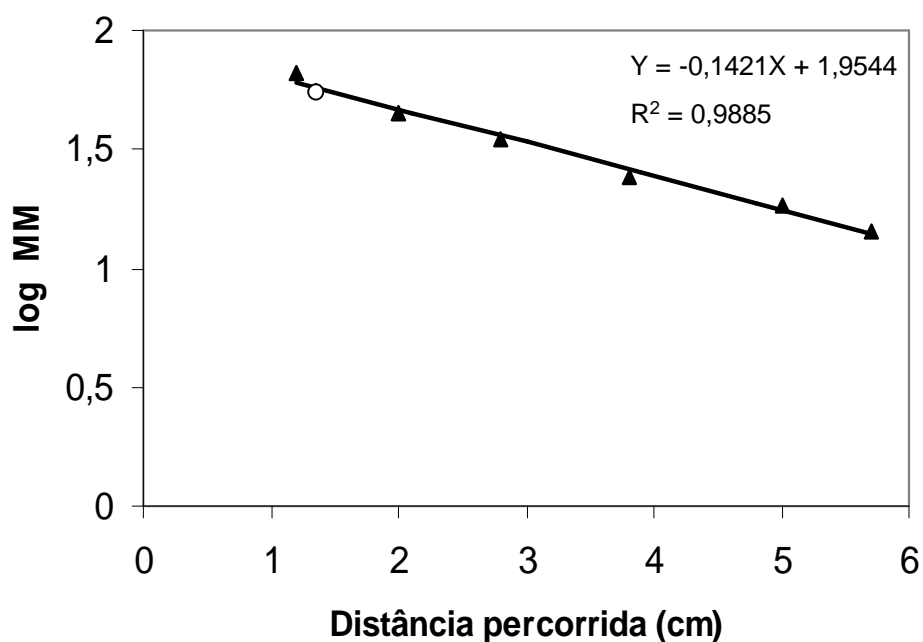


Figura 24 – Determinação da massa molecular da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*. Marcadores de massa molecular: Albumina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Pepsina (34,7 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), β -Lactoalbumina (18,4 kDa) e Lisozima (14,3 kDa). Distâncias percorridas pelos padrões protéicos (\blacktriangle) e pela α -galactosidase (\circ).

Em concordância com a massa molecular de 58,8 kDa determinada para a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii*, valores aproximados foram também encontrados para as α -galactosidases de *Aspergillus fumigatus*, 54,7 kDa (DE REZENDE, 1998), de *Zygosaccharomyces cidri*, 51,7 kDa (TURAKAINEN *et al.*, 1994), de *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749, 57 kDa (PUCHART *et al.*, 2000). Ishiguro *et al.* (2001) determinaram a massa molecular da α -galactosidase recombinante de *Thermus* sp. linhagem T2 expressa em *E. coli*, de 53,5 kDa e Sripuan *et al.* (2003) determinaram a massa molecular da α -galactosidase termoestável de *Ganoderma lucidum* de 56 kDa.

Entretanto, α -galactosidases de massas moleculares maiores foram purificadas por Ruohola *et al.* (1986), que determinaram a massa molecular de uma α -galactosidase de *Saccharomyces cerevisiae* de 76 kDa e por Oda; Tonomura (1995), que em estudos com α -galactosidase de *Torulasporea delbrueckii* IFO 1255 determinaram a massa molecular de 88 kDa.

4.2.3. Caracterização enzimática

4.2.3.1. Efeito do pH

A atividade da α -galactosidase extracelular purificada foi testada na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 8,0 na temperatura de 60 °C, utilizando o substrato sintético p-NP- α Gal (Figura 25). Atividades consideráveis (acima de 67 %) foram determinadas na faixa de pH entre 3,6 e 5,6, entretanto, a atividade máxima foi encontrada em pH 5,0. Atividades menores (abaixo de 20 %) foram observadas em pH 3,0 e 6,6. Em valores de pH compreendidos entre 7,0 e 8,0 a atividade da α -galactosidase foi nula.

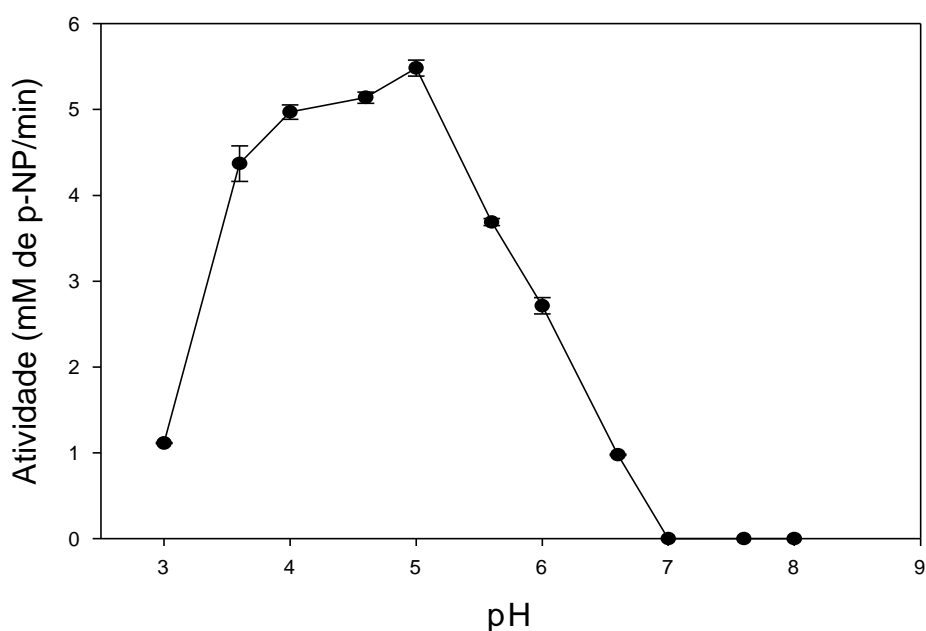


Figura 25 - Efeito do pH na atividade da enzima α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* na temperatura de 60 °C.

A faixa de pH ótimo determinada para α -galactosidase extracelular purificada de *Torulasporea delbrueckii* IFO 1255 foi entre 4,5 e 5,5 (ODA; TONOMURA, 1995). De Rezende (1998), trabalhando com α -galactosidase purificada de *Aspergillus fumigatus* encontrou intervalo de pH ótimo entre 4,0 e 4,5. Resultado semelhante ao descrito nesse trabalho foi observado por Callegari (2003), no estudo de α -galactosidase semipurificada de sementes germinadas de soja da variedade Monarca.

Puchart *et al.* (2000), estudando uma α -galactosidase purificada a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749, observaram maior atividade enzimática na faixa de pH entre 4,5 e 5,0. Ishiguro *et al.* (2001) observaram maior atividade da enzima α -galactosidase recombinante de *Thermus* sp. linhagem T2 expressa em *E.coli*, em pH 6,0, sendo este, o mesmo valor de pH encontrado para atividade máxima da α -galactosidase de *Ganoderma lucidum* (SRIPUAN *et al.*, 2003).

Para a α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM 5146, o pH ótimo da enzima manteve-se na faixa de 6,5 a 7,0 (GOTE *et al.*, 2004). Ulezlo; Zapromelova (1982) descreveram que geralmente, α -galactosidases de bactérias têm pH ótimos na faixa alcalina (6,0 - 7,5), enquanto que α -galactosidases de fungos e leveduras têm pH ótimos na faixa ácida (3,0 - 5,0).

4.2.3.2. Efeito da temperatura

A atividade da α -galactosidase extracelular purificada foi ensaiada na faixa de temperatura entre 25 e 80 °C em pH 5,0, utilizando o substrato sintético p-NP- α Gal (Figura 26). Maiores atividades (acima de 65 %) foram detectadas entre as temperaturas de 45 e 65 °C, entretanto, a temperatura ótima foi de 60 °C. Em temperaturas acima de 65 °C foi observado decréscimo acentuado na atividade enzimática e, esta foi nula nas temperaturas 75 e 80 °C.

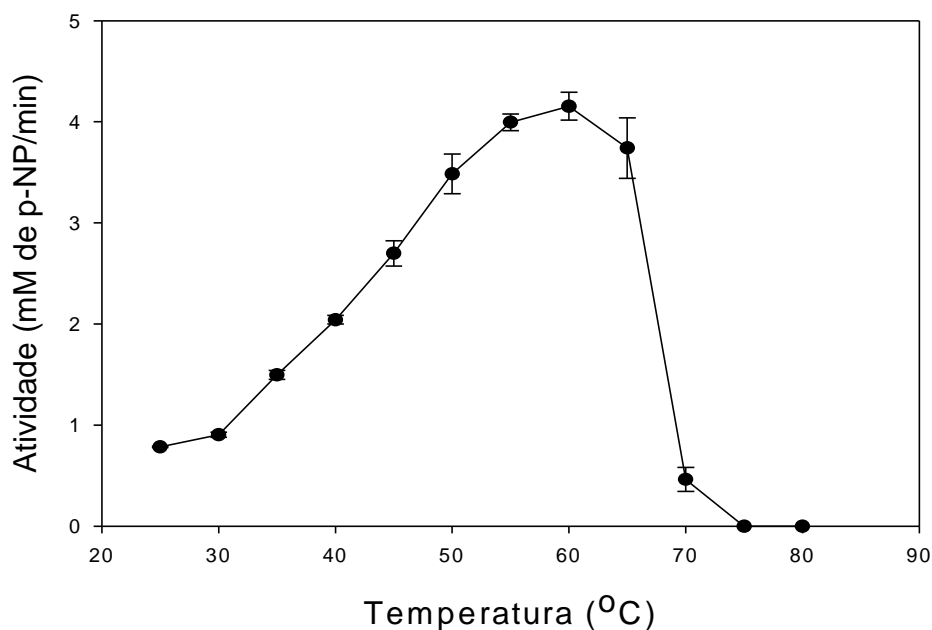


Figura 26 - Efeito da temperatura na atividade da enzima α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* em pH 5,0.

Resultado similar foi observado por Ademark *et al.* (2001) em estudo de 4 formas de α -galactosidase de *Aspergillus niger* ATCC 46890. A temperatura ótima encontrada para a enzima α -galactosidase purificada da levedura *Torulaspota delbrueckii* IFO 1255 (ODA; TONOMURA, 1995) foi 55 °C. De Rezende (1998), trabalhando com α -galactosidase purificada de *Aspergillus fumigatus* também encontrou temperatura ótima de 55 °C para atividade da α -galactosidase. Puchart *et al.* (2000), estudando α -galactosidase purificada a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749, observaram maior atividade enzimática na faixa de temperatura entre 65 e 70 °C e acima de 70 °C a enzima foi inativada por desnaturação protéica. De acordo com Ishiguro *et al.* (2001), em estudos com α -galactosidase de *Thermus* sp. linhagem T2 expressa em *E. coli*, a temperatura ótima da enzima foi de 75 °C, sendo também esta, a temperatura ótima da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (FRIDJONSSON *et al.*, 1999). As α -galactosidases de *Thermus brockianus* e *Thermomolga* apresentaram maior atividade nas temperaturas de 90 e 95 °C, respectivamente (DUFFAUD *et al.*, 1997; FRIDJONSSON *et al.*, 1999; KING *et al.*, 1998). A α -galactosidase de *Ganoderma lucidum* foi mais ativa entre 60 e 70 °C (SRIPUAN *et al.*, 2003).

Viana (2002) e Callegari (2003) encontraram temperaturas ótimas de 50 °C para atividades das α -galactosidases semipurificadas, de sementes germinadas de soja da variedade CAC-1 e de sementes germinadas de soja da variedade Monarca, respectivamente.

4.2.3.3. Análise da termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade, amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 40 a 70 °C, por vários tempos (Figura 27). A α -galactosidase purificada de *D. hansenii* manteve 95 % de sua atividade original quando pré-incubada a 40 °C por um período de 1440 min e perdeu 70 % de sua atividade após 2880 min de pré-incubação. Na temperatura de 50 °C a enzima manteve 90 % de sua atividade original por 360 min, conservando 33 % de sua atividade após 1080 min. A 55 °C, a enzima também manteve em torno de 90 % de sua atividade original por 360 min, no entanto, perdeu 80 % de sua

atividade após 1080 min. Na temperatura de 60 °C, a enzima manteve 91 % de sua atividade original por 150 min, perdendo 80 % de sua atividade após 540 min de pré-incubação. A enzima manteve 78 % de sua atividade original por 60 min quando pré-incubada a 65 °C e apenas 58 % de sua atividade original foi mantida quando pré-incubada por 15 min a 70 °C.

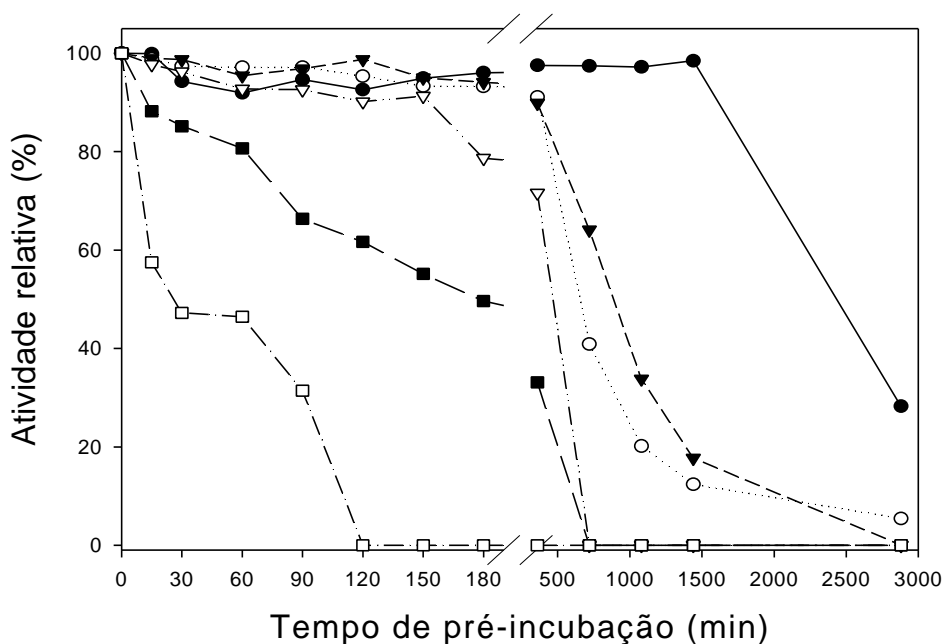


Figura 27 – Efeito da temperatura na estabilidade da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 40 °C (●); 50 °C (*); 55 °C (○); 60 °C (▽); 65 °C (+) e 70 °C (◻). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

De acordo com Puchart *et al.* (2000), a α -galactosidase do fungo *Thermomyces lanuginosus* permaneceu estável durante 360 min a 60 °C. Ishiguro *et al.* (2001), em estudo com α -galactosidase de *Thermus* sp. linhagem T2 expressa em *E.coli*, determinaram que a enzima foi estável à 60 °C, em pH 7,0 durante 60 min. Ademark *et al.* (2001), em estudo de 4 formas de α -galactosidase de *Aspergillus niger* ATCC 46890, observaram que as enzimas mantiveram 95 % da atividade original após 1260 min a 40 °C e 80 % a 50 °C. As enzimas perderam atividade após 1260 min a 60 °C. A α -

galactosidase de *Ganoderma lucidum* foi altamente estável a 70 °C e manteve 30 % da atividade original quando pré-incubada por 30 min a 80 °C (SRIPUAN *et al.*, 2003). A α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM 5146 manteve mais de 80 % da atividade após 120 min de pré-incubação a 65 °C, diminuindo a atividade rapidamente a 75 °C (GOTE *et al.*, 2004). Segundo Olafur *et al.* (1999), poucas α -galactosidases relatadas têm apresentado boa estabilidade térmica a 70 °C, como é o caso da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (meia-vida a 70 °C – 1140 min).

King *et al.* (1998) descreveram que, somente α -galactosidases de bactérias hipertermofílicas, como *Thermologa maritima* (meia-vida a 85 °C - 360 min) e *Thermologa neapolitana* (manteve 75 % da atividade após 240 min a 85 °C) têm demonstrado atividade e estabilidade prolongadas acima de 75 °C.

A atividade da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* também foi avaliada na temperatura de 4 °C, durante 3 meses. A enzima em solução manteve 94 % de sua atividade original (2,97 mM de p-NP/min) nos primeiros 30 dias, 84 % com 60 dias e 78 % com 90 dias de pré-incubação a 4 °C.

Comparados aos valores da literatura, especialmente com os dados de estabilidade térmica de α -galactosidases de leveduras, a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* exibiu termoestabilidade considerável, o que vem a ser um fator importante, principalmente para possíveis aplicações industriais da enzima.

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

O efeito do pH na estabilidade da α -galactosidase extracelular foi testado incubando-se a enzima nos valores de pH entre 3,0 e 8,0 por 30 min a 60 °C. Após o período de pré-incubação, a atividade da enzima foi determinada como descrito no item 3.9.1. A atividade e a estabilidade da α -galactosidase extracelular em diferentes valores de pH são mostrados na Figura 28.

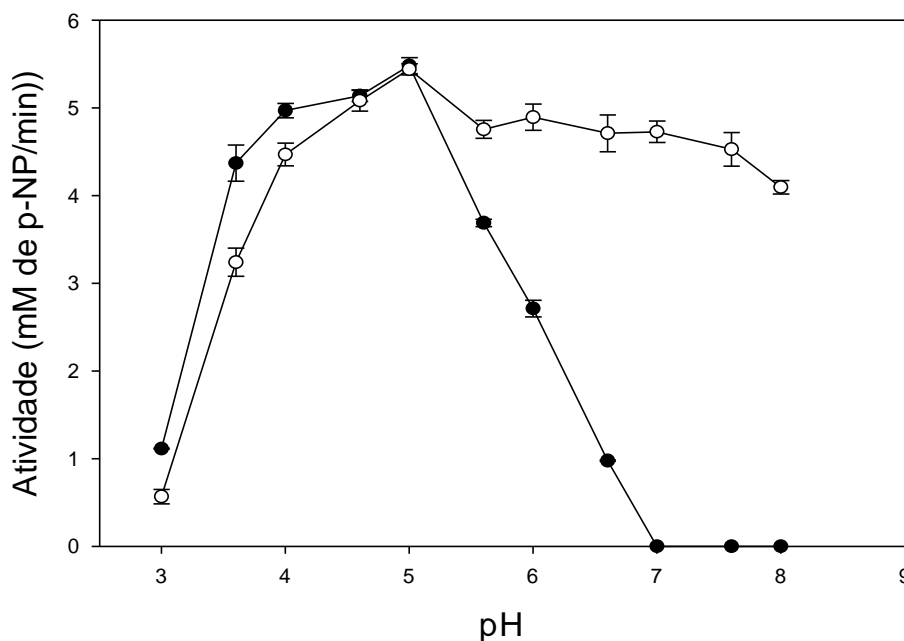


Figura 28 - Efeito do pH na atividade e estabilidade da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*. Curva de pH: gráfico de atividade versus pH (●). Curva de estabilidade: atividade em pH 5,0 por 30 min a 60 °C, após pré-incubação da enzima nos valores de pH indicados (○).

O valor de pH para atividade máxima da α -galactosidase foi 5,0, entretanto, a enzima manteve acima de 82 % de sua atividade quando pré-incubada na faixa de pH entre 4,0 e 7,6. A pré-incubação da enzima nos valores de pH 3,0 e 3,6 promoveram redução na atividade enzimática em cerca de 90 e 40 %, respectivamente. Também a pré-incubação da enzima em pH 8,0 levou a um decréscimo de 25 % na atividade enzimática.

Estudos com α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* realizados por Gote *et al.* (2004) demonstraram que a enzima apresentou pH ótimo entre 6,5 e 7,0 e permaneceu estável na faixa de pH entre 3,0 e 10,0. A enzima exibiu 70 % da atividade em pH 3,0 e 90 % em pH 10,0. A α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* exibiu 82 % da atividade em pH 4,0 e 70 % em pH 8,0.

De acordo com Segel (1979), os efeitos do pH na estabilidade de uma enzima devem ser levados em conta em qualquer estudo do efeito do pH na

ligação do substrato e na catálise. A curva de pH não dá indicações das razões pelas quais a velocidade declina acima e abaixo do pH ótimo e, o declínio poderia resultar da constituição de uma forma iônica não adequada do substrato ou da enzima (ou de ambos), ou da inativação da enzima, ou ainda da combinação destes efeitos. Segundo o autor, a estabilidade de uma enzima ao pH depende de vários fatores como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de íons metálicos e contaminantes, concentração de substratos ou cofatores da enzima ou da própria concentração da enzima. Em muitos casos, um substrato pode induzir uma mudança conformacional na enzima para uma forma que será mais ou menos resistente à desnaturação pelo pH ou temperatura. A própria concentração de enzima pode ser um dos fatores. Em baixas concentrações, a enzima pode se dissociar em oligômeros menores ou monômeros, que podem ser menos estáveis do que o oligômero original. Pode ocorrer também que uma enzima permaneça mais estável por um período de tempo mais longo em pH diferente do ótimo utilizado nas determinações (SEGEL, 1979).

O declínio na atividade da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii*, observado nas faixas de pH acima de 5,0 até 8,0 e abaixo de 5,0 até 3,6 poderia ser resultado da constituição de uma forma iônica não adequada da enzima.

4.2.3.5. Meia-vida da α -galactosidase extracelular

Para determinação dos valores de meia-vida da α -galactosidase extracelular purificada, os ensaios foram conduzidos por um tempo total de 2880 min, em diversas temperaturas. Na temperatura de 50 °C, a meia-vida da enzima foi de 821 min (Figura 29). A 55 °C, a meia-vida foi de 647 min (Figura 30); a 60 °C, de 373 min (Figura 31); a 65 °C, de 180 min (Figura 32) e, na temperatura de 70 °C, a meia-vida da enzima foi de 34,6 min (Figura 33).

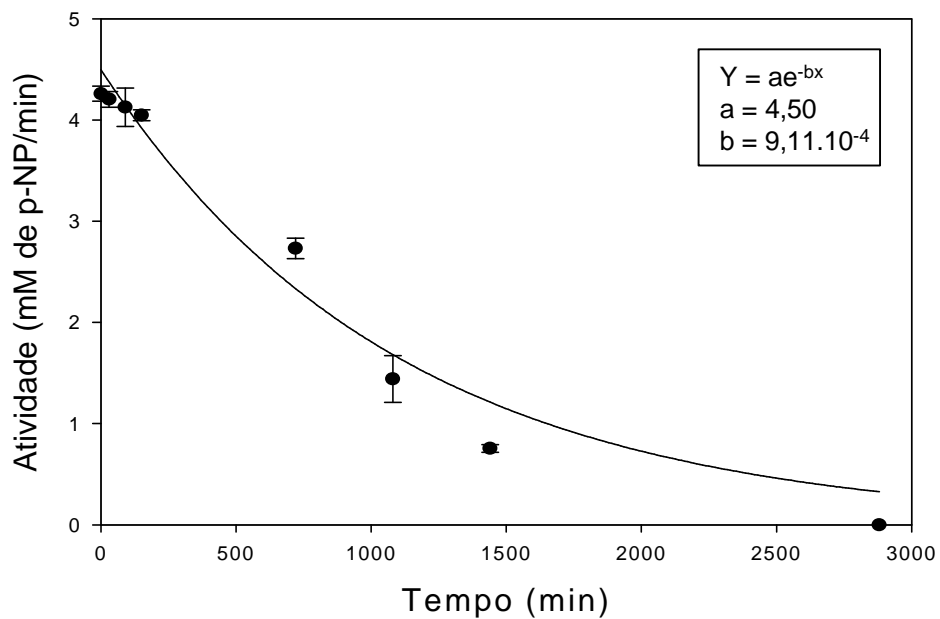


Figura 29 – Meia-vida a 50 °C da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*.

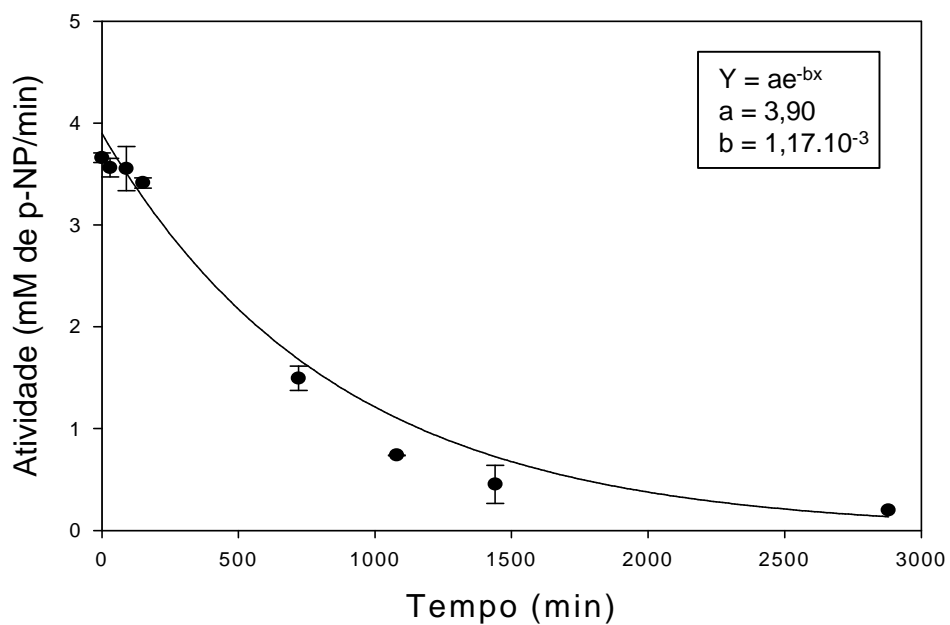


Figura 30 – Meia-vida a 55 °C da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*.

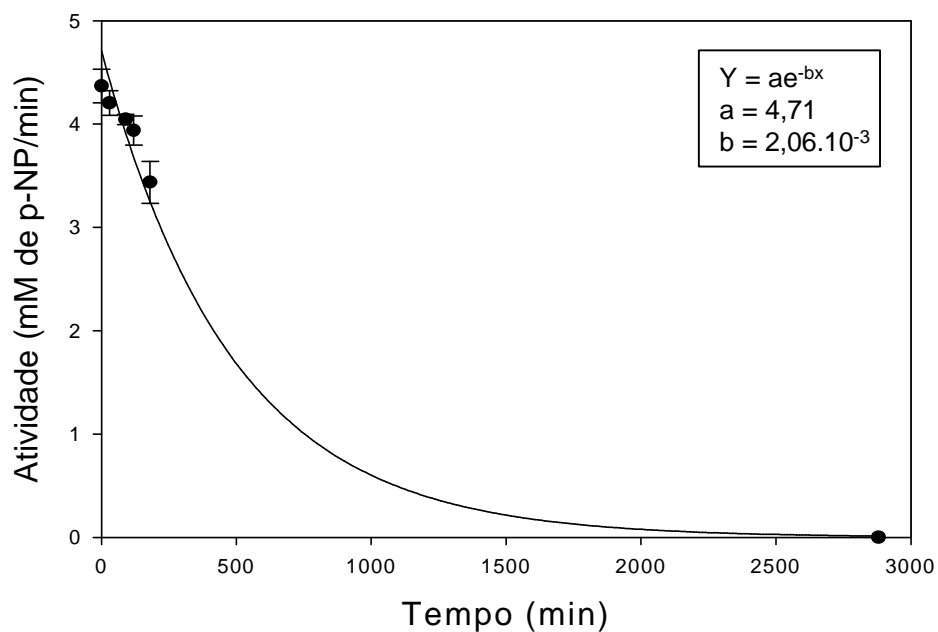


Figura 31 – Meia-vida a 60 °C da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*.

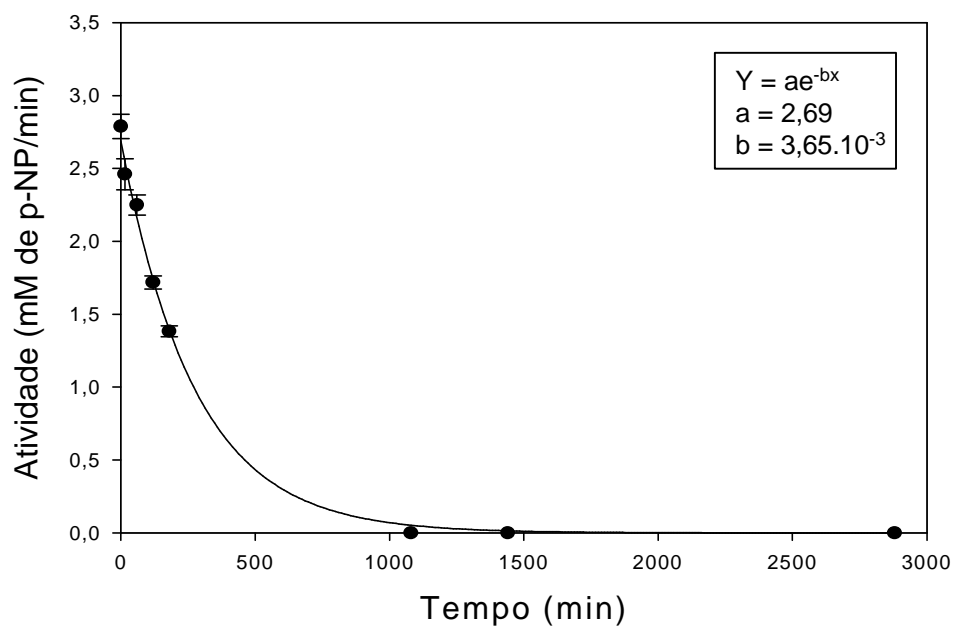


Figura 32 – Meia-vida a 65 °C da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*.

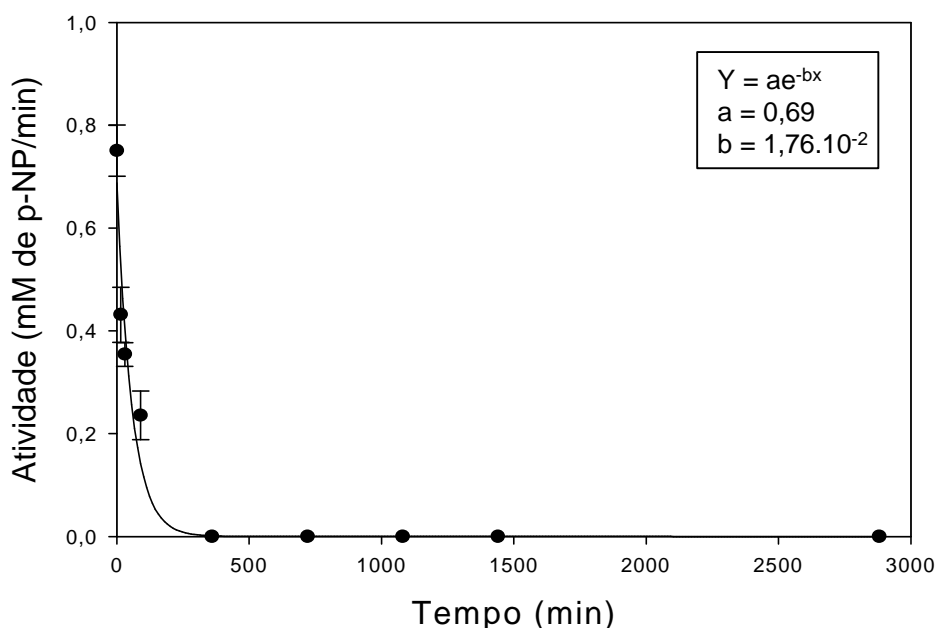


Figura 33 – Meia-vida a 70 °C da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*.

O valor da meia-vida a 50 °C da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* foi de 821 min, enquanto que, a meia-vida da α -galactosidase semipurificada de sementes de soja da variedade Monarca germinadas foi de 8,6 min (CALLEGARI, 2003). Guimarães *et al.* (2001) encontraram o tempo de meia-vida a 50 °C das α -galactosidases P1 e P2 de sementes de soja em germinação, de 16,0 e 11,2 min, respectivamente. Viana (2002) encontrou meia-vida de 30,3 min para α -galactosidase semipurificada de sementes germinadas de soja da variedade CAC-1.

Estudos com α -galactosidase do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* realizados por Puchart *et al.* (2000) mostraram que a meia-vida a 65 °C da enzima foi de 180 min, mesmo valor encontrado para a meia-vida da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii*.

Para a α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM 5146 a meia-vida da enzima a 70 °C foi de 78 min (GOTE *et al.*, 2004), enquanto que, a meia-vida da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* foi de 34,6 min.

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

O efeito da concentração dos substratos ρ -NP- α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase extracelular purificada da levedura *D. hansenii*, foi determinado pela curva de Michaelis-Menten.

Os valores da constante cinética K_M e da velocidade máxima V_{max} para cada substrato são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de K_M , V_{max} e V_{max}/K_M determinados pela curva de Michaelis-Menten com os substratos ρ -NP- α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose.

Substratos	K_M (mM)	V_{max} *	V_{max}/K_M
ρ -NP- α Gal	0,30	6,09	20,3
Melibiose	2,01	0,02	0,01
Estaquiose	9,66	8,18	0,85
Rafinose	16,0	5,99	0,37

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

De acordo com a Tabela 2, o menor valor da K_M encontrado foi para o substrato ρ -NP- α Gal (Figura 34). Em segundo lugar, para o substrato melibiose, como mostrado na Figura 35, seguido de estaquiose (Figura 36) e finalmente, para o substrato rafinose (Figura 37). De acordo com Segel (1979), como K_M mostra a adaptação do substrato no centro ativo da enzima, sugere-se que o substrato sintético ρ -NP- α Gal foi aquele que melhor se adaptou no centro ativo da enzima α -galactosidase, nas condições de ensaio.

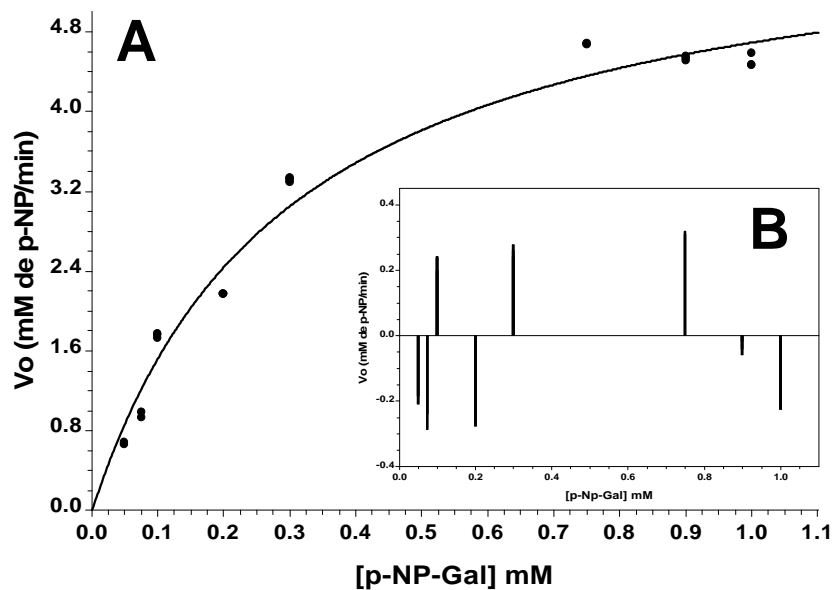


Figura 34 – (A): efeito da concentração do substrato p-NP- α Gal na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*; (B): gráfico de resíduos.

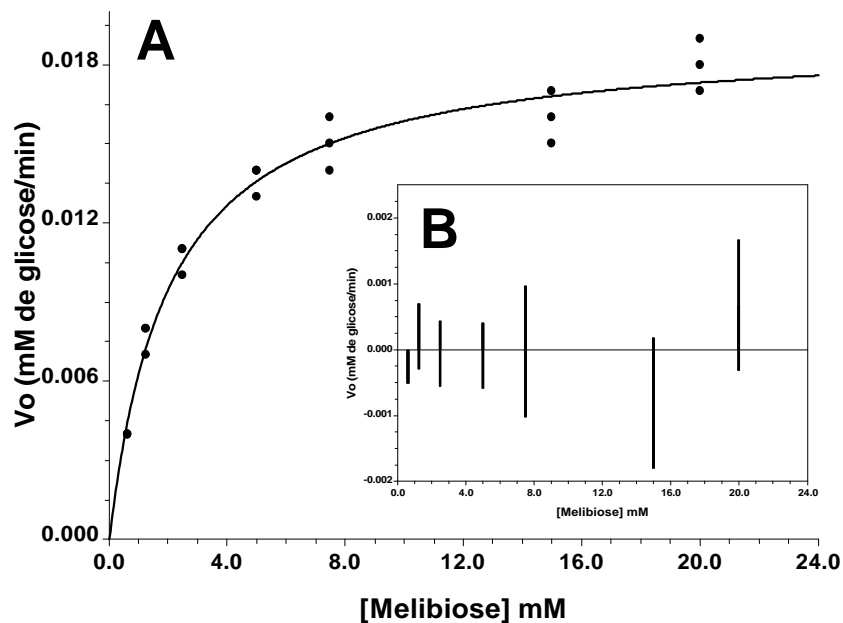


Figura 35 – (A): efeito da concentração do substrato melibiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*; (B): gráfico de resíduos.

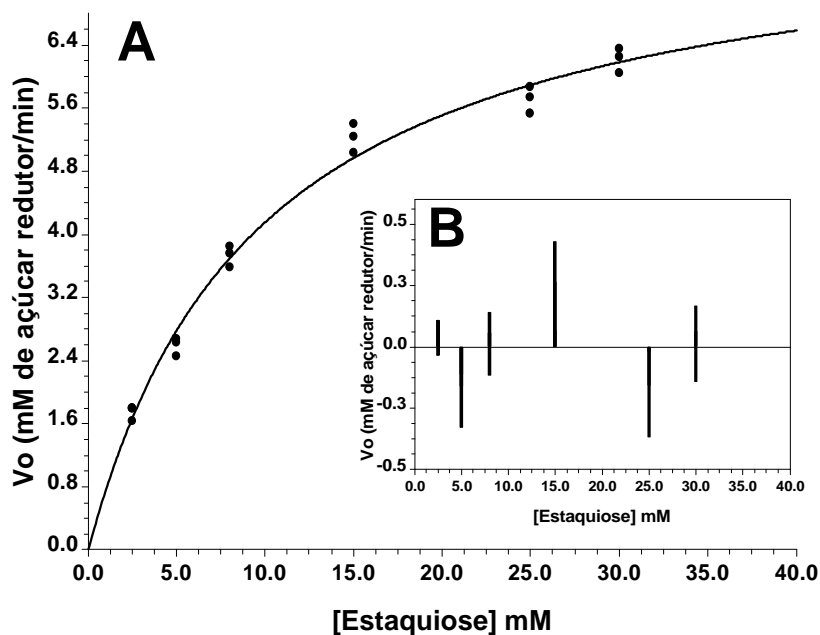


Figura 36 – (A): efeito da concentração do substrato estaquiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*; (B): gráfico de resíduos.

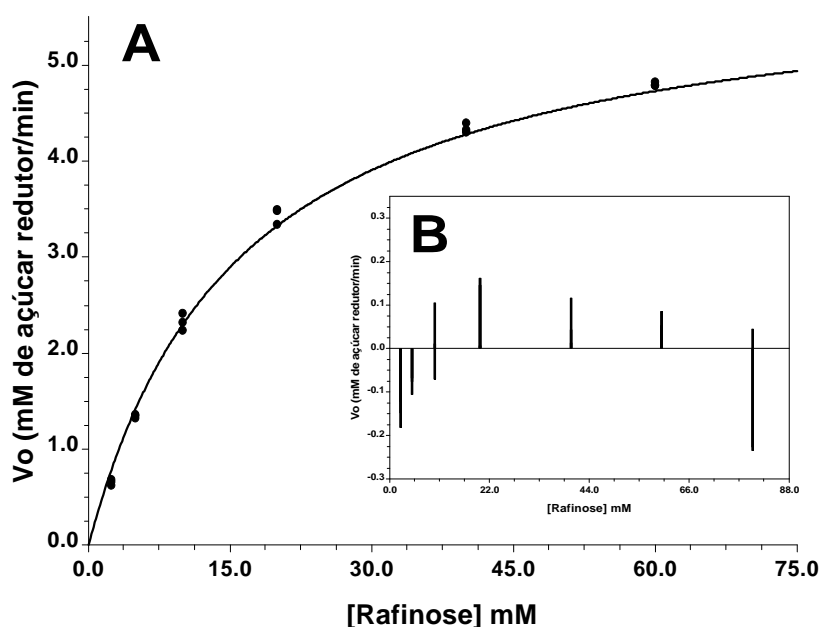


Figura 37 – (A): efeito da concentração do substrato rafinose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*; (B): gráfico de resíduos.

O valor da K_M da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* para o substrato p-NP- α Gal (0,30 mM) foi o mesmo obtido para a α -galactosidase purificada de *Aspergillus fumigatus* (DE REZENDE, 1998). Para a α -galactosidase de *Trichoderma reesei* RUT C-30 foi estimado o valor para K_M de 1,2 mM (ZEILINGER *et al.*, 1993). Ishiguro *et al.* (2001) encontraram valor de K_M de 4,7 mM para α -galactosidase recombinante de *Thermus* sp. próximo ao valor obtido para α -galactosidase de *Thermus brockianus*, 2,5 mM (FRIDJONSSON *et al.*, 1999). Sripuan *et al.* (2003), estudando α -galactosidase de *Ganoderma lucidum*, encontraram valor da K_M para p-NP- α Gal de 0,4 mM.

Os valores da K_M para a α -galactosidase do fungo *Thermomyces lanuginosus* observados por Puchart *et al.* (2000) para os substratos melibiose e rafinose, foram de 2,4 e 11,3 mM, respectivamente, próximos aos valores encontrados para a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii*.

Ademark *et al.* (2001) obtiveram o valor de K_M de 1,0 mM para o substrato melibiose para a forma α -gal I purificada a partir da cultura de *Aspergillus niger* ATCC 46890, cultivado em meio com goma de alfarroba e goma guar.

Guimarães *et al.* (2001), trabalhando com α -galactosidases purificadas de sementes germinadas de soja da variedade Doko, determinaram o valor de K_M de 5,34 mM para o substrato melibiose.

Oda; Tonomura (1995), em estudos com α -galactosidase de *Torulasporea delbrueckii* IFO 1255, obtiveram os valores de K_M para p-NP- α Gal, melibiose, rafinose e estaquiose de 2,8, 4,2, 170 e 230 mM, respectivamente. Segundo os autores, as propriedades da α -galactosidase desta levedura foram similares às das espécies de *Saccharomyces cerevisiae*.

De acordo com Varbanets *et al.* (2001), os valores da K_M para α -galactosidase de *Penicillium* sp. 23, estimados para p-NP- α Gal, melibiose, rafinose e estaquiose foram 1,0, 4,0, 5,7 e 3,5 mM, respectivamente. Dados da literatura sugerem que o valor da K_M para o mesmo substrato essencialmente varia com a origem da enzima (LAZO; OCHOA; GASCÓN, 1977). Segundo Adya; Elbein (1977); Lazo; Ochoa; Gascón (1977), os valores da K_M para rafinose, determinados utilizando α -galactosidases de diversos microrganismos

diferiram significativamente: *Aspergillus niger* (0,5 mM), *Pycnoporus cinnabarinus* (2,16 mM), *Streptomyces* (9,6 mM) e *Saccharomyces carlsbergensis* (135 mM).

4.2.3.7. Especificidade da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* com outros substratos

A enzima α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii* foi avaliada quanto à capacidade de hidrolisar outros substratos sintéticos como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* com substratos sintéticos.

Substrato	Concentração (mM)	Atividade (mM de p-NP/min) \pm DP
p-NP- α Gal	0,5	3,39 \pm 0,15
p-NP- β Gal	0,5	0,0
p-NP- α Glc	0,5	0,0
p-NP- β Xil	0,5	0,0
p-NP- α Man	0,5	0,0
p-NP- α Ara	0,5	0,0
o-NP- β Gal	0,5	0,0
o-NP- β Glc	0,5	0,0

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3 a enzima α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii* demonstrou ser altamente seletiva, apresentando especificidade absoluta para a galactose em posição α , uma vez que hidrolisou somente o substrato p-NP- α Gal, não hidrolisando os outros substratos sintéticos com resíduos de açúcar diferentes da galactose ou unidos por ligação β .

Resultados semelhantes foram obtidos por Guimarães *et al.* (2001), trabalhando com duas frações enzimáticas (P1 e P2) de α -galactosidases de sementes de soja, na qual a fração P2 hidrolisou apenas o substrato sintético p-NP- α Gal. Ishiguro *et al.* (2001), trabalhando com α -galactosidase

recombinante de *Thermus* sp. linhagem T2 expressa em *E.coli*, mostraram que a enzima foi específica para α -galactopiranosídeos. A α -galactosidase de *Penicillium* sp. 23 não hidrolisou derivados p-nitrofenil de β -D-galactose e de α e β -D-glicose e hidrolisou exclusivamente α -D-galactosídeos, indicando assim que, a configuração dos carbonos 1 e 4 dos substratos é de extrema importância para a interação com a enzima (VARBANETS *et al.*, 2001). A enzima α -galactosidase semipurificada de sementes de soja da variedade Monarca, estudada por Callegari (2003) demonstrou especificidade quase absoluta para a galactose em posição α , porém, apresentou uma atividade enzimática muito baixa (4,53 %) na presença do substrato p-NP- β Gal. Também em estudos realizados por Kang; Lee (2001), com α -galactosidase associada à polpa de uva, observou-se que a enzima hidrolisou com maior eficiência o substrato sintético p-NP- α Gal, que contém o resíduo de D-galactose unido por ligação α -1,4, em relação a outros substratos sintéticos. Esta enzima apresentou apenas 16 % de hidrólise do resíduo unido por ligação β -1,4 comparado com o controle, sugerindo que a α -galactosidase é α -anômero específica.

A α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii* também foi ensaiada com substratos naturais, cujas concentrações utilizadas nos ensaios foram próximas ao valor da K_M (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* com substratos naturais.

Substrato	Concentração (mM)	Atividade (mM de p-NP/min) \pm DP
Sacarose	10	0,0
Estaquiose	10	3,84 \pm 0,02
Rafinose	15	2,78 \pm 0,05
Melibiose	2	0,002
Gentiobiose	10	0,0
Maltose	10	0,0
Lactose	10	0,0

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 4 a enzima α -galactosidase foi ativa em ligações contendo galactose na posição α de oligossacarídeos como melibiose, rafinose e estaquiose. Apresentou maior atividade para estaquiose comparada com os demais substratos. Atividades de α -galactosidases em aril α -D-galactosídeos como melibiose, rafinose e estaquiose são exibidas por quase todas as α -galactosidases (PUCHART *et al.*, 2000). Estudos realizados pelo mesmo autor com α -galactosidase do fungo *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749, mostraram que a enzima foi eficiente na hidrólise de oligossacarídeos como melibiose, rafinose e estaquiose. Os açúcares melibiose e rafinose foram mais rapidamente hidrolisados que a estaquiose, açúcar que sofre uma dupla degalactosilação. Os autores sugeriram que o passo limitante da reação foi a liberação do primeiro resíduo galactosil ligado na estaquiose, sendo a rafinose resultante mais rapidamente degalactosilada à sacarose e, por esta razão, dificilmente foi observada entre os produtos.

A enzima α -galactosidase semipurificada de sementes de soja da variedade Monarca, estudada por Callegari (2003), também hidrolisou os açúcares rafinose, estaquiose e melibiose, porém, apresentou maior atividade para rafinose, seguida de estaquiose e melibiose. Resultados semelhantes foram descritos por Guimarães (2001), para α -galactosidase de sementes de soja, que também hidrolisou os açúcares rafinose, melibiose e estaquiose, apresentando maior atividade para rafinose, seguido de melibiose e estaquiose. A α -galactosidase recombinante de *Thermus* sp. hidrolisou os galacto-oligossacarídeos na seguinte ordem, estaquiose, melibiose e rafinose (ISHIGURO *et al.*, 2001). Sripuan *et al.* (2003), estudando α -galactosidase de *Ganoderma lucidum*, observaram que a enzima hidrolisou estaquiose (69,7 %), rafinose (52,4 %) e melibiose (42,1 %).

A enzima α -galactosidase extracelular purificada da levedura *D. hansenii* não hidrolisou os açúcares sacarose, lactose, gentiobiose e maltose, sugerindo que a enzima foi altamente específica para galactose em posição α . Muitas preparações de α -galactosidases obtidas por sínteses microbiológicas têm em comum o fato de que elas podem hidrolisar substratos sintéticos (p-NP-Gal)

mais extensivamente do que α -galactosídeos naturais (VARBANETS *et al.*, 2001).

A enzima α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii* também foi ensaiada com polímeros (Tabela 5).

Tabela 5 – Atividade da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* com polímeros.

Substrato	Concentração (%)	Atividade (mM de p-NP/min) \pm DP
Goma de alfarroba	1,0	0,64 \pm 0,01
Goma guar	1,0	0,56 \pm 0,01

De acordo com os dados da Tabela 5 a enzima α -galactosidase também apresentou atividade sobre os polímeros testados. Estudos realizados com α -galactosidase de arroz (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) por Kim *et al.* (2002) mostraram que a enzima hidrolisou 32 e 24 % de goma de alfarroba e goma guar, respectivamente. A α -galactosidase de arroz atuou em goma de alfarroba mais rapidamente do que em goma guar e, este mesmo efeito foi relatado para outras enzimas microbianas e de plantas (PUCHART *et al.*, 2000).

Penicillium simplicissimum produziu α -galactosidases com diferentes especificidades de substratos (LUONTERI *et al.*, 1998). A AGLI foi capaz de hidrolisar galacto(glico)mananas, enquanto que, a AGLII foi mais específica na hidrólise de pequenos oligossacarídeos.

Ademark *et al.* (2001), trabalhando com 4 formas da α -galactosidase de *Aspergillus niger*, observaram que as enzimas liberaram resíduos de galactosil em posição α -1,6 de melibiose, rafinose e estaquiose. A α -gal I também clivou resíduos galactosil ligados no terminal redutor de GalMan₃ mas, não de GalMan₅. A α -galactosidase AGLII do fungo *Trichoderma reesei* e α -gal I de *Aspergillus niger* foram mais específicas para oligossacarídeos como melibiose e rafinose e tiveram pouca ou nenhuma atividade com substratos poliméricos (MARGOLLES-CLARK *et al.*, 1996).

Yoshida *et al.* (1997), em estudos com α -galactosidases de leveduras, incubadas juntamente com os polímeros Gal₃Man₃ e Gal₄Man₄ nas concentrações de 1 % (p/v), a 40 °C, pH 4,5, observaram que a enzima extracelular de *Debaryomyces castellii* IFO 1359 hidrolisou completamente Gal₃Man₃ em galactose e β - 1,4-manotriose, após 4 h de incubação. Porém, a enzima não hidrolisou Gal₄Man₄ até 12 h de reação. As α -galactosidases das demais leveduras testadas, também hidrolisaram apenas o polímero Gal₃Man₃, após as 12 h de incubação.

4.2.3.8. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*

Para determinar o efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase extracelular, soluções com concentrações definidas desses compostos foram pré-incubadas com a enzima purificada por 20 min, a 60 °C, seguido da realização do ensaio para a atividade da enzima como descrito no item 3.11.9 (Figura 38). A concentração final dos efetores no ensaio foi 2 mM e a atividade relativa foi calculada considerando-se a atividade da enzima pré-incubada sem efetor como 100 %.

Íons monovalentes e divalentes, açúcares redutores e açúcares simples, promoveram efeitos diversos sobre a α -galactosidase. A enzima apresentou perda total de sua atividade na presença de prata e cobre, sendo parcialmente inibida por D-galactose e melibiose. Entretanto, a enzima quase não foi afetada por EDTA, cloreto de magnésio, iodoacetamida, cloreto de sódio, SDS, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, β -mercaptoetanol, rafinose, maltose, sacarose, D-glicose, lactose, gentiobiose, estaquiase e D-manose. Uma vez que a atividade enzimática praticamente não sofreu alteração por EDTA e iodoacetamida, pode-se sugerir que não houve dependência de íons metálicos para a atividade catalítica e, que não existiam grupos –SH (sulfidril) livres essenciais à catálise na molécula da enzima, respectivamente.

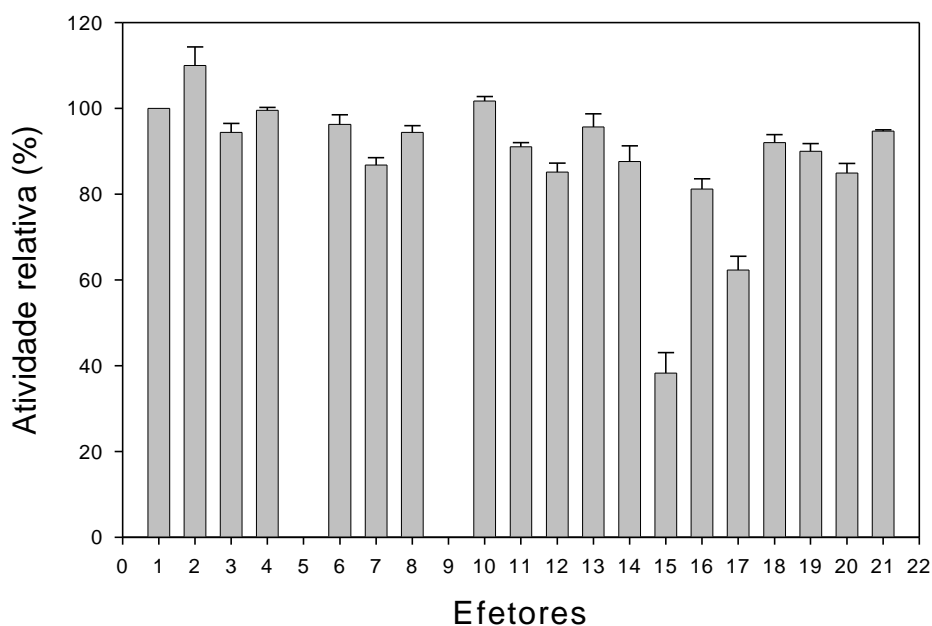


Figura 38 – Atividade relativa da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* submetida aos efeitos de íons, agentes redutores e açúcares: **1**- Controle; **2**- EDTA; **3**- Cloreto de Magnésio; **4**- Iodoacetamida; **5**- Nitrato de Prata; **6**- Cloreto de Sódio; **7**- SDS; **8**- Cloreto de potássio; **9** - Sulfato de cobre; **10**- Cloreto de Cálcio; **11**- β -mercaptoetanol; **12**- Rafinose; **13**- Maltose; **14**- Sacarose; **15**- Melibiose; **16**- D-Glicose; **17**- D-Galactose; **18**- Lactose; **19**- Gentiobiose; **20**- Estaquiose; **21**- D-Manose.

Oda; Tonomura (1995) observaram que a atividade da α -galactosidase de *Torulasporea delbrueckii* IFO 1255 foi extremamente afetada por Ag^{+2} e Cu^{+2} , nas concentrações de 1 mM, pré- incubada a 40 °C por 30 min.

Ishiguro *et al.* (2001), trabalhando com α -galactosidase recombinante de *Thermus sp.*, observaram que a atividade enzimática não foi afetada pelos íons Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} e Mn^{+2} , entretanto, o íon Ag^{+1} inativou significativamente a enzima (menos que 20 % do controle). A enzima α -galactosidase de *Saccharomyces carlsbergensis* foi estável por 2 h a 30 °C na presença de 0,25 M de β -mercaptoetanol (LAZO; OCHOA; GASCÓN, 1976).

Ademark *et al.* (2001), trabalhando com 4 formas da α -galactosidase de *Aspergillus niger*, observaram que as α -gal II-IV sofreram pouco ou nenhum efeito pela presença de manose, glicose e frutose e, a α -gal I foi afetada por

manose (70 % a 40 mM), mas também foi afetada em menor grau por outros monossacarídeos (23-35 % a 40 mM).

Viana (2002) encontrou forte redução na atividade da α -galactosidase semipurificada de sementes germinadas de soja da variedade CAC-1, quando ensaiada em meio contendo SDS, cobre e galactose.

De acordo com Sripuan *et al.* (2003), a α -galactosidase de *Ganoderma lucidum* apresentou uma redução na atividade original de 32 % pela adição de Ag^{+1} . Outros íons metálicos como Al^{+3} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , K^{+1} e Na^{+1} e reagentes como β -mercaptoetanol e EDTA, não afetaram a atividade da enzima, enquanto que a enzima foi completamente inibida por galactose e parcialmente por lactose. Os açúcares maltose e sacarose não afetaram a atividade da enzima.

A atividade da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NCIM 5146 também foi reduzida por Ag^{+1} e Cu^{+2} , nas concentrações de 1 mM, não sendo afetada por EDTA (GOTE *et al.*, 2004).

4.2.3.9. Constante de inibição (K_i) para os açúcares galactose e melibiose

Os dados apresentados na Figura 38 mostram que a enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* foi parcialmente inibida por galactose e melibiose. Os valores de K_i para a α -galactosidase extracelular, na presença destes açúcares foram determinados utilizando o substrato p-NP- α Gal.

A Figura 39A representa o gráfico da velocidade da reação de hidrólise de p-NP- α Gal pela α -galactosidase extracelular na ausência e presença de diferentes concentrações de galactose. Observa-se que para uma mesma concentração do substrato p-NP- α Gal, a velocidade da reação é maior na ausência de galactose e, diminui com o aumento da concentração de galactose, caracterizando-se um efeito de inibição.

A Figura 39B mostra que as retas convergem para o mesmo ponto no eixo X indicando que, o valor da K_M permanece constante, mesmo na presença do inibidor e a V_{max} diminui, sugerindo assim, uma inibição não-competitiva.

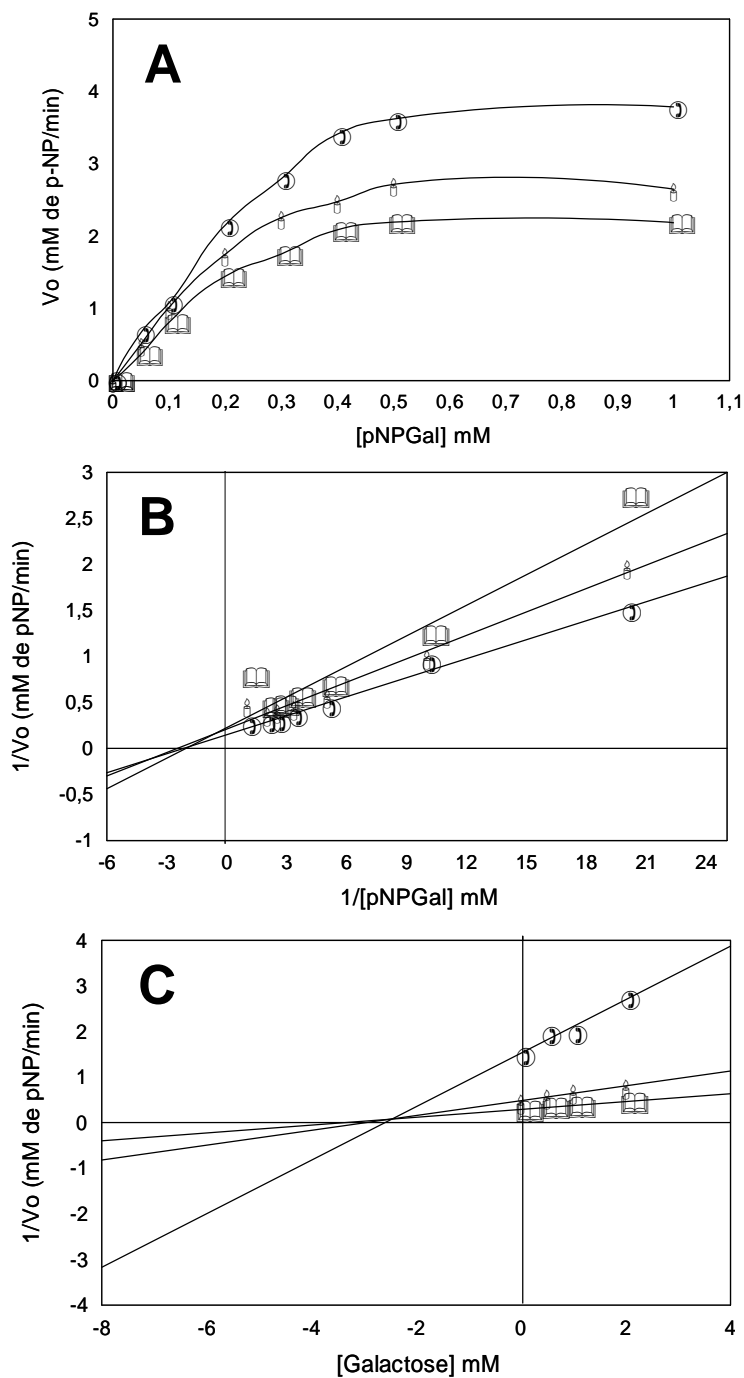


Figura 39 – **(A)**: gráfico da velocidade da reação em função da concentração de p-NP- α Gal pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* na ausência () e na presença de 1,0 (э) e de 2 mM (&) de galactose; **(B)**: gráfico do duplo-recíproco; **(C)**: gráfico de Dixon para um inibidor não-competitivo correlacionando a concentração de galactose e o inverso da velocidade da reação na presença de várias concentrações de p-NP- α Gal: [0,05] (); [0,2] (э) e [0,5] (&).

O tipo de inibição e o valor de K_i foram determinados pelo gráfico de Dixon (1953). A inibição da hidrólise do substrato p -NP- α Gal pela α -galactosidase extracelular na presença do produto inibidor galactose mostrou ser do tipo não-competitiva com o valor de K_i de 2,7 mM (Figura 39C).

De acordo com a cinética de um inibidor não competitivo (Figura 40), a via de reação mostra que o inibidor se liga tanto à enzima livre quanto ao complexo enzimático. Em consequência, não pode ser atingido V_{max} mesmo em altas concentrações de substrato (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004).

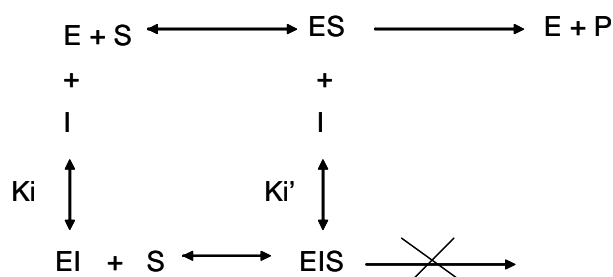


Figura 40 - Reações de equilíbrio para um inibidor não-competitivo.

O valor de K_M permanece o mesmo na presença deste inibidor porque, qualquer que seja a concentração de inibidor, as formas da enzima que podem combinar com S (E e EI) apresentam a mesma afinidade para com o S. O efeito final de um inibidor não-competitivo é fazer com que pareça que haja menor quantidade de enzima presente (SEGEL, 1979).

Guimarães *et al.* (2001) determinaram que a atividade da α -galactosidase P2 de sementes de soja em germinação com o substrato p -NP- α Gal foi inibida competitivamente na presença do inibidor galactose, com o valor de K_i de 0,67 mM, determinado pelo gráfico de Dixon.

Da mesma forma, foi determinado o valor de K_i para o inibidor melibiose. A Figura 41A representa o gráfico da velocidade da reação de hidrólise de p -NP- α Gal pela α -galactosidase na ausência e presença de diferentes concentrações de melibiose. Observa-se também que, para uma mesma concentração do substrato p -NP- α Gal, a velocidade da reação é maior na ausência de melibiose e, diminui com o aumento da concentração de melibiose, caracterizando-se um efeito de inibição.

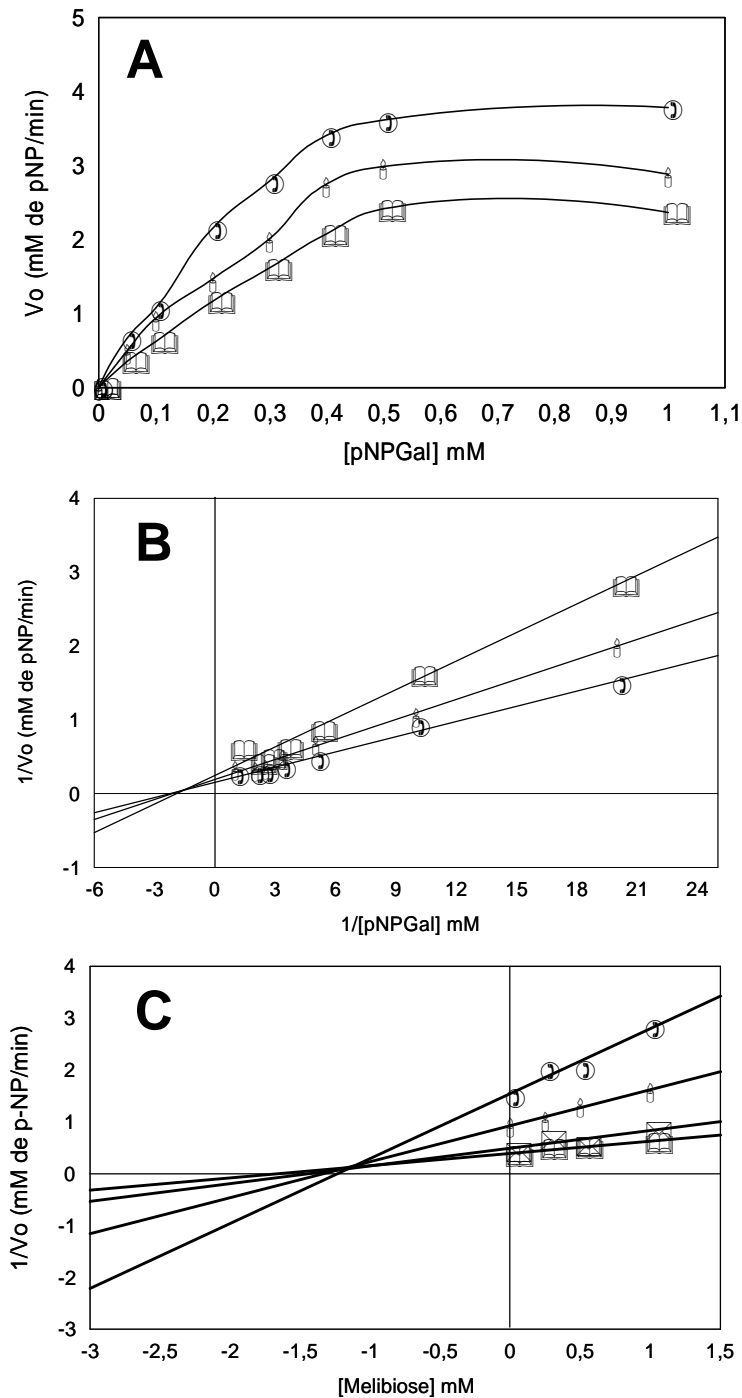


Figura 41 – **(A)**: gráfico da velocidade da reação em função da concentração de p-NP- α Gal pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* na ausência (○) e na presença de 0,25 (△) e de 1 mM (◻) de melibiose; **(B)**: gráfico do duplo-recíproco; **(C)**: gráfico de Dixon para um inibidor não-competitivo correlacionando a concentração de melibiose e o inverso da velocidade da reação na presença de várias concentrações de p-NP- α Gal: [0,05] (○); [0,1] (△); [0,2] (◻) e [0,3] (◻).

A Figura 41B mostra que as retas convergem para o mesmo ponto no eixo X indicando que, o valor da K_M permanece constante, mesmo na presença do inibidor e a V_{max} diminui, sugerindo assim, uma inibição não-competitiva.

O tipo de inibição e o valor de K_i foram determinados pelo gráfico de Dixon (1953). A inibição da hidrólise do substrato p -NP- α Gal pela α -galactosidase extracelular na presença do inibidor melibiose mostrou ser do tipo não-competitiva com o valor de K_i de 1,2 mM (Figura 41C). As reações de equilíbrio são as mesmas apresentadas na Figura 40.

De acordo com os valores de K_i determinados para os substratos galactose e melibiose, observa-se que a enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* apresentou uma maior inibição na presença de melibiose.

4.2.3.10. Seqüenciamento do N-terminal da α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*

A α -galactosidase extracelular purificada foi transferida de um gel SDS-PAGE para uma membrana de PVDF (Figura 42) e, posteriormente utilizada para a realização do seqüenciamento dos 14 primeiros aminoácidos da porção N-terminal, pela técnica de degradação de Edman, conforme descrição no item 3.11.10.



Figura 42 - Transferência da α -galactosidase extracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* do gel de poliacrilamida para membrana de PVDF.

Para o seqüenciamento da porção N-terminal da enzima foram realizados 21 ciclos, resultando os seguintes aminoácidos: **Tyr-Glu-Asn-Gly-Leu-Asn-Leu-Val-Pro-Gln-Met-Gly-Trp-Asn (YENGLNLVPQMGWN)**.

Apesar do número reduzido de resíduos de aminoácidos seqüenciados, a comparação da seqüência obtida com outras disponíveis no banco de dados BLASPP, evidenciou similaridade com a seqüência de algumas α -galactosidases de diversos microrganismos, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Alinhamento da seqüência de α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* com outras α -galactosidases. Resíduos de aminoácidos conservados em todas as seqüências são mostrados em negrito.

Microrganismo	N-terminal
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	YENGLNLVPQMGWN
<i>Magnaporthe grisea</i>	NGLNLVPQMGWN
<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767	YENGLGLTPQMGWN
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	NGLGLTPQMGWN
<i>Zygosaccharomyces mrakii</i>	NGLGLTPQMGWN
<i>Zygosaccharomyces cidri</i>	NGLGLTPQMGWD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NGLGLTPQMGWD
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	NGLGLTPQMGWD
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NGLGLKPPQMGWN
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	NGLGLTPQMGWD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS4411	NGLGLTPQMGWD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> VKM Y-1830	NGLGLTPQMGWD
<i>Saccharomyces mikatae</i>	NGLGLTPQMGWD
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	DNGLAITPQMGWND
<i>Mortierella vinacea</i>	NGLAITPQMGWN
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	DDGLARTPQMGWN
<i>Umbelopsis vinacea</i>	PQMGWN
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	ELGLNLVPQ
<i>Aspergillus oryzae</i>	ELGLNLVPQ
<i>Emericella nidulans</i>	ELGLNLVPQ
<i>Eremothecium gossypii</i>	YENGLNGILADEMG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YENGLNGILADEMG
<i>Kluyveromyces lactis</i>	YENGLNGILADEMG
<i>Candida glabrata</i> CBS138	YENGLNGILADEMG
<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	LTLVVATPPMGWN

A α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* apresentou maior similaridade com as α -galactosidases de outras leveduras, como de *Magnaporthe grisea* (100 %), *Debaryomyces hansenii* CBS767 (86 %), *Torulaspota delbrueckii* e *Zygosaccharomyces mrakii* (71 %). Também foram encontradas similaridades com α -galactosidases de alguns fungos, como *Aspergillus nidulans* FGSC A4 e *Aspergillus oryzae*, (57 %).

A alta porcentagem de similaridade determinada entre a seqüência do terminal amínico da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* com a seqüência de outras α -galactosidases confirmaram que a proteína purificada corresponde à enzima α -galactosidase.

PARTE 3

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA α -GALACTOSIDASE INTRACELULAR DE *Debaryomyces hansenii*

4.3.1. Purificação da α -galactosidase intracelular produzida pela levedura *Debaryomyces hansenii*

A α -galactosidase intracelular produzida por *D. hansenii* foi extraída conforme descrição no item 3.8.2.1. Um esquema do processo de purificação da α -galactosidase intracelular está representado na Figura 13 e as etapas de purificação são apresentadas na Tabela 7. As atividades enzimáticas foram determinadas utilizando o substrato p-NP- α Gal, como descrito no item 3.9.1, e o teor protéico determinado pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico, como descrito no item 3.12.

Tabela 7 - Resumo das etapas de purificação da α -galactosidase intracelular de *Debaryomyces hansenii*.

Etapas de purificação	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	64,5	59,0	0,91	1	100
Crioprecipitação	58,3	54,7	0,94	1,03	92,7
Filtração em gel (Sephadex G-150)	1,24	46,7	37,7	41,4	79,1
Troca-iônica (DEAE-Sepharose)	0,10	26,3	263	289	44,6

1 U: 1 μ mol de p-NP formado por minuto

No processo de purificação da enzima, primeiramente o extrato bruto sofreu uma crioprecipitação (item 3.8.2.3). Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido à cromatografia de filtração em gel em uma coluna de Sephadex G-150, observando-se nessa etapa, um aumento da atividade específica da enzima de 41,4 vezes. O perfil cromatográfico da filtração em gel está representado na Figura 43.

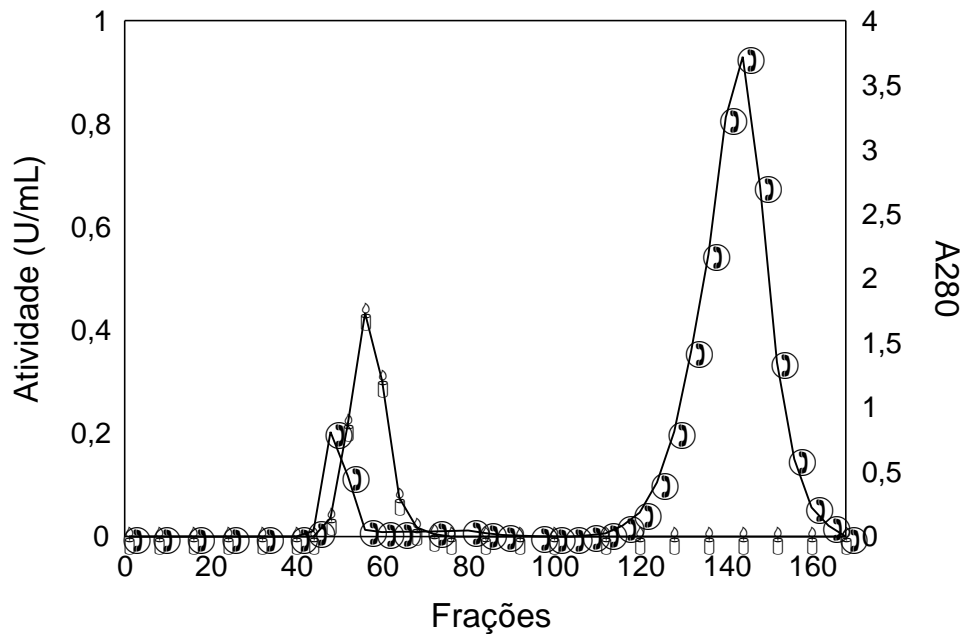


Figura 43 - Perfil cromatográfico da amostra de α -galactosidase intracelular de *Debaryomyces hansenii* proveniente da crioprecipitação, em filtração em gel Sephadex G-150. Atividade de α -galactosidase (○) e proteína (□).

O perfil de eluição da cromatografia de filtração em gel revelou a presença de apenas um pico protéico com atividade de α -galactosidase, eluído inicialmente. A maior parte das proteínas foi eluída em um segundo pico, que não apresentou atividade de α -galactosidase. As frações contendo atividade enzimática foram reunidas e posteriormente submetidas à cromatografia de troca-iônica, em uma coluna de DEAE-Sepharose, observando-se um aumento da atividade específica da enzima de 7 vezes em relação à etapa anterior.

O perfil da cromatografia de troca-iônica está representado na Figura 44.

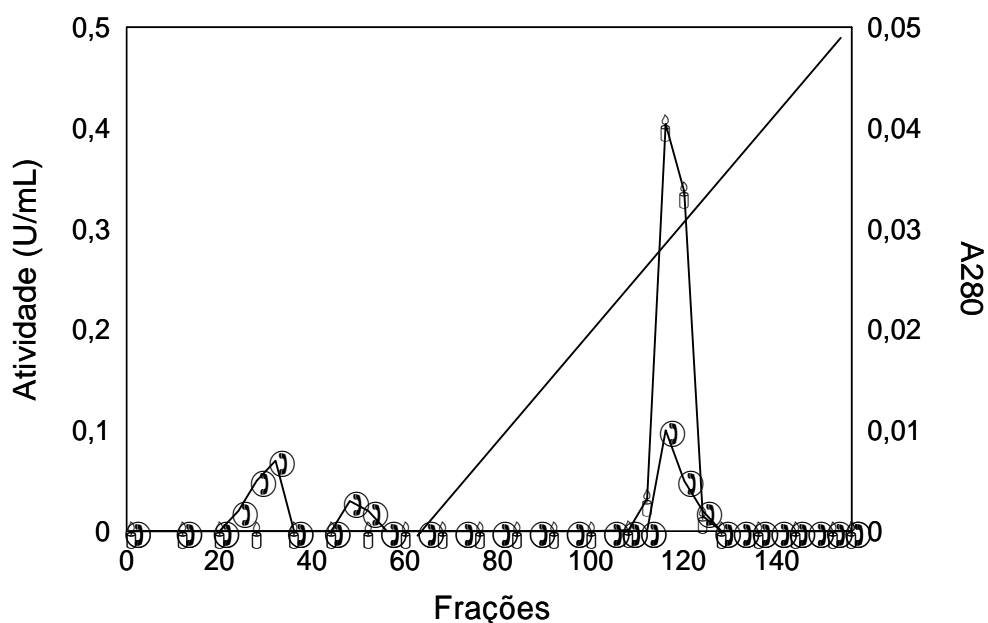


Figura 44 - Perfil cromatográfico da fração enzimática contendo a α -galactosidase intracelular de *Debaryomyces hansenii*, proveniente da cromatografia de filtração em gel, em cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-Sepharose. Atividade de α -galactosidase (ε); proteína ($()$); gradiente de NaCl de 0 a 1 M ($-$).

O perfil da eluição da cromatografia em coluna de troca-iônica também revelou a presença de apenas um pico protéico com atividade de α -galactosidase, que foi eluído com aproximadamente 0,5 M de NaCl.

Ao final do processo, a α -galactosidase intracelular de *D. hansenii* apresentou um fator de purificação de 289 vezes, com um rendimento de 44,6 % (Tabela 7). Na amostra enzimática contendo a α -galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* não foi detectada a presença da enzima invertase. No caso do fungo termofílico *Humicola* sp. a α -galactosidase foi a primeira enzima relatada de produção intracelular constitutiva e livre de invertase (KOTWAL *et al.*, 1999).

A fração eluída da coluna de DEAE-Sepharose que apresentou atividade enzimática foi submetida à eletroforese, em gel de poliacrilamida 12,5 %, sob condições desnaturantes.

O perfil de migração está apresentado na Figura 45. A análise eletroforética da amostra proveniente da cromatografia de troca-iônica em

coluna de DEAE-Sepharose revelou a presença de apenas uma banda protéica (Figura 45 - linha 2), confirmando o alto grau de purificação da enzima.

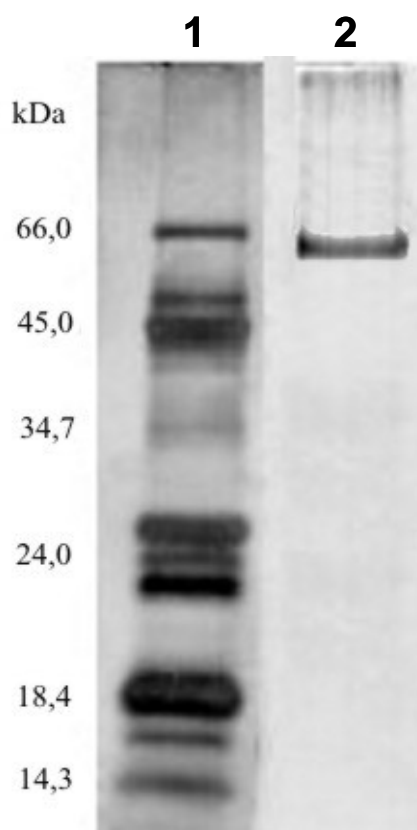


Figura 45 – Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12,5 %) corado com prata de amostras de α -galactosidase intracelular de *Debaryomyces hansenii*. **1**- marcadores de massa molecular; **2**- fração enzimática proveniente da cromatografia de troca-iônica.

4.3.2. Determinação da massa molecular

A massa molecular da enzima α -galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* 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 45). Para a distância de 2,1 cm percorrida pela enzima α -galactosidase foi calculado o valor da massa molecular de aproximadamente $(61,3 \pm 0,03)$ kDa (Figura 46).

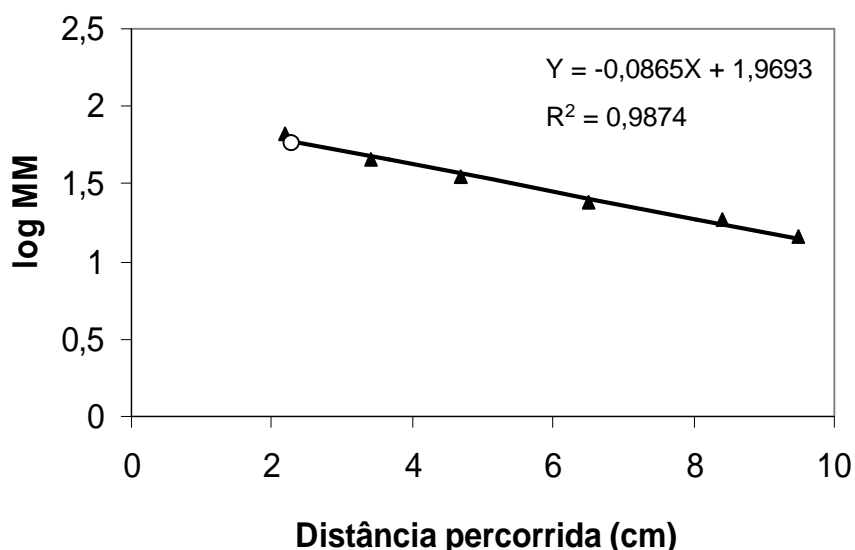


Figura 46 – Determinação da massa molecular da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*. Marcadores de massa molecular: Albumina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Pepsina (34,7 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), β -Lactoalbumina (18,4 kDa) e Lisozima (14,3 kDa). Distâncias percorridas pelos padrões protéicos (▲) e pela α -galactosidase (○).

O valor determinado para a massa molecular da α -galactosidase intracelular de *D. hansenii* foi próximo ao valor encontrado para a α -galactosidase extracelular (58,8 kDa). α -Galactosidase intracelular de massa molecular maior, 87,1 kDa, foi purificada por Kotwal *et al.* (1999), a partir do fungo *Humicola sp.*

4.3.3.. Caracterização enzimática

4.3.3.1. Efeito do pH

Atividades consideráveis (acima de 77 %) foram determinadas na faixa de pH entre 3,6 e 5,6, entretanto, a atividade máxima foi encontrada em pH 5,0. Atividades menores foram observadas em pH 3,0 (57 % da atividade) e 6,0 (50 %). Em valores de pH acima de 6,6 a atividade reduziu drasticamente e entre 7,6 e 8,0 a atividade da α -galactosidase foi nula (Figura 47).

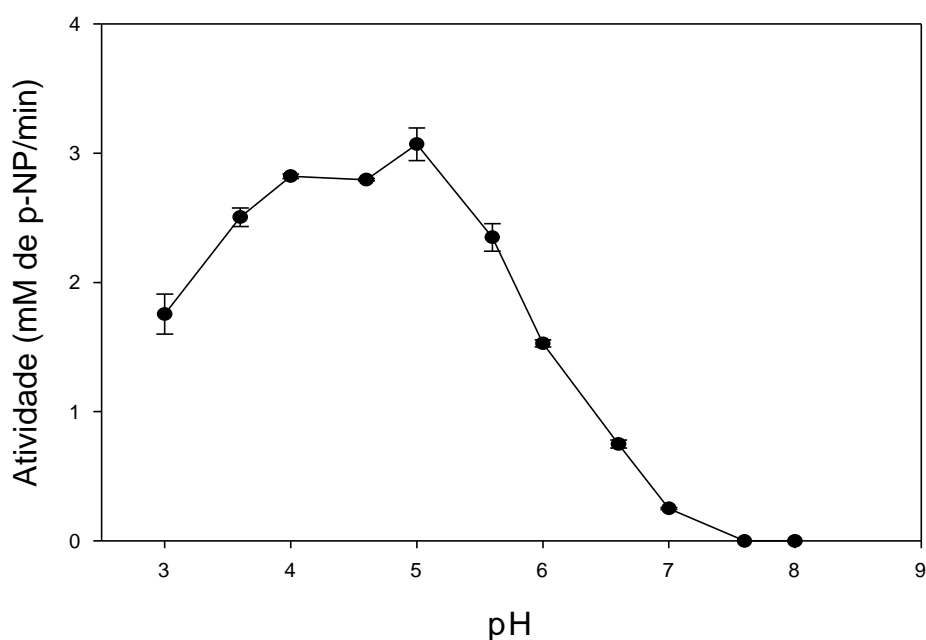


Figura 47 - Efeito do pH na atividade da enzima α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* na temperatura de 55 °C.

Resultados semelhantes foram obtidos para α -galactosidase extracelular da levedura *D. hansenii*, entretanto, em pH 3,0 a enzima extracelular manteve apenas 20 % da atividade máxima (Figura 25), ao contrário da forma intracelular, que nesse valor de pH ainda manteve 57 % da sua atividade máxima (Figura 47).

Mesmo valor de pH ótimo foi encontrado por Kotwal *et al.* (1999) para α -galactosidase intracelular do fungo *Humicola* sp. Porém, esta enzima permaneceu estável entre pH 4,0 e 6,5 com 80 % de sua atividade original.

4.3.3.2. Efeito da temperatura

Maiores atividades (acima de 67 %) foram detectadas entre as temperaturas de 45 e 60 °C, entretanto, a temperatura ótima foi de 55 °C. Em valores acima de 65 °C a atividade enzimática foi bastante diminuída (26 %), atingindo nulidade a partir de 70 °C (Figura 48).

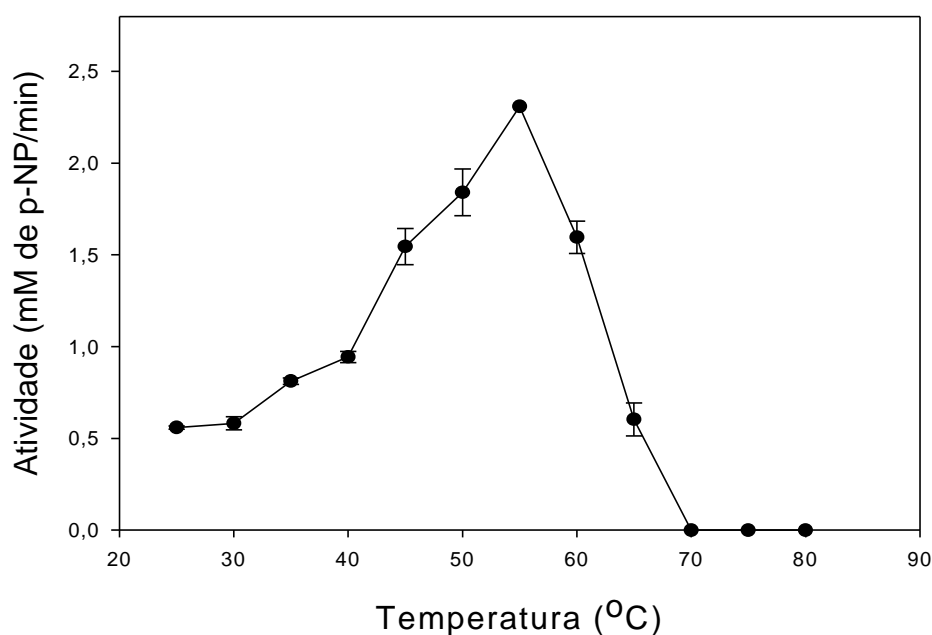


Figura 48 - Efeito da temperatura na atividade da enzima α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* em pH 5,0.

No caso da α -galactosidase extracelular da levedura *D. hansenii*, a temperatura ótima determinada foi 60 °C (Figura 26), entretanto, nessa temperatura, a enzima intracelular manteve apenas 69 % de sua atividade máxima.

Kotwal *et al.* (1999) determinaram a temperatura ótima da α -galactosidase intracelular de *Humicola* sp. de 65 °C. Os valores de pH e temperatura ótimos da α -galactosidase deste fungo foram similares aos valores determinados para α -galactosidas de bactérias, leveduras e outros fungos (HASHIMOTO *et al.*, 1993; ZEILINGER *et al.*, 1993). A temperatura ótima de 75 °C foi relatada para a α -galactosidase intracelular da levedura *Candida javanica* (CAVAZZONI *et al.*, 1987).

4.3.3.3. Análise da termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade, amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 40, 55 e 65 °C, por vários tempos. A α -

galactosidase intracelular purificada manteve 80 % de sua atividade original quando pré-incubada a 40 °C, por um período de 498 min, perdendo 70 % de sua atividade após 2502 min. No entanto, a 55 °C a enzima manteve 85 % de sua atividade original por 402 min e perdeu 40 % de sua atividade após 1500 min, sendo inativada após 2880 min. A enzima manteve apenas 53 % de sua atividade original por 30 min quando pré-incubada a 65 °C, sendo inativada após 180 min (Figura 49).

Comparando-se as α -galactosidases intra e extracelulares de *D. hansenii*, foi observado que a enzima extracelular permaneceu mais estável em temperaturas mais elevadas, uma vez que manteve 78 % de sua atividade original quando pré-incubada a 65 °C por 60 min (Figura 27), enquanto que a enzima intracelular manteve 53 % de sua atividade original quando pré-incubada nessa mesma temperatura por um período de apenas 30 min (Figura 49). Estes resultados sugerem que a enzima extracelular de *D. hansenii* é mais termoestável comparada à intracelular.

A α -galactosidase intracelular do fungo *Humicola* sp. reteve atividade completa por 60 min quando pré-incubada a 55 °C, sendo que, metade da atividade original permaneceu após 60 min a 60 °C e, a enzima foi completamente inativada após 60 min de pré-incubação a 65 °C (KOTWAL *et al.*, 1999). No caso da α -galactosidase intracelular de *D. hansenii*, também foi mantida em torno de 100 % da atividade original quando esta foi pré-incubada a 55 °C por 60 min, entretanto, metade da atividade original permaneceu após cerca de 40 min a 60 °C.

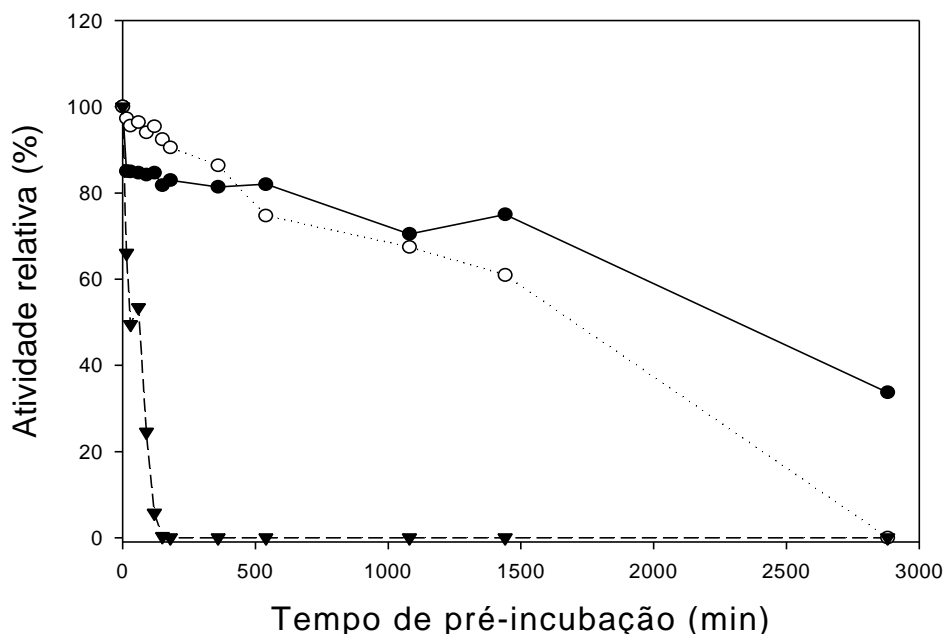


Figura 49 – Efeito da temperatura na estabilidade da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 40 °C (●); 55 °C (○) e 60 °C (*). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

A atividade da α -galactosidase intracelular de *D. hansenii* também foi avaliada na temperatura de 4 °C, durante 3 meses. A enzima manteve 91 % de sua atividade original (0,82 mM de p-NP/min) nos primeiros 30 dias, 81 % com 60 dias e 70 % com 90 dias de pré-incubação a 4 °C. Resultado semelhante foi encontrado para a enzima extracelular.

4.3.3.4. Meia-vida da α -galactosidase intracelular

Para determinação dos valores de meia-vida da α -galactosidase intracelular purificada, os ensaios foram conduzidos por um tempo total de 2880 min, nas temperaturas de 40, 55 e 65 °C. Na temperatura de 40 °C, o tempo estimado da meia-vida da α -galactosidase intracelular foi de 2363 min (Figura 50). A 55 °C, a meia-vida foi de 1880 min (Figura 51) e a 65 °C, a meia-vida foi de 38,5 min, conforme mostrado na Figura 52.

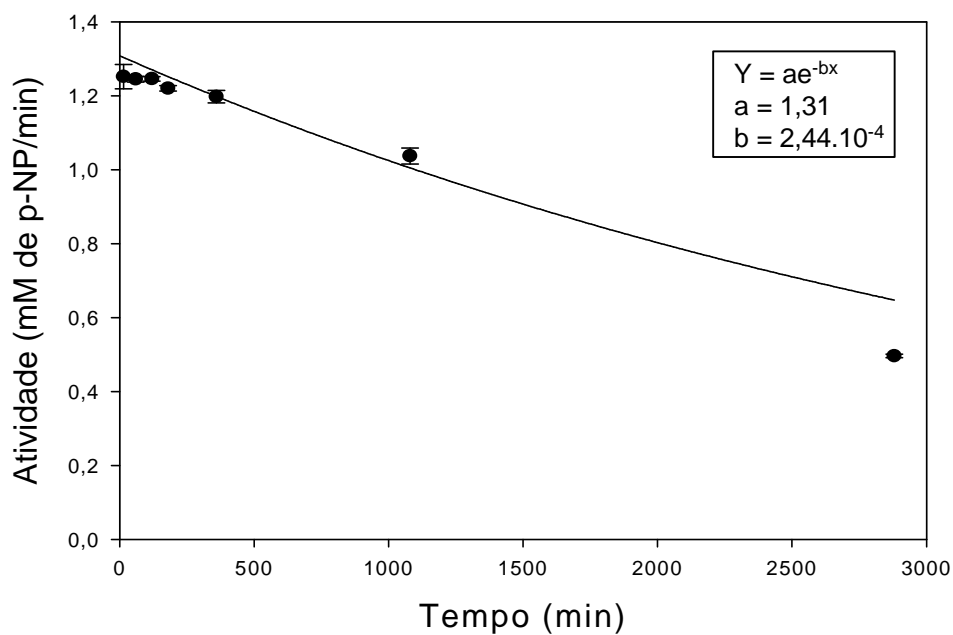


Figura 50 – Meia-vida a 40 °C da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*.

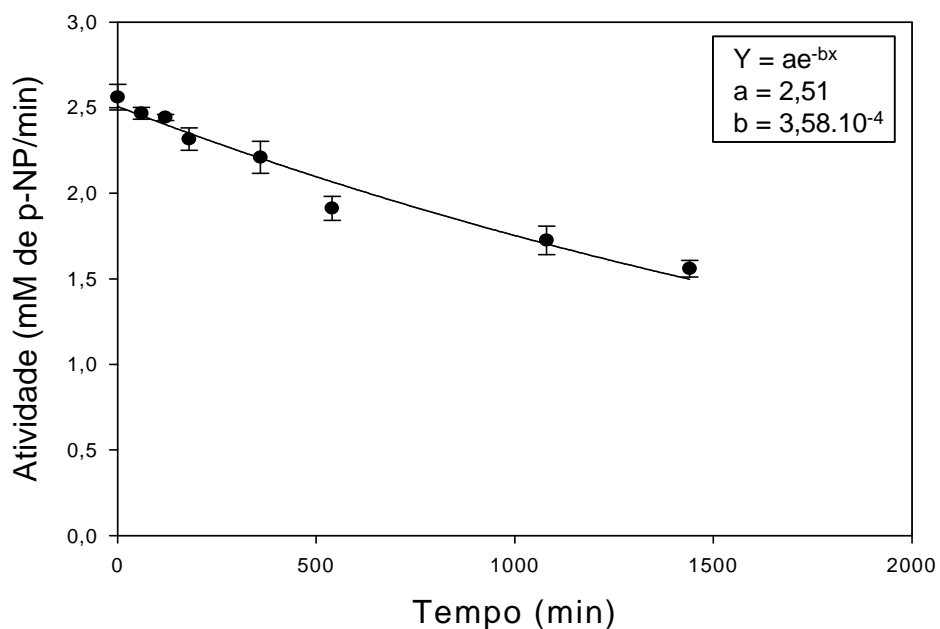


Figura 51 – Meia-vida a 55 °C da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*.

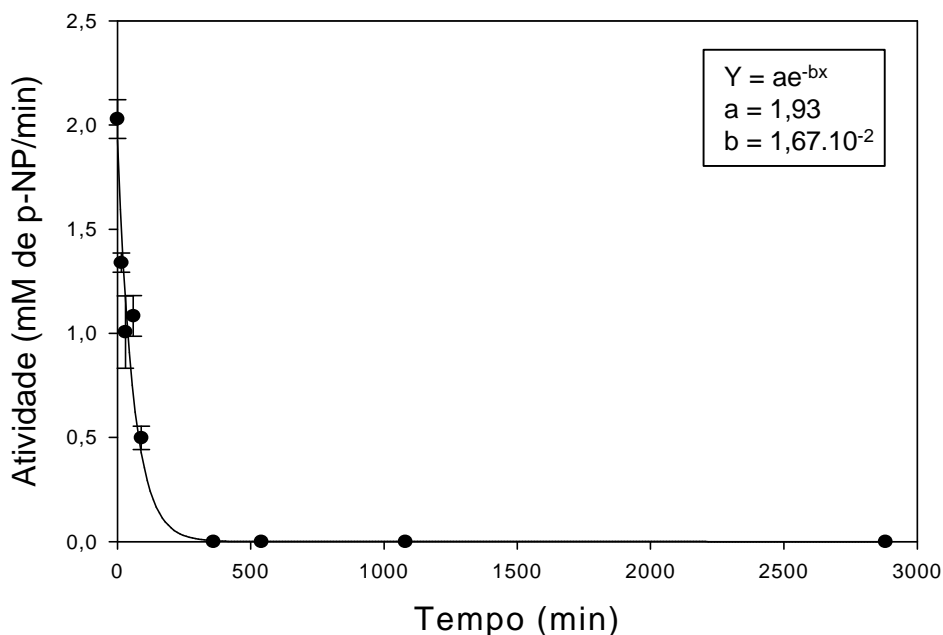


Figura 52 – Meia-vida a 65 °C da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*.

Comparando os valores de meia-vida determinados nas diferentes temperaturas para as α -galactosidas intra e extracelulares de *D. hansenii* observa-se que, na temperatura de 55 °C o valor da meia-vida para a α -galactosidase intracelular, 1880 min (Figura 51) foi maior comparado com a enzima extracelular, 647 min (Figura 30). Entretanto, em temperaturas mais elevadas como 65 °C, a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* manteve metade da sua atividade original por um tempo maior, 180 min (Figura 32), comparado com a enzima intracelular, 38,5 min (Figura 52).

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

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

Os valores da constante cinética K_M e da velocidade máxima V_{max} para cada substrato são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de K_M , V_{max} e V_{max}/K_M determinados pela curva de Michaelis-Menten com os substratos ρ -NP- α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose.

Substratos	K_M (mM)	V_{max} *	V_{max}/K_M
ρ -NP- α Gal	0,32	3,29	10,3
Melibiose	2,12	0,02	0,01
Estaquiose	10,8	5,89	0,54
Rafinose	32,8	3,66	0,11

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

De acordo com a Tabela 8, o menor valor da K_M encontrado foi para o substrato ρ -NP- α Gal (Figura 53). Em segundo lugar para o substrato melibiose, como mostrado na Figura 54, seguido de estaquiose (Figura 55) e finalmente, para o substrato rafinose (Figura 56).

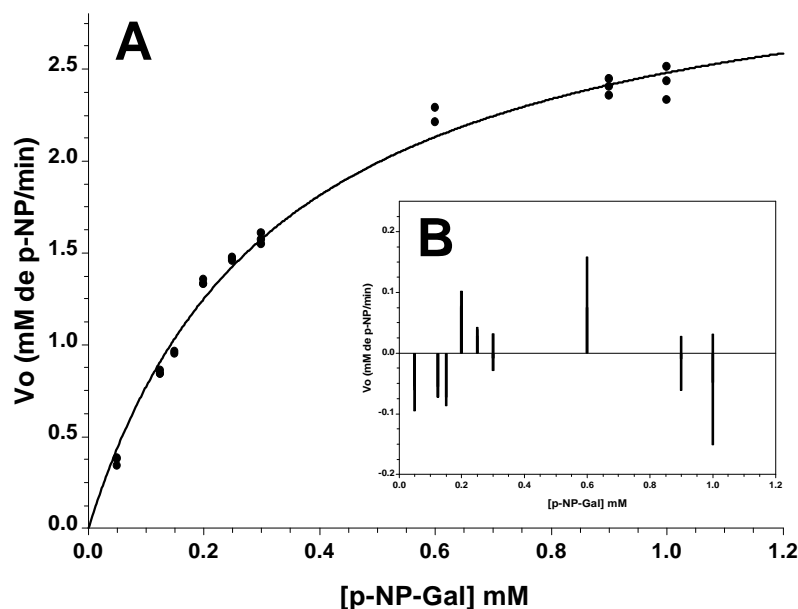


Figura 53 – (A): efeito da concentração do substrato ρ -NP- α Gal na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*; (B): gráfico de resíduos.

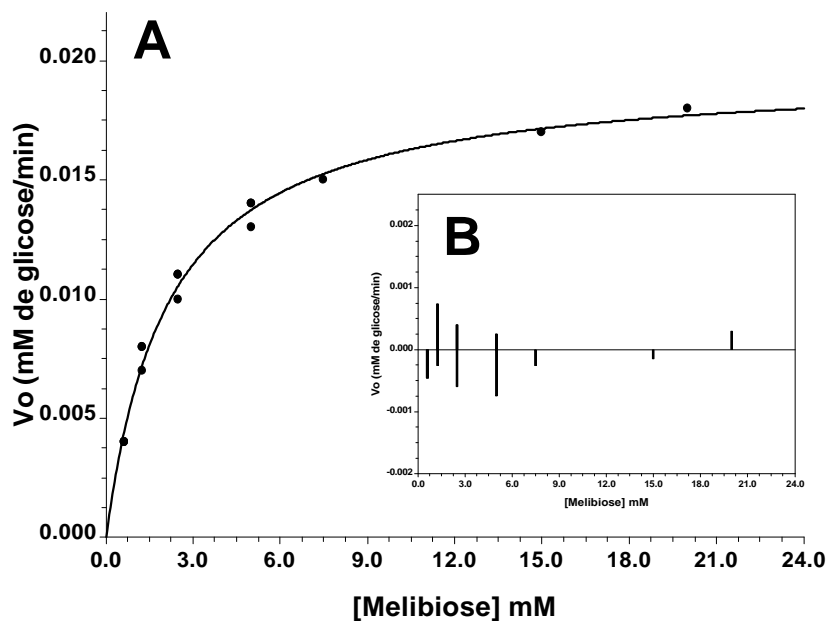


Figura 54 – (A): efeito da concentração do substrato melibiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*; (B): gráfico de resíduos.

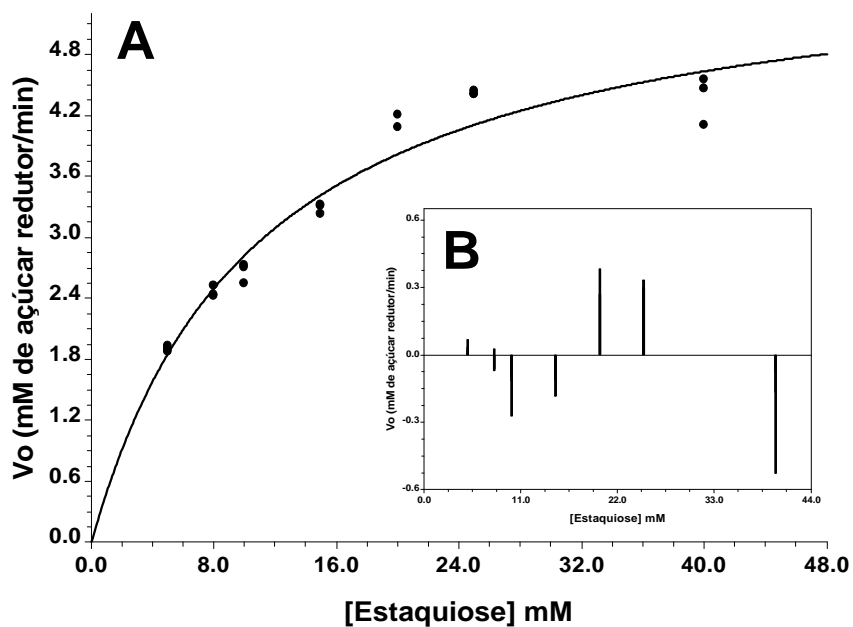


Figura 55 – (A): efeito da concentração do substrato estaquiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*; (B): gráfico de resíduos.

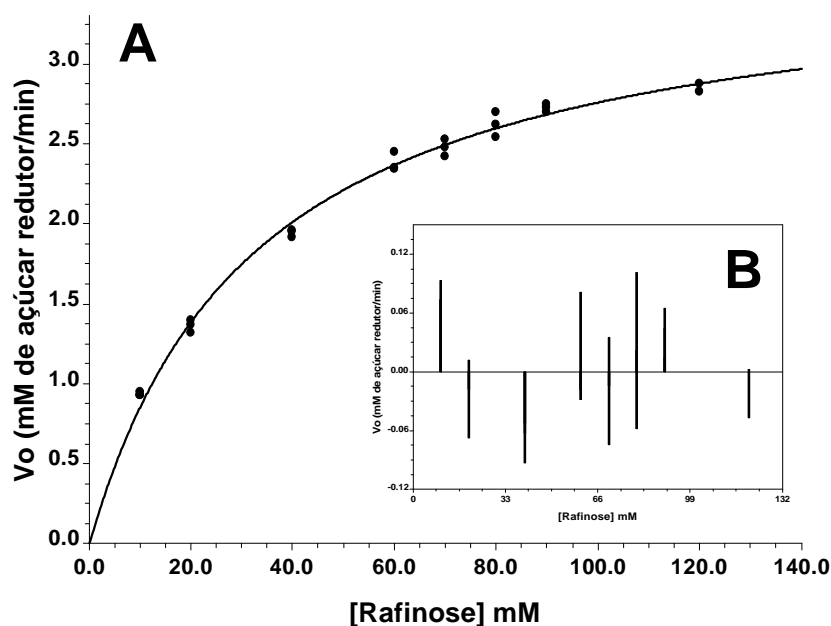


Figura 56 – (A): efeito da concentração do substrato rafinose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*; **(B):** gráfico de resíduos.

Os valores da K_M calculados para as α -galactosidases intra e extracelulares utilizando o substrato p-NP- α Gal foram menores comparados com os demais substratos testados, sugerindo que, o substrato p-NP- α Gal teve melhor adaptação nos centros ativos das α -galactosidases de *D. hansenii* (Tabelas 8 e 2). Para o substrato estaquiose, o valor da K_M para α -galactosidase intracelular (10,8 mM) foi próximo do valor da enzima extracelular (9,66 mM). Entretanto, para o substrato rafinose, o valor da K_M para α -galactosidase extracelular (16 mM) foi menor comparado ao da intracelular (32,8 mM). Neste caso, sugere-se que o substrato estaquiose pode ter tido uma melhor adaptação no centro ativo de ambas α -galactosidases, comparado com a rafinose.

De acordo com Kotwal *et al.* (1999), os valores da K_M para α -galactosidase intracelular de *Humicola* sp., determinados para p-NP- α Gal, rafinose e estaquiose foram 0,28, 1,45 e 1,42 mM, respectivamente.

Esses resultados sugerem que as α -galactosidases de diferentes fontes possuem maior afinidade pelo substrato sintético p-NP- α Gal.

4.3.3.6. Especificidade da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* com outros substratos

A enzima α -galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* foi avaliada quanto à capacidade de hidrolisar outros substratos sintéticos como mostrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Atividade da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* com substratos sintéticos.

Substrato	Concentração (mM)	Atividade (mM de p-NP/min) \pm DP
p-NP- α Gal	0,5	2,49 \pm 0,03
p-NP- β Gal	0,5	0,0
p-NP- α Glc	0,5	0,0
p-NP- β Xil	0,5	0,0
p-NP- α Man	0,5	0,0
p-NP- α Ara	0,5	0,0
o-NP- β Gal	0,5	0,0
o-NP- β Glc	0,5	0,0

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9 a enzima α -galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* demonstrou ser altamente seletiva, apresentando especificidade absoluta para a galactose em posição α , uma vez que hidrolisou somente o substrato p-NP- α Gal, não hidrolisando os outros substratos sintéticos com resíduos de açúcar diferentes da galactose ou unidos por ligação β . O mesmo resultado foi obtido para a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii*.

De acordo com Kotwal *et al.* (1999), a α -galactosidase intracelular do fungo *Humicola* sp., também não hidrolisou β -galactosídeos, α e β -glicosídeos, manosídeos indicando que, a configuração do substrato é importante para a enzima atuar cataliticamente.

A α -galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* também foi ensaiada com substratos naturais, cujas concentrações utilizadas nos ensaios foram próximas ao valor da K_M (Tabela 10).

Tabela 10 – Atividade da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* com substratos naturais.

Substrato	Concentração (mM)	Atividade (mM de p-NP/min) \pm DP
Sacarose	10	0,0
Estaquiose	10	3,19 \pm 0,01
Rafinose	30	2,28 \pm 0,01
Melibiose	2	0,002
Gentiobiose	10	0,0
Maltose	10	0,0
Lactose	10	0,0

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10 a enzima α -galactosidase intracelular foi ativa em ligações contendo galactose na posição α de oligossacarídeos como, rafinose e estaquiose. Apresentou maior atividade para estaquiose (3,19 mM de p-NP/min), comparada com os demais substratos, sendo próximo ao valor encontrado para α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* (3,84 mM de p-NP/min).

A α -galactosidase intracelular do fungo *Humicola* sp. também hidrolisou vários glicosídeos e oligossacarídeos contendo ligações α -galactosídicas no terminal não redutor como melibiose, rafinose e estaquiose (KOTWAL *et al.*, 1999).

As enzimas extra e intracelulares de *D. hansenii* e a enzima intracelular de *Humicola* sp. mostraram maior afinidade pelo p-NP- α Gal, do que com rafinose e estaquiose, os quais são substratos naturais da enzima.

A enzima α -galactosidase intracelular da levedura *D. hansenii* não hidrolisou os açúcares sacarose, gentiobiose, maltose e lactose, e apresentou atividade praticamente nula com o açúcar melibiose. Resultados semelhantes foram encontrados para α -galactosidase extracelular da mesma levedura (Tabela 4).

A enzima α -galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* também foi ensaiada com polímeros (Tabela 11).

Tabela 11 – Atividade da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* com polímeros.

Substrato	Concentração (%)	Atividade (mM de p-NP/min) \pm DP
Goma de alfarroba	1,0	0,55 \pm 0,01
Goma guar	1,0	0,55 \pm 0,02

De acordo com os dados da Tabela 11 a enzima α -galactosidase intracelular hidrolisou os polímeros testados, porém, numa velocidade um pouco menor comparada com a enzima extracelular (Tabela 5).

A enzima α -galactosidase intracelular do fungo *Humicola* sp. também hidrolisou os polímeros goma de alfarroba e goma guar (KOTWAL *et al.*, 1999). As α -galactosidasas intracelulares das leveduras *Debaryomyces castelli* IFO 1359, *Debaryomyces nepalensis* IFO 1428, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 1997, *Pichia guilliermondii* IFO 10106, *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis* IFO 1839, *Candida guilliermondii* IFO 0566 e *Lipomyces starkeyi* IFO 10383 hidrolisaram após 12 h de incubação a 40 °C, pH 4,5, o resíduo galactosil terminal do polímero Gal₃Man₃, porém, não hidrolisaram o polímero Gal₃Man₄ (YOSHIDA *et al.*, 1996).

4.3.3.7. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii*

Para determinar o efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase intracelular, soluções com concentrações definidas desses compostos foram pré-incubadas com a enzima purificada por 20 min, a 55 °C, seguido da realização do ensaio para a atividade da enzima, conforme descrição no item 3.9.1. (Figura 57). A concentração final dos efetores no ensaio foi 2 mM e a atividade relativa foi calculada considerando-se a atividade da enzima pré-incubada sem efetor como 100 %.

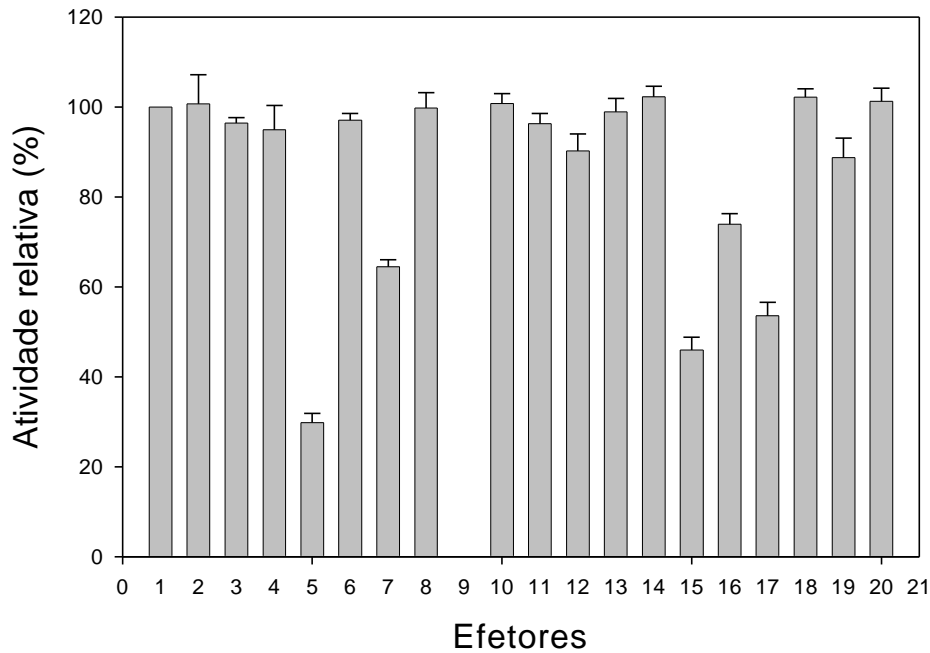


Figura 57 – Atividade relativa da α -galactosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* submetida aos efeitos de íons, agentes redutores e açúcares: 1- Controle; 2- EDTA; 3- Cloreto de Magnésio; 4- Iodoacetamida; 5- Nitrato de Prata; 6- Cloreto de Sódio; 7- SDS; 8- Cloreto de potássio; 9 - Sulfato de cobre; 10- Cloreto de Cálcio; 11- β -mercaptoetanol; 12- Rafinose; 13- Maltose; 14- Sacarose; 15- Melibiose; 16- D-Glicose; 17- D- Galactose; 18- D-Manose; 19- Lactose; 20- Estaquiouse.

Íons monovalentes e divalentes, açúcares redutores e, açúcares simples, promoveram efeitos diversos sobre a α -galactosidase intracelular. A atividade da enzima foi completamente anulada por cobre e altamente diminuída por prata, perdendo 70 % da atividade (Figura 57). Em concordância com esses resultados, a α -galactosidase extracelular da levedura *D. hansenii* não apresentou atividade na presença de cobre e prata (Figura 38).

A enzima intracelular foi muito pouco, ou não foi afetada por EDTA, cloreto de magnésio, iodoacetamida, cloreto de sódio, SDS, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, β -mercaptoetanol, rafinose, maltose, sacarose, glicose, lactose, estaquiouse e D-manose. Resultados semelhantes foram encontrados para α -galactosidase extracelular (Figura 38), apesar de a enzima intracelular ter sido mais afetada por SDS, perdendo 35 % de sua atividade, comparada a extracelular, que perdeu apenas 15 %.

A enzima intracelular foi parcialmente inibida por D-galactose e melibiose. Não foi afetada por EDTA e iodoacetamida, sugerindo que não houve dependência de íons metálicos para a atividade catalítica e que não existiam grupos –SH (sulfidril) livres essenciais à catálise na molécula da enzima, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados para a α -galactosidase extracelular da levedura *D. hansenii* (Figura 38).

Kotwal *et al.* (1999), trabalhando com α -galactosidase intracelular do fungo *Humicola* sp., observaram que a atividade enzimática não foi afetada pelos íons Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} e Mn^{+2} , KCl, EDTA, iodoacetamida e β -mercaptoetanol, entretanto, o íon Ag^{+1} inativou a enzima. De forma similar, as α -galactosidases intra e extracelulares da levedura *D. hansenii* e as enzimas intracelulares de *Aspergillus tamaris* (CIVAS *et al.*, 1984) e *Mortierella vinacea* (SUZUKI; LI, S.; LI, Y., 1970), também tiveram suas atividades bastante reduzidas na presença do íon Ag^{+1} . Contrariamente, o íon Cu^{+2} não promoveu efeito algum sobre a atividade da α -galactosidase intracelular do fungo *Humicola* sp. mas, reduziu drasticamente a atividade das α -galactosidases intra e extracelulares da levedura *D. hansenii* (Figuras 57 e 38).

4.3.3.8. Constante de inibição (k_i) para os açúcares galactose e melibiose

Os dados apresentados na Figura 57 mostram que a enzima α -galactosidase intracelular de *D. hansenii* foi parcialmente inibida por galactose e melibiose. Os valores de K_i para a α -galactosidase intracelular, na presença destes açúcares foram determinados utilizando o substrato p-NP- α Gal.

A Figura 58A representa o gráfico da velocidade da reação de hidrólise de p-NP- α Gal pela α -galactosidase intracelular na ausência e presença de diferentes concentrações de galactose. Observa-se que, para uma mesma concentração do substrato p-NP- α Gal, a velocidade de reação foi maior na ausência de galactose, diminuindo com o aumento da sua concentração, caracterizando um efeito de inibição.

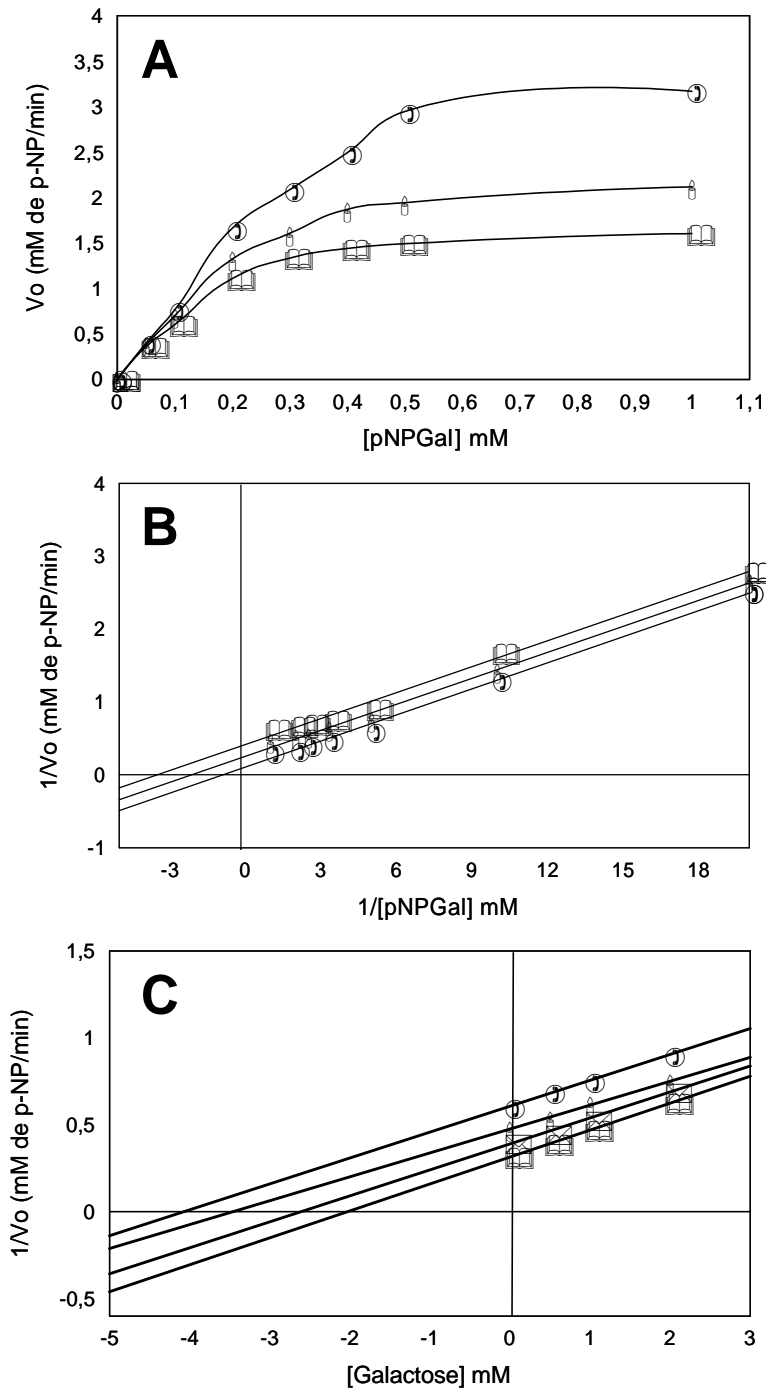


Figura 58 – (A): gráfico da velocidade da reação em função da concentração de p-NP- α Gal pela α -galactosidase intracelular de *Debaryomyces hansenii* na ausência (○) e na presença de 1,0 (△) e de 2 mM (□) de galactose; **(B):** gráfico do duplo-recíproco; **(C):** gráfico de Dixon para um inibidor incompetitivo correlacionando a concentração de galactose e o inverso da velocidade de reação na presença de várias concentrações de p-NP- α Gal: [0,2] (○); [0,3] (△); [0,4] (□) e [1,0] (&).

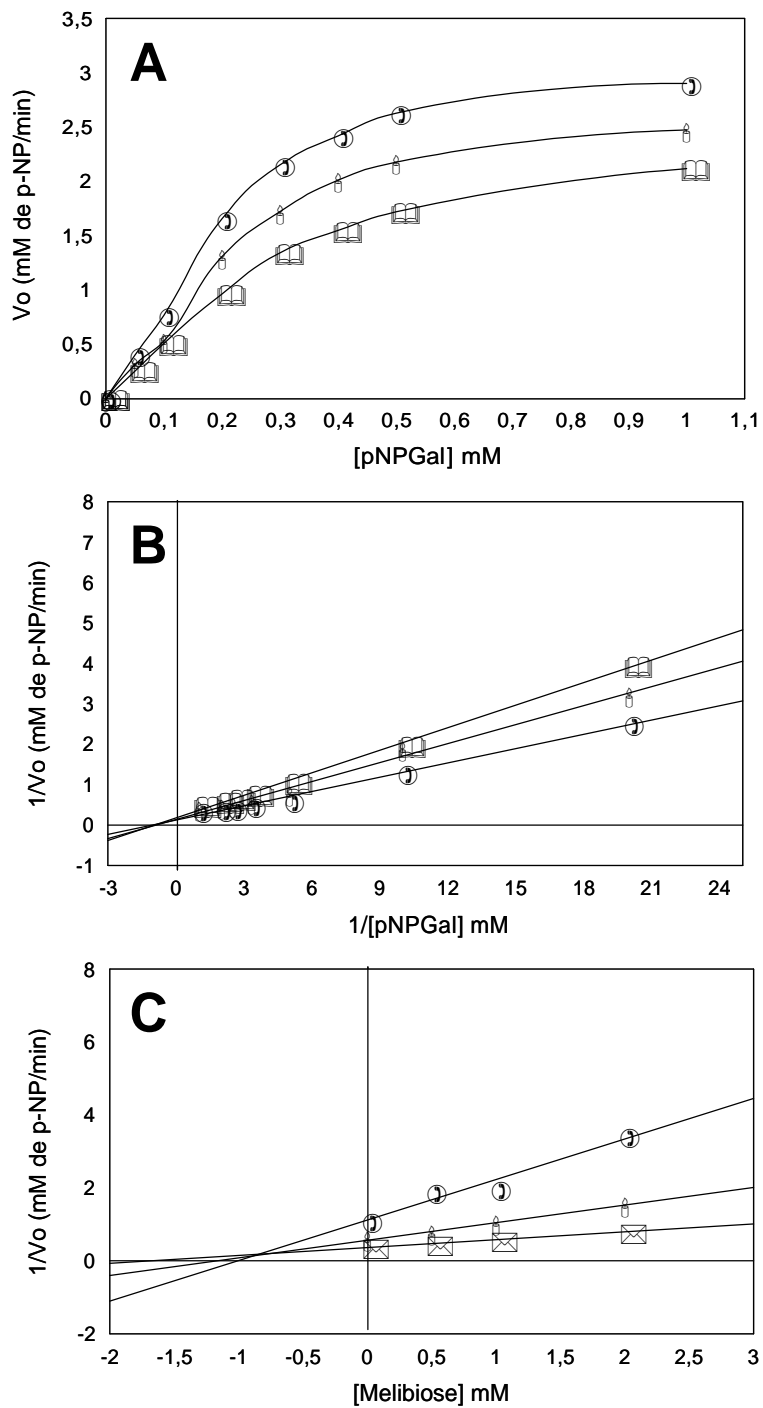


Figura 60 – **(A)**: gráfico da velocidade da reação em função da concentração de p-NP- α Gal pela α -galactosidase intracelular de *Debaryomyces hansenii* na ausência () e na presença de 0,5 (э) e de 1 mM (&) de melibiose; **(B)**: gráfico do duplo-recíproco; **(C)**: gráfico de Dixon para um inibidor competitivo correlacionando a concentração de melibiose e o inverso da velocidade de reação na presença de várias concentrações de p-NP- α Gal: [0,1] (); [0,2] (э) e [0,5] (*).

De acordo com a Figura 60A, observa-se também que, para uma mesma concentração do substrato ρ -NP- α Gal, a velocidade da reação é maior na ausência de melibiose, diminuindo com o aumento da sua concentração, caracterizando-se um efeito de inibição. Entretanto, esse efeito foi menor à medida que se aumentava a concentração de substrato.

A Figura 60B mostra que as retas convergem para o mesmo ponto no eixo Y indicando que, o valor de V_{\max} permanece constante, mesmo na presença do inibidor e a K_M aumenta, sugerindo assim, uma inibição competitiva

O tipo de inibição e o valor de K_i foram determinados pelo gráfico de Dixon (1953). A inibição da hidrólise do substrato ρ -NP- α Gal pela α -galactosidase na presença do inibidor melibiose mostrou ser do tipo competitiva com o valor de K_i de 0,98 mM (Figura 60C).

De acordo com a cinética de um inibidor competitivo (Figura 61), conforme aumenta a concentração do inibidor, maiores concentrações de substrato são necessárias para atingir uma determinada velocidade de reação. O que caracteriza a inibição competitiva é que ela pode ser anulada por uma concentração suficientemente alta de substrato (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004).

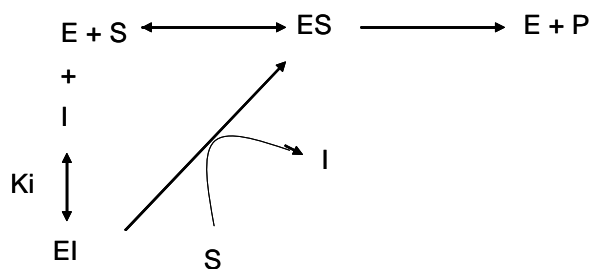


Figura 61 - Reações de equilíbrio para um inibidor competitivo.

A α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* sofreu inibição não-competitiva na presença de melibiose (Figura 41), diferindo da enzima intracelular, que sofreu inibição competitiva (Figura 60).

Apesar de não serem conclusivos, esses resultados sugerem que as α -galactosidasas intra e extracelulares de *D. hansenii* podem ser formas distintas da enzima.

PARTE 4

IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA α -GALACTOSIDASE EXTRACELULAR DE *Debaryomyces hansenii*

4.4.1. Imobilização da α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* sobre sílica modificada

Visando otimizar a utilização da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii*, especialmente para uso na hidrólise dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose presentes em produtos derivados de soja, procedeu-se a imobilização dessa enzima em sílica modificada, conforme descrição no item 3.13. O esquema da imobilização enzimática compõe a Figura 62.

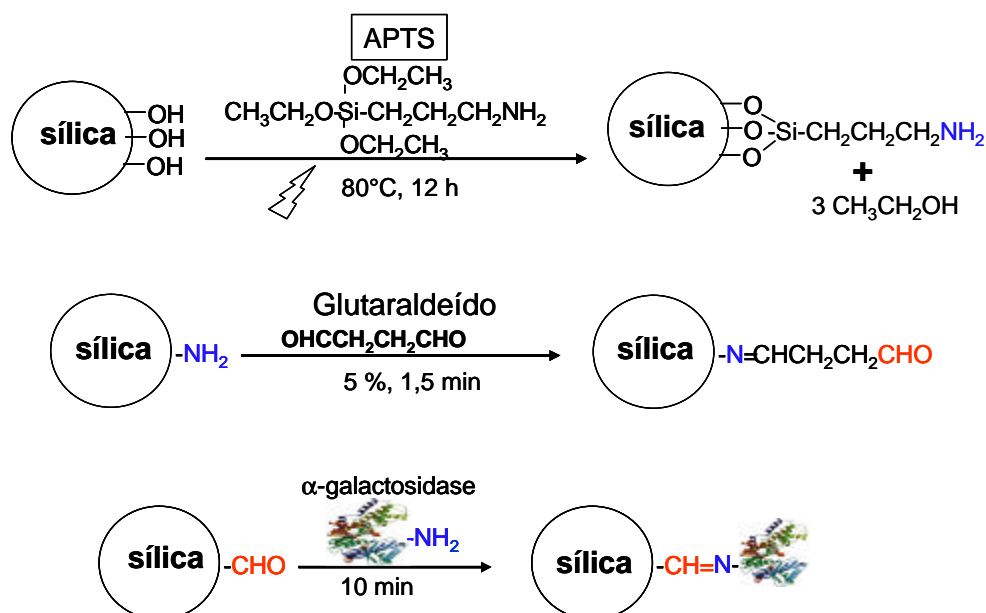


Figura 62 - Esquema da imobilização da α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*.

Previamente à imobilização foi determinada a atividade da α -galactosidase, conforme descrito no item 3.9.1 e após o processo de imobilização, o sobrenadante foi coletado e novamente determinada a atividade enzimática. A Tabela 12 mostra o resultado obtido na imobilização.

Tabela 12 - Determinação da atividade da α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* antes e após a imobilização.

Atividade enzimática	Pré-imobilização	Pós-imobilização
Atividade (U)	20	10
Atividade (%)	100	50

De acordo com os dados da Tabela 12, nas condições utilizadas, 50 % das unidades da enzima foram imobilizadas sobre 0,5 g de SMA, tendo sido obtida uma relação de 20 U/g de sílica.

Falkoski *et al.* (2004), trabalhando com α -galactosidase parcialmente purificada do fungo *Penicillium griseoroseum* transformante Pg/644, realizou a imobilização dessa enzima, segundo metodologia utilizada para a imobilização da α -galactosidase de *D. hansenii*, porém, em 2 g de SMA. A relação obtida foi de 75 U/g de sílica. Estes dados mostram que, a SMA foi capaz de imobilizar maior quantidade de α -galactosidase de *P. griseoroseum*, aproximadamente 3,8 vezes, comparada a imobilização da α -galactosidase de *D. hansenii*. No entanto, estes valores devem ser avaliados, uma vez que as condições de imobilização para as duas enzimas não foram idênticas. Segundo Ahmad; Answar; Saleemudidin (2001); Ettalibi; Baratti (2000), o tempo de reação entre a SMA e a enzima é fundamental para melhorar o rendimento da imobilização. Dessa forma, esse tempo poderia ser alterado, visando a otimização do processo.

Ettalibi; Baratti (2000) utilizaram sílica de diferentes granulometrias modificadas por 3-aminopropiltriétoxisilano (APTS) para imobilização de inulinase e alcançaram um rendimento médio para a imobilização de 73 %. D'Souza; Godbale (2002), imobilizando invertase sobre suporte de polietilanimina obtiveram um rendimento de 55 % aplicando 30 mL de solução enzimática com 250 μ g/mL de proteína adicionadas a 1 g de suporte.

4.4.2. Efeito do pH na atividade da α -galactosidase extracelular imobilizada

O efeito do pH na atividade da enzima imobilizada foi testado na faixa compreendida entre 4,0 e 8,0 conforme descrição no item 3.11.1. A atividade foi determinada como descrito no item 3.9.1. Como apresentado na Figura 63, atividades consideráveis (acima de 78 %) foram determinadas na faixa de pH entre 4,0 e 6,0, entretanto, a atividade máxima da enzima imobilizada foi encontrada em pH 5,0 (1,55 mM de p-NP/min), mesmo pH observado para as enzimas extra e intracelulares de *D. hansenii*. Atividades menores (abaixo de 27 %) foram encontradas em pH 7,6 e 8,0.

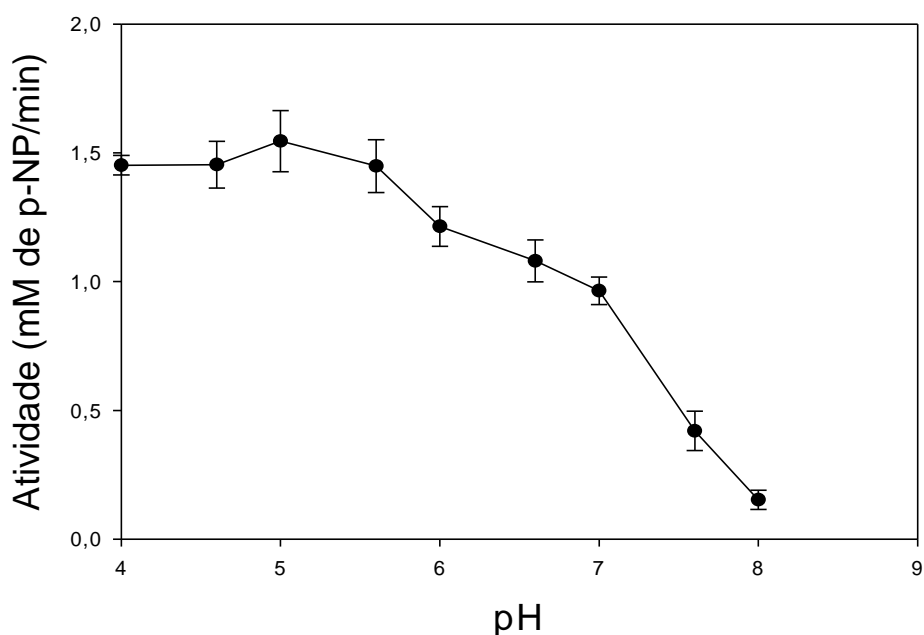


Figura 63 - Efeito do pH na atividade da enzima α -galactosidase extracelular imobilizada de *Debaryomyces hansenii*.

Conforme apresentado na Figura 64 a enzima α -galactosidase extracelular imobilizada foi mais estável em valores de pH acima de 5,0 em comparação com a enzima livre. Em valores de pH 7,0 a enzima imobilizada manteve 62 % de sua atividade original, enquanto que, a enzima livre perdeu totalmente sua atividade. Em pH 8,0 a enzima imobilizada ainda manteve 9,8 % da sua atividade original.

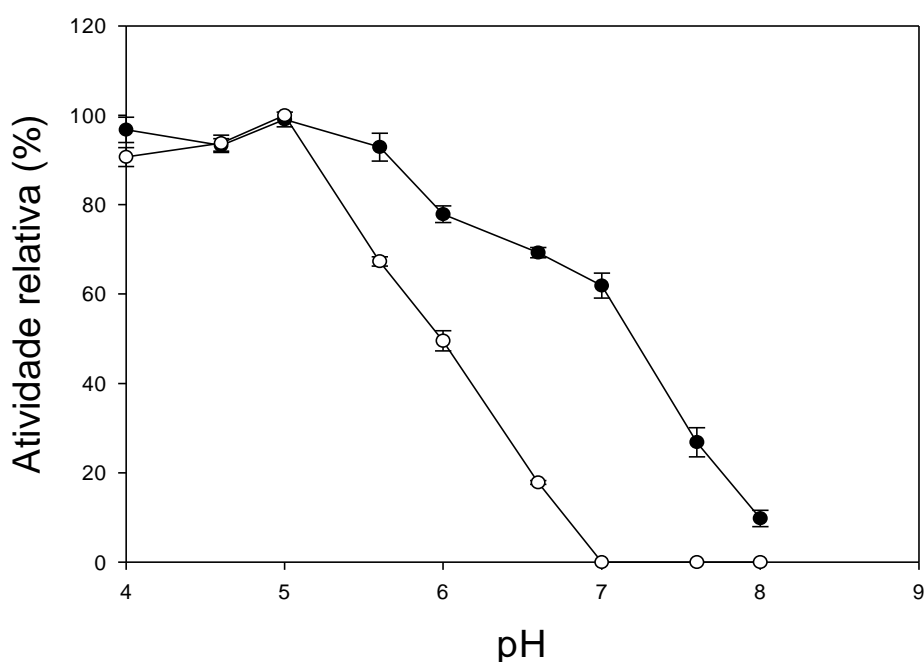


Figura 64 - Efeito do pH na atividade das enzimas α -galactosidasas extracelular imobilizada (●) e livre (○) de *Debaryomyces hansenii*. As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade em pH 5,0 como 100 %.

No caso da enzima invertase da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, relatado por Tanrisevem; Dogan (2001); Ahmad; Answar; Saleemudidin, (2001), a enzima imobilizada também permaneceu mais estável em condições de pH elevado. Ahmad; Answar; Saleemudidin (2001) relataram inclusive que, a invertase imobilizada sobre suporte CCL-Seralose manteve 98 % da atividade máxima em pH 7,0, enquanto que a enzima livre alcançou somente 40 % da atividade máxima nas mesmas condições.

4.4.3. Efeito da temperatura na atividade da α -galactosidase extracelular imobilizada

O efeito da temperatura na atividade da enzima imobilizada foi testada na faixa entre 40 e 90 °C, conforme descrição no item 3.11.2. A atividade foi determinada conforme descrito no item 3.9.1.

De acordo com a Figura 65 foi verificado que a elevação da temperatura promoveu aumento da atividade da enzima imobilizada, atingindo o máximo em 80 °C. Na temperatura de 90 °C, a enzima manteve 94 % da sua atividade original.

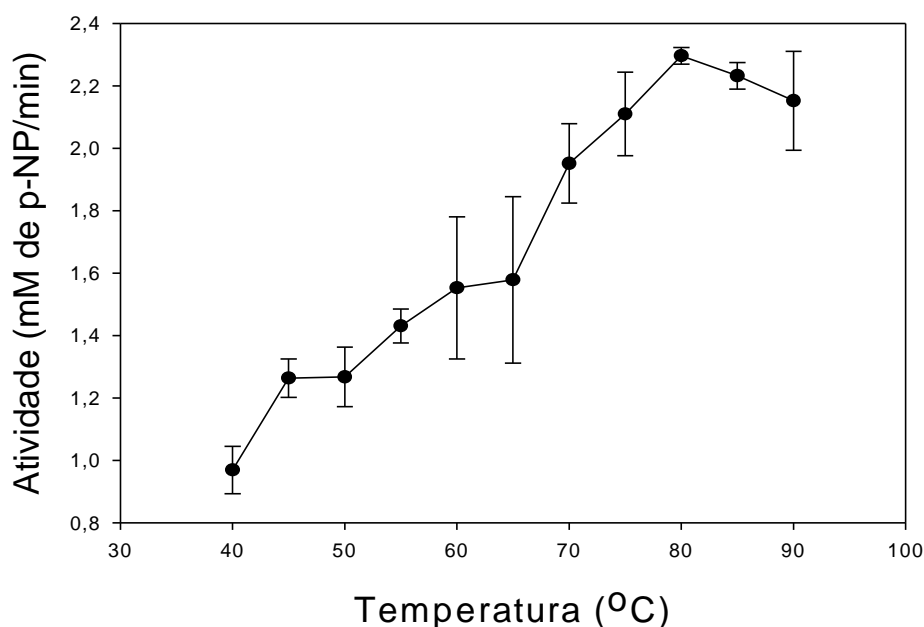


Figura 65 - Efeito da temperatura na atividade da enzima α -galactosidase extracelular imobilizada de *Debaryomyces hansenii*.

Como apresentado na Figura 66 a enzima extracelular imobilizada foi mais estável quando comparada à enzima livre. Na temperatura de 70 °C, a enzima imobilizada manteve 85 % de sua atividade original, enquanto que a enzima livre manteve apenas 11 %. Na temperatura ótima da enzima imobilizada, 80 °C, a enzima livre não possuía mais atividade.

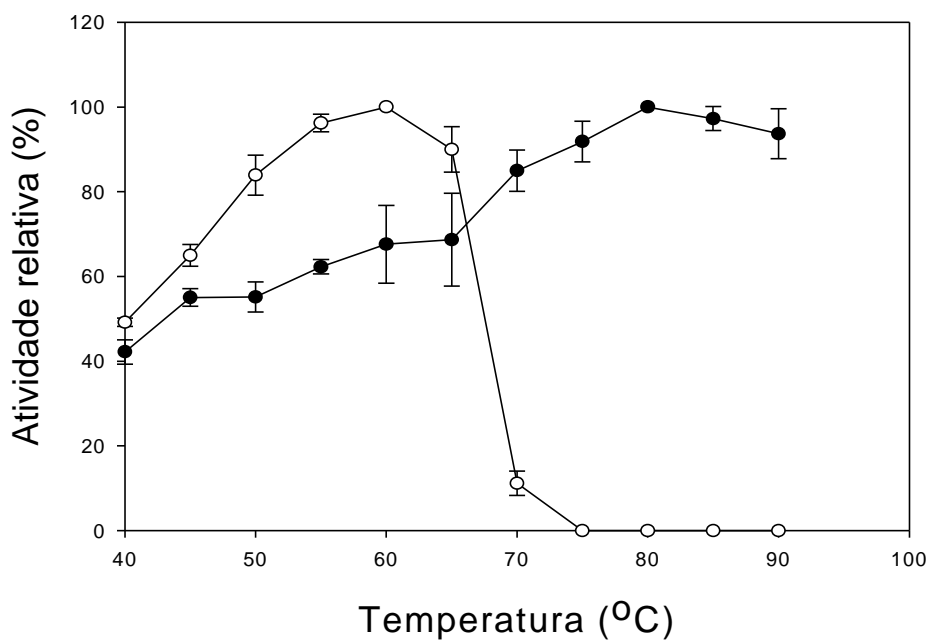


Figura 66 - Efeito da temperatura na atividade das enzimas α -galactosidasas extracelular imobilizada (●) e livre (○) de *Debaryomyces hansenii*. As atividades relativas foram calculadas considerando-se as atividades nas temperaturas ótimas das enzimas como 100 %.

O efeito da temperatura sobre a atividade da invertase livre e imobilizada da levedura *Saccharomyces cerevisiae* avaliado por Tanrisevem; Dogan (2001) mostrou que, a primeira apresentou maior atividade quando incubada na faixa entre 45 e 50 °C, diferentemente da invertase imobilizada que apresentou maior atividade entre 55 e 60 °C. Ahmad; Answar; Saleemudidin (2001) determinaram a temperatura ótima para a invertase livre e imobilizada de *S. cerevisiae*, de 50 °C verificando-se no mesmo estudo, alta estabilidade da invertase imobilizada sobre CCL-Seralose a 70 °C sendo mantida 85 % da atividade. Resultados semelhantes foram encontrados por Tunturk *et al.* (2000) com invertase imobilizada sobre grânulos do dímero ácido Col-alquil-poliamina, contudo, a 70 °C a enzima perdeu 50 % de sua atividade.

De uma forma geral, a imobilização da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* promoveu aumento na estabilidade da enzima em diferentes valores de pH e temperatura.

4.4.4. Análise de termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade, amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C, por vários tempos, conforme descrito no item 3.11.3. A enzima α -galactosidase extracelular imobilizada manteve 94 % da sua atividade original por 960 min, a 70 °C, perdendo 30 % da atividade após 2220 min (Figura 67). Na temperatura de 80 °C, manteve 94 % da sua atividade por 90 min, e 11 % por 30 min, a 90 °C. A α -galactosidase livre quando incubada a 70 °C, manteve 58 % de sua atividade por 15 min, conforme mostrado na Figura 27. Foi observado que o processo de imobilização contribuiu para uma maior termoestabilidade da enzima.

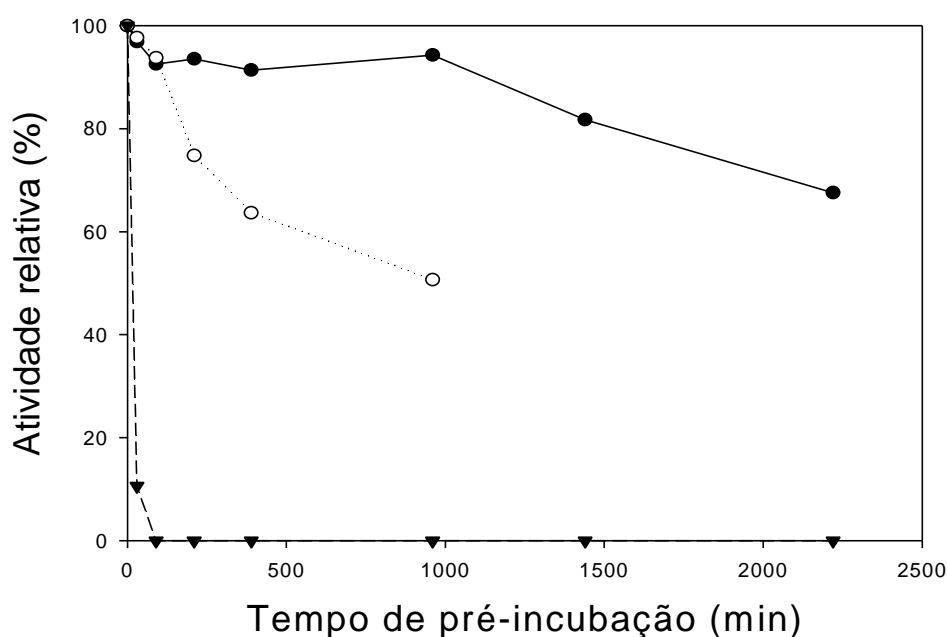


Figura 67 - Efeito da temperatura na estabilidade da α -galactosidase extracelular imobilizada de *Debaryomyces hansenii*, nas temperaturas de 70 °C (●); 80 °C (○) e 90 °C (*). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

A atividade da α -galactosidase extracelular imobilizada também foi avaliada na temperatura de 4 °C, por um período de 5 meses. A enzima imobilizada manteve 100 % de sua atividade durante esse tempo, enquanto que a enzima livre manteve 94 % de sua atividade original nos primeiros 30 dias, perdendo 22 % de sua atividade aos 90 dias de pré-incubação a 4 °C.

De acordo com os resultados, a enzima imobilizada foi mais estável em diferentes condições de pH e temperatura, comparada à enzima livre. Além disso, a imobilização permitiu a reutilização da enzima várias vezes, ao passo que, após a realização dos ensaios a enzima livre foi perdida.

PARTE 5

HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS DE
RAFINOSE EM PRODUTOS DE SOJA PELAS
 α -GALACTOSIDASES DE *Debaryomyces hansenii*

4.5.1. Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (RO) em produtos derivados de soja pelas α -galactosidases de *Debaryomyces hansenii*

4.5.1.1. Extrato desengordurado de soja (Leite de soja)

Uma vez que as α -galactosidases extra e intracelulares de *D. hansenii* foram capazes de hidrolisar rafinose e estaquiose, essas enzimas livres e a enzima extracelular imobilizada foram testadas na redução dos oligossacarídeos de rafinose (RO) presentes no leite de soja.

6 Hidrólise de RO utilizando a α -galactosidase extracelular purificada

No ensaio com a enzima α -galactosidase extracelular, a hidrólise de RO presentes no leite de soja foi realizada conforme descrição no item 3.14, seguido da extração de RO (item 3.16) e análise de RO por CLAE (item 3.17). A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes no leite de soja, em função do tempo de incubação com a enzima. Como controle, o leite de soja foi incubado com igual volume de água destilada, em substituição à enzima purificada, nas mesmas condições.

Os resultados estão apresentados na Figura 68 e os valores das porcentagens de redução dos açúcares solúveis estão mostrados na Tabela 13.

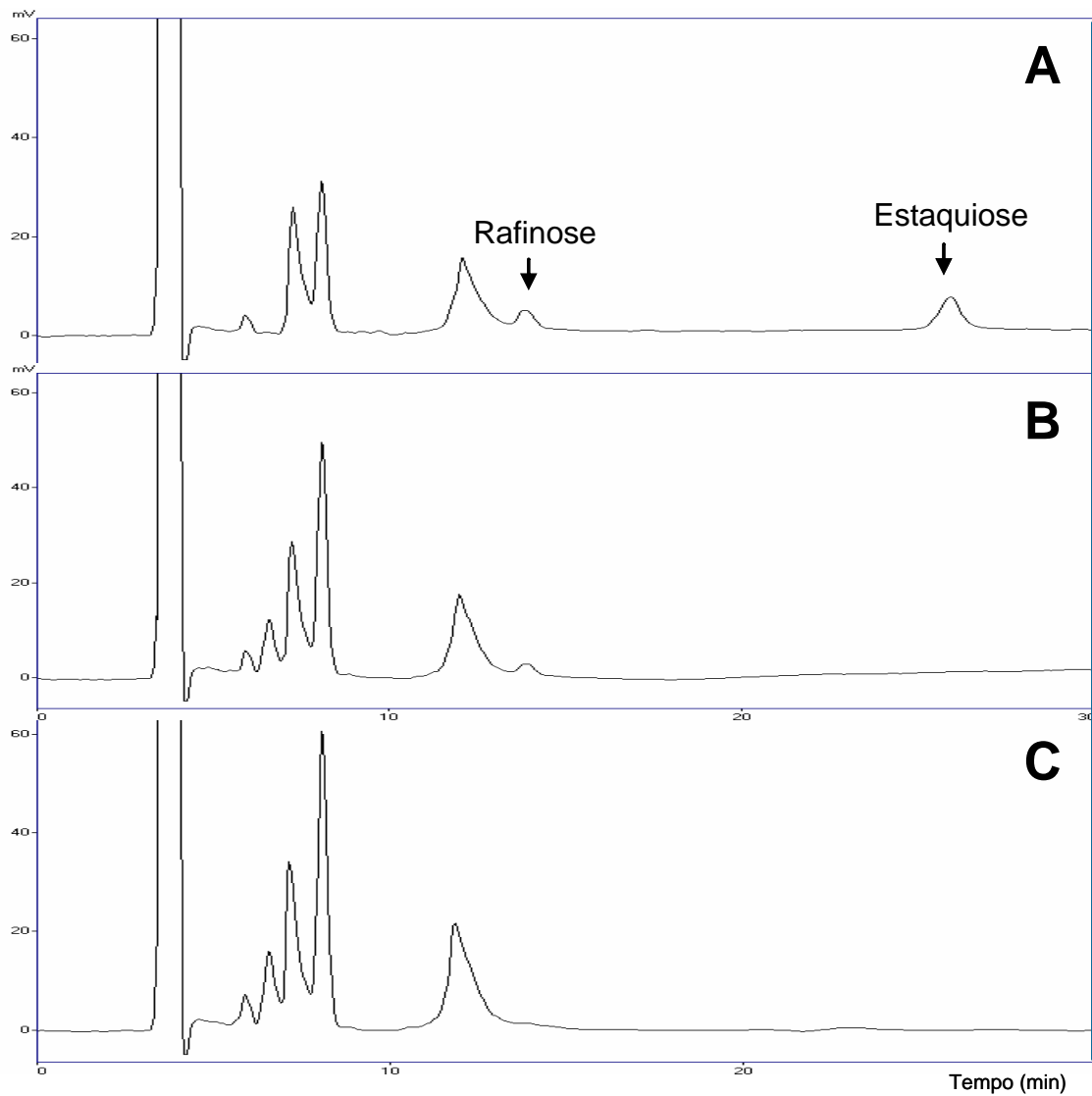


Figura 68 - Cromatograma comparativo da hidrólise de RO do leite de soja pela enzima α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* nos tempos 0 h (**A**), 2 h (**B**) e 4 h (**C**).

Tabela 13 - Porcentagem de hidrólise de RO no leite de soja pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*.

Tempo de hidrólise (h)	Redução (%)	
	Rafinose	Estaquiase
0	0	0
2	24	100
4	100	100

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

Segundo os dados apresentados na Tabela 13 a enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* apresentou alta atividade sobre os RO, confirmando o seu potencial uso na redução dos teores desses açúcares no leite de soja. Foi verificado que os teores de rafinose e estaquiase foram completamente reduzidos, após 4 h de incubação do leite de soja com 10,5 U de enzima. Resultado semelhante foi obtido com a α -galactosidase S1 do fungo *Aspergillus terreus*, porém, com uma maior quantidade da enzima, 40 U (REIS *et al.*, 2004). Ensaio realizado com a α -galactosidase do fungo transformante *Penicillium griseoroseum* Pg/644, também com 40 U da enzima, mostraram que o tratamento enzimático reduziu 74 % dos teores de rafinose e 100 % dos teores de estaquiase presentes no leite de soja, após 6 h, a 40 °C (FALKOSKI *et al.*, 2004).

Guimarães *et al.* (2001) conseguiram reduzir os teores de rafinose e estaquiase em 67 e 53 %, respectivamente, após tratamento do leite de soja por 12 h, a 30 °C, com a α -galactosidase (1,2 U de enzima por mL de leite de soja não desengordurado) parcialmente purificada de sementes de soja em germinação. Callegari (2003), trabalhando com α -galactosidase semipurificada de soja da variedade Monarca, observou uma redução dos teores de rafinose e estaquiase de 100 e 53 %, respectivamente, após 8 h de incubação, a 40 °C.

A α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* mostrou ser mais eficiente na hidrólise dos oligossacarídeos presentes no leite de soja, comparada às α -galactosidasas dos fungos transformante *Penicillium griseoroseum* Pg/644,

Aspergillus terreus e das sementes germinadas de soja. Esses resultados indicam que a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* pode ser usada no desenvolvimento de um processo, com a finalidade de melhorar o valor nutricional do leite de soja, aumentando com isso, o consumo deste produto.

Mulimani; Thippeswamy; Ramalingam (1997), utilizando extrato bruto de α -galactosidase de sementes de guar, conseguiram obter uma hidrólise dos oligossacarídeos da farinha de soja de 90 % da rafinose e 92 % da estaquiase. Cruz; Batistela; Wosacki (1981) observaram que a α -galactosidase não purificada produzida por *Cladosporium cladosporioides* hidrolisou completamente os oligossacarídeos presentes em amostras de leite de soja. As α -galactosidases não purificadas de *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, testadas por Mansour; Khalil (1998) foram eficientes na redução dos teores de rafinose e estaquiase, presentes na farinha de grão-de-bico. Entretanto, segundo Guimarães *et al.* (2001), a hidrólise dos RO pode ser realizada pela α -galactosidase, que cliva as ligações α -1,6 dos oligossacarídeos, liberando galactose e sacarose e, pode ser realizada também pela invertase, que cliva as ligações α -1,2, produzindo frutose e melibiose. Com isso, os resultados de hidrólise obtidos por Mulimani; Thippeswamy; Ramalingam (1997); Cruz; Batistela; Wosacki (1981); Mansour; Khalil (1998), utilizando extrato não purificado de α -galactosidases, poderiam ter sido decorrentes da ação dessa enzima, mas também da ação de invertases que poderiam estar presentes no extrato bruto.

6 Hidrólise dos RO utilizando células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii*, contendo a α -galactosidase intracelular.

Uma vez que, a enzima α -galactosidase extracelular livre foi capaz de hidrolisar os RO presentes no leite de soja, foram realizados testes de hidrólise com as células permeabilizadas de *D. hansenii*, contendo a enzima α -galactosidase intracelular.

No ensaio com as células permeabilizadas de *D. hansenii*, a hidrólise de RO foi realizada conforme descrito no item 3.14, seguido da extração de RO (item 3.16) e análise de RO por CLAE (item 3.17). A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes no leite de soja, em função

do tempo de incubação com a enzima. Como controle, o leite de soja foi incubado com igual volume de água destilada, em substituição à enzima, nas mesmas condições.

Os resultados estão apresentados na Figura 69 e os valores das porcentagens de redução dos açúcares solúveis estão mostrados na Tabela 14.

O tratamento utilizando células permeabilizadas de *D. hansenii* contendo a α -galactosidase intracelular permitiu a redução de 70 % dos teores de rafinose e 100 % dos teores de estaquiose presentes no leite de soja, após 6 h de incubação a 60 °C (Tabela 14). Como as células foram permeabilizadas, provavelmente ocorreu o transporte dos substratos rafinose e estaquiose presentes no leite de soja para o interior das mesmas, sendo estes hidrolisados pelas enzimas intracelulares específicas como α -galactosidase e possivelmente invertase e, os produtos liberados no meio.

Em estudos do catabolismo da rafinose em *Escherichia coli* K12, bactéria capaz de crescer em meio contendo rafinose como única fonte de carbono, Schmid; Schmitt (1976) afirmaram que a utilização desse trissacarídeo depende de um sistema de transporte e das enzimas invertase e α -galactosidase. Além disso, a síntese e a regulação dessas enzimas foram exercidas pelo plasmídeo Raf D1021. Estudos subseqüentes realizados por Aslanidis; Schmitt (1990) estabeleceram um modelo para o metabolismo da rafinose, onde os genes codificantes para os produtos envolvidos nesse metabolismo estão organizados em um operon. De acordo com esse modelo, a rafinose é transportada para o interior da célula por uma permease, sendo degradada pela ação seqüencial de uma α -galactosidase e uma invertase, ambas enzimas intracelulares.

No processo de hidrólise dos RO presentes no leite de soja, a vantagem da utilização das próprias células de *D. hansenii*, uma levedura utilizada no processamento de alimentos, sendo portanto não patogênica, é que elimina as etapas de extração e purificação da enzima α -galactosidase intracelular. Isto poderia aumentar a praticidade do processo, gerando economia de tempo e de custos.

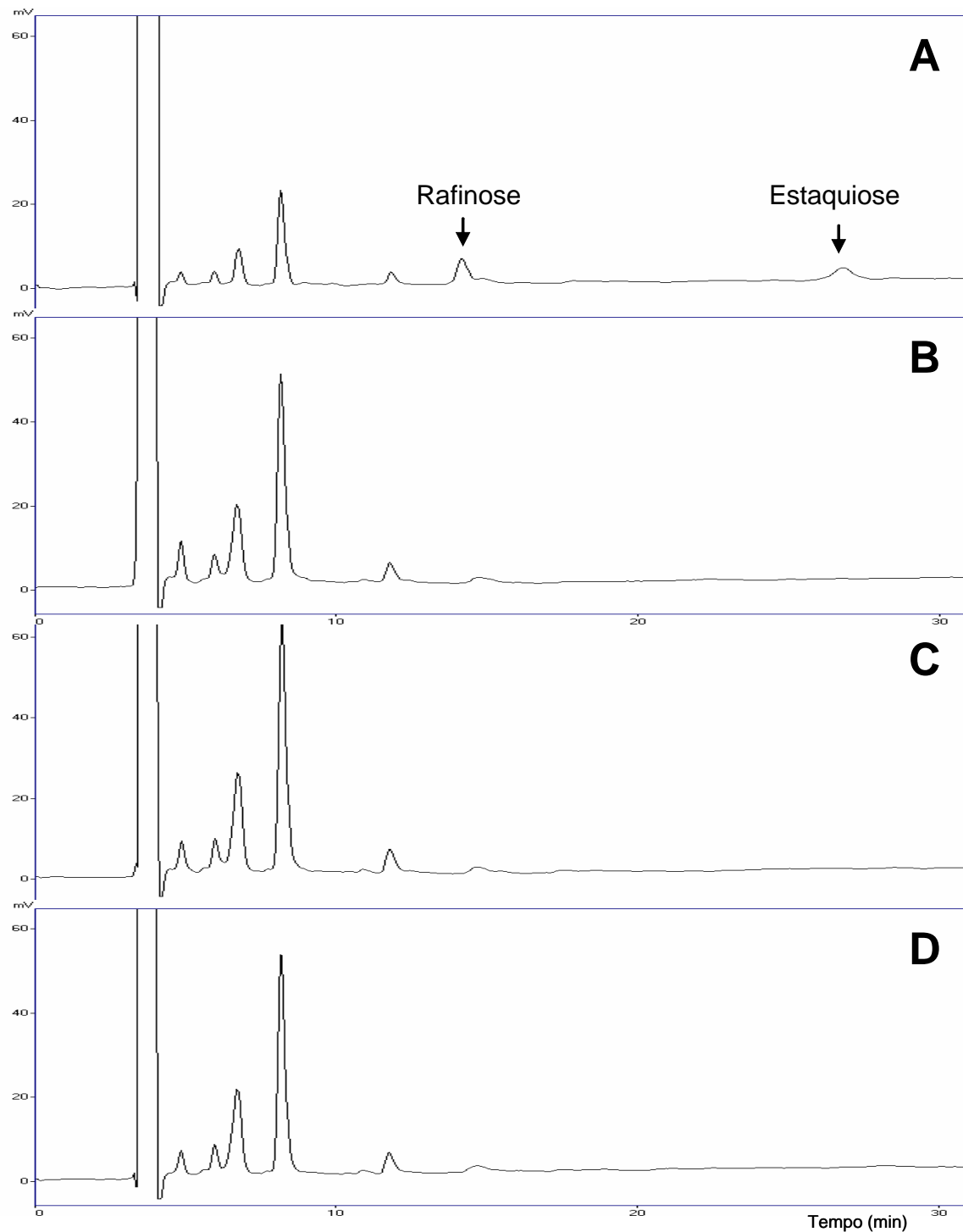


Figura 69 - Cromatograma comparativo da hidrólise de RO do leite de soja utilizando células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* contendo a α -galactosidase intracelular, nos tempos 0 h (A), 2 h (B), 4 h (C) e 6 h (D).

Tabela 14 - Porcentagem de hidrólise de RO no leite de soja utilizando células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* contendo a α -galactosidase intracelular.

Tempo de hidrólise (h)	Redução (%)	
	Rafinose	Estaquiase
0	0	0
2	52	100
4	65	100
6	70	100

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

Comparando-se a eficiência de hidrólise das enzimas extra e intracelulares de *D. hansenii* foi observado que, a primeira reduziu completamente os teores de rafinose e estaquiase presentes no leite de soja, após 4 h de incubação (Figura 68 e Tabela 13), enquanto que, a utilização das células permeabilizadas de *D. hansenii* contendo a enzima intracelular reduziu 52 e 100 % os teores de rafinose e estaquiase, respectivamente, nesse mesmo tempo (Figura 69 e tabela 14), e possivelmente com ação da enzima invertase. Apesar da maior eficiência de hidrólise dos RO exibida pela α -galactosidase extracelular purificada, a utilização das células permeabilizadas apresenta vantagens de custo e tempo. Portanto, modificações nas condições de uso das células poderia ser estudada, visando otimização do processo e eficiência comparável ao uso da enzima purificada.

6 Hidrólise dos RO utilizando a α -galactosidase extracelular imobilizada

Os ensaios de hidrólise com a α -galactosidase extracelular imobilizada foram realizados conforme descrição no item 3.14 e os demais procedimentos foram realizados como descrito anteriormente para a α -galactosidase extracelular.

Os resultados estão apresentados na Figura 70 e os valores das porcentagens de redução dos RO estão descritos na Tabela 15.

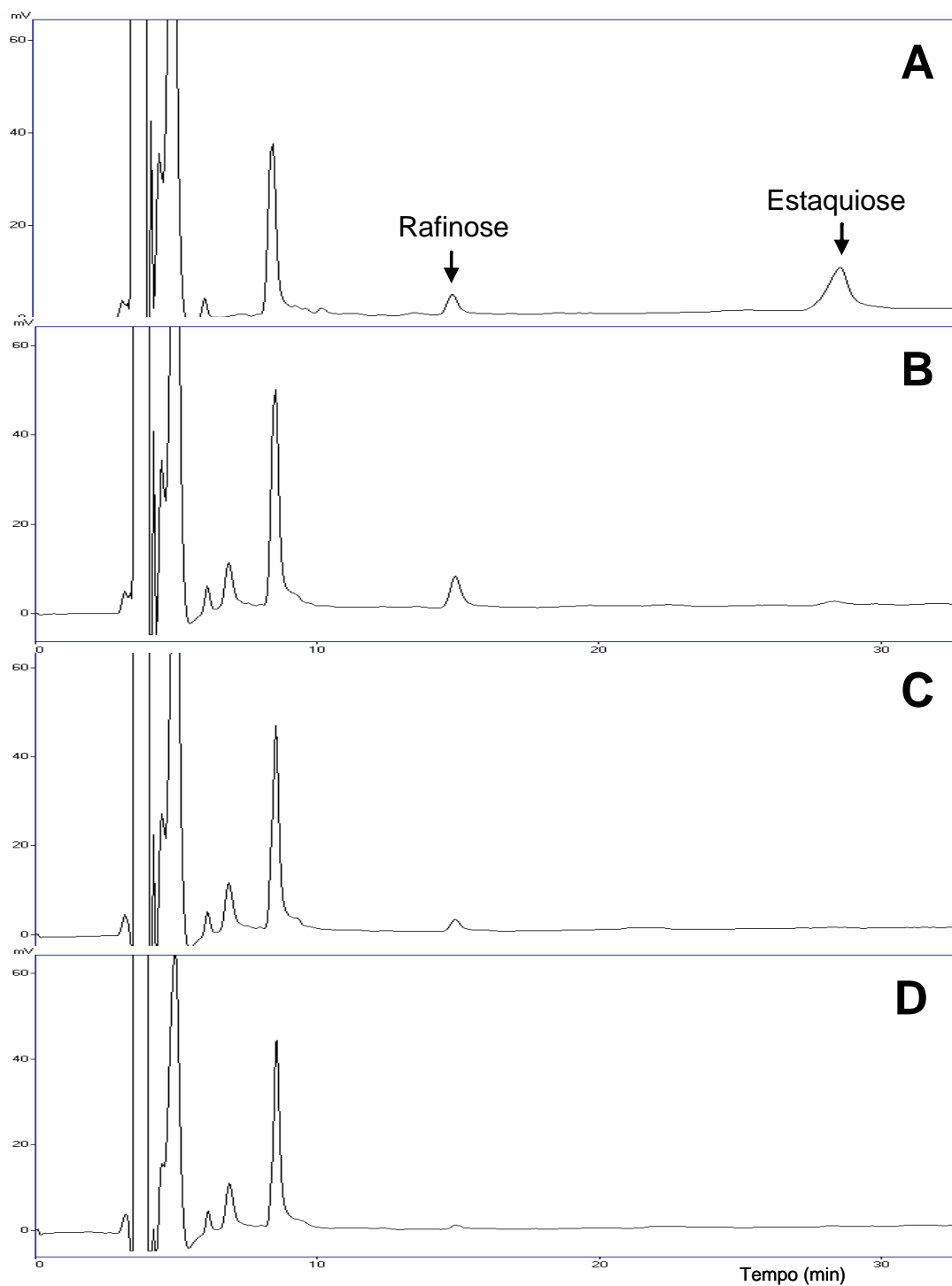


Figura 70 - Cromatograma comparativo da hidrólise de RO do leite de soja pela α -galactosidase extracelular imobilizada de *Debaryomyces hansenii*, nos tempos 0 h (A), 2 h (B), 4 h (C) e 10 h (D).

Tabela 15 - Porcentagem de hidrólise de RO no leite de soja pela α -galactosidase extracelular imobilizada de *Debaryomyces hansenii*.

Tempo de hidrólise (h)	Redução (%)	
	Rafinose	Estaquiose
0	0	0
2	0	88
4	25	100
10	63	100

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

De acordo com os dados da Tabela 15 foi verificado que a enzima imobilizada hidrolisou completamente os teores de estaquiose presentes no leite de soja, após 4 h de incubação. Já a enzima livre, hidrolisou esse oligossacarídeo após 2 h de incubação (Figura 68 e Tabela 13). Com relação ao oligossacarídeo rafinose, a enzima imobilizada reduziu 63 % dos teores desse açúcar presente no leite de soja, após 10 h de incubação, enquanto que após 4 h de incubação, houve hidrólise completa desse RO pela enzima livre.

A enzima imobilizada necessitou de um tempo maior para hidrolisar os oligossacarídeos presentes no leite de soja, comparada com a enzima livre. Esses resultados indicam que o processo de imobilização poderia ter provocado uma perda da afinidade da enzima pelo substrato. Vários trabalhos corroboram esta afirmação (ERGINER *et al.*, 2000; AHMAD; ANSWAR; SALEEMUDIDIN; TONRISEVEN; DOGAN, 2001). Essa perda de afinidade da enzima pelo substrato pode ser devida a alterações físicas e eletrostáticas provocadas pela ligação covalente das proteínas ao suporte. Outro fator de extrema importância que poderia explicar estas alterações é a difusão restrita do substrato através do complexo enzimático (ERGINER *et al.*, 2000).

Thippeswamy; Mulimani (2002), estudando hidrólise enzimática de RO presentes no leite de soja, pela α -galactosidase imobilizada e livre de *Gibberella fujikuroi*, verificaram que as enzimas livre e imobilizada hidrolisaram 91 e 71 % do açúcar rafinose, respectivamente. Apesar de a enzima livre ter

mostrado maior eficiência catalítica após 12 h de incubação, a imobilização permitiu a reutilização da enzima por várias vezes, enquanto que, a enzima livre foi sempre perdida após a realização dos ensaios.

4.5.1.2. Melaço de soja

A enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* também foi testada na redução dos RO nos produtos melaço leve e pesado de soja, conforme descrito no item 3.15.

O melaço de soja é o produto resultante da evaporação do álcool etílico, um solvente utilizado para a extração dos oligossacarídeos, durante o preparo de concentrados protéicos de soja. O processo de extração de RO arrasta um pouco de proteína juntamente com os açúcares (CALLEGARI, 2003). Comercialmente, os produtos melaço leve e pesado de soja são obtidos após a manutenção do melaço por 3 a 4 dias em repouso. Após este período, ocorre uma separação no fundo do tanque de decantação dos sólidos em solução aquosa. A fração do fundo, que se apresenta esbranquiçada, pela presença de proteínas, corresponde ao melaço pesado e, a fração superior, límpida, corresponde ao melaço leve. Os produtos melaço leve e pesado de soja contêm 3,89 e 5,45 mg de isoflavonas/g de melaço, respectivamente. A tabela 16 mostra os teores de açúcares presentes nesses produtos (CALLEGARI, 2003).

Tabela 16 - Teores de açúcares nos produtos melaço leve e pesado de soja.

Açúcares	Melaço leve (mg/g)	Melaço pesado (mg/g)
Frutose	3,02	13
Glicose	2,17	2,36
Sacarose	127	120
Rafinose	21,6	20
Estaquiose	62	56,2

Retirado de Callegari, 2003.

Os resultados dos tratamentos dos produtos melaço leve e pesado com a enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* estão apresentados nas

Figuras 71 e 72, respectivamente e os valores das porcentagens de redução dos RO estão mostrados na Tabela 17.

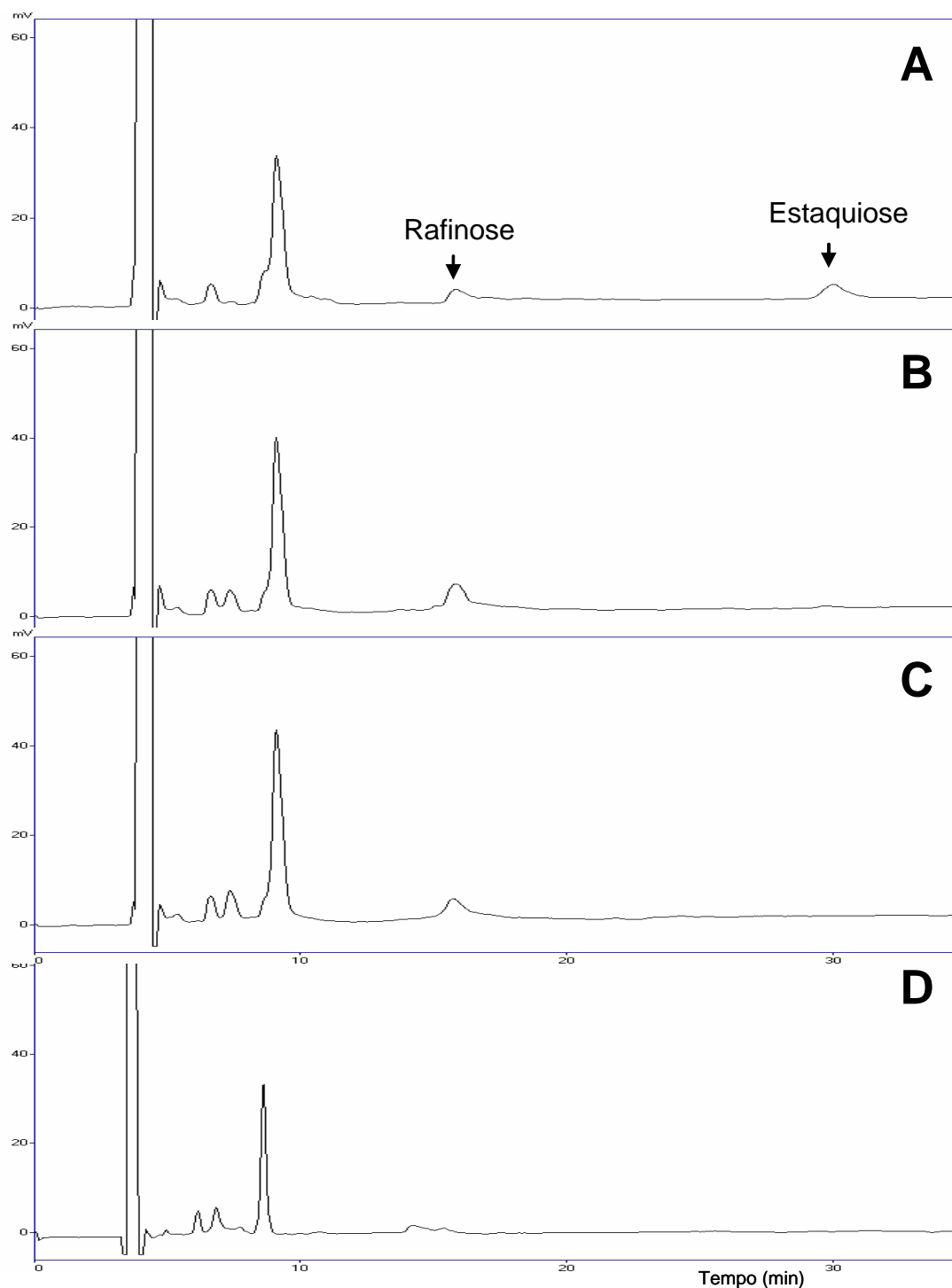


Figura 71 - Cromatograma comparativo da hidrólise de RO do produto melaço leve pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* nos tempos 0 h (A), 2 h (B), 4 h (C) e 6 h (D).

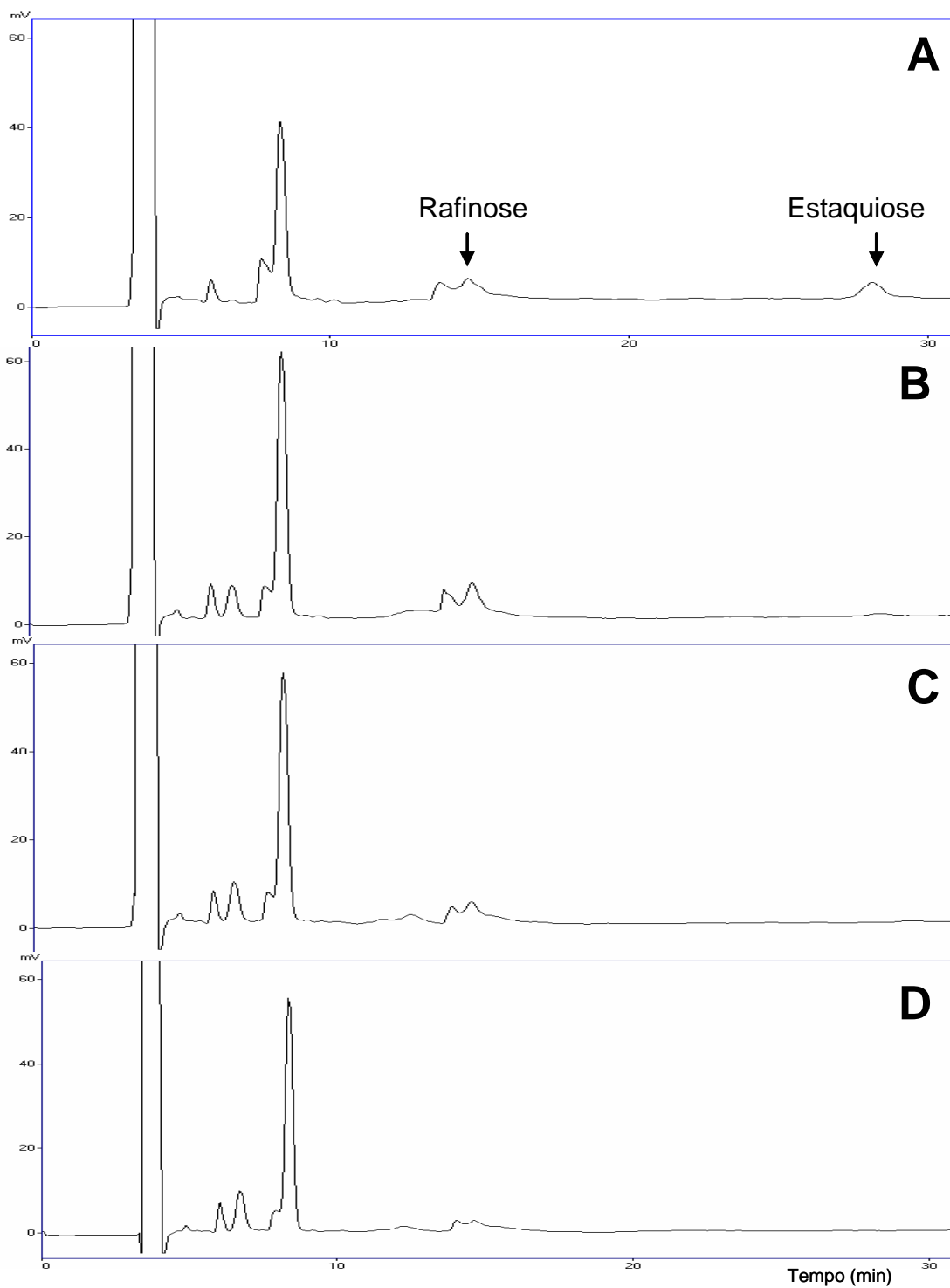


Figura 72 - Cromatograma comparativo da hidrólise de RO do produto melaço pesado pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*, nos tempos 0 h (A), 2 h (B), 4 h (C) e 6 h (D).

Tabela 17 - Porcentagem de hidrólise dos RO nos produtos melão leve e pesado pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*.

Tempo de hidrólise (h)	Melão leve Redução (%)		Melão pesado Redução (%)	
	Rafinose	Estaquiose	Rafinose	Estaquiose
0	0	0	0	0
2	11	100	0	100
4	21	100	26	100
6	58	100	46	100

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

Nos experimentos realizados com os produtos melão leve e pesado, foi observado que a enzima α -galactosidase extracelular reduziu completamente os teores de estaquiose presentes nos melões após 2 h de incubação. Entretanto, a enzima reduziu 58 e 46 % dos teores de rafinose nos produtos melão leve e pesado, respectivamente, após 6 h de incubação.

Callegari (2003) verificou que a enzima α -galactosidase semipurificada de sementes germinadas de soja da variedade Monarca foi mais eficiente na hidrólise dos teores de rafinose presentes nos melões, reduzindo 100 %, após 4 h de incubação, a 40 °C. Com relação ao oligossacarídeo estaquiose, a enzima de soja reduziu 58 e 50 % dos teores desse açúcar, nos produtos melão leve e pesado, respectivamente, após 6 h de incubação. Estes resultados indicam que, a enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* foi mais eficiente na hidrólise de estaquiose, em produtos derivados de soja comparada à enzima α -galactosidase de sementes germinadas de soja da variedade Monarca, que foi mais eficiente na hidrólise de rafinose.

Entretanto, como em sementes de soja e em seus produtos derivados, o teor de estaquiose é maior comparado ao de rafinose, é interessante que a enzima utilizada seja mais eficiente na hidrólise de estaquiose. Além disso, a hidrólise do tetrassacarídeo estaquiose pela α -galactosidase gera o trissacarídeo rafinose, que por sua vez, é novamente hidrolisado pela ação da

α -galactosidase, rendendo galactose e sacarose. Dessa forma, no processo de hidrólise dos RO em produtos derivados de soja pelas α -galactosidases de *D. hansenii* pode ter havido, em decorrência da hidrólise de estaquiose, um aumento temporário na concentração de rafinose, que provavelmente foi hidrolisado mais lentamente.

Portanto, as características das enzimas α -galactosidases de *Debaryomyces hansenii* são compatíveis com as exigências para o desenvolvimento de um processo de redução dos oligossacarídeos de rafinose presentes em produtos derivados de soja, como, leite e o melaço de soja.

5. CONCLUSÕES

- A levedura *Debaryomyces hansenii* produziu, em meio contendo galactose, uma α -galactosidase extracelular de massa molecular aproximada de $(58,8 \pm 0,03)$ kDa e uma forma intracelular de $(61,3 \pm 0,03)$ kDa.
- As α -galactosidases extra e intracelulares e, a extracelular imobilizada apresentaram atividades máximas em pH ácido e foram altamente termoestáveis.
- A α -galactosidase extracelular foi mais termoestável, comparada com a intracelular, mantendo 91 % de sua atividade original por 180 min, a 60 °C, entretanto, a α -galactosidase extracelular imobilizada foi mais termoestável do que as enzimas livres, mantendo 51 % de sua atividade original por 960 min, a 80 °C.
- As α -galactosidases extra e intracelulares tiveram redução total de suas atividades na presença de Cu^{+2} e redução em níveis diferentes, na presença de Ag^{+1} .

- As α -galactosidases extra e intracelulares apresentaram inibição por melibiose, dos tipos não-competitiva e competitiva, respectivamente, e apresentaram inibição por galactose, dos tipos não-competitiva e incompetitiva, respectivamente.
- As α -galactosidases extra e intracelulares demonstraram ser altamente seletivas, apresentando especificidades absolutas para a galactose em posição α .
- O N-terminal da α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* apresentou similaridade com α -galactosidases de diversos microrganismos.
- As α -galactosidases de *Debaryomyces hansenii* podem ser indicadas para uso no melhoramento das propriedades glicicas de polissacarídeos, uma vez que apresentaram atividade sobre esses substratos.
- As α -galactosidases extra e intracelulares e, a extracelular imobilizada da levedura *Debaryomyces hansenii* foram bastante eficientes na redução dos RO presentes em produtos derivados da soja, indicando que podem ser utilizadas industrialmente para o processamento desses açúcares.
- Após a imobilização, a α -galactosidase manteve sua capacidade de hidrolisar RO, viabilizando o uso desta enzima em biorreatores.

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.

ADYA, S.; ELBEIN, A.D. Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus niger*. purification and properties of α -galactosidase. **Journal of Bacteriology**, v.129, p.850-856, 1977.

AHMAD, S.; ANSWAR, A.; SALEEMUDIDIN, M. Immobilization and stabilization of invertase on *Cajanus cajan* lectin support. **Bioresearch Technology**, v.79, p.121-127, 2001.

ASLANIDIS, C., SCHIMID, K., SCHIMITT, R. Nucleotide sequence and operon structure of plasmid-borne genes mediating uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.6753-6763, 1989.

ASLANIDIS, C., SCHIMITT, R. Regulatory elements of the raffinose operon: nucleotide sequence of operator and repressor genes. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.2178-2180, 1990.

AZEVEDO, J.L. Genética de microrganismos em biotecnologia de engenharia genética/Coordenação de João Lúcio de Azevedo [et al.]. Piracicaba: **FEALQ** 1985. II 20, p.155-157, 1985.

BARNETT, J.A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyeen ex Reess: a short review for non-taxonomists. **Yeast** 8, p.1-23, 1992.

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

- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5ª edição, p.201, 2004.
- BIRK, Y. Protein protease inhibitors of plant origin and their significance in nutrition. In: **Workshop on Antinutritional Factors of Legumes**, Wageningen, 1989.
- BLOM, D.; SPEIJER, D.; LINTHORST, G.E.; DONKER-KOOPMAN, W.G.; STRIJLAND, A.; AERTS, J.M. Recombinant enzyme therapy for disease: absence of editing of human alpha-galactosidase A mRNA. **American Journal Human Genetics**, v.72, p.23-31, 2003.
- 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.
- BOLUMAR, T.; SANZ, Y.; ARISTOY, M.C.; TOLDRÁ, F. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.227-232, 2002.
- BOSLEY, J.A.; PEILOW, A.D. Immobilization of lipases on porous polypropylene:reduction in esterification efficiency at low loading. **Journal of American Oil Chemists**, v.74, p.107-111, 1997.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BURKARDT, H.J.; MATTES, R.; SCHMID, K.; SCHMITT, R. Properties of two conjugative plasmids mediating tetracycline resistance, raffinose catabolism and hydrogen sulfide production in *Escherichia coli*. **Molecular and General Genetics**, v. 166, p.75-84, 1978.
- BURROWS, S. Baker's yeast. In: Rose, A.H. **Economic Microbiology**. London: Academic Press, p.31-64, 1979.
- CALLEGARI, C. M. **Hidrólise enzimática de oligossacarídeos de rafinose em produtos de soja por α -galactosidases**. Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG, p.49. (Tese M.S), 2003.
- CÂNDIDO, L.M.B.; CAMPOS, A.M. **Alimentos para fins especiais dietéticos**. São Paulo: Livraria varela, 423p, 1995.
- CAVAZZONI, V.; ADAMI, A.; CRAVERI, R. α -Galactosidase from the yeast *Candida javanica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.555-559, 1987.
- CHIBATA, L. Production of L-amino acids. **Immobilized Enzymes: Research and Development**, New York, USA, John Wiley and Sons, p.168-178, 1978.
- CHIBATA, L.; WINGARD, L.B.J. Immobilized microbial cells. **Applied Biochemistry and Bioengineering**, v.4, p.1-11, 1983.

CHURCH, F.C.; MEYER, S.P. α -Galactosidase from *Pichia guilliermondii*. **Mycologia**, v.72, p.279-287, 1980.

CIVAS, A.R.; EBERHARD, P.L.; DIZEL; PETEK, F. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii* mycelial α -D-galactosidases. **Biochemistry Journal**, v.219, p.849-855, 1984.

COOK, P.E. Fungal ripened meats and meat products. In G. Campbell-Platt and P.E. Cook (ed.); **Fermented meats**. Chapman e Itall, London, United Kingdom, p.110-129, 1995.

COON, C.N.; LESKE, K.L.; AKAVANICHAN, O.; CHENG, T.K. Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters. **Poultry Science**, v.69, p.787-793, 1990.

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

CRUZ, R.; BATISTELA, J.C.; WOSACKI, G. Microbial α -galactosidase from milk processing. **Journal of Food Science**, v. 46, p.1196-1200, 1981.

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

DE LA FUENTE, G.E.; SOLS, A. Biochemistry Biophysic Acta, v.56, p.49-62, 1962. In: LAZO, P.S.; OCHOA, A.G.; GASCÓN, S. α -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*: cellular localization and purification of the external enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v.77, p.375-382, 1976.

DELENTE, J.; JONHSON, J.H.; KUO, M.J.; O'CONNOR, R.J.; WEEKS, L.E. Production of a new thermostable neutral α -galactosidase from a strain of *Bacillus stearothermophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.16, p.1227-1243, 1974.

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

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

DESJARDINS, M.L.; ROY, D.; GOULET, J. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. **Journal Dairy Science**, v.73, p.299-307, 1990.

DEY, P.M. Biochemistry of galactosidic linkages in the Plant Kingdom. **Advanced Carbohydrates Biochemistry**, v.37, p.273-283, 1980.

- DEY, P.M. In: DEY, P.M.; DIXON, R.A. Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants, **New York: Academic Press**, p.53-129, 1985.
- DEY, P.M. In: Methods in plant biochemistry. **London: Academic Press**, p.189-218, 1990.
- DEY, P.M.; PATEL, S.; BROWNLEADER, M.D. Induction of α -galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyanopsis tetragonobola*) gum. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.17, p.361-371, 1993.
- DEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. Biochemistry of α -galactosidases. **Advances Enzymology**, v.36, p. 91-130, 1972.
- DIXON, M. **Biochemistry Journal**, v.55, p.170-171, 1953.
- D'SOUZA, S.F.; GODBALE, S.S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. **Journal Biophysical Methods**, v.52, p.59-62, 2002.
- DUFFAUD, G.D.; MCCUTCHEN, C.M.; LEDUC, P.; PARKER, K.N.; KELLY, R.M. Purification and characterization of extremely thermostable β -mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.169-177, 1997.
- DUFFUS, C.M.; SLAUGHTER, J.C. Seeds and their uses. **New York: John Wiley**, p.1-34, 1980.
- DUJON B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G.; DURRENS, P.; CASAREGOLA, S. G. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v.430, p.35-44, 2004.
- DURÁ, A.; FLORES, M.; TOLDRÁ, F. Purification and characterization of a glutaminase from *Debaryomyces hansenii* sp. **International Journal Food Microbiology**, v.76, p.117-126, 2002.
- EMBRAPA SOJA. <http://www.Cnpso.embrapa.br/sgnum>. Londrina, PR, 2003.
- ENCINAS, J.P.; LOPES-DÍAZ, T.M.; GARCIA-LOPEZ, A.O.; MORENO, B. Yeast populations on Spanish fermented sausages. **Meat Science**, v.54, p.203-208, 2000.
- ERGINER, R.; TOPPARE, L.; ALKAN, S.; BAKIR, U. Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. **Reactive and Functional Polymers**, v.45, p.227-233, 2000.
- ETTABIBI, M.; BARATTI, J.C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized from *Aspergillus ficuum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.596-601, 2001.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry: A Textbook**, 3 ed., Cap. 1, 2 e 3, Berlin, Germany, Springer-Verlag, 1997.

FALKOSKI, D.L.; GUIMARÃES, V.M.; QUEIROZ, M.V.; BARROS, E.G.; DE REZENDE, S.T. Immobilization of α - galactosidase of *Penicillium griseoroseum* for the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, XXXIII Reunião Anual SBBq 2004, Caxambú, MG, **Anais eletrônicos**, Caxambu, 2004, 1 CD ROOM.

FLEET, G.H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.101-117, 1999.

FLOREZ, I.G.; LAZO, P.S.; OCHOA, A.G.; GASCÓN, S. The specificity of induction of α - galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. **Biochemical et Biophysical Acta**, v.674, p.71-77, 1981.

FRIDJONSSON, O.; WATZLAWICH, H.; GEHWEILER, A.; MATTES, R. Thermostable α - galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB 3621: cloning , sequencing and characterization. **FEMS Microbial. Letters**, v.176, p.147-153, 1999.

FRIIS, J.; OTTOLENGHI, P. C.R. Trav.Lab.Carlsberg., V.31, P.272-281, 1959. In: LAZO, P.S.; OCHOA, A.G.; GASCÓN, S. α -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*: cellular localization and purification of the external enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v.77, p.375-382, 1976.

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

GADAGA, T.H.; MUTUKUMIRA, A.N.; NARVHUS, J.A. Enumeration and identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. **International Dairy Journal**, v.10, p.459-466, 2000.

GARRO, M.S.; DE GIORI, G.S.; DE VALDEZ, G.F.; OLIVER, G. Characterization of α - galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.485-488, 1993.

GARRO, M.S.; DE GIORI, G.S.; DE VALDEZ, G.F.; OLIVER, G. α -D-Galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, p.16-19, 1994.

GASENT-RAMIREZ, J.M.; CODON, A.C., BENITEZ, T. Characterization of genetically transformed *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts able to metabolize melibiose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p.2113-2121, 1995.

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

GOTE, M.; 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.

GUIMARÃES, V.M. **Purificação e caracterização de α -galactosidase de sementes de soja em germinação e seu uso para hidrólise de oligossacarídeos**. Universidade de Brasília - Brasília, DF, p.161. (Tese D.S), 2001.

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

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPPSSON, K.S.; PRIOR, B. Biochemistry and physiology of xilose fermentation by yeasts. **Enzyme Microbial Technology**, v.16, p.933-943, 1994.

HAKAMATA, W.; NISHIO, T.; OKU, T. Hydrolytic activity of α -galactosidases against deoxy derivatives of p-nitrophenil- α -D-galactopyranoside. **Carbohydrates Research**. V.324, p. 107-115, 2000.

HARO, R.; BANNELOS, M.A.; QUINTERO, F.J.; RUBIO, F.; RODRIGUEZ-NAVARRO, A. Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. **Physiology Plant**, v.89, p.868-874, 1993.

HARTMEIER W. **Immobilizes Biocatalysis-An Introduction**, Cap 1 e 2, Berlin, Germany, Springer-Verlag, 1998.

HASHIMOTO, H.; KATAYAMA, C.; GOTO, M.; KITAHATA, S. Purification and some properties of α -galactosidase from *Pseudomonas fluorescens*. H-601; **Agricultural Biology Chemistry**, v.55, p.2831-2838, 1991.

HASHIMOTO, H.; KATAYAMA, C.; GOTO, M.; KITAHATA, S. Purification and some properties of α -galactosidase from *Candida guilliermondii*. H-404. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.57, p.372-378, 1993.

HASHIMOTO, H.; KATAYAMA, C.; GOTO, M.; OKINAGA, T.; KITAHATA, S. Transgalactosilation catalyzed by α -galactosidase from *Candida guilliermondii*. H-404, **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, p.619-623, 1995.

HENSING, M.C.M.; BANGMA, K.A.; RAAMSDONK, L.M.; HULSTER, E.; DIJEN, J.P.; PRONK, J.T. Effects of cultivation conditions on the production of heterologous α -galactosidase by *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.43, p.58-64, 1995.

HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural Biology Chemistry**, v.53, p.667-673, 1989.

HYAMS, D. Curve Expert 1.3: A comprehensive curve fitting system for Windows. Copyright ©, 1997.

ISHIGURO, M.; KANEKO, S.; KUNO, A.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, S.; PARK, G-G.; SAKAKIBARA, Y.; KUSAKABE, I.; KOBAYASHI, H. Purification and characterization of the recombinant *Thermus* sp. strain T2 α -galactosidase expressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1601-1606, 2001.

JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**, v.6, p.755-768, 1996.

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

JOHNSON, M.; CARLSON, M. Regulation of carbon and phosphate utilization. In: JONES, E.W.; PRINGLE, J.R.; BROACH, J.R. **Molecular and Cellular Biology of the yeast *Saccharomyces***, ed. Cold Spring harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.2, p.193-281, 1992.

KANG, H.C.; LEE, S.H. Characteristics of an α -galactosidase associated with grape flesh. **Phytochemistry**, v.58, p. 231-239, 2001.

KAWAMURA, S.; TADA, M. Isolation and determination of sugars from the cotyledon, hull and hypocotyl of soybeans by carbon column chromatography. **Technology Bulletin Fac. Agricultural Kagawa University**, v.18, p.138-141, 1967.

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

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

KIM, W.J.; SMITH, C.J.B.; NAKAYAMA, T.O.M The removal of oligosaccharides from soybeans. **Lebensm-Wiss. Technology**, v.6, p.201-204, 1973.

KING, M.R.; YERNOOL, D.A.; EVELEIGH, D.E.; CHASSY, B.M. Thermostable α -galactosidase from *Thermotoga neapolitana*: cloning, sequencing and expression. **FEMS Microbiology Letters**, v.163, p.37-42, 1998.

KOBAYASHI, H.; SUZUKI, H. Studies on the decomposition of raffinose by α -galactosidase of mold. **Journal Fermentation Technology**, v.50, p.625-632, 1972.

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

KOTWAL, S.M.; GOTE, M.M.; SAINKAR, S.R.; KHAN, M.I.; KHIRE, J.M Production of α -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp. In solid-state fermentation and its application in soymilk hydrolysis. **Process Biochemistry**, v.33, p.337-343, 1998.

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

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

LAZO, P.S.; OCHOA, A.G.; GASCÓN, S. α -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*: cellular localization and purification of the external enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v.77, p.375-382, 1976.

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

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

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

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.

MALANCHUK, V.M.; BUGLOVA, T.T.; VARBANETS, L.D. Study of functional groups in the active center of alpha-galactosidase of *Penicillium* sp. 23. **Microbiology Z.**, v.63, p.9-18, 2001.

- MANSOUR, E.H.; KHALIL, A.H. Reduction of raffinose oligosaccharides in chickpea (*Cicer aritinum*) flour by crude extracellular fungal α -galactosidase. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.78, p.175-181, 1998.
- MARANVILLE, E.; ZHU, A. The carboxyl terminus of coffee bean alpha-galactosidase is critical for enzyme activity. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.373, p.225-230, 2000.
- MARGOLLES-CLARK, E.; TENKANEN M.; LUONTERI, E.; PENTILLÄ, M. Three α -galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. **European Journal Biochemistry** v. 240, p.104-111, 1996.
- MATHEW, C.D.; BALASUBRAMANIAM, K. Mechanism of action of α -galactosidase. **Phytochemistry**, v.26, p.1299-1300, 1987.
- McLLVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Biochemistry**, v.49, p.183-186, 1921.
- MELCHER, K.; XU, H.E. Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal 4p binding sites is required for complete GAL gene repression. **The EMBO Journal**, v.20, p.841-851, 2001.
- MEL.ELLAN, W.I.; LAMPEN, J.O. *Biochemistry Biophysic Acta*, v.67, p.324-326, 1963. In: LAZO, P.S.; OCHOA, A.G.; GASCÓN, S. α -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*: cellular localization and purification of the external enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v.77, p.375-382, 1976.
- MEYER, H.; REID, J.S.G. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: LOEWUS, F.A.; TANNER, W.; editors. **Encyclopedia of Plant Physiology**, v.13^a Berline: Springer Verlag, p.418-471, 1982.
- MILAGRES, B.G. **Desenvolvimento de biossensores para determinação de salicilato e glicose**. Campinas, SP:UNICAMP, 133p. (Tese D.S), 1996.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1956.
- MISTSUTOMI, M.; HONDA, J.; OHTAKARA, A. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides by the condensation action of thermostable α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Nipon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v.38, p.722-728, 1991.
- MITAL, B.K.; STEINKRAUS, K.H. Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soy milk. **Journal Food Science**, v.40, p.114-118, 1975.

MONTEIRO, M.R.P. **Avaliação bioquímica e nutricional do extrato hidrossolúvel obtido de farinha de soja desengordurada e emulsificada.** Viçosa, MG: UFV, p. 56 (Tese M.S), 2000.

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

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

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

NOBRE, A.; LUCAS, C.; LEÃO, C. Transport and Utilization of Hexoses and Pentoses in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.35494-3598, 1999.

ODA, Y.; TONOMURA, K. Purification and characterization of invertase from *Torulaspota pretoriensis* YK-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, p.1155-1157, 1994.

ODA, Y.; TONOMURA, K. α -Galactosidase from the yeast *Torulaspota delbrueckii* IFO 1255. **Department of Food Science and Technology**, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima, Japan, 1995.

OLAFUR, F.; HILDEGARD, W.; AXEL, G.; RALF, M. Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB 3621: cloning, sequencing and characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v.176, p.147-153, 1999.

OLENSEN, P.T.; STAHNKE, L. The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. **Meat Science**, v.56, p.357-368, 2000.

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

PAICE, M.G; JURASEK, L. Removing hemicellulose from pulps by specific enzyme hydrolysis. **Journal Food Chemistry Technology**, v.4, p.187-198, 1984.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J.M. Production of xylitol from raw wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii* NRRLY-7426. **Bioprocess Engineering**, v.13, p.125-131, 1995.

PEREIRA, E. B. **Lipase livre e imobilizada em quitosana: caracterização e potencial de aplicação em reações de hidrólise e síntese.** Maringá, PR: UEM, 127p. (Tese M.S), 1999.

- PETERSEN, K.M.; WESTALL, S.; JESPERSEN, L. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surface-ripened cheeses, **Journal Dairy Science**, v.85, p.478-486, 2002.
- PHAFF, H.J. Abstr. 9 th. International Congress Microbiology, p.93, 1966. In: LAZO, P.S.; OCHOA, A.G.; GASCÓN, S. α -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*: cellular localization and purification of the external enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v.77, p.375-382, 1976.
- PORTER, J.E.; HERMANN, K.M.; LADISCH, M.R. Integral Kinetics of α -galactosidase purified from Glycine max for simultaneous hydrolysis of stachyose and raffinose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.15-22, 1991.
- POSADA, B.I.S.M. Biodisponibilidade de isoflavonoides de soya y sus implicaciones el la salud. **Revesta Soyanoticias, Caracas**, v.27, p.1-5, 1998.
- PRICE, K.R.; LEWIS, J.; WYATT, G.M.; FENWICK, G.R. Flatulence-causes, relation to diet and remedies. **Nahrung**, v.32, p.609-626, 1988.
- PRIOR, B.A.; KILLIAN, S.G.; DU PREEZ, J.C. Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v.89, p.21-32, 1989.
- PRISTA, C.; ALMAGRO, A.; DIAS, M.C.; RAMOS, J. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4005-4009, 1997.
- PUCHART, V.; VRSANSKÁ, M.; BHAT, M. K.; BIELY, P. Purification and characterization of α -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochemical et Biophysical Acta**, v.1524, p.27-37, 2000.
- REIS, A.P.; GUIMARÃES, V.M.; QUEIROZ, J.H.; OLIVEIRA, M.G.A.; FERREIRA, J.G.; DE REZENDE, S.T. Multiple α - galactosidasas from *Aspergillus terreus*: production, purification and biochemical and kinetic characterization. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, XXXIII Reunião Anual SBBq 2004, Caxambú, MG, **Anais eletrônicos**, Caxambu, 2004, 1 CD ROOM.
- RIBEIRO, M. **Estabelecimento de um método colorimétrico para determinação da atividade da galactinol sintase, purificação parcial e caracterização da enzima de sementes de soja**. Universidade de Brasília, Brasília- DF, p.125. (Tese D.S), 2001.
- RICHARDSON, M. Protein inhibitors of enzymes. **Food Chemistry**, v.6, p.235-253, 1981.

RIOS, S.; MONISTROL, I.F.; LABORDA, F. Effect of tunicamycin on α -galactosidase secretion by *Aspergillus nidulans* and the importance of N-glycosylation. **FEMS Microbiology Letters**, v.120, p.169-176, 1994.

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

ROHM, H.R.; LECHNER, F.I.; BRÄUER, M. Diversity of yeasts in selected dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.370-376, 1992.

ROSEIRO, J.C.; PEITO, M.A.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. **Archives Microbiology**, v.156, p.484-490, 1991.

ROSENOW, C.; MANIAR, M.; TRIAS, J. Regulation of the α -galactosidase activity in *Streptococcus pneumoniae*: Characterization of the raffinose utilization system. **Genome Research**, v.9, p.1189-1197, 1999.

ROUWENHRST, R.J.; RITMEESTER, W.S.; SCHEFFERS, W.A.; VAN-DIJKEN, J.P. Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3329-3336, 1990.

RUOHOLA, H.; LILJESTROMI, P.L.; TORKELLI, T.; KOPU, H.; LEHTINEN, P.; KALKKINEN, N.; KORHOLA, M. Expression and regulation of the yeast MEL 1 gene. **FEMS Microbiology Letters**, v.34, p.179-185, 1986.

SAHABALIN, D.A.; KULMINSKAYA, A.A.; SAVEL'EV, A.N.; SHISHKYANNIKOV, S.M.; SKONSTANTIN, K.N.; 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.

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

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

SCALABRINI, P.; ROSSI, M.; SPETTOI, P.; MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.213-219, 1998.

SCHMID, K. SCHMITT, R. Raffinose metabolism in *Escherichia coli* K12. Purification and properties of a new α -galactosidase specified by a transmissible plasmid. **European Journal of Biochemistry**, v.114, p.477-481, 1976.

- SEGEL, I. H. **Bioquímica. Teoria e Problemas.** Cap. 4 – Enzimas, 1979.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações,** p.216-228, 1996.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.15, p.76-85, 1985.
- SORENSEN, B.B.; SAMUELSEN, H. The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat of meat starter culture organism, *Staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. **International Journal Food Microbiology**, v.32, p.59-71, 1996.
- SRIPUAN, T.; KAZUHIRO, A.; YAMAMOTO, K.; TONGKAO, D.; KUMAGAI, H. Purification and characterization of thermostable α -galactosidase from *Ganoderma lucidum*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.67, p.1485-1491, 2003.
- STEGGERDA, F.R.; DIMMICK, J.F. Effect of bean diet on concentration of carbon dioxide in flatus. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.19, p.120-124, 1966.
- STENBERG, D.; VIJAYKUMAR, P.; REESE, E.T. β -glucosidase: microbiology of production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Canadian Journal Microbiology**, v.23, 139-147, 1970.
- SUAREZ, F.L.; SPRINGFIELD, J.; FURNE, J.K.; LOHRMANN, T.T.; KERR, P.S.; LEVITT, M.D. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, n.1, p.135-139, 1999.
- SUGIMOTO, H.; VAN BUREN, J.P. Removal of oligosaccharides from soymilk by enzyme from *Aspergillus saitoi*. **Journal Food Science**, v.35, p.655, 1970.
- SUZUKI, H.; LI, S.C.; LI, Y.T. α -Galactosidase from *Mortierella vinacea* crystallization and properties. **Journal Biology Chemistry**, v.245, p.781-786, 1970.
- TANRISEVEN, A.; DOGAN, S. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. **Process Biochemistry**, v.36, p.101-183, 2001.
- THANANUNKUL, D.; TANAKA, M.; CHIEHESTER, C.O.; LI, T. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of α -galactosidase within polyacrylamide gel. **Journal Food Science**, v.41, p.173-175, 1976.
- THIPPESWAMY, J.S.; MULIMANI, V.H. Enzymatic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujiduroi*. **Process Biochemistry**, v.38, p.635-640, 2002.

- TOENIENESSEN, G.H. Plant molecular biology and the international agricultural research system. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.3, p.1-11, 1985.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**, 6^a edição, p.322;328;753, 2002.
- TUNTURK, A.; ARSLAN, F.; DISLI, A.; TUFANN, Y. Immobilization of invertase attached to a granular dimmer acid-co-alkyl polyamine. **Food Chemistry**, v.69, p.5-9, 2000.
- TURAKAINEN, H.; HANKAANPAA, M.; KORHOLA, M.; AHO, S. Characterization of MEL genes in the genus *Zygosaccharomyces*. **Yeast**, v.10, p.733-745, 1994.
- TURAKAINEN, H.; KORHOLA, M.; AHO, S. Cloning, sequence and chromosomal location of a MEL gene from *Saccharomyces carlsbergensis* NCYC 396. **Gene**, v.101, p.97-104, 1991.
- ULEZLO, I.V.; ZAPROMELOVA, O.M. Microbial α -galactosidase (a review). **Applied Biochemistry Microbiology**, v.18, p.1-12, 1982.
- USDA (<http://www.soystats.com/2003>), 2003.
- VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Review**., v.32, p.199-224, 1986.
- VAN ZYL, C.B.; PRIOR, B. A.; KILLIAN, S.G.; KOCK, J.L. D-xylose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Gene Microbiology**, v.135, p.2791-2798, 1989.
- VAN ZYL, C.B.; PRIOR, B. A.; BRANDT, V. Role of D-ribose in D-xylose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.1487-1494, 1993.
- VARBANETS, L.D.; MALANCHUK, V.M.; BUGLOVA, T.T.; KUHLMANN R.A. *Penicillium* sp.23 α -galactosidase: purification and substrate specificity. **Carbohydrate Polymers**, v.44, p.357-363, 2001.
- VIANA, S.F. **Caracterização de α -galactosidase de soja para hidrólise de oligossacarídeos de rafinose**. Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG, p.65. (Tese M.S), 2002.
- XU, H.; LI, M.; HE, B. Immobilization of *Candida cylindracea*. Lipase on methyl acrylate-divinyl benzene copolymer and its derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.194-199, 1995.
- WAGNER, J.R.; BECKER, R.; GUMBMAN, R.; OLSON, A.C. Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose, oligosaccharides-free bean residue. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v.56, p.3-13, 1976.

WHEELER, G.E.; ROSE, A.H. *Journal Gen. Microbiology*, v.74, p.189-192, 1973. In: LAZO, P.S.; OCHOA, A.G.; GASCÓN, S. α -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*: cellular localization and purification of the external enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v.77, p.375-382, 1976.

WHITE, D.; HEGEMAN, G. D. **Microbial physiology and biochemistry laboratory a quantitative approach**, p. 6-7, 1998.

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

WINGARD, L.B. Enzyme Engineering. In: **Advances in Biochemical Engineering**, n.2, p.1-48. Springer Verlag, New York, 1972.

YOSHIDA, S.; TAN, C.H.; SHIMOKAWA, T.; TURAKAINEN, H.; KUSAKABE, I. Substrate specificities of α -galactosidases from yeasts. Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v 61, p.359-361, 1997.

ZANIN, G.M.; DE MORAES, F.F. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Suraia Said e Rosimeire C.L.R. Pietro-Ribeirão Preto: Legis Summa, p.56, 2004.

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

ZEILINGER, S.; KRISTUFEK, D.; ARISAN-ATAC, I.; HODITS, R.; KUBICEK, C.P. Conditions for formation, purification and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. **Applied and 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**, v.140, p.227-231, 1994.

7. APÊNDICE

APÊNDICE A

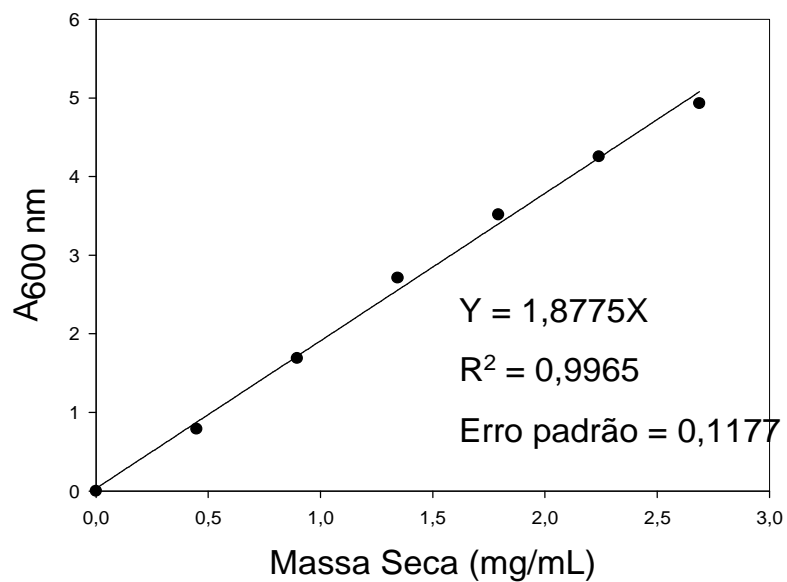


Figura 1A: Curva de calibração utilizada na definição da massa seca correspondente a uma unidade de absorbância (A).

APÊNDICE B

Tabela 1B: Atividade de α -galactosidase extracelular (U/mL) no meio de cultura YP de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,052	0,137	0,187	0,042	0,022	0,162
27	0,249	0,259	0,990	0,260	0,089	0,770
36	0,250	0,344	0,704	0,346	0,078	0,920
48	0,830	0,523	1,285	0,968	0,161	0,235

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 2B: Atividade de α -galactosidase extracelular (U/mg proteína) no meio de cultura YP de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	1,58	1,37	3,90	2,63	0,155	12,46
27	1,24	1,54	4,32	1,45	0,212	3,63
36	2,34	6,62	10,20	3,26	0,207	3,95
48	3,05	4,93	5,02	3,97	0,232	3,56

1U: 1 μ mol de p-NP formado por minuto

Tabela 3B: Atividade de α -galactosidase extracelular (U/mg célula) no meio de cultura YP de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,009	0,029	0,053	0,010	0,007	0,037
27	0,034	0,035	0,144	0,037	0,021	0,104
36	0,031	0,042	0,083	0,047	0,015	0,118
48	0,103	0,071	0,176	0,148	0,043	0,034

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 4B: Atividade de α -galactosidase extracelular (U/mL) no meio mineral com extrato de levedura (MME) de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,024	0,070	0,161	0,021	0,043	0,139
27	0,064	0,063	0,518	0,140	0,131	0,252
36	0,066	0,113	0,438	0,141	0,215	0,260
48	0,071	0,105	0,758	0,149	0,258	0,202

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 5B: Atividade de α -galactosidase extracelular (U/mg proteína) no meio mineral com extrato de levedura (MME) de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,750	2,258	1,77	0,700	0,194	1,53
27	4,267	4,20	10,79	4,118	2,98	7,64
36	3,143	8,071	6,26	8,294	2,42	6,67
48	4,733	8,750	8,61	6,478	2,15	10,63

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 6B: Atividade de α -galactosidase extracelular (U/mg célula) no meio mineral com extrato de levedura (MME) de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,009	0,036	0,054	0,010	0,019	0,051
27	0,024	0,023	0,094	0,046	0,039	0,052
36	0,025	0,039	0,101	0,050	0,066	0,059
48	0,027	0,042	0,189	0,061	0,100	0,061

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 7B: Atividade de α -galactosidase extracelular (U/mL) no meio mineral (MM) de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,029	0,101	0,182	0,017	0,063	0,160
27	0,076	0,163	0,016	0,027	0,004	0,016
36	0,107	0,008	0,088	0,001	0,003	0,051
48	0,054	0,023	0,453	0,004	0,051	0,371

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 8B: Atividade de α -galactosidase extracelular (U/mg célula) no meio mineral (MM) de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,053	0,192	0,288	0,063	0,246	0,181
27	0,095	0,115	0,088	0,022	0,001	0,005
36	0,118	0,004	0,079	0,000	0,001	0,021
48	0,036	0,008	0,566	0,003	0,023	0,240

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 9B: Atividade de α -galactosidase extracelular (U/mL) no meio mínimo YNB com sulfato de amônio (0,5 %) de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,0	0,0	0,014	0,0	0,030	0,0
27	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
36	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

APÊNDICE C

Tabela 1C: Atividade de α -galactosidase intracelular (U/mL) no meio de cultura YP de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,274	0,380	0,281	0,395	0,360	0,538
27	1,605	2,434	2,761	2,356	1,757	3,510
36	2,966	3,407	4,158	3,580	1,846	2,936
48	3,278	4,279	4,867	5,275	1,262	4,633

1U:1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 2C: Atividade de α -galactosidase intracelular (U/mg célula) no meio de cultura YP de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,059	0,094	0,087	0,106	0,172	0,142
27	0,240	0,360	0,441	0,370	0,476	0,515
36	0,404	0,462	0,542	0,547	0,404	0,417
48	0,451	0,630	0,746	0,918	0,338	0,746

1U:1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 3C: Atividade de α -galactosidase intracelular (U/mL) no meio mineral com extrato de levedura (MME) de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,157	0,383	0,473	0,663	0,172	0,419
27	0,880	0,686	2,715	2,052	0,805	1,375
36	1,152	0,744	2,055	1,515	0,603	1,256
48	0,695	0,666	3,109	1,406	1,196	1,061

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 4C: Atividade de α -galactosidase intracelular (U/mg célula) no meio mineral com extrato de levedura (MME) de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,058	0,198	0,158	0,323	0,076	0,153
27	0,332	0,247	0,494	0,671	0,241	0,282
36	0,435	0,256	0,473	0,536	0,185	0,283
48	0,265	0,265	0,775	0,572	0,463	0,322

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 5C: Atividade de α -galactosidase intracelular (U/mL) no meio mineral (MM) de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,186	0,179	0,107	0,112	0,115	0,244
27	0,295	0,703	1,080	0,331	0,347	1,380
36	0,526	0,506	1,581	0,409	0,425	1,819
48	0,638	1,189	0,904	0,296	0,811	2,533

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min

Tabela 6C: Atividade de α -galactosidase intracelular (U/mg célula) no meio mineral (MM) de *Debaryomyces hansenii* crescida a 30 °C, por vários tempos em diferentes fontes de carbono (1 %).

Tempo (h)	Açúcares					
	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiose	Rafinose
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,339	0,342	0,169	0,414	0,449	0,276
27	0,369	0,496	0,517	0,270	0,086	0,443
36	0,579	0,223	1,420	0,398	0,149	0,764
48	0,421	0,419	1,159	0,209	0,361	1,635

1U: 1 μ mol de p-NP formado por min