

DANIEL LUCIANO FALKOSKI

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -GALACTOSIDASES DO FUNGO *Penicillium griseoroseum* PARA UTILIZAÇÃO NA HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE EM DERIVADOS DE SOJA

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

T

F193p
2007

Falkoski, Daniel Luciano, 1980-

Purificação e caracterização de α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum* para utilização na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em derivados de soja / Daniel Luciano Falkoski. – Viçosa, MG , 2007. xv, 96f. : il. ; 29cm.

Orientador: Sebastião Tavares de Rezende.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 83-96.

1. α -galactosidases. 2. *Penicillium griseoroseum*.
3. Soja - Produtos. 4. Hidrólise. 5. Cinética enzimática.
6. Enzimas imobilizadas. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 572.793

DANIEL LUCIANO FALKOSKI

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -GALACTOSIDASES DO FUNGO *Penicillium griseoroseum* PARA UTILIZAÇÃO NA HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE EM DERIVADOS DE SOJA

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

APROVADA: 28 fevereiro de 2007.

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz
(Co-Orientadora)

Prof^a. Juliana Lopes Rangel Fietto

Prof. Ieso de Miranda Castro

Prof^a. Maria Goreti Oliveira de Almeida
(Presidente da Banca)

AGRADECIMENTOS

A Jesus, exemplo de ser humano, fonte de minhas certezas e de minhas inseguranças.

À minha mãe, Terezinha Maria Falkoski, exemplo de coragem e determinação, que permitiu que eu alçasse vôos mais ambiciosos em minha vida.

Ao meu pai, Isidoro Antônio Falkoski, por me ensinar o valor do trabalho.

Aos meus irmãos, Joice Maria Falkoski e João Róis Falkoski, pela amizade, confiança e lealdade.

Ao Professor Sebastião Tavares de Rezende, exemplo de humildade e sabedoria, pela orientação, confiança, paciência e amizade durante toda minha vida acadêmica.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade ímpar concedida para a realização desse curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

A Professora Valéria Guimarães Monteze, pela co-orientação e sugestões ao longo deste trabalho e principalmente pela sua amizade.

A Professora Maria Goreti Oliveira de Almeida, por presidir minha banca de tese e por disponibilizar o Laboratório de Enzimologia para a execução de algumas etapas deste trabalho.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela co-orientação e pela disponibilização do Laboratório de Proteínas para a execução de etapas cruciais deste trabalho.

À Professora Marisa Vieira de Queiroz, pela co-orientação e pela cessão do microrganismo utilizado neste trabalho.

Aos Professores Ieso de Miranda Castro e Juliana Lopes Rangel Fietto, pelas correções e sugestões que certamente contribuíram muito para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Inês José Chanel, por me ensinar o que é um laboratório.

À Angélica Pataro Reis, pela amizade, apoio e confiança dedicados a mim durante estes seis anos de convivência.

À Pollyanna Amaral Viana, pelas inestimáveis contribuições na realização deste trabalho e principalmente pela amizade.

Aos amigos dos Laboratórios de Análises Bioquímicas e Enzimologia: Lílian, Juliana, Germano, Ana Paula, Solange, Eleonice, Anderson, Liliane, Pedro Ivo, Camila, Cristina e Fausto, pela amizade a mim conferida.

Aos funcionários, Reginaldo, Gláucia e Aloísio, pelos inúmeros serviços prestados a mim ao longo do desenvolvimento deste trabalho e principalmente pela amizade.

Ao professor Marcelo Tozzi, da Escola Estadual Ildfonso Simões Lopes, pela amizade e por me estimular a ingressar na vida acadêmica.

Ao meu amigo Marcelo Rodrigues dos Reis, pelas sugestões neste trabalho, pelo suporte técnico e por nossa longa amizade de seis anos e meio.

Ao secretário da pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Eduardo Monteiro, pela amizade e por resolver todas as mazelas burocráticas ligadas a minha vida acadêmica.

Aos meus colegas de República, Flávio, Weyllison, Julio Cláudio, Carlão, Bruno, Leandro, Breno e Lucas pela convivência, amizade, descontração e principalmente por transmitir a mim o valor de uma grande amizade.

A minha namorada, Maíra Nicolau de Almeida, por “surgir” em minha vida em um momento tão atribulado e me trazer a paz e a serenidade necessárias para que eu executasse minhas obrigações da melhor maneira possível.

E finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

DANIEL LUCIANO FALKOSKI, filho de Isidoro Antônio Falkoski e Terezinha Maria Falkoski, nasceu na cidade de Santo Antônio da Patrulha, Rio Grande do Sul, em 24 de outubro de 1980.

Em agosto de 1999, formou-se Técnico em Agropecuária pela Escola Estadual Ildfonso Simões Lopes, Osório, rio Grande do Sul, Brasil.

Em janeiro de 2005, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Iniciou o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular em março de 2005, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa. Submetendo-se à defesa de dissertação em 5 de março de 2007.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Soja: composição e importância econômica e nutricional	4
2.2. Fatores antinutricionais presentes na soja	7
2.3. Eliminação dos fatores antinutricionais	8
2.4. Uso de enzimas α -galactosidases.....	9
2.5. Enzimas e sua importância industrial	10
2.6. Imobilização enzimática	11
1.7. Principais métodos de imobilização	12
1.7.1. Ligação cruzada	12
1.7.2. Adsorção física em suporte	13
1.7.3. Ligação iônica	13
1.7.4. Ligação covalente	14
1.7.5. Encapsulação ou aprisionamento	15
2.8. Considerações sobre o fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	16

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Reagentes.....	17
3.2. Microrganismo.....	18
3.3. Multiplicação e manutenção da cultura do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	18
3.4. Crescimento do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i> e obtenção do extrato enzimático.....	18
3.5. Purificação das enzimas α -galactosidases.....	19
3.5.1. Centrifugação e diálise.....	20
3.5.2. Cromatografia de troca aniônica DEAE-Sepharose.....	20
3.5.3. Ultrafiltração.....	20
3.5.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – Gel Nativo.....	21
3.5.4.1. Preparo do gel.....	21
3.5.4.2. Preparo da amostra.....	21
3.5.4.3. Condições utilizadas durante a eletroforese.....	21
3.5.4.4. Localização e identificação da banda protéica contendo atividade α -galactosidase.....	22
3.5.4.5. Extração das enzimas α -galactosidases do gel.....	22
3.6. Determinação da atividade das α -galactosidases.....	23
3.6.1. Determinação da atividade α -galactosidase contra substrato sintético ρ -NP- α Gal.....	23
3.6.2. Determinação da atividade α -galactosidase sobre oligossacarídeos redutores.....	24
3.6.3. Determinação da atividade α -galactosidase sobre oligossacarídeos não redutores.....	24
3.6.4. Determinação da atividade α -galactosidase sobre outros substratos sintéticos.....	25
3.7. Determinação do grau de pureza e da massa molecular aparente das α -galactosidases.....	25
3.7.1. Eletroforese.....	25
3.7.2. Coloração dos géis de eletroforese.....	26
3.7.3. Utilização de gel filtração para determinação da massa molecular aparente.....	26
3.8. Caracterização enzimática.....	27

3.8.1. Efeito do pH	27
3.8.1.2. Efeito do pH sobre a estabilidade das α -galactosidases	27
3.8.2. Efeito da temperatura	27
3.8.2.1. Análise de termoestabilidade	28
3.8.3. Determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_M) e das velocidades máximas (V_{max})	28
3.8.4. Efeitos de íons, agentes redutores e açúcares nas atividades das α -galactosidases	29
3.8.5. Determinação da Energia de Ativação (E_a)	29
3.9. Determinação do teor protéico nos extratos enzimáticos	30
3.9.1. Método de Bradford	30
3.9.2. Método do Ácido Bicinconínico	30
3.10. Imobilização da enzima α -Gal I do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	31
3.10.1. Modificação da superfície do suporte	31
3.10.2. Imobilização da α -galactosidase sobre SM	31
3.11. Hidrólise de RO em produtos derivados de soja pelas α -galactosidases do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	32
3.11.1. Preparo do extrato desengordurado de soja	32
3.11.2. Hidrólise de RO utilizando α -galactosidases livres	32
3.11.3. Hidrólise de RO utilizando α -galactosidases livres	32
3.11.4. Avaliação do potencial de reutilização da enzima α -Gal I imobilizada	33
3.12. Extração de RO	33
3.13. Determinação do teor de oligossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Purificação das α -galactosidases extracelulares do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	35
4.2. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das α -galactosidases de <i>Penicillium griseoroseum</i>	39
4.3. Determinação do tempo de ensaio para a hidrólise de p -NP- α Gal pelas α -galactosidases de <i>Penicillium griseoroseum</i>	43
4.4. Efeito do pH sobre a atividade das α -galactosidases do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	45

4.5. Efeito da temperatura sobre a atividade das α -galactosidases do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	49
4.6. Determinação das constantes cinéticas	56
4.7. Especificidade das α -galactosidases do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	61
4.8. Efeitos de íons, agentes redutores e açúcares na atividade das α -galactosidases do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	64
4.9. Determinação da energia de ativação para as α -galactosidases do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	68
4.10 Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (RO) em extrato desengordurado de soja pelas α -galactosidases do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	70
4.10.1. Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (RO) pelas enzimas livres	70
4.11. Imobilização da enzima α -Gal I do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	75
4.11.1. Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (RO) pela SMGGal	76
4.11.2. Avaliação do potencial de reutilização de SMGGal	78
5. CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α -Gal I	Enzima α -galactosidase I
α -Gal II	Enzima α -galactosidase II
Å	Ângstrom
APTS	3-Aminopropiltriétoxisilano
BSA	Albumina sérica bovina
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DEAE-Sepharose	Dietil aminoetil-Sepharose
E_a	Energia de ativação
DNS	Dinitrossalicilato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
kDa	Kilodalton
K_M	Constante de Michaelis-Menten
I_R	Coefficiente de inclinação
log	Logaritmo
MM	Massa molecular
m-NP- α Gal	meta-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo
o-NP- α Gal	o-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo
o-NP- β Gli	orto-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
o-NP- β Gli	o-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
p-NP- α Gal	p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo

ρ -NP- β Gal	ρ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
ρ -NP- α Gli	ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
ρ -NP- α Xil	ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo
ρ -NP- α Man	ρ -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo
ρ -NP- α Ara	ρ -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo
ρ -NP	ρ -nitrofenol
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PVDF	Difluoreto de polivinila
rpm	Rotação por minuto
RO	Oligossacarídeos de rafinose
S	Substrato
SM	Sílica modificada por silanização
SMG	Sílica modificada ativada com glutaraldeído
SMGGal	α -Gal I imobilizada sobre sílica modificada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade de atividade enzimática
v/v	Volume/volume
Vo	Velocidade inicial
V _{max}	Velocidade máxima
V	Volts

RESUMO

FALKOSKI, Daniel Luciano, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2007. **Purificação e caracterização de α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum* para utilização na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em derivados de soja.** Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Co-orientadores: Maria Goreti Oliveira de Almeida, Mariza Vieira de Queiroz e Valéria Monteze Guimarães.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência das α -galactosidases purificadas do fungo *Penicillium griseoroseum* na hidrólise dos RO presentes no extrato desengordurado de soja. *Penicillium griseoroseum* foi cultivado em meio mineral, contendo galactomanana como fonte de carbono, por 120 h, a 28 °C. Após este período, o meio foi centrifugado, dialisado e utilizado como fonte de enzimas α -galactosidases. Os extratos enzimáticos foram submetidos à cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose, pH 5,0. A eluição das proteínas que aderiram a resina foi feita com um gradiente de NaCl de 0 a 0,3 M, sendo detectado dois picos protéicos distintos contendo atividade α -galactosidase, sendo a enzima detectada o primeiro pico protéico eluído denominada α -Gal I e enzima eluída no segundo pico denominada α -Gal II. As frações contendo as enzimas α -Gal I e α -Gal II foram reunidas, concentradas por ultrafiltração e submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições não desnaturantes. Ao término das corridas eletroforéticas, os géis foram incubados em uma solução de p -NP- α Gal (4 mg.mL⁻¹) para determinar a localização das enzimas α -galactosidases. As regiões dos géis contendo as enzimas α -Gal I e α -Gal II, foram recortadas, maceradas e submetidas a

agitação em tampão acetato de sódio, pH 5, 100 mM para extração e obtenção das enzimas purificadas. As enzimas α -Gal I e α -Gal II tiveram fatores de purificação de 155 e 53 vezes, respectivamente, com um rendimento final de 38 e 9 %, respectivamente. Atividades máximas de ambas as enzimas foram detectadas em pH 5,0 a 45°C. Os valores de meia vida da enzima α -Gal I a 40 e 45°C foram de 16 e 0,66 h respectivamente. Os valores de meia-vida da enzima α -Gal II a 40 e 45°C foram de 3,8 e 0,25 h respectivamente. Os valores da K_M para p -NP- α Gal, o -PN- α Gal, melibiose, estaquiose e rafinose para a enzima α -Gal I foram de 1,06, 1,31, 4,77, 19,99 e 28,74 mM, respectivamente, enquanto que, para a enzima α -Gal II foram de 0,80, 1,26, 5,10, 21,74 e 30,46 mM, respectivamente. As α -galactosidases apresentaram especificidade absoluta para galactose em posição α , hidrolisando os substratos sintéticos p -NP- α Gal, o -NP- α Gal, estaquiose, rafinose, melibiose. Sulfato de cobre, sulfato de ferro e cloreto de mercúrio inativaram completamente as α -galactosidases quando presentes em concentrações iguais 1 mM no meio de reação. Os resultados dos tratamentos de extrato desengordurado de soja com as enzimas α -Gal I e α -Gal mostraram uma redução de 100% de estaquiose pós-incubação a 40 °C, por 8 h. Houve redução de 69 e 12 % da rafinose após 8 h de incubação, a 40 °C, com as enzima α -Gal I e α -Gal II, respectivamente. A enzima α -Gal I foi imobilizada em suporte insolúvel (sílica modificada) e utilizada em ensaios de hidrólise de RO contidos em extrato desengordurado de soja, sendo verificado uma redução de 100 e 70% de estaquiose e rafinose, respectivamente, após 8 h de incubação. A enzima α -Gal I foi reutilizada 8 vezes consecutivas, em ensaios de hidrólise de RO, não sendo detectada nenhuma perda de atividade enzimática. Observa-se que as α -galactosidases de *P. griseoroseum* foram eficientes na redução dos RO presentes em produtos derivados de soja, sendo indicadas para a utilização industrial no processamento desses açúcares.

ABSTRACT

FALKOSKI, Daniel Luciano, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2007. **Purification and characterization of α -galactosidases from fungus *Penicillium griseoroseum* to application in hydrolysis of oligosaccharides in soybean products.** Adviser: Sebastião Tavares de Rezende. Co-advisers: Maria Goreti Oliveira de Almeida, Mariza Vieira de Queiroz and Valéria Monteze Guimarães.

The present work aims to evaluate the efficiency of the purified α -galactosidases from *Penicillium griseoroseum* in the hydrolysis of the RO present in the free fat soy extract. *Penicillium griseoroseum* was cultivated in a mineral medium which contained galactomanana as a source of carbone, for 120 hours, at 28 °C. After this period, the medium was dialysed, centrifuged and used as a source of enzymes α -galactosidases. The enzymatic extracts were submitted to the chromatography in DEAE-Sepharose, pH 5.0. Adsorbed proteins were liberated with linear increasing gradient of NaCl (0-0,3 M) and two peaks containing α -galactosidase activity was detected. The enzyme detected on first peak was denominated α -Gal I and the enzyme detected on second peak was denominated α -Gal II. α -Galactosidase active fractions were pooled and concentrated by ultrafiltration cell using 10 kDa cut-off membrane. Concentrated samples were submitted in a native electrophoresis polyacrylamide gel and in the end of the electrophoresis the gel was incubated with ρ -NP- α Gal solution (4 mg.mL.⁻¹) to visualizing of the enzymes α -galactosidases. The places containing the enzymes α -galactosidases were cut off, macerated with 100 mM sodium acetate buffer (pH 5) and kept under agitation for 24 h to extracting the purified enzymes. The enzymes α -Gal I and

α -Gal II got purification factors of 155 and 53 times, respectively, with a final result of 38 and 9 %, respectively. The maximum activities of the α -Gal I and α -Gal II were detected in pH 5.0 at 45 °C. The values of half-life to α -Gal I at 40 and 45 °C were 16 and 0,66 h respectively. The values of half-life to α -Gal II at 40 and 45 °C were 3,8 and 0,25 h respectively. The values of K_M for p -NP- α Gal, o -NP- α Gal, melibiose, stachyose and raffinose for the α -Gal I were 1,06, 1,31, 4,77, 19,99 e 28,74 mM, respectively, while for the α -Gal II were 0,80, 1,26, 5,10, 21,74 e 30,46 mM, respectively. The α -galactosidases presented absolute specification for galactose in α position, hydrolysing the substrates p -NP- α Gal, o -NP- α Gal, stachyose, raffinose, melibiose. Copper sulphate, iron sulphate and silver nitrate completely deactivated the α -galactosidases from *P. griseoroseum* in a concentration of the 1 mM. The results of the treatments of free fat soy extract with enzymes α -Gal I and α -Gal II demonstrated a reduction of 100 % of the stachyose after 8 h of incubation at 40 °C. There were 69 and 12% of reduction of the raffinose after 8 h of incubation at 60 °C, with the enzyme α -Gal I and α -Gal II, respectively. The enzyme α -Gal I was immobilized in insoluble support (modified silica) and used in assays of hydrolysis of RO present in free fat soy extract. The immobilized enzyme hydrolysed 100 and 70% of stachyose and raffinose, respectively, after 8 h of incubation. The immobilized enzyme α -Gal I was reapplied 8 times consecutively in hydrolysis treatment without loss in its activity. Therefore, it can be observed that the α -galactosidases of *P. griseoroseum* 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

Devido a sua alta produtividade, capacidade adaptativa e qualidade nutricional a soja é considerada um dos principais produtos agrícolas do mundo. Trata-se de um grão rico em proteínas e carboidratos constituindo um alimento capaz de suprir as exigências estruturais e energéticas dos organismos. Seu consumo pode se dar na forma direta, seja como extrato hidrossolúvel, concentrados protéicos ou como ingrediente e complemento alimentar em bolos, farinhas enriquecidas, doces, biscoitos, etc.

Apesar de seu alto valor nutricional, o uso da soja é muitas vezes restrito devido a fatores antinutricionais presentes no grão desta leguminosa. Dentre estes fatores destaca-se a capacidade de produzir flatulência e outros distúrbios gastrintestinais. As causas destes distúrbios são os oligossacarídeos de rafinose (RO) que correspondem a cerca de 40% dos carboidratos solúveis encontrados na soja.

Os RO são sacarídeos que contêm a ligação α -1-6 galactosil em sua estrutura. Tanto homens quanto animais monogástricos, não conseguem clivar esta ligação devido à incapacidade de produção de enzimas α -galactosidases. Desta forma, os RO, ao passarem ilesos no trato digestivo do homem, ou demais animais monogástricos, são degradados anaerobicamente na mucosa intestinal pelos microrganismos residentes, liberando CO₂, H₂ e CH₄, dando origem à flatulência. O acúmulo destes açúcares no intestino pode trazer

também outros sintomas desagradáveis, tais como: retenção de líquidos, diarreia, náuseas e cólicas.

Considerando-se também os aspectos nutricionais, pode-se observar que um tratamento prévio de produtos a base de soja, para redução dos teores de RO, seria duplamente interessante, pois além de eliminar os sintomas desagradáveis oriundos da ingestão destes produtos, traria também um aumento no valor energético destes alimentos devido à transformação dos RO em galactose e sacarose, açúcares estes, prontamente metabolizados pelo trato digestivo de animais monogástricos.

Uma alternativa interessante para redução dos teores destes RO nos derivados de soja seria o tratamento dos mesmos utilizando enzimas α -galactosidases extraídas de microrganismos e vegetais.

Várias α -galactosidases microbianas foram extraídas, isoladas e testadas quanto a sua capacidade de hidrolisar RO presentes em derivados de soja em escala industrial, apresentando resultados significativos.

No entanto, o uso de enzimas na indústria encontra uma série de restrições como, por exemplo: alto custo de obtenção e purificação, impossibilidade de reutilização, alta instabilidade, entre outros.

Visando amenizar estes problemas, diversas técnicas de imobilização enzimática sobre suportes sólidos foram desenvolvidas e avaliadas, a fim de que fosse possível a utilização de enzimas por repetidos ciclos sem que estas percam suas propriedades catalíticas.

Desta maneira, seria de grande importância a prospecção e caracterização de novas enzimas α -galactosidases microbianas que apresentem potencial para serem usadas na hidrólise de RO em derivados de soja. Por outro lado, determinar um modelo de imobilização enzimática que garanta a manutenção das características destas enzimas e permita sua reutilização seria de grande valia, pois desta forma seria possível considerar efetivamente o uso destas enzimas em escala industrial.

Considerando-se os organismos atualmente estudados com o objetivo de selecionar enzimas hidrolíticas com potencial para aplicações em processo biotecnológicos, merece grande destaque os fungos filamentosos, principalmente aquelas espécies pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Dentre as características vantajosas destes microrganismos para estudos de prospecção de enzimas hidrolíticas, destacam-se: produção de um

amplo espectro de enzimas hidrolíticas com possibilidade de aplicação na hidrólise dos mais diversos substratos, sejam eles naturais ou sintéticos; produção de enzimas extracelulares, o que desonera o processo de obtenção e purificação enzimática; baixa seletividade com relação à fonte de carbono, o que permite a utilização de substratos mais baratos (farelo de trigo, bagaço de cana, etc) para o crescimento e desenvolvimento destes microrganismos em meio de cultura, e, facilidade de manipulação genética, o que possibilita a clonagem e a engenharia de genes que codificam proteínas/enzimas de interesse.

Considerando os aspectos discutidos, os objetivos gerais deste trabalho foram purificar, caracterizar bioquímica e cineticamente e avaliar os potenciais de aplicações biotecnológicas de enzimas α -galactosidases produzidas pelo fungo *P. griseoroseum*, visando especialmente a redução ou eliminação dos oligossacarídeos de rafinose presentes em produtos derivados de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soja: composição e importância econômica e nutricional

A soja [*Glycine max* (L) Merrill] é uma das mais importantes fontes para a alimentação de homens e animais domésticos, principalmente devido ao elevado valor nutricional de suas frações lipídica e protéica (Sediyama, 1989; Morais & Silva, 1996).

A soja constitui um dos produtos de maior importância na economia brasileira ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país. Estima-se que o complexo agroindustrial da soja no Brasil movimentava cerca de US\$ 30 bilhões por ano (www.embrapa.gov.br). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, sendo responsável pela produção de mais de 58 milhões de toneladas deste grão no ano de 2006 (www.ibge.gov.br). Roessing & Lazzaroto (2004) estimaram que no Brasil, o complexo agroindustrial da soja é responsável pela geração de mais de 4,5 milhões de postos de trabalho, o que caracteriza o cultivo desta leguminosa como um dos mais capital-intensivos do agronegócio brasileiro.

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 elevado teor de proteínas (30-45 %), com uma composição de aminoácidos adequada à alimentação. O grão de soja possui também um

considerável teor de carboidratos (20-35 %), o que atribui a este alimento um alto valor energético (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 e fitatos (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 fração protéica da soja é 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 soja produzida no mundo é utilizada para extração de óleo, que é 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 é obtido submetendo-se a farinha desengordurada de soja a vários processos de extração, os quais removem componentes solúveis como a sacarose, rafinose,

estaquiouse, 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 superior ao da farinha ou do concentrado protéico de soja (Sgarbieri, 1996).

O leite de soja ou extrato hidrossolúvel é um produto protéico de soja que pode ser comparável ao leite de vaca em conteúdo de proteínas e gorduras, tendo obtido alta aceitabilidade em programas de nutrição infantil (Moreira, 1999). De acordo com Desjardins *et al.* (1990), o leite de soja é rico em proteínas de alta qualidade e não contém colesterol e lactose, apenas pequenas quantidades de ácidos graxos saturados. O leite de soja é uma alternativa para as pessoas portadoras de certas intolerâncias ao leite de origem animal e de algumas deficiências genéticas, como a ineficiência em metabolizar a lactose (De Lumen, 1992).

Nos últimos anos, uma grande atenção vem sendo dada à soja também devido ao fato desta leguminosa ser rica em substâncias que podem prevenir a ocorrência de uma série de doenças, o que caracteriza este grão como um alimento funcional. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimentos funcionais são aqueles que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos por meio da atuação de um nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento, manutenção e em outras funções normais do organismo humano.

Sirtori *et al.* (2003) destacam que os altos teores de isoflavonas presentes em derivados de soja podem ser diretamente relacionados com atividades anti-carcinogênicas e com a prevenção de doenças coronárias. Também Anderson *et al.* (1999) destacam que a ingestão desta leguminosa, pela ação de suas fibras, pode contribuir para a redução dos níveis de colesterol e para o aumento da tolerância a glicose em diabéticos. Segundo Scheppach *et al.* (2004), a ingestão de derivados de soja reduz a ocorrência de processos inflamatórios e carcinogênicos do trato digestivo.

Estudos avaliando a ingestão de produtos a base de soja por mulheres na menopausa mostraram que esta leguminosa possui ação estrógena, capaz de aliviar os problemas relativos aos desequilíbrios hormonais tão comuns neste período (Frankenfeld *et al.*, 2003). Além disto, Potter *et al.* (1998)

afirmam que o consumo de soja pode reduzir significativamente os riscos da manifestação de doenças do sistema ósseo, como a osteoporose, por exemplo.

2.2. Fatores antinutricionais presentes na soja

Embora sejam indiscutíveis as vantagens do emprego da soja na alimentação humana, no Brasil, o consumo desta leguminosa é baixo, talvez por terem os brasileiros herdado hábitos alimentares de culturas européias, africanas e indígenas, apreciadores de carnes e gorduras animais, todos de paladar bem diferentes daquele da soja (Huhn, 1977).

No entanto, o que mais afeta negativamente o consumo de soja é a existência de uma série de fatores antinutricionais dentre os quais se destacam o baixo teor de aminoácidos sulfurados, o fenômeno “hard to cook”, proteínas pouco digeríveis, baixa palatabilidade, presença de fitatos, presença de inibidores de tripsina, e capacidade de produzir flatulência (De Lumen, 1992).

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

Outro fator antinutricional de grande importância na soja refere-se ao alto teor de oligossacarídeos de rafinose (RO) encontrado em suas sementes. A ingestão de soja pode resultar em flatulência, náuseas, desconforto e diarreia, devido ao seu alto conteúdo dos oligossacarídeos de rafinose (Wagner *et al.*, 1976). O trato digestivo de humanos e de outros animais monogástricos (aves e suínos) é desprovido 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, 1966; 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. Eliminação dos fatores antinutricionais

Objetivando eliminar ou minimizar os sintomas indesejáveis causados pela ingestão de soja e aumentar o consumo desta leguminosa foram desenvolvidas várias práticas para a redução dos fatores antinutricionais nela presente.

Monteiro (2000) utilizou soja modificada geneticamente isenta do inibidor de tripsina Kunitz e constatou que a digestibilidade das proteínas desta cultivar foi melhor que o da soja convencional. Liener (1994) e Viola (1999) citam em seus trabalhos vantagens sobre o tratamento térmico realizado em soja para a eliminação de inibidores de tripsina.

Produtos alimentícios destituídos de fatores de flatulência podem ser preparados por várias técnicas de processamento. Servem de exemplo, produtos de soja como concentrados e isolados protéicos com quantias mínimas de rafinose e estaquiose (Rackis, 1974).

Omosaiye (1978) obteve um concentrado protéico de soja com 60% de proteínas e 0,6% de RO usando ultracentrifugação. Canella & Sodini, (1977) demonstraram que os RO podem ser removidos da farinha de soja usando uma solução de butanol acidificada com ácido clorídrico onde teores iniciais de 0,94% de rafinose e 4,70% de estaquiose foram reduzidos para 0,83% e 2,88% respectivamente.

Havel *et al.* (1977) e Ku *et al.* (1976) relataram em seus trabalhos a utilização do tratamento térmico da soja e seus derivados como forma de eliminar ou reduzir os teores de RO. East *et al.* (1972) estudaram a variação dos teores de oligossacarídeos em sementes de soja durante a germinação. A rafinose desapareceu completamente após 96 h de germinação, o mesmo acontecendo com a estaquiose após 144 h de germinação.

Sugimoto & Van Burem (1970) verificaram que uma preparação contendo atividade α -galactosidase de *Aspergillus saitoi* hidrolisou em três horas todos os oligossacarídeos no pH natural do leite de soja. Thananunkul *et al.* (1976) usaram α -galactosidase de *Mortierella vinacea* para hidrolisar oligossacarídeos do leite de soja obtendo uma redução em torno de 80% nos teores destes açúcares.

Tratamentos enzimáticos têm sido usados para eliminar os RO, principalmente no leite de soja, e podem ser feitos tanto com uma preparação rica em enzimas α -galactosidas (Gote *et al.*, 2004; Prashanth & Mulimani, 2005; Viana *et al.*, 2006;) quanto com microrganismos capazes de utilizar os oligossacarídeos da família da rafinose (Chieh *et al.*, 2002; Garro *et al.*, 2004).

Considerando-se os métodos utilizados para a redução dos teores de RO em derivados de soja, o uso de enzimas α -galactosidas constitui-se na alternativa mais vantajosa, uma vez que os tratamentos enzimáticos são extremamente específicos, proporcionando assim, menores alterações na composição e nas características organolépticas destes produtos.

2.4. Uso de enzimas α -galactosidas

As α -galactosidas (α -D-galactosídeo galactohidrolase E.C. 3.2.1.22) estão amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais (Dey, 1972). Estas enzimas catalisam a clivagem dos terminais α -1-6-galactosil de uma série de substratos, incluindo oligossacarídeos lineares e ramificados, polissacarídeos e substratos sintéticos como paranitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p-NPGal) (Ademark *et al.*, 2001). Devido a esta capacidade, α -galactosidas podem ser aplicadas em produtos de soja para hidrolisar os RO em açúcares digeríveis e assim moderar as propriedades causadoras de flatulência (Porter *et al.*, 1991).

Partindo deste princípio, várias α -galactosidas de origem vegetal e principalmente microbianas foram selecionadas, caracterizadas e testadas quanto a viabilização do seu uso na redução dos teores de RO em produtos a base de soja (Guimarães *et al.*, 2001; Gote *et al.*, 2004; Viana *et al.*, 2005; Falkoski *et al.*, 2006).

Thippiswamy & Mulimani (2002) e Thananankul (1976) empregaram α -galactosidas imobilizadas de *Gibberella fujikuroi* e *Mortierella vinacea*

respectivamente para a construção de biorreatores capazes de hidrolisar RO em leite de soja alcançando resultados expressivos.

Entretanto, o uso de enzimas α -galactosidases não é restrito à hidrólise de RO em derivados de soja. Tais enzimas podem ser usadas, por exemplo, na hidrólise de rafinose em xarope de açúcar de beterraba (Kobayashi e Suzuki, 1972).

Na indústria de papel a extração de lignina das fibras de madeira é um passo essencial no branqueamento da polpa. O tratamento alcalino usado para clivar a ligação covalente entre a hemicelulose e a lignina é essencial para posterior remoção da lignina, no entanto, esta metodologia traz consigo um grave problema ambiental (Paice & Jurasek, 1984). O uso de hemicelulases como β -D-manoses e α -galactosidases garantem uma eficiência semelhante ao tratamento alcalino na remoção da lignina, contudo sem trazer os mesmos problemas ambientais (Viikari *et al.*, 1986).

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

Enzimas α -galactosidases também são empregadas na hidrólise de resíduos de galactose em galactomananas, polímeros naturais amplamente utilizados como espessante na indústria de alimentos e de cosméticos, promovendo alterações em suas propriedades reológicas (Pai & Khan, 2002).

2.5. Enzimas e sua importância industrial

Nos últimos anos, enzimas constituem-se no principal alvo da pesquisa em Biotecnologia, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (Do Canto & Menezes, 1995).

A utilização de enzimas como catalisadores em processos industriais possibilita elevar a taxa de transformação de substrato em produtos em níveis considerados economicamente viáveis. Também propicia a transformação de produtos indesejáveis em compostos não tóxicos. Neste contexto, existe um crescente interesse mundial por enzimas adequadas a processos industriais específicos (De Rezende, 1998). Dados referentes ao mercado das enzimas

são baseados em critérios bastante diferentes para estimativas e avaliações, o que resulta em conclusões muito divergentes umas das outras (Pereira, 1999).

O maior empecilho ao uso de enzimas em processos industriais está relacionado ao alto custo desses catalisadores (Gandhi, 1997). Apesar do alto custo da utilização de enzimas, suas vantagens em diversos campos são tão óbvias que uma variada gama de indústrias as utiliza em seus processos, movimentando um mercado de aproximadamente U\$ 1,5 bilhões por ano (Van Beilen & Li, 2002). Os maiores consumidores deste mercado são as indústrias de: detergentes, alimentos e rações, papel e celulose, química fina e fármacos, seguidas de perto pela indústria têxtil e de manufatura de couros (Pzszczola, 2001).

No entanto, apesar de tamanha importância industrial, o uso de enzimas é muitas vezes limitado devido a sua relativa instabilidade em solução, custos elevados de isolamento e purificação e a dificuldade tecno-econômica de recuperação para reutilização da enzima ativa da mistura reacional após a finalização do processo catalítico. Estes inconvenientes podem ser minimizados quer pela síntese química de compostos que possam reproduzir a atividade e a especificidade das enzimas possuindo melhor estabilidade (enzimas sintéticas), quer pelo uso de técnicas de imobilização, tornando as enzimas mais estáveis cataliticamente e simplificando as etapas de recuperação do produto (Chibata & Wingard, 1983).

Embora nos últimos 20 anos a utilização de enzimas na indústria esteja aumentando de forma rápida, ainda existe um grande campo para sua expansão. A utilização de novas enzimas está criando novas oportunidades e em alguns ramos da indústria a utilização de biocatalizadores é ainda irrisória (Pereira, 1999).

2.6. Imobilização enzimática

Enzimas são geralmente muito menos resistentes do 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 e Angnes, 1999).

Definem-se como enzimas imobilizadas aquelas que estão fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região do espaço com retenção das suas atividades catalíticas e que podem ser utilizadas repetidamente e continuamente (Chibata, 1978).

Dentre as vantagens relativas à utilização de enzimas imobilizadas podemos destacar: a possibilidade de sua reutilização, possibilidade da construção de sistemas operacionais em fluxo contínuo, fácil separação entre a enzima e os produtos de sua catálise, minimização dos problemas de efluentes e manuseamento de materiais e melhorias das propriedades enzimáticas tais como, atividade e estabilidade (Pereira, 1999).

Atualmente, as imobilizações enzimáticas podem ser feitas em diferentes formas e tipos de suporte. Enzimas podem ser imobilizadas sobre partículas, membranas (as enzimas são imobilizadas por aprisionamento dentro de uma membrana semipermeável), 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, a grande maioria dos processos de imobilização enzimática é realizada sobre partículas, devido principalmente a facilidade de manuseio e aplicação deste tipo de suporte (Hartmeier, 1998).

1.7. 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.

1.7.1. 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 o reativo, 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).

1.7.2. Adsorção física em suporte

A adsorção é o método mais simples de imobilização de enzimas em suportes insolúveis em água. 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, ponte de hidrogênio e ligações heteropolares (Pereira, 1999).

As vantagens desta técnica são referentes 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 et al., 1995).



Figura 1: Representação esquemática da ligação de uma enzima a um suporte por adsorção.

1.7.3. Ligação iônica

Difere da adsorção física pela força da ligação da enzima ao suporte. As forças iônicas são mais fortes do que no caso da adsorção física.

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, que dependendo do valor do pH do meio podem apresentar-se positivamente carregados. Sendo assim, estas proteínas podem aderir a suportes que estejam carregados negativamente.

Ao se usar ligações iônicas para imobilização enzimática, os valores de pH e força iônica adequados devem ser preservados, evitando assim desestabilizar o sistema (Pereira, 1999).

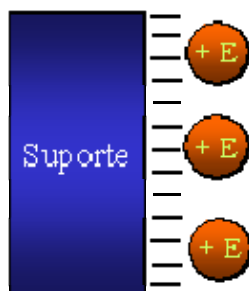


Figura 2: Representação esquemática da ligação iônica de uma enzima a um suporte polianiónico.

1.7.4 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 (hidroxilas, aminas, fenóis, etc.) ligados à superfície do suporte.

Como exemplo de suporte, podemos citar agar-agar, 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 estresse na enzima. A imobilização necessariamente brusca conduz normalmente a alterações consideráveis na conformação resultando numa perda significativa da atividade catalítica (Bosley e Peilow, 1997). Como vantagem deste processo de imobilização pode-se citar uma menor suscetibilidade a problemas decorrentes de variações de pH, força iônica, solvente e temperatura (Milagres, 1996).

A conexão entre suporte e enzima pode se dar de forma direta ou por meio de uma ligação intercalada, utilizando moléculas (reagentes) de diferentes comprimentos, denominados 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 (Hortmeier, 1998).



Figura 3: Representação esquemática da ligação covalente de uma enzima a um suporte sem (A) e com (B) espaçador.

1.7.5. Encapsulação ou aprisionamento

As enzimas imobilizadas pelos métodos de encapsulação ou aprisionamento ficam localizadas dentro de uma matriz polimérica ou membrana sendo este processo de mera retenção física da proteína. 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 e Wingard, 1983).

Neste processo a enzima é imobilizada nos espaços intersticiais de uma ligação cruzada de um polímero insolúvel em água tais como poliacrilamida ou polivinilalcol (Chibata, 1978), ou então microencapsulada em membranas poliméricas semipermeáveis (Chibata e 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 4 – Ilustração da imobilização de enzimas por encapsulamento.

2.8. Considerações sobre o fungo *Penicillium griseoroseum*

A secreção de enzimas é um aspecto fundamental da fisiologia da maioria dos fungos; por isso, esses microrganismos são fontes de cerca de 40% das enzimas produzidas e utilizadas na indústria por mais de 50 anos. As enzimas de origem fúngica mais comumente usadas catalisam a hidrólise de polímeros, como, amido, celulose, hemicelulose e pectina. Além dessas enzimas, as proteases de fungos são também amplamente utilizadas. Por isso, há contínua necessidade de se buscar, avaliar e melhorar novas espécies fúngicas, com o intuito de descobrir e aumentar a produção destas enzimas. Nas últimas décadas, a tecnologia do DNA recombinante está sendo muito aplicada, o que é consequência de manipulação genética, com desenvolvimento de sistemas de expressão substancialmente eficazes, com clonagem, purificação de enzimas, determinação da seqüência N-terminal e subseqüentes hibridizações com sondas específicas em bibliotecas genômicas de interesse (Peberdy *et al.*, 1991; Archer e Peberdy, 1997; Dalbøge, 1997).

Penicillium griseoroseum é um fungo deuteromicete que vem sendo estudado ultimamente quanto a sua capacidade em produzir enzimas hidrolíticas com potencial para aplicação na indústria. Estudos foram realizados com *P. griseoroseum* quanto à produção das enzimas poli-galacturanases e pectina liases, tendo-se concentrado na obtenção de linhagens mutantes, manipulações genéticas como isolamento e caracterização de genes, estabelecimento e técnicas de transformação genéticas, aumento do número de cópias dos genes endógenos de interesse, análises filogenéticas e estudos dos mecanismos regulatórios envolvidos na expressão dos genes que codificam essas enzimas (Baracat *et al.*, 1989; Brumano *et al.*, 1993; Baracat-Pereira *et al.*, 1999; Minussi *et al.*, 1998; Fernandes-Salomão *et al.*, 1996; Ribon, 2001; Ribon *et al.*, 2002; Cardoso, 2004; Ribeiro, 2005).

Falkoski *et al.* (2003) verificou que o fungo *P. griseoroseum* é capaz de produzir enzimas com atividade α -galactosidase quando crescido em meio de cultura contendo farelo de trigo como fonte de carbono o que, juntamente com o conhecimento já adquirido previamente sobre a fisiologia e genética do fungo, credencia este microrganismo como um potencial produtor de enzimas α -galactosídicas para aplicação em processos biotecnológicos de redução dos teores de RO em derivados de soja.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Análises Bioquímicas, Laboratório de Enzimologia e Laboratório de Proteínas, todos localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária/BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Reagentes

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

Da Merk S. A. Indústrias Químicas foram obtidos os reagentes: p-nitrofenol (p-NP), sacarose, glicose, lactose, maltose, frutose e nitrato de prata, tartarato de sódio e potássio, sulfato de cobre e cloreto de potássio.

Da Amersham Pharmacia Biotech foram obtidas as resinas Sephacryl S-300 e DEAE-Sepharose, além dos Kits contendo os padrões para determinação de massa molecular de proteínas por SDS-PAGE e gel filtração.

Da Bunge do Brasil foi obtida a farinha desengordurada de soja.

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

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

3.2. Microrganismo

Foi utilizada para a realização deste trabalho a linhagem selvagem do fungo *Penicillium griseoroseum*, isolada de sementes florestais na UFV e depositada na Coleção de Culturas Tropicais André Tosello, Campinas, com código de acesso CCT 6421.

3.3. Multiplicação e manutenção da cultura do fungo *Penicillium griseoroseum*

Meio mineral mínimo contendo NaNO₃ (0,6%), KH₂PO₄ (0,15%), KCl (0,05%), MgSO₄ (0,05%), FeSO₄ (0,001%), ZnSO₄ (0,001%) e glicose (1%), foi utilizado para crescimento e manutenção da cultura do fungo *P. griseoroseum*. O inóculo foi repicado para tubos inclinados contendo meio sólido e acondicionados em B.O.D por 7 dias, a 30 °C.

3.4. Crescimento do fungo *Penicillium griseoroseum* e obtenção do extrato enzimático.

O meio de cultura líquido utilizado para crescimento do fungo *P. griseoroseum*, e obtenção de enzimas α -galactosidases produzidas por este microrganismo continha NaNO₃ (0,6%), KH₂PO₄ (0,15%), KCl (0,05%), MgSO₄ (0,05%), FeSO₄ (0,001%), ZnSO₄ (0,001%) e galactomanana (1%) como fonte de carbono.

Após 7 dias de crescimento do fungo em meio sólido, os esporos foram ressuspensos em água destilada autoclavada e transferidos, sob condições assépticas, para erlenmeyers contendo 200 mL de meio de cultura. Os erlenmeyers foram acondicionados em Shaker, a 28 °C, sob agitação de 150 rpm por 120 h. Após o crescimento da cultura, o extrato bruto foi filtrado e armazenado a 5°C. Foi adicionado azida sódica (0,002%) ao extrato bruto para impedir a proliferação de microrganismos.

3.5. Purificação das enzimas α -galactosidases

O processo utilizado para purificar as enzimas α -galactosidases extracelulares do fungo *P. griseoroseum* está representado de forma resumida no fluxograma da Figura 5.

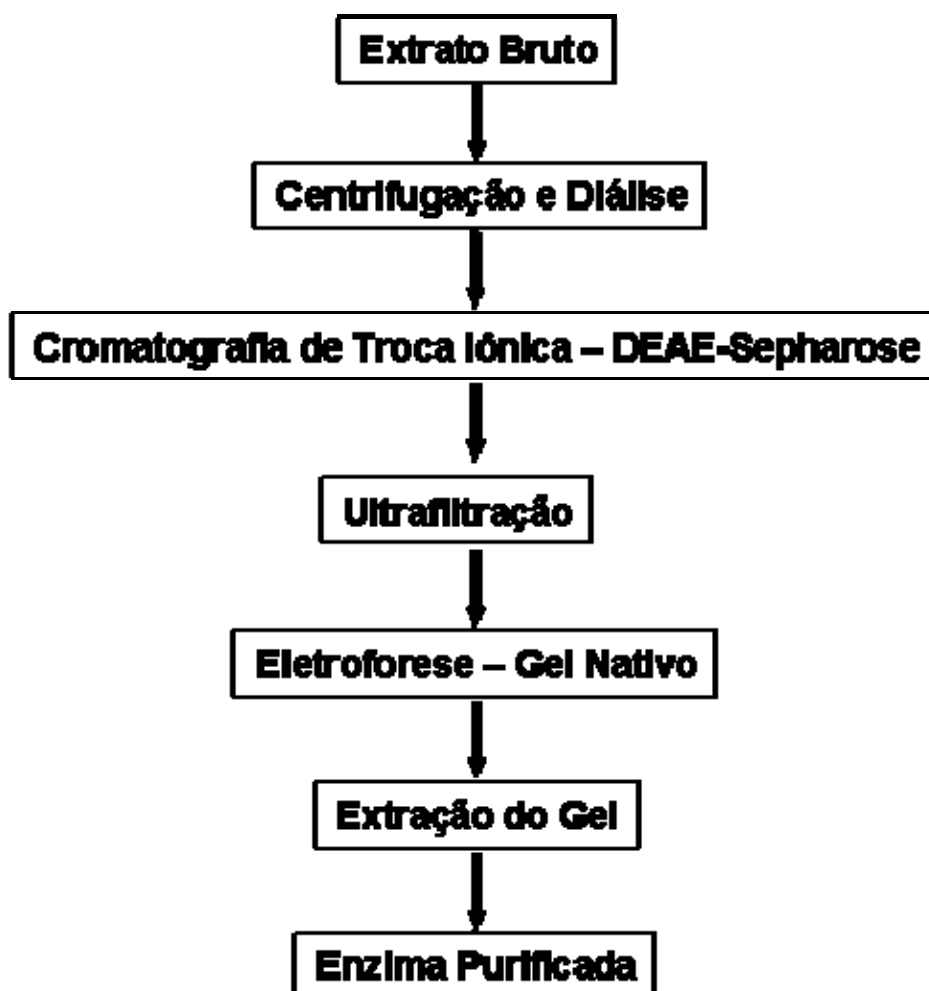


Figura 5: Seqüências dos métodos de fracionamento de proteínas utilizados no processo de purificação das α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum*.

3.5.1. Centrifugação e diálise

Inicialmente uma alíquota de 400 mL do extrato bruto, obtido como descrito no item 3.4, foi centrifugada a 12500 rpm, durante 30 minutos a 4 °C. O material precipitado foi descartado, sendo o sobrenadante, então, dialisado contra 4 L de tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5 por 12 h, a 4 °C. Neste processo, foi utilizada uma membrana de diálise com um poro de exclusão de 30 kDa.

3.5.2. Cromatografia de troca aniônica DEAE-Sepharose

Após centrifugação e diálise, o extrato enzimático foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em uma coluna catiônica DEAE-Sepharose. A coluna (25 x 30 mm) foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5. As proteínas que não aderiram à coluna foram eluídas no tampão de equilíbrio. As proteínas que aderiram a resina foram eluídas pela aplicação de um gradiente crescente de NaCl, constituído de 300 mL do tampão do equilíbrio e 300 mL do mesmo tampão contendo NaCl 300 mM.

Todo o processo foi conduzido a uma temperatura de 4 °C. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 60 mL.h⁻¹ e as frações coletadas continham 4 mL. Após avaliação do perfil de eluição, os picos protéicos contendo atividade α -galactosidase foram reunidos e subsequentemente submetidos ao próximo passo de purificação.

3.5.3. Ultrafiltração

As frações contendo atividade α -galactosidase foram concentradas em uma célula de ultrafiltração Amicon, utilizando-se uma membrana de exclusão de 10 kDa. Esta etapa do processo foi conduzida à temperatura ambiente, sendo, entretanto, a célula de ultrafiltração imersa em banho de gelo. As amostras foram concentradas até que os volumes alcançassem o valor de 10 mL. No prosseguimento do processo de purificação das enzimas α -galactosidasas, as preparações enzimáticas concentradas foram submetidas a uma eletroforese em gel nativo como descrito no item a seguir.

3.5.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – Gel Nativo

Corridas eletroforéticas em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes, foram utilizadas com o intuito de purificar as enzimas α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum*.

3.5.4.1. Preparo do gel

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

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

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

3.5.4.2. Preparo da amostra

As alíquotas concentradas das enzimas α -galactosidases, obtidas como descrito no item 3.5.3, foram preparadas para serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes. Para cada 1 mL da amostra concentrada, foram adicionados 0,154 mL de tampão Tris/HCl, 0,5 M, pH 6,8; 0,128 mL de glicerol e um “traço” de azul de bromofenol, para sinalizar o “status” da corrida eletroforética.

3.5.4.3. Condições utilizadas durante a eletroforese

Uma solução de Tris/HCl 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M, foi utilizado como tampão de tanque durante a eletroforese em gel de acrilamida,

em condições não desnaturantes. A eletroforese foi conduzida a 5°C, utilizando-se uma voltagem de 200 V, durante 8 h.

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

Ao término da corrida eletroforética, uma faixa de aproximadamente 1 cm de largura, foi longitudinalmente separada do gel para a localização da banda protéica contendo atividade α -galactosidase. A faixa extraída do gel foi acondicionada em uma placa de petri e lavada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, durante 1 minuto. Após esta lavagem, a faixa foi cuidadosamente coberta com uma solução tamponada (tampão acetado de sódio, 100 mM, pH 5) de p -NP- α Gal (4 mg.mL⁻¹) e incubada por 5 minutos a 40 °C em banho-maria. A banda protéica contendo a enzima α -galactosidase pode ser facilmente evidenciada pelo surgimento de uma banda amarela no local onde a enzima se encontrava no momento que a corrida eletroforética foi interrompida.

3.5.4.5. Extração das enzimas α -galactosidases do gel

Após a localização da posição da enzima α -galactosidase no gel, a faixa foi realinhada ao gel original, a fim de servir de guia para a realização de um corte transversal no gel. Esta faixa transversal foi fragmentada em pedaços menores, de aproximadamente 1 mm de espessura e posteriormente triturada, a seco, em gral de porcelana. Após uma total desintegração do gel, 40 mL de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5 foram adicionados ao macerado e posteriormente repassados para um béquer de 100 mL. Esta mistura foi mantida sob agitação, em agitador magnético, a 5°C, durante 24 h, com o objetivo de maximizar a extração da enzima da malha do gel. Ao final do processo, a mistura era então filtrada em papel de filtro, para eliminação dos resíduos macroscópicos do gel. Os passos descritos no item 3.5.4.4 e 3.5.4.5 estão sumarizados na Figura 6.

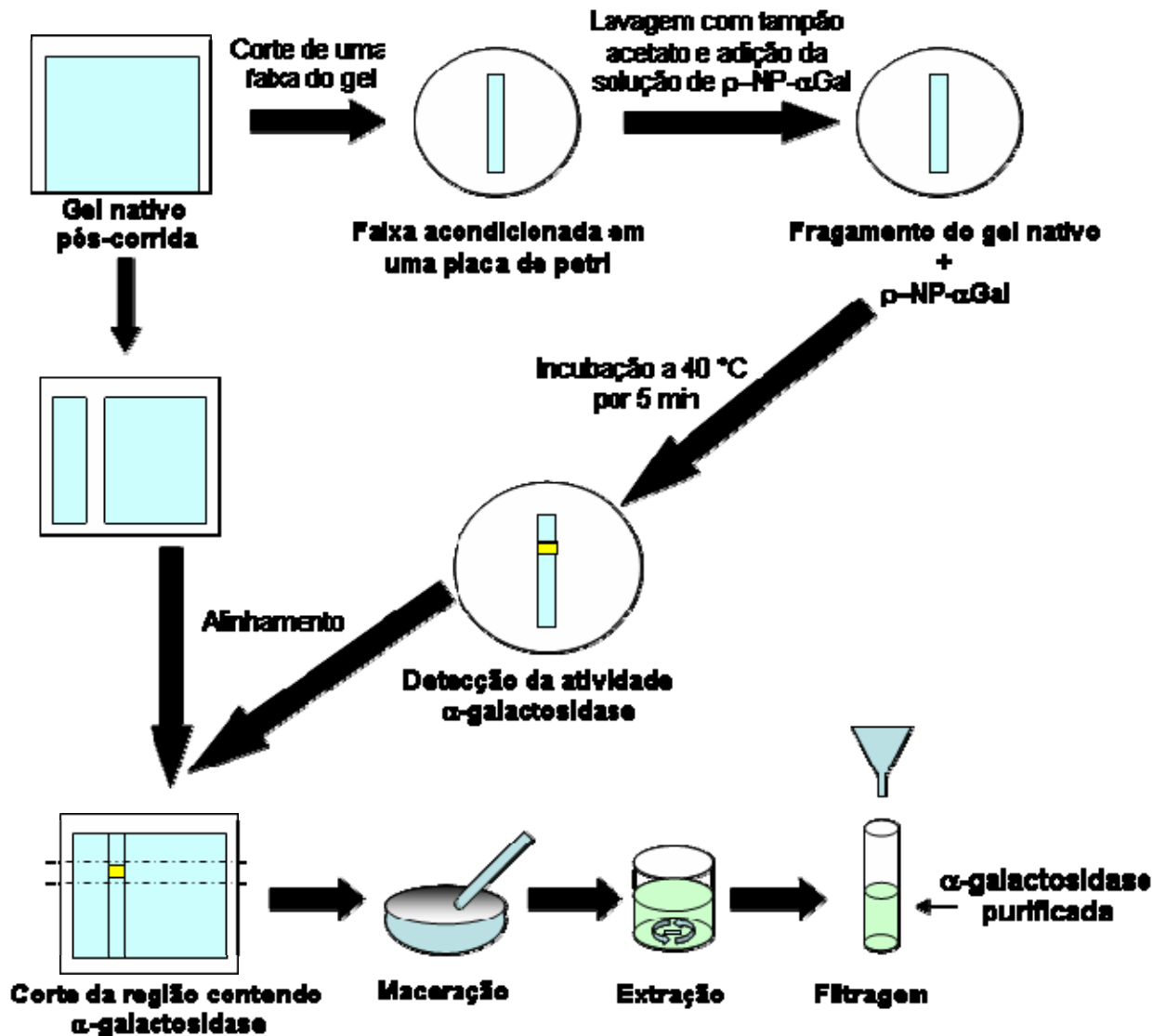


Figura 6: Esquema destacando os principais passos do processo de purificação das α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum* utilizando gel nativo.

3.6. Determinação da atividade das α -galactosidases

3.6.1. Determinação da atividade α -galactosidase contra substrato sintético p-NP- α Gal

O ensaio para a determinação da atividade da enzima α -galactosidase de *P. griseoroseum* sobre o substrato sintético p-NP- α Gal foi conduzido a partir de uma mistura de reação contendo 650-740 μ L de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5, 250 μ L de uma solução de p-NP- α Gal, 2 mM (concentração final do ensaio de 0,5 mM) e 10-100 μ L de extrato enzimático. A reação foi conduzida em banho-maria por 5 minutos a uma temperatura de 40 °C. Ao final

do tempo estipulado, a reação era paralisada pela adição de 1 mL de uma solução de Na₂CO₃ 0,5 M. Os valores de absorbância obtidos a 410 nm foram transformados em μmoles de p-NP, utilizando uma curva padrão construída com 0-0,2 μmoles de p-NP a partir de uma solução estoque de concentração 2 μM. Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de p-NP por min, nas condições de ensaio.

3.6.2. Determinação da atividade α-galactosidase sobre oligossacarídeos redutores

Quando oligossacarídeos que continham extremidades redutoras em sua estrutura (melibiose, maltose, lactose) foram utilizados como substrato para as enzimas α-galactosidases de *P. griseoroseum*, o método da glicose oxidase (Sternberg *et al.*, 1970) foi empregado para a determinação da atividade enzimática.

A reação foi executada a partir da mistura de 700-780 μL de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5, 200 μL de uma solução 10 mM de melibiose, maltose ou lactose e 20-100 μL de extrato enzimático. O ensaio foi conduzido em banho-maria, por 15 min, a 40 °C. A reação foi paralisada pela imersão dos tubos de ensaios em água fervente por 5 min, seguido de uma nova incubação, em água gelada, para redução da temperatura do meio de reação.

Ao final desta primeira etapa, 0,5 mL do reativo de glicose oxidase foi adicionada a reação. A mistura foi novamente incubada em banho-maria, a 37 °C, durante 10 min. Os valores de absorbância foram tomados a 505 nm e convertidos em teores de glicose, utilizando-se uma curva padrão construída com 0 – 0,15 μmoles de glicose.

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

3.6.3. Determinação da atividade α-galactosidase sobre oligossacarídeos não redutores

Para os ensaios com os substratos sacarose, rafinose e estaquiose, a atividade das α-galactosidases de *P. griseoroseum* foram determinadas medindo-se a quantidade de açúcar redutor produzido por meio do uso do reagente dinitrossalicilato (DNS), segundo Miller (1956).

A mistura de reação era constituída de 700-780 μL de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5, 200 μL de uma solução 10 mM de rafinose, estaquiose ou sacarose e 20-100 μL de extrato enzimático. O ensaio foi conduzido em banho-maria, por 15 min, a 40 °C. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL do reativo de DNS, seguido pela imersão dos tubos de ensaio em banho de água fervente por 5 min.

As medidas espectrofotométricas foram tomadas a 540 nm, e os valores de absorbância convertidos em μmoles de açúcar redutor, utilizando uma curva padrão construída a partir de quantidades de glicose variando entre 0,2 e 2,0 μmoles .

3.6.4. Determinação da atividade α -galactosidase sobre outros substratos sintéticos

Os ensaios para determinação da atividade das α -galactosidas de *P. griseoroseum* contra outros substratos sintéticos foram idênticos ao descrito no item 3.6.1, exceto que foram utilizados os substratos ρ -NP- β Gal, ρ -NP- α Gli, ρ -NP- β Xil, ρ -NP- α Ara, ρ -NP- α Man, o -NP- β Gli, o -NP- β Gal, ρ -NP- β Gli, m -NP- α Gal) e o -NP- α Gal.

3.7. Determinação do grau de pureza e da massa molecular aparente das α -galactosidas

3.7.1. Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), contendo SDS e β -mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). Os mini-géis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30 % (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, para o gel separador e tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, para o gel empilhador, persulfato de amônio 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e, N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino (TEMED). As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 100 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 curva padrão, os perfis de migração das proteínas-padrão (distância percorrida no gel) com o logaritmo da massa molecular.

3.7.2. Coloração dos géis de eletroforese

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

Após a corrida eletroforética, 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) sendo logo em seguida rinsados com água destilada e incubados, por 25 min, em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37 μ L de formaldeído 37 % (v/v). Após o tratamento em solução de nitrato de prata, os géis foram lavados 3 vezes, por 20 segundos, com água destilada e imediatamente imergidos em solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 50 μ L de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas protéicas. A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de ácido acético.

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

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

Uma cromatografia utilizando azul de dextrana foi executada, com o objetivo de determinar o volume vazio da coluna. As massas moleculares das α -galactosidases foram estimadas correlacionando-se, por meio de uma curva

padrão, as constantes de eluição das proteínas-padrão (K_{av}) com o logaritmo da massa molecular das respectivas proteínas. Os padrões de massa molecular utilizados neste ensaio foram tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa) e aldolase (158 kDa).

3.8. Caracterização enzimática

3.8.1. Efeito do pH

A influência do pH sobre a taxa de hidrólise das α -galactosidases de *P. griseoroseum* contra os substratos p -NP- α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose foi avaliada. As atividades enzimáticas foram determinadas em uma faixa de pH variando de 3 a 8. Para a determinação dos valores de pH ótimos para as enzimas α -galactosidases, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas nos itens 3.6.1, 3.6.2 e 3.6.3, exceto que, os ensaios foram realizados em diferentes valores de pH, utilizando-se tampões citrato-fosfato (McIlvaine, 1921).

3.8.1.2. Efeito do pH sobre a estabilidade das α -galactosidases

O efeito do pH sobre a estabilidade das α -galactosidases de *P. griseoroseum* foi testado incubando-se as enzimas em pHs variando de 3,0 a 8,0, durante por 12 h a 5 °C.

Após o período de incubação, todos os ensaios para determinação da atividade residual foram conduzidos em pH 5, como descrito no item 3.6.1.

3.8.2. Efeito da temperatura

A influência da temperatura sobre a taxa de hidrólise das α -galactosidases de *P. griseoroseum* contra os substratos p -NP- α Gal, rafinose e melibiose foi avaliada. Para a determinação das temperaturas ótimas das α -galactosidases, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas nos itens 3.6.1 3.6.2 e 3.6.3, exceto que, os ensaios foram conduzidos em diferentes temperaturas, compreendidas entre 20 e 60° C.

3.8.2.1. Análise de termoestabilidade

A estabilidade térmica das α -galactosidases de *P. griseoroseum* foram avaliadas a 40 e 45 °C. Extratos contendo as α -galactosidases purificadas foram incubadas nas temperaturas acima citadas, em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Para o ensaio conduzido a 40 °C, a atividade residual foi avaliada nos tempos de 1, 4, 6, 8, 20, 28, 32 e 44 h; já para o ensaio conduzido a 45 °C a atividade residual foi avaliada nos tempos de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 min. Após cada tempo de pré-incubação, uma alíquota de 100 μ L de extrato enzimático era tomado e então procedia-se o ensaio enzimático como descrito no item 3.6.1.

Os valores de meia-vida das enzimas α -galactosidases foram calculados a partir do ajuste de uma equação exponencial decadente, do tipo $y = a.e^{-b.x}$, aos dados obtidos no experimento acima citado, utilizando o programa Sigma Plot[®], versão 9.0.

3.8.3. 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, o -PN- α Gal, rafinose, estaquiase e melibiose. Os ensaios enzimáticos para o substrato p -NP- α Gal foram conduzidos como descrito no item 3.6.1, exceto que, as concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10 mM foram utilizadas. Para o substrato o -PN- α Gal, foram avaliadas as concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 e 10 mM, sendo os ensaios conduzidos como descrito no item 3.6.4.

A influência da concentração dos substratos rafinose e estaquiase, sobre a velocidade de hidrólise das α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum*, foram avaliadas pela quantificação do açúcar redutor formado, como descrito no item 3.6.3. Os ensaio para rafinose foram executados nas concentrações de 5; 10; 20; 40; 70; 100 e 200 mM, enquanto que para o substrato estaquiase, as concentrações de 1; 3; 5; 10; 20 e 50 mM foram avaliadas.

As constantes cinéticas referentes à hidrólise do substrato melibiose foram estimadas pela quantificação da glicose formada, utilizando o método da glicose oxidase, como descrito no item 3.6.2. Neste caso, as concentrações avaliadas foram de 1; 3; 6; 15; 30 e 50 mM.

Os valores de K_M e V_{max} foram calculados pela curva de velocidade em função da concentração de substrato (curva de Michaelis-Menten), utilizando o programa Sigma Plot[®], versão 9.0.

3.8.4. 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 de *P. griseoroseum*, foram avaliados em diferentes concentrações destes efetores. Os ensaios foram conduzidos como descrito no item 3.6.1, exceto pelo fato da adição dos efetores. Os efeitos dos íons $MgCl_2$, $CaCl_2$, $CuSO_4$, KCl , $NaCl$, $HgCl_2$, $AgNO_3$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$, SDS e EDTA foram avaliados nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mM.

Os ensaios de interferência para os açúcares lactose, maltose, melibiose, rafinose, manose, galactose, estaquiase, sacarose, glicose e frutose foram conduzidos nas concentrações de 2; 10 e 30 mM. As misturas contendo tampão acetato de sódio, pH 5, 100 mM, solução do efetor e as enzimas α -galactosidases foram pré-incubadas em banho-maria por 30 min, a 40 °C, sendo logo em seguida, adicionado o substrato p -NP- α Gal. O efeito destes efetores sobre a atividade das enzimas foi determinado em termos percentuais, utilizando um ensaio sem efetor algum como referência.

3.8.5. Determinação da Energia de Ativação (E_a)

Utilizando a equação do Duplo-recíproco, foram calculados os valores de V_{max} das enzimas α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* para a hidrólise dos substratos p -NP- α Gal, melibiose e rafinose em diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C). A energia de ativação (E_a) das α -galactosidases para a hidrólise destes substratos foi estimada pelo gráfico de Arrhenius, que correlaciona $\log V_{max}$ vs $1.T^{-1}$ (°K).

Os valores de inclinação das retas (I_R) obtidas em cada caso foram diretamente aplicados à equação de Arrhenius ($E_a = -4,554.I_R$) para determinação da energia de ativação para cada substrato especificamente.

3.9. Determinação do teor protéico nos extratos enzimáticos

Durante a execução deste trabalho, os teores protéicos das preparações enzimáticas das α -galactosidases de *P. griseoroseum* foram determinados de duas maneiras: para as análises feitas durante a montagem do perfil de eluição da cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976); para as análises de determinação do grau de pureza, cálculo da atividade específica e montagem da tabela de purificação, o método do ácido Bicinconínico foi utilizado (Smith *et al.*, 1985).

3.9.1. Método de Bradford

O reagente de Bradford concentrado 5 vezes foi preparado misturando-se 100 mg de Coomassie Brillant Blue G-250, 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 nº1. Este método baseia-se no desenvolvimento da cor em função da ligação da proteína com o pigmento Coomassie Brillant Blue G-250.

O ensaio para determinação do teor protéico das preparações enzimáticas foram conduzidos a partir da mistura de 50-800 μ L do extrato protéico, 0-750 μ L de água destilada e 200 μ L do reagente de Bradford. A mistura foi agitada em vórtex e mantida por 15 min a temperatura ambiente. Os valores de absorbância foram tomados a 595 nm e convertidos em valores de massa protéica utilizando uma curva padrão construída com BSA.

3.9.2. Método do Ácido Bicinconínico

Para as determinações do teor de proteína pelo método do ácido Bicinconínico, a mistura de reação continha 20-100 μ L do extrato protéico, 0-80 μ L de água destilada e 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 fração protéica da reação era adicionada a cada tubo de ensaio em intervalos regulares de 30 segundo; procedia-se rapidamente uma agitação e em seguida, uma incubação em banho-maria a 37 °C, por exatos 30 min. Após este período, os tubos eram 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, e os valores de absorbância convertidos em massa protéica, utilizando curva padrão construída com BSA.

3.10. Imobilização da enzima α -Gal I do fungo *Penicillium griseoroseum*

Sílica gel modificada com grupos aminos foi utilizada como suporte para a imobilização da enzima α -Gal I do fungo *P. griseoroseum*. O processo de imobilização enzimática deu-se em duas etapas. Em um primeiro momento procedeu-se a modificação da superfície do suporte. Posteriormente, a enzima α -galactosidase foi ligada covalentemente à superfície do suporte modificado, caracterizando-se assim, a imobilização enzimática propriamente dita.

3.10.1. Modificação da superfície do suporte

Partículas de sílica gel (150 Å de diâmetro) tiveram sua superfície modificada pela adição de grupamentos aminos, via reação de silanização, utilizando o reagente 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS). Para isto, 20 g de sílica, previamente seca durante 3 horas a 105°C, foram adicionada a um balão de destilação juntamente com 200 mL de xileno e 3 mL de APTS. O conjunto foi aquecido a 80°C sob agitação constante e mantido sob refluxo pelo tempo de 12 horas.

Após as 12 h de reação, a sílica modificada (SM) foi filtrada e lavada, primeiramente com 200 mL de xileno e posteriormente com 400 mL de etanol. Após a lavagem e total eliminação do etanol a SM foi disposta em papel de filtro sobre vidro-relógio e seca a temperatura ambiente pelo tempo de 2 h. Finalizando o processo, a sílica SM foi submetida a nova secagem em estufa, a 40 °C, pelo tempo de 45 minutos.

3.10.2. Imobilização da α -galactosidase sobre SM

Glutaraldeído foi utilizado como agente de ligação entre a SM e a enzima α -Gal I de *P. griseoroseum*. Em um primeiro momento, 2 g de SM foram adicionadas a 50 mL de uma solução de glutaraldeído (5%) e submetidas a agitação por 5 min para ativação do suporte. Após esta etapa, a SM ativada pelo glutaraldeído (SMG) foi lavada 5 vezes com água destilada para total eliminação do glutaraldeído não ligado.

SMG foi então adicionada a 20 mL de uma solução tamponada (tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5) da enzima α -Gal I (20 U.mL⁻¹) e agitada durante 10 min para promover a ligação covalente entre a enzima e o suporte ativado. Ao término deste período, SMG contendo a α -galactosidase imobilizada (SMGGal) foi drenada e lavada 5 vezes com água destilada para eliminação das proteínas não ligadas. SMGGal foi armazenada em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5, a 5 °C e posteriormente aplicada em experimentos de hidrólise de ROs em derivados de soja para determinação do seu potencial de aplicação.

3.11. Hidrólise de RO em produtos derivados de soja pelas α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum*

3.11.1. Preparo do extrato desengordurado de soja

O extrato desengordurado de soja foi obtido a partir da farinha desengordurada de soja. Uma alíquota de 20 g da farinha desengordurada foi ressuspendida em 200 mL (p/V 1:10) de água destilada e homogeneizada em um agitador magnético por 10 min até completa dissolução dos sólidos.

Posteriormente, o extrato foi submetido a um novo processo de homogeneização, em agitador Politron, pelo tempo de 5 min e imediatamente aplicado em testes de hidrólise de RO utilizando as enzimas α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum*.

3.11.2. Hidrólise de RO utilizando α -galactosidases livres

As duas α -galactosidase do fungo *P. griseoroseum* foram avaliadas quanto à eficiência em hidrolisar RO presentes em derivados de soja. Em erlenmeyers de 50 mL foram adicionadas alíquotas de 20 mL do extrato desengordurado de soja e 5 mL de extrato enzimático contendo a enzima α -Gal I ou α -Gal II (total de 10 U de enzima em ambos os casos). As preparações foram incubadas em Shaker, sob agitação de 100 rpm, por 2, 4 e 6 h, a 40 °C.

3.11.3. Hidrólise de RO utilizando α -galactosidases livres

Para os testes de hidrólise com a enzima α -Gal I imobilizada foram montados ensaios em frascos de 50 mL, contendo 20 mL de extrato desengordurado de soja e 10 U da enzima imobilizada (aproximadamente 0,5 g

de SMGGal). Os ensaios foram conduzidos como no item anterior, e a hidrólise avaliada após 2, 4, 6 e 8 h de incubação.

Em ambos os ensaios, após cada tempo de incubação, as amostras tratadas foram imediatamente congeladas a -80 °C e posteriormente liofilizadas. As taxas de hidrólise obtidas em cada situação foram avaliadas pela determinação do teor de RO presentes em 30 mg do material liofilizado. Os teores de RO determinados nos extratos tratados com as enzimas foram comparados àqueles das amostras não tratadas.

3.11.4. Avaliação do potencial de reutilização da enzima α -Gal I imobilizada

Uma das principais vantagens do emprego de enzimas imobilizadas é a possibilidade de sua reutilização. A enzima α -Gal I imobilizada foi empregada na hidrólise de RO em extrato desengordurado de soja como descrito no item 3.12.3. Após 6 h de tratamento, SMGGal foi separada do extrato tratado por decantação, lavada com água destilada e reaplicada em um tratamento idêntico. O potencial de reutilização da enzima α -Gal I imobilizada para hidrólise de RO em extrato desengordurado de soja foi avaliado em 8 tratamentos consecutivos.

3.12. Extração de RO

A extração de RO do extrato desengordurado de soja antes e após o tratamento enzimático foi conduzida como descrita por Saravitz, *et al.* (1987), com modificações. Aproximadamente 30 mg das amostras liofilizadas pesadas em tubos tipo eppendorff foram usadas para o processo de extração dos açúcares solúveis. Os açúcares foram então extraídos em 3 etapas de tratamento com etanol 80 %, a 100 °C, por 5 min. Após cada extração feita com álcool 80 %, a mistura foi submetida à centrifugação em centrífuga do tipo Eppendorff 5415C, 14.000 rpm, por 10 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 HPLC.

3.13. Determinação do teor de oligossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os RO extraídos do extrato desengordurado 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

4.1. Purificação das α -galactosidases extracelulares do fungo *Penicillium griseoroseum*

O extrato enzimático, contendo enzimas α -galactosidases extracelulares do fungo *P. griseoroseum*, foi obtido após 132 h de crescimento, nas condições já especificadas no item 3.4. O extrato enzimático foi então submetido ao processo de purificação descrito no item 3.5 para a obtenção das frações purificadas das enzimas α -galactosidases. Durante todas as etapas de purificação empregadas, a atividade enzimática foi monitorada pela mensuração da hidrólise do substrato p -NP- α Gal, enquanto que o teor protéico das amostras foi avaliado pela utilização do método do Ácido Bicinconínico. A medida da atividade específica (U de enzima/mg de proteína) foi utilizada como um parâmetro para avaliação da eficiência de cada método de purificação empregado. O resumo dos resultados obtidos em cada etapa de purificação pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos em cada etapa, durante o processo de purificação das α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum*.

Etapa	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Ativ. Específica (U.mg ⁻¹)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Meio de Cultura	140,10	161,70	0,86	1,00	100,00
Centrif. + Diálise	144,60	99,30	1,45	1,68	103,21
DEAE-Sepharose					
α -gal I	86,66	10,95	7,91	9,13	61,85
α -gal II	22,39	2,52	8,88	10,25	15,98
Ultrafiltração					
α -gal I	90,72	3,85	23,50	27,13	64,75
α -gal II	16,94	0,72	23,26	26,85	12,09
Gel Nativo					
α -gal I	52,80	0,39	134,71	155,48	37,69
α -gal II	13,05	0,28	46,48	53,64	9,31

1U = quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de p-NP por minuto

As etapas de purificação compreendidas pela centrifugação e diálise, inicialmente utilizadas neste protocolo de purificação, foram empregadas principalmente com o intuito de preparar o extrato enzimático para os passos subsequentes, eliminando impurezas macroscópicas e o excesso de sais presentes no extrato bruto.

Em um segundo momento, o extrato enzimático foi aplicado em uma coluna de troca aniônica, DEAE-Sepharose, equilibrada com tampão acetato de sódio, pH 5, 100 mM. A eluição das proteínas que aderiram à resina foi feita pela aplicação de um gradiente crescente de NaCl, variando de 0 a 0,3 M.

A eluição com gradiente salino permitiu a detecção de dois picos protéicos contendo atividade α -galactosidase, como pode ser observado na Figura 7. A possibilidade de um organismo expressar mais de uma enzima com atividade α -galactosidase é um fato que pode ser facilmente observado na literatura. Varbanets *et al.* (2001) fracionaram duas α -galactosidases de *Penicillium sp.* após cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Toyopearl 650M. Ademark *et al.* (2001) purificaram quatro diferentes formas de α -galactosidases de *Aspergillus niger* após quatro etapas de purificação. Grossmann & Terra (2001), avaliando extratos enzimáticos obtidos a partir do intestino de larvas de *Tenebrio molitor*, detectaram três enzimas com atividade α -galactosidase.

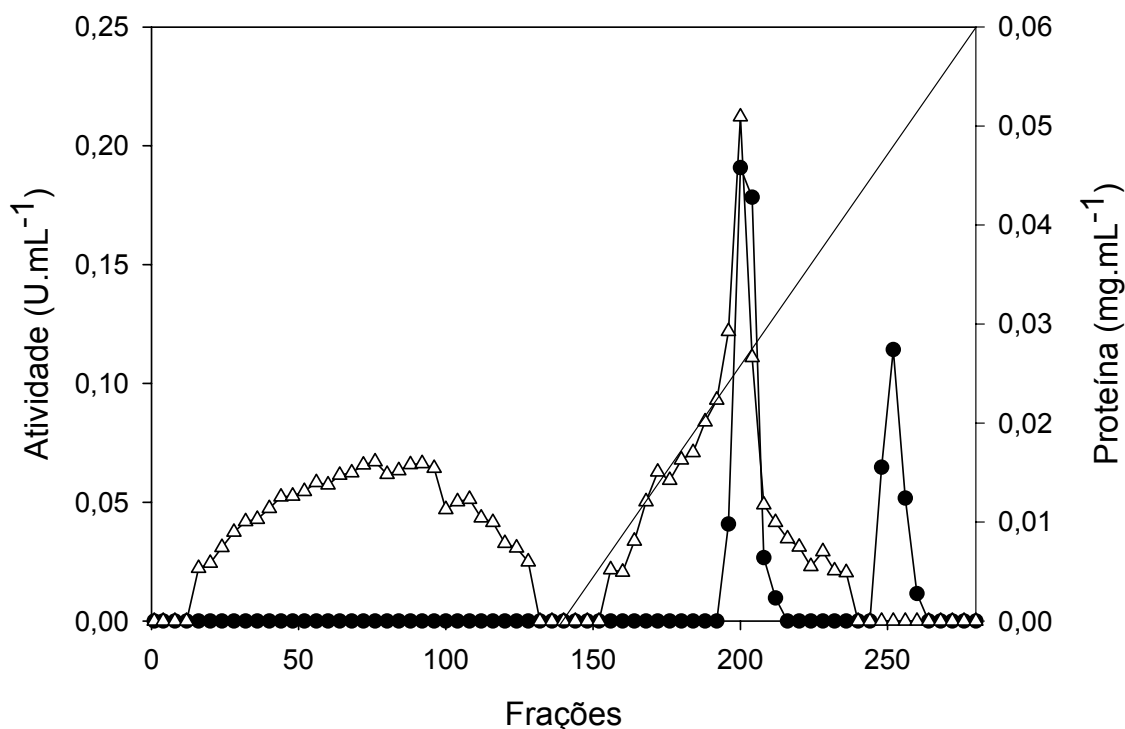


Figura 7: Perfil cromatográfico, obtido após a aplicação das preparações enzimáticas centrifugadas e dialisadas em coluna de troca iônica DEAE-Sepharose. Atividade α -galactosidase (●); teor de proteína (Δ); gradiente salino (—).

As duas frações protéicas contendo atividade de α -galactosidases, oriundas da coluna DEAE-Sepharose, foram reunidas e analisadas. Podemos observar que o primeiro pico protéico representava 79,46% da atividade α -galactosídica recuperada após esta etapa de purificação (Tabela 1). Tal observação nos permite sugerir que esta, é a α -galactosidase preferencialmente expressa pelo fungo *P. griseoroseum* nas condições de crescimento especificadas neste trabalho.

Objetivando facilitar a descrição dos resultados obtidos neste trabalho, a partir deste momento, iremos nos referir a α -galactosidase do primeiro pico protéico como α -Gal I, sendo conseqüentemente a α -galactosidase encontrada no segundo pico, denominada α -Gal II.

Dando prosseguimento ao processo de purificação, as frações reunidas contendo as enzimas α -Gal I e α -Gal II foram concentradas por ultrafiltração, utilizando uma membrana com um limite de exclusão de 10 kDa, como descrito no item 3.5.3. Como pode ser observado na Tabela 1, o uso desta etapa no protocolo de purificação promoveu, além da redução dos volumes dos eluatos, um grande acréscimo nos valores de atividade específica das preparações

enzimáticas (cerca de 3 vezes), principalmente por promover a exclusão de fragmentos protéicos e de peptídeos de massa molecular menor que 10 kDa.

As preparações enzimáticas concentradas das enzimas α -Gal I e α -Gal II foram submetidas separadamente a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes (gel nativo), como descrito no item 3.5.4.

A utilização de uma eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições não desnaturantes, tem como uma das principais vantagens, permitir que a proteína mantenha a maioria das características físico-químicas normalmente detectadas em seu estado nativo, dentre as quais, podemos destacar: a sua estrutura tridimensional e a manutenção de suas propriedades catalíticas.

Desta forma, ao término de ambas as corridas eletroforéticas, uma faixa longitudinal de cada gel foi recortada e incubada em uma solução tamponada (tampão acetato de sódio, pH 5, 100 mM) do substrato p -NP- α Gal (4 mg.mL⁻¹), tendo como objetivo, determinar as regiões dos géis que continham as bandas protéicas com atividade α -galactosidase.

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

Para a confirmação da presença das bandas protéicas, uma outra faixa de cada gel foi recortada e corada com prata, como descrito no item 3.7.2. Os resultados obtidos durante ambos os processos de revelação do gel para a enzima α -Gal I podem ser observados na Figura 8. Resultados idênticos foram obtidos quando o mesmo procedimento foi aplicado à enzima α -Gal II (resultados não mostrados).

Após as revelações dos géis nativos de ambas α -galactosidases de *P. griseoroseum*, as enzimas foram extraídas dos géis como descrito no item 3.5.4.5.

Ao final deste processo, a enzima α -Gal I apresentou uma purificação de 155,5 vezes com um rendimento de 37,7%, ao passo que a enzima α -Gal II foi purificada 53,6 vezes com um rendimento de 9,3%.

Após cromatografias em coluna de gel filtração Sephadex G-150 e em coluna de troca iônica DEAE-Sepharose, a α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii* foi purificada 16,7 vezes com um rendimento de 58,3% (Viana *et al.*, 2006). Kim *et al.* (2002) purificaram uma α -galactosidase de *Oryzae sativa* 524 vezes, com uma recuperação de 52% da atividade enzimática. King *et al.* (2002), após quatro etapas de purificação, obtiveram uma α -galactosidase de *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* purificada 908 vezes, com um rendimento de 7%. Também a α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* foi purificada 389 vezes, com um rendimento de 44 % (Gote *et al.*, 2006).

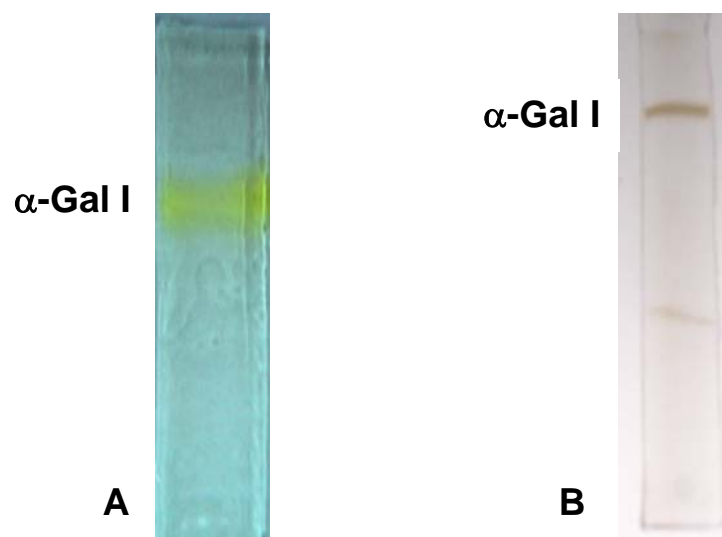


Figura 8: Resultado da revelação do gel nativo com p -NP- α Gal (A), mostrando a presença da atividade da enzima α -Gal I de *Penicillium griseoroseum*. Resultado da revelação do gel nativo com prata (B), confirmando a presença de uma banda protéica isolada na mesma região do gel onde se detectou a atividade α -galactosidase.

4.2. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das α -galactosidas de *Penicillium griseoroseum*

Para confirmar a purificação das α -galactosidas do fungo *P. griseoroseum*, submetem-se as preparações enzimáticas extraídas do gel nativo a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 15 %, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). O perfil de migração das proteínas presentes nessas amostras está apresentado na Figura 9.

Podemos observar claramente, em ambos os géis desnaturantes, uma única banda protéica nas canaletas onde foram aplicadas as amostras das enzimas α -Gal I e α -Gal II do fungo *P. griseoroseum*, sendo desta forma, confirmado o alto grau de pureza destas proteínas e a eficácia do protocolo de purificação utilizado.

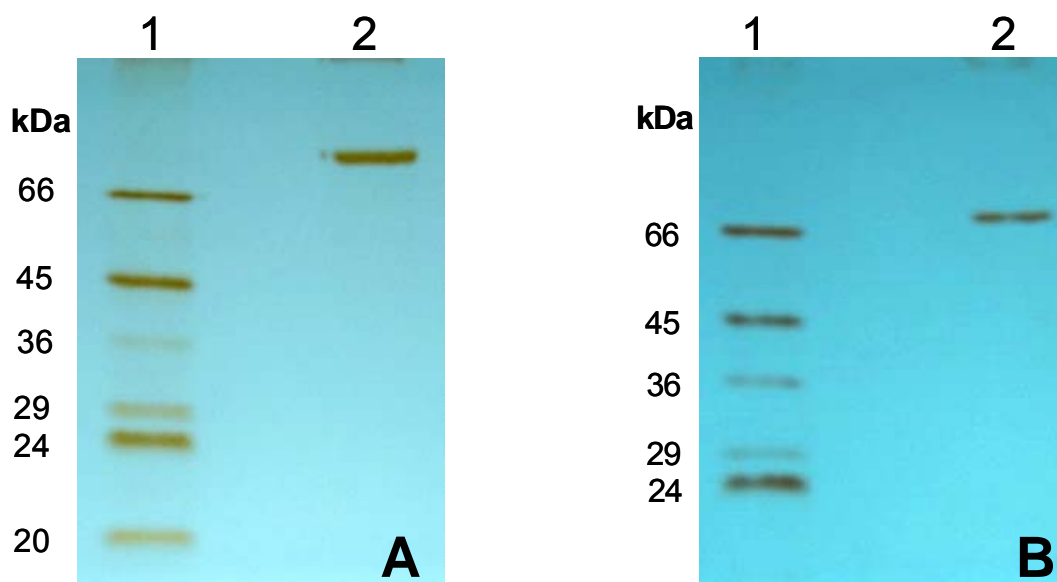
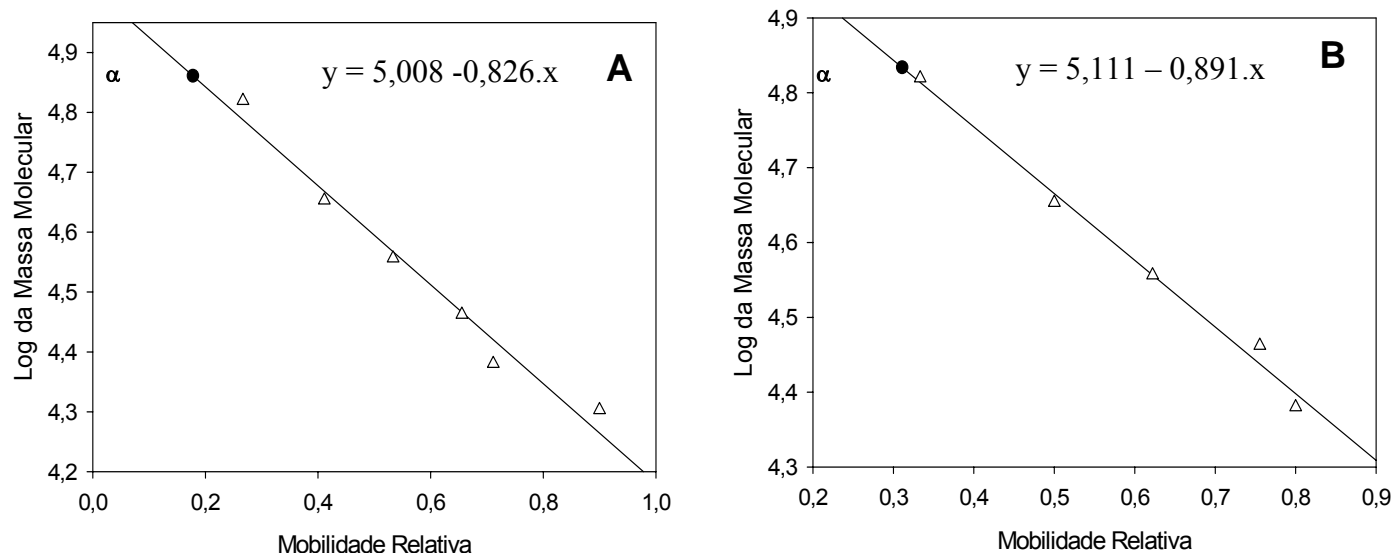


Figura 9: Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15 %) corado com prata das α -Gal I (A) e α -Gal II(B) do fungo *Penicillium griseoroseum*. A linha 1 contém as bandas protéicas referentes aos marcadores de peso molecular. A linha 2 contém as bandas referentes as amostras de proteínas que foram extraídas do gel nativo.

As massas moleculares das enzimas α -Gal I e α -Gal II de *P. griseoroseum* foram calculadas a partir de uma equação linear, obtida correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares de proteínas padrão com a distância percorrida no gel SDS-PAGE. Como as corridas eletroforéticas foram conduzidas separadamente para as duas enzimas, houve a necessidade da obtenção de duas equações lineares para estimar os valores das massas moleculares. As regressões para as enzimas α -Gal I e α -Gal II estão, respectivamente, representadas nas Figuras 10A e 10B.

A partir das equações obtidas, estimou-se uma massa molecular aproximada de 72,6 kDa para a enzima α -Gal I, enquanto que para a enzima α -Gal II, a massa molecular estimada foi de 68,2 kDa.

Podemos encontrar na literatura as massas moleculares estimadas de uma série de enzimas α -galactosidases. Puchart *et al.* (2000), estudando uma α -galactosidase do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, estimaram uma massa molecular de 57 kDa. Este mesmo valor de massa molecular foi encontrado para a α -galactosidase do fungo mesofílico *Trichoderma reesei*



(Golubev *et al.*, 2004). Também De Rezende (1998) purificou e caracterizou uma α -galactosidase do fungo *Aspergillus fumigatus* de massa molecular estimada em 54,7 kDa.

Figura 10: Estimativas das massas moleculares das enzimas α -Gal I (A) e α -Gal II (B) do fungo *P. griseoroseum*. Os coeficientes para as regressões foram calculados utilizando o programa Sigma Plot®, versão 9.0. Padrões de massa molecular (Δ); enzimas α -galactosidases (\bullet).

Em testes para a purificação realizados no início deste trabalho, as α -galactosidases de *P. griseoroseum* foram submetidas à filtração em gel, utilizando resinas Sephacryl S-200 e Sephacryl S-300, sendo estas proteínas sempre eluídas no volume vazio da coluna (resultados não mostrados). Tal fato, em combinação com os resultados obtidos na análise em SDS-PAGE, nos possibilitou formular a hipótese de que estas enzimas, quando em sua conformação nativa, apresentavam-se como oligômeros, sendo formadas por subunidades idênticas.

Para elucidar nossas suspeitas, também estimamos as massas moleculares das α -galactosidases de *P. griseoroseum* por filtração em gel,

utilizando uma coluna empacotada com a resina Sephacryl S-300 como descrito no item 3.7.3.

As massas moleculares das enzimas α -galactosidases de *P. griseoroseum* foram estimadas a partir da regressão linear, obtida correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares de proteínas padrão com a constante de eluição (K_{av}) das respectivas proteínas (Figura 11).

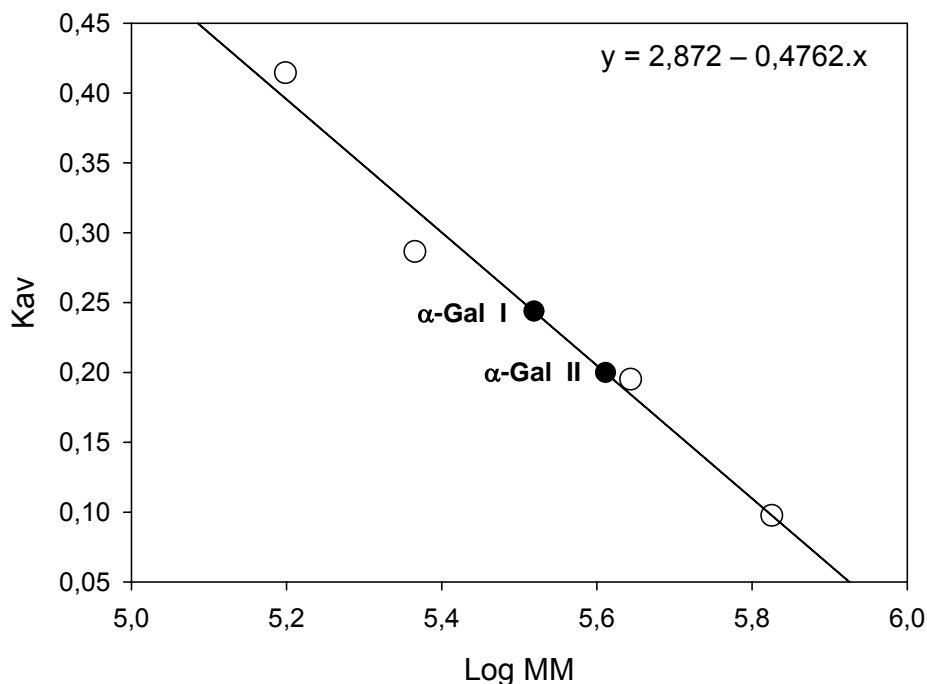


Figura 11: Estimativa das massas moleculares das enzimas α -Gal I e α -Gal II do fungo *Penicillium griseoroseum* por gel filtração. Os coeficientes para a regressão foram calculados utilizando o programa Sigma Plot[®], versão 9.0. Os padrões de massa molecular (○) utilizados foram aldolase (158 kDa), catalase (232 kDa), ferritina (440 kDa) e tiroglobulina (669 kDa); enzimas α -galactosidases (●).

Os resultados obtidos na filtração em gel nos permitiram estimar que a enzima α -Gal I possui uma massa molecular de 408,4 kDa. Ao dividirmos este valor por 72,6 (massa molecular estimada por SDS-PAGE) encontramos um valor próximo a 6, o que sugere que esta enzima é um hexâmero, formado por subunidades idênticas, quando se encontra em solução e no seu estado nativo.

A massa molecular estimada da α -Gal II foi de 330,3 kDa. Ao dividirmos este valor por 68,2 (massa molecular estimada por SDS-PAGE) podemos

sugerir que esta enzima é um pentâmero formado por subunidades idênticas, quando se encontra no seu estado nativo.

Fridjonsson *et al.* (1999) determinaram que a α -galactosidase produzida por *Bacillus stearothermophilus* NUB3621 é uma proteína tetramérica, composta por subunidades idênticas de 80,3 kDa. Também a bactéria *Streptococcus mutans*, expressa uma enzima α -galactosidase tetramérica com subunidades idênticas de massa molecular próxima a 82 kDa (Aduse-Opoku *et al.*, 1991).

King *et al.* (2002) estimaram a massa molecular da α -galactosidase da bactéria *Thermoanaerobacterium polysacchrolyticum* por gel filtração, encontrando uma proteína com massa molecular igual a 176 kDa em seu estado nativo. Análises da mesma proteína por SDS-PAGE sugeriram que esta enzima é um dímero, formado por duas subunidades idênticas de aproximadamente 80 kDa.

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

4.3. Determinação do tempo de ensaio para a hidrólise de ρ -NP- α Gal pelas α -galactosidases de *Penicillium griseoroseum*

O primeiro passo a se tomar em qualquer experiência ou estudo cinético envolvendo enzimas é estabelecer os limites de linearidade, ou seja, estabelecer a concentração máxima de produto que pode ser acumulado antes que as respostas de [P] vs tempo e velocidade de hidrólise vs [E] se tornem não lineares (Segel, 1979).

Baseados nesta premissa, ensaios de hidrólise do substrato p -NP- α Gal com as enzimas α -Gal I e α -Gal II foram conduzidos para a determinação de um tempo de reação adequado, que seria posteriormente utilizado como padrão para as demais análises. As misturas de reação foram constituídas de 650 μ L de tampão acetato de sódio, pH 5, 100 mM, 100 μ L de extrato purificado das enzimas α -Gal I ou α -Gal II e 250 μ L de uma solução 2 mM do substrato p -NP- α Gal. Os ensaios foram conduzidos a 40 °C pelos tempos de 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20 e 22,5 min. Os resultados obtidos nestes ensaios podem ser observados na Figura 12.

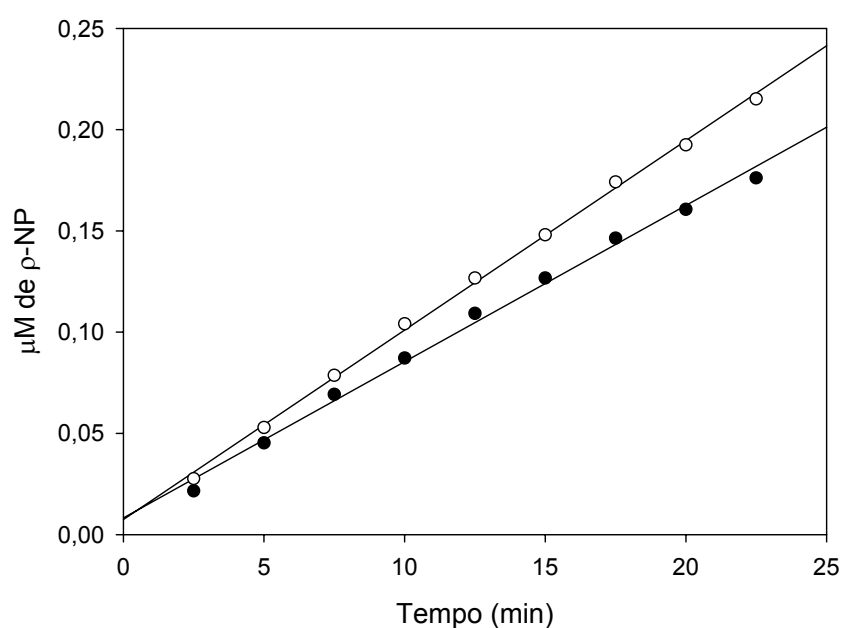


Figura 12: Taxa de hidrólise do substrato p -NP- α Gal pelas enzimas α -Gal I (●) e α -Gal II (○) em diferentes tempos de reação.

Como pode ser observado na Figura 11, as taxas de hidrólise das enzimas α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* mantiveram-se constantes durante todo o período de tempo avaliado (22,5 min). Por motivos de segurança e praticidade, o tempo de ensaio escolhido para as demais análises realizadas com as enzimas α -Gal I e α -Gal II foi de 5 min.

4.4. Efeito do pH sobre a atividade das α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum*

O efeito do pH sobre a atividade das α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* contra os substratos p-NP- α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose foi avaliado como descrito no item 3.8.1. Considerando o p-NP- α Gal como substrato padrão para este tipo de análise, podemos observar que as enzimas α -Gal I e α -Gal II, possuem um comportamento semelhante ao longo de toda a faixa de pH estudada, sendo que o pico máximo de atividade para ambas as enzimas foi detectado nos ensaios realizados em pH 5 (Figura 13A).

Podemos observar também que as α -galactosidases de *P. griseoroseum* mantiveram mais de 80% de sua atividade máxima em uma faixa restrita de pH, compreendida entre os valores 4,5 e 5,5, o que indica uma grande sensibilidade destas enzimas com relação a esta variável. α -Gal I e α -Gal II tiveram atividade nula em pH 3, entretanto, em pH 8, pode-se observar que estas enzimas apresentam ainda 5 e 4% da atividade máxima, respectivamente.

A α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi* apresenta máxima atividade quando incubada em pH 5,8, sendo que esta enzima mantém 90% de sua atividade máxima em uma faixa de pH compreendida entre 4 e 6,3 (Thippeswamy & Mulimani, 2002). Prashanth & Mulimani (2005) determinaram que a α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* apresenta máxima taxa de hidrólise quando incubada em pH 4,8.

Gote *et al.* (2004), estudando α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus*, concluíram que esta enzima tem máxima atividade quando incubada em uma faixa de pH entre 6,5 e 7, sendo que esta enzima mantém ainda cerca de 10% de sua atividade máxima quando incubada em pH 10.

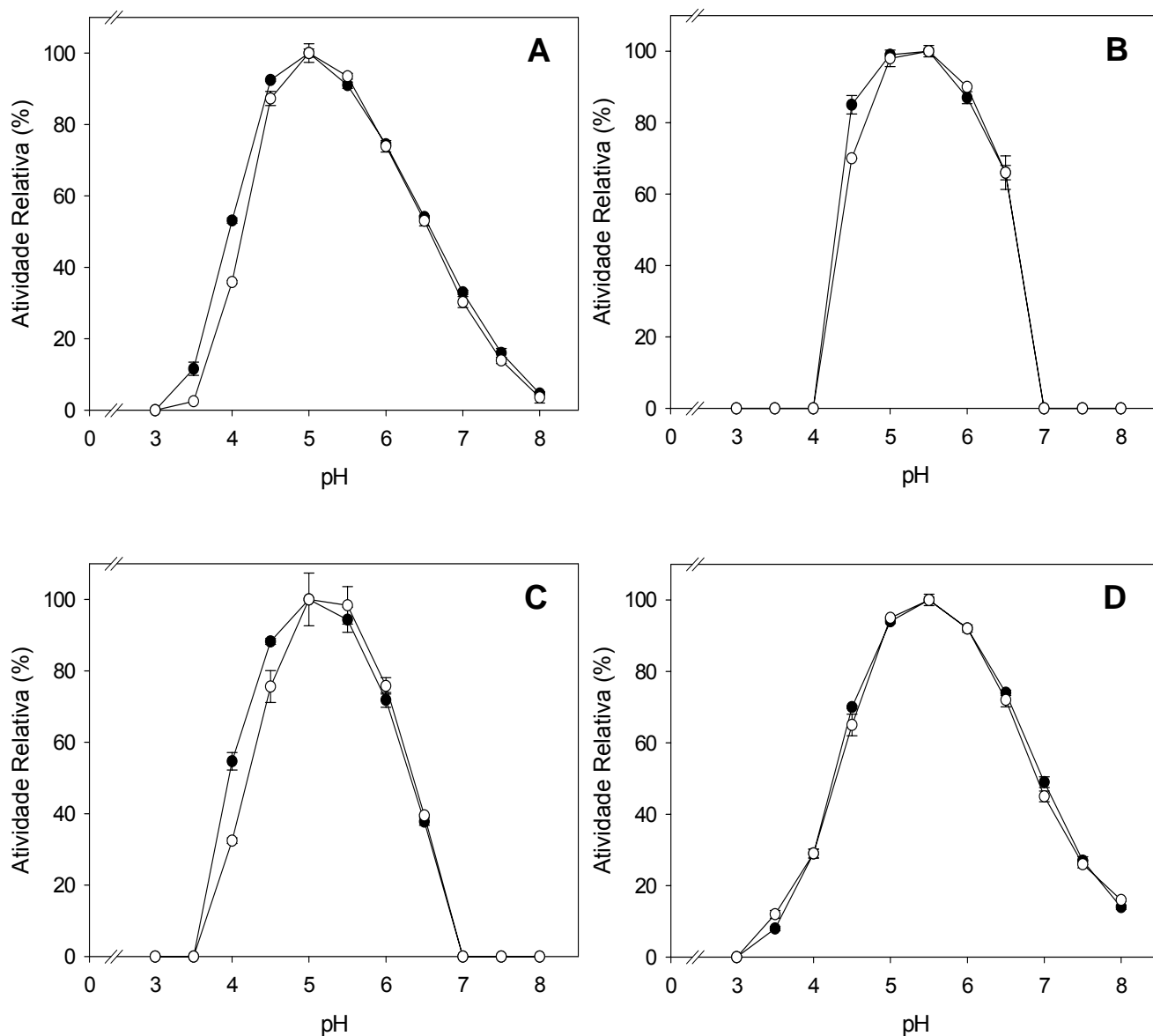


Figura 13: Efeito do pH sobre a atividade das enzimas α -Gal I (●) e α -Gal II (○) do fungo *Penicillium griseoroseum* para os substratos ρ -NP- α Gal (A), rafinose (B), estaquiose (C) e melibiose (D)

Em trabalho realizado por Viana *et al.* (2005), foi estabelecido que a α -galactosidase de *Glycine max* desempenha sua máxima atividade quando ensaiada em pH 6. Kang & Lee (2001) purificaram e caracterizaram uma α -galactosidase de *Vitis vinifera* que apresenta máxima atividade em pH 7. Viana *et al.* (2006), estudando a α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii*, determinaram que esta enzima tem seu pico de atividade quando incubada em pH 5, entretanto, esta enzima foi totalmente inativa em valores de pH superiores a 7.

Não foram notadas diferenças significativas com relação ao pH ótimo das enzimas α -Gal I e α -Gal II quando os substratos rafinose (Figura 13B), estaquiose (Figura 13C) e melibiose (Figura 13D) foram utilizados, sendo que para todos estes substratos ambas as enzimas apresentaram atividade máxima em pH 5. Entretanto, podemos observar que para os substratos rafinose e estaquiose, ambas as α -galactosidases demonstraram atividade em uma faixa de pH mais restrita.

Para os substratos p -NP- α Gal e melibiose, as α -galactosidases de *P. griseoroseum* mostraram-se ativas em uma faixa de pH variando entre 3,5 e 8. Já para o substrato estaquiose, pode-se detectar alguma atividade α -galactosidase apenas em uma faixa de pH compreendida entre os valores 4 e 6,5. Para o substrato rafinose a restrição foi ainda maior, pois como pode ser observado na figura 13B, ambas as α -galactosidases foram ativas somente em uma faixa de pH entre 4,5 e 6,5.

Este fato pode estar associado às diferenças no tamanho das moléculas destes substratos. Certamente, os substratos de maior massa molecular (rafinose e estaquiose) são dependentes de um maior número de interações eletrostáticas junto ao sítio ativo da enzima para que se alcance o estado de transição. Quanto maior for o número de resíduos de aminoácidos envolvidos no processo de estabilização da molécula de substrato no sítio ativo, provavelmente, mais restritas serão as condições de pH para a sua hidrólise, pois, na medida em que se distancia do valor de pH ótimo, maiores serão as chances de que pelo menos um dos resíduos de aminoácidos envolvidos no processo de estabilização assumam uma carga que desfavoreça a catálise.

A estabilidade das enzimas α -Gal I e α -Gal II, após 12 de incubação em diferentes pHs, foi analisada como descrito no item 3.8.1.2. As atividades residuais das α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* após a incubação são mostradas na Figura 14.

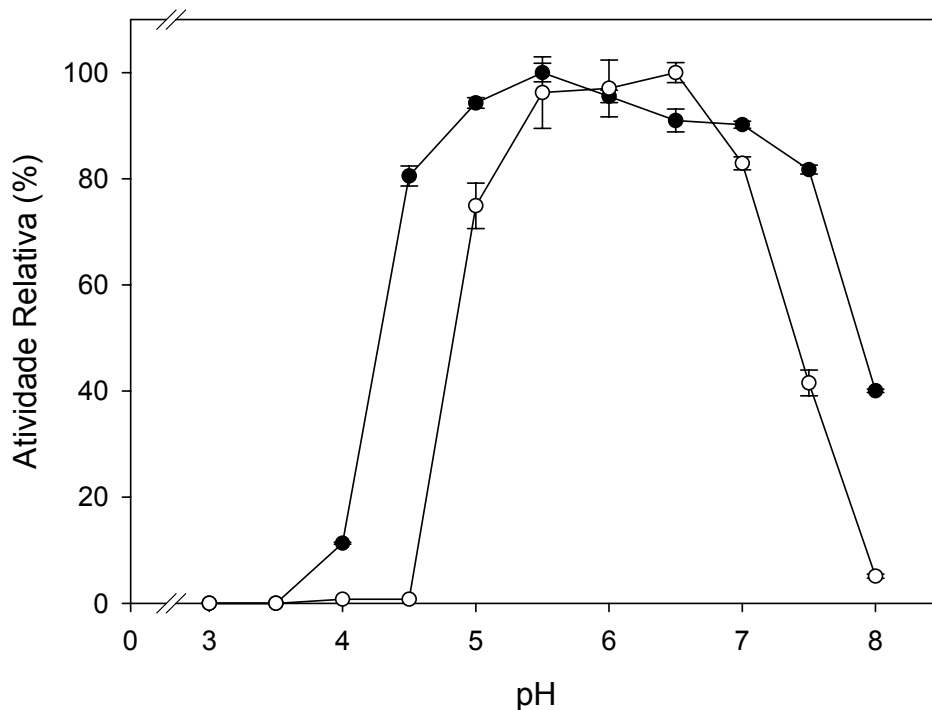


Figura 14: Efeito do pH sobre a e estabilidade das enzimas α -Gal I (●) e α -Gal II (○) do fungo *Penicillium griseoroseum* após 12 h de incubação

Ao contrário dos resultados obtidos nos ensaios para determinação do pH ótimo para as enzimas α -Gal I e α -Gal II, nota-se claramente, uma diferença no comportamento destas duas enzimas quando pré-incubadas por 12 h em diferentes condições de pH. A enzima α -Gal I mostrou maior estabilidade quando incubada a pH 5,5, sendo o valor de atividade obtido neste ensaio utilizado como parâmetro de comparação para os demais valores de atividade. A enzima α -Gal I manteve mais de 80% da sua atividade máxima quando incubada por 12 h em uma faixa de pH entre 4,5 e 7,5. Quando incubada em pH 8, α -Gal I reteve ainda 40% de sua atividade máxima, entretanto, verificou-se que a enzima foi irreversivelmente inativada após 12 de incubação em pHs inferiores a 3,5.

A enzima α -Gal II mostrou maior estabilidade quando incubada a pH 6,5, sendo o valor de atividade obtido neste ensaio utilizado como parâmetro de comparação para os demais valores de atividade obtidos. A enzima α -Gal II mostrou-se mais instável do que a enzima α -Gal I, mantendo mais de 80% da sua atividade máxima após a incubação apenas em uma faixa de pH entre 5,5 a 7. Quando incubada em pH 8, α -Gal II reteve apenas 5% de sua atividade máxima, sendo verificado também que a enzima foi irreversivelmente inativada após 12 de incubação em pHs inferiores a 4,5.

Gote *et al.* (2004) analisaram a estabilidade da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* em diferentes pHs, concluindo que esta enzima exibe mais de 80% de atividade residual após 12 h de incubação em uma faixa de pH compreendida entre os valores 4 e 10.

Aspergillus niger produz três enzimas α -galactosidases (α -gal II, α -gal III e α -gal IV) que mantêm mais de 70% de sua atividade máxima, após 17 horas de incubação, em uma faixa de pH entre 2 e 4,5 (Ademark *et al.*, 2001).

Segel (1979) descreve que 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. Somente a curva para determinação do pH ótimo não dá indicações das razões pelas quais a velocidade declina acima e abaixo do pH ótimo. O declínio poderia resultar da constituição de uma forma iônica não adequada do substrato ou da enzima (ou de ambos), ou pela inativação da enzima, ou ainda da combinação destes efeitos.

Baseados nesta premissa, poderíamos concluir que a perda da eficiência catalítica para a α -Gal I, verificada nos ensaios realizados para determinação do pH ótimo, em valores de pH entre 5 e 4,5 e entre os pH 5 e 7,5 deve-se a uma constituição iônica não adequada da enzima. O mesmo raciocínio pode ser aplicado a enzima α -Gal II para valores de pH entre 5 e 7.

4.5. Efeito da temperatura sobre a atividade das α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum*

O efeito da temperatura sobre a atividade das α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* contra os substratos p -NP- α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose foi avaliado como descrito no item 3.8.2. Considerando o p -NP- α Gal como substrato padrão para este tipo de análise, podemos observar que as enzimas α -Gal I e α -Gal II, possuem um comportamento idêntico quando ensaiadas em uma faixa de temperatura entre 20 e 45 °C, sendo que ambas as enzimas exibem a máxima atividade quando ensaiadas a 45 °C. Para temperaturas acima de 45 °C nota-se uma queda brusca na atividade das α -galactosidases, entretanto, para a enzima α -Gal II este declínio é mais acentuado (Figura 15A).

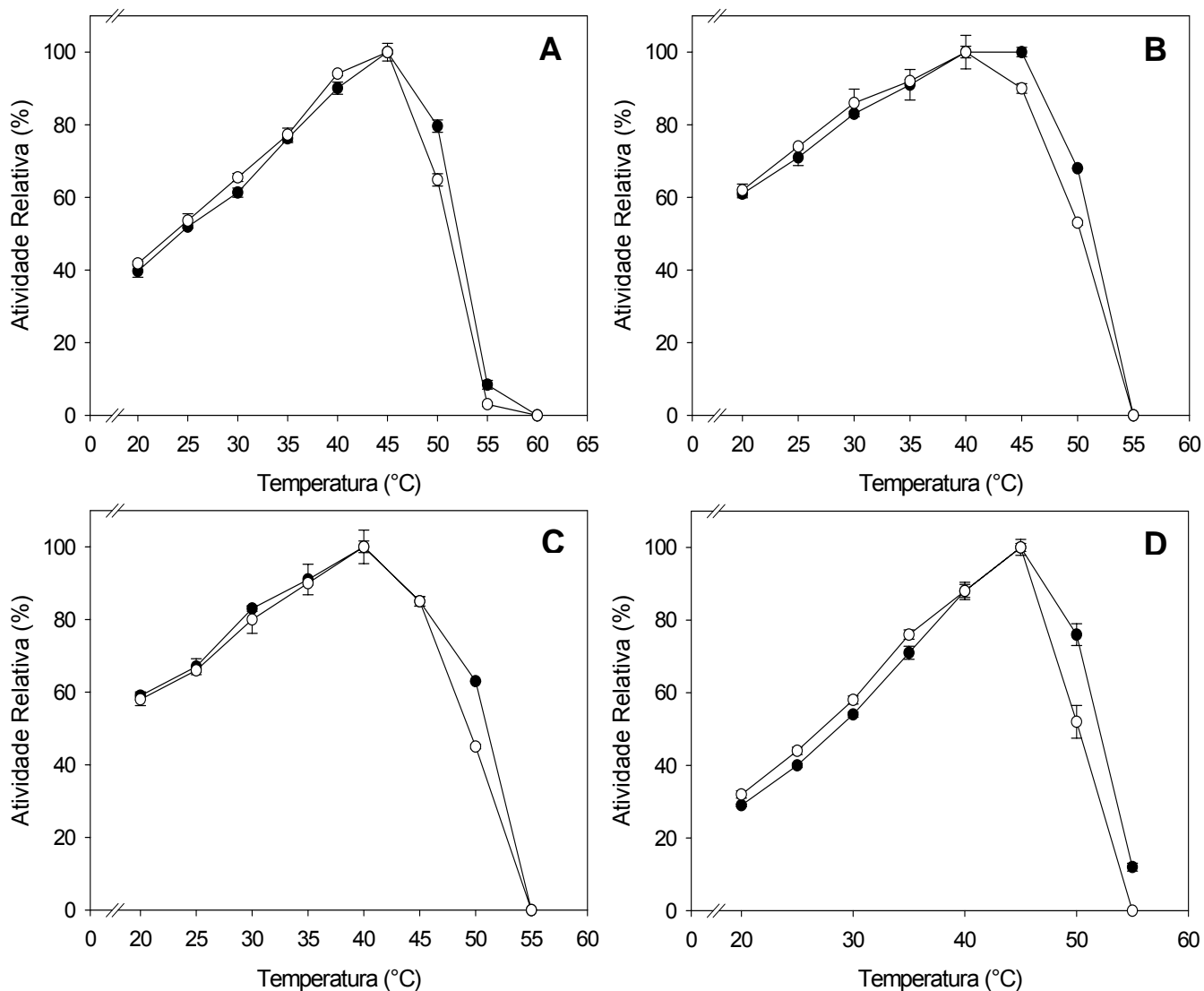


Figura 15: Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas α -Gal I (●) e α -Gal II (○) do fungo *Penicillium griseoroseum* para os substratos ρ -NP- α Gal (A), rafinose (B), estaquiose (C) e melibiose (D).

Ambas as α -galactosidases apresentam em torno de 40% de sua atividade máxima quando ensaiadas a 20 °C. Para os ensaios realizados a 50 °C observou-se que as enzimas α -Gal I e α -Gal II mantiveram 80% e 65% da sua atividade máxima respectivamente, o que indica que a α -Gal II apresenta uma maior instabilidade estrutural quando exposta a temperaturas mais elevadas.

As α -galactosidases de *Glycine max* foram estudadas por Viana *et al.* (2005) e Guimarães *et al.* (2001), sendo em ambos os trabalhos, determinado que estas enzimas exibem máxima atividade quando ensaiada em uma faixa de temperatura entre 45 e 50 °C.

Prashanth & Mulimani (2005) determinaram que a α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* exerce sua máxima capacidade hidrolítica a 50 °C. Esta enzima também exibiu acima de 80% de sua atividade máxima quando ensaiada em uma faixa de temperatura compreendida entre 30 e 60 °C.

Baik *et al.* (2000) clonaram a α -galactosidase de *Absidia corymbifera* em *E. coli* e caracterizaram a proteína expressada pelo organismo recombinante. Os autores determinaram que a enzima heteróloga apresentava máxima atividade a 60 °C.

O fungo *Thermomyces lanuginosus* produz uma α -galactosidase termoestável que tem máxima atividade quando incubada entre 65 e 70°C, sendo ainda observado que esta enzima mantém cerca de 80% da sua atividade máxima quando os ensaios foram realizados a 80 °C.

Gote *et al.* (2006) purificaram uma α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* cuja temperatura ótima para hidrólise do substrato ρ -NP- α Gal foi de 65 °C. Os autores também determinaram que esta enzima manteve 80 e 90% de sua atividade máxima quando ensaiada a 60 e 70 °C, respectivamente.

Não foi notada diferença significativa com relação a temperatura ótimo das enzimas α -Gal I e α -Gal II quando o substrato melibiose foi utilizada como substrato (Figura 15D), sendo que ambas as enzimas exibiram atividade máxima quando ensaiadas a 45°C.

A análise do efeito da temperatura sobre a atividade das α -galactosidases de *P. griseoroseum* contra o substrato rafinose, mostrou que as enzimas α -Gal I e α -Gal II apresentam maior atividade quando ensaiadas a 45 e 40 °C respectivamente (Figura 15B). Entretanto, quando estaquiase é utilizada como substrato, observa-se que ambas as enzimas exibem atividade máxima a 40 °C (Figura 15C).

Distintos valores de temperaturas ótimas para diferentes substratos podem ser explicados devido a alterações estruturais que ocorrem na molécula de uma enzima quando ela é submetida a diferentes condições de temperatura. Como os substratos são estruturalmente diversos, pequenas mudanças no arranjo tridimensional dos aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima afetarão de formas distintas as ligações entre a enzima e os seus substratos.

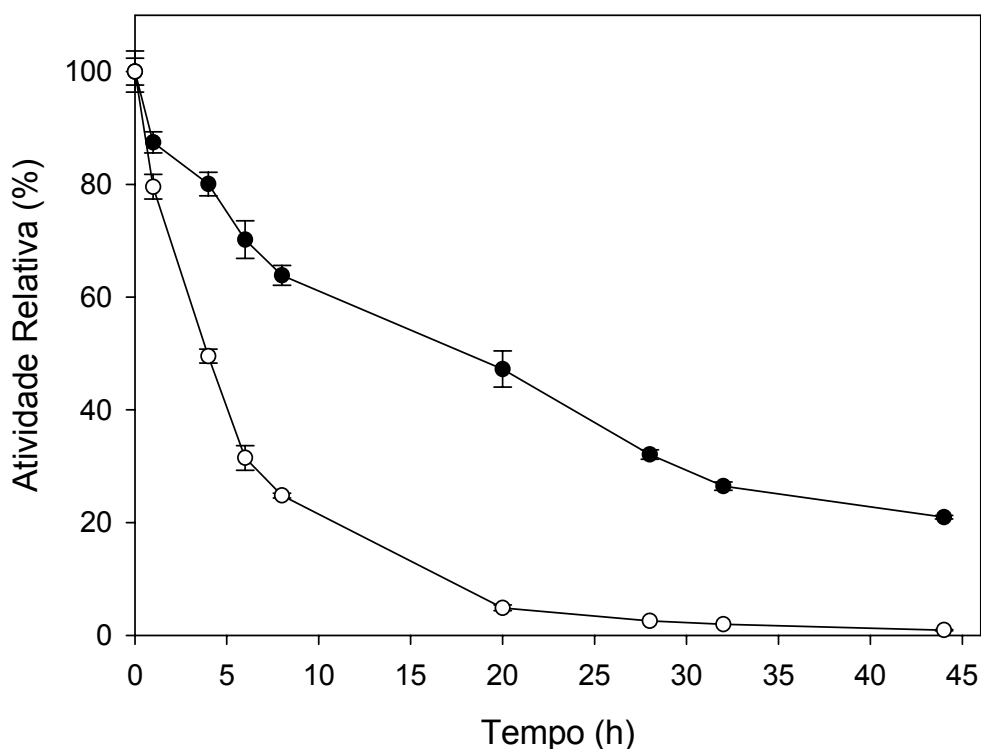


Figura 16: Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas α -Gal I (●) e α -Gal II (○) do fungo *Penicillium griseoroseum* incubadas a 40 °C.

A termoestabilidade das α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* foi avaliada nas temperaturas de 40 e 45 °C como descrito no item 3.8.2.1. A enzima α -Gal I mostrou maior estabilidade em relação à enzima α -Gal II quando incubada a 40°C (Figura 16). Este fato corrobora os dados inicialmente obtidos nos ensaios para determinação da temperatura ótima para ambas as enzimas, onde nitidamente, observou-se uma queda mais acentuada na atividade da enzima α -Gal II quando incubada em temperaturas mais elevadas (Figura 15). Após um período de incubação de 20 h, a enzima α -Gal I teve uma atividade residual de 48%, ao passo que após o mesmo período de incubação, foi observada uma atividade residual de 5% para a enzima α -Gal II. Após 44 h de incubação, α -Gal I reteve ainda 21% de sua atividade original, não sendo, entretanto, detectada atividade significativa para a enzima α -Gal II após este período de incubação.

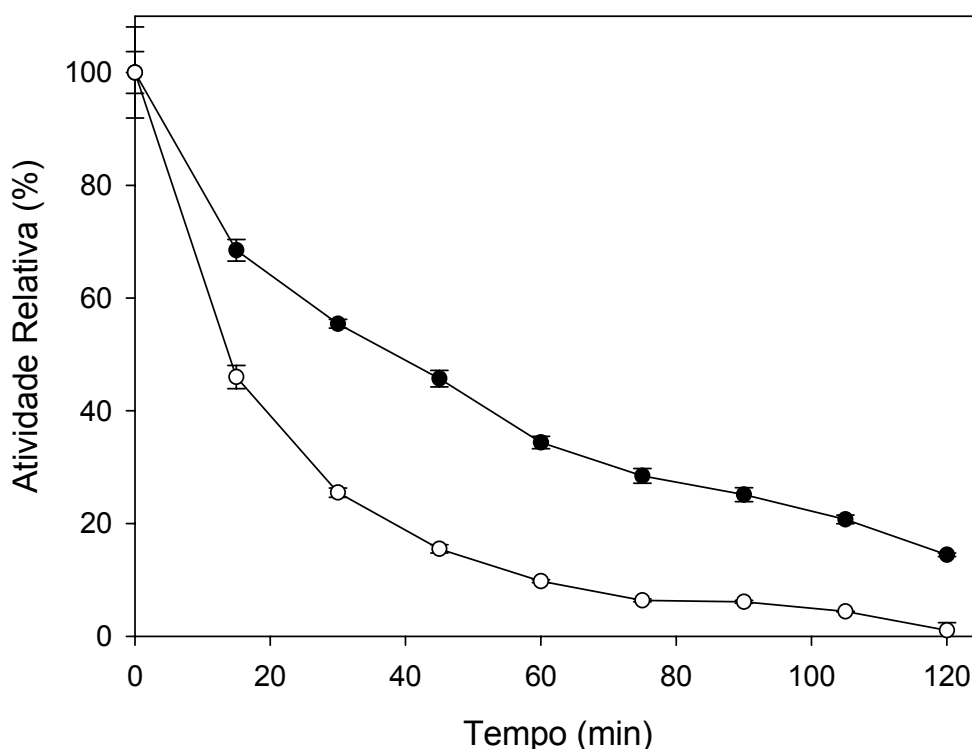


Figura 17: Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas α -Gal I (●) e α -Gal II (○) do fungo *Penicillium griseoroseum* incubadas a 45°C.

As enzimas α -galactosidases de *P. griseoroseum* mostraram-se muito instáveis quando incubadas a 45 °C (Figura 17). Novamente pode-se observar uma maior termoestabilidade por parte da enzima α -Gal I, que reteve 15% da sua atividade inicial após 2 horas de incubação. Após este mesmo período de incubação, não foi detectada atividade residual para a enzima α -Gal II.

Atualmente na literatura, encontra-se uma série de trabalhos que ressaltam enzimas α -galactosidases altamente termoestáveis. Viana *et al.* (2006) verificaram que a enzima α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* reteve 100 e 20% de sua atividade inicial após 24 h de incubação a 40 e 50 °C, respectivamente.

Não foi detectada perda de atividade para a enzima α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* após 60 h de incubação a 50 °C. A mesma enzima ainda exibiu 50 e 30% de atividade residual após 60 h de incubação a 65 e 70 °C respectivamente (Gote *et al.*, 2006).

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

a 85 °C) têm demonstrado atividade e estabilidade prolongadas acima de 75 °C.

De Rezende (1998), estudando α -galactosidase de *Aspergillus fumigatus*, observou que esta enzima mantém 80% de sua atividade inicial após 90 min de incubação a 50 °C.

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

Os valores de meia-vida das α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* a 40 e 45 °C foram obtidos por meio de uma ajuste dos dados obtidos nos experimentos de termoestabilidade a uma equação do tipo exponencial decadente ($y = a.e^{-b.x}$), utilizando o programa Sigma Plot® 9.0, como descrito no item 3.8.2.1. Os gráficos e os coeficientes obtidos em cada regressão são mostrados na Figura 18.

As enzimas α -Gal I e α -Gal II apresentaram uma meia-vida 980 e 230 min, respectivamente, quando incubadas a 40 °C. Quando incubada a 45 °C, α -Gal I teve uma meia vida de 40 min, ao passo que a meia vida da enzima α -Gal II foi estimada em 15 min.

Guimarães *et al.* (2001) descreveram que as α -galactosidases P1 e P2, extraídas de semente de soja germinadas, apresentaram uma meia vida de 16 e 11 min, respectivamente, quando incubadas a 50 °C. Gote *et al.* (2004) estudaram uma α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* com meia-vida de 80 min a 70 °C. A mesma enzima ainda exibiu 80% de atividade residual após 120 min de incubação a 65 °C.

Os valores de meia-vida da α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii* a 50, 55, 60, 65 e 70 °C foram de 821, 647, 373, 180, e 34.6 min, respectivamente (Viana *et al.*, 2006).

Segundo Segel (1979), enzimas de baixo peso molecular, compostas de uma única cadeia polipeptídica e possuindo pontes dissulfetos são geralmente

mais estáveis à altas temperaturas do que enzimas oligoméricas e de alto peso molecular. Como já descrito neste trabalho, as massas moleculares das enzimas α -Gal I e α -Gal II, em seu estado nativo, foram estimadas em 408,4 e 330,3 kDa, respectivamente. Desta maneira, este elevado valor de massa molecular, pode ser uma das possíveis justificativas para a baixa termoestabilidade destas enzimas.

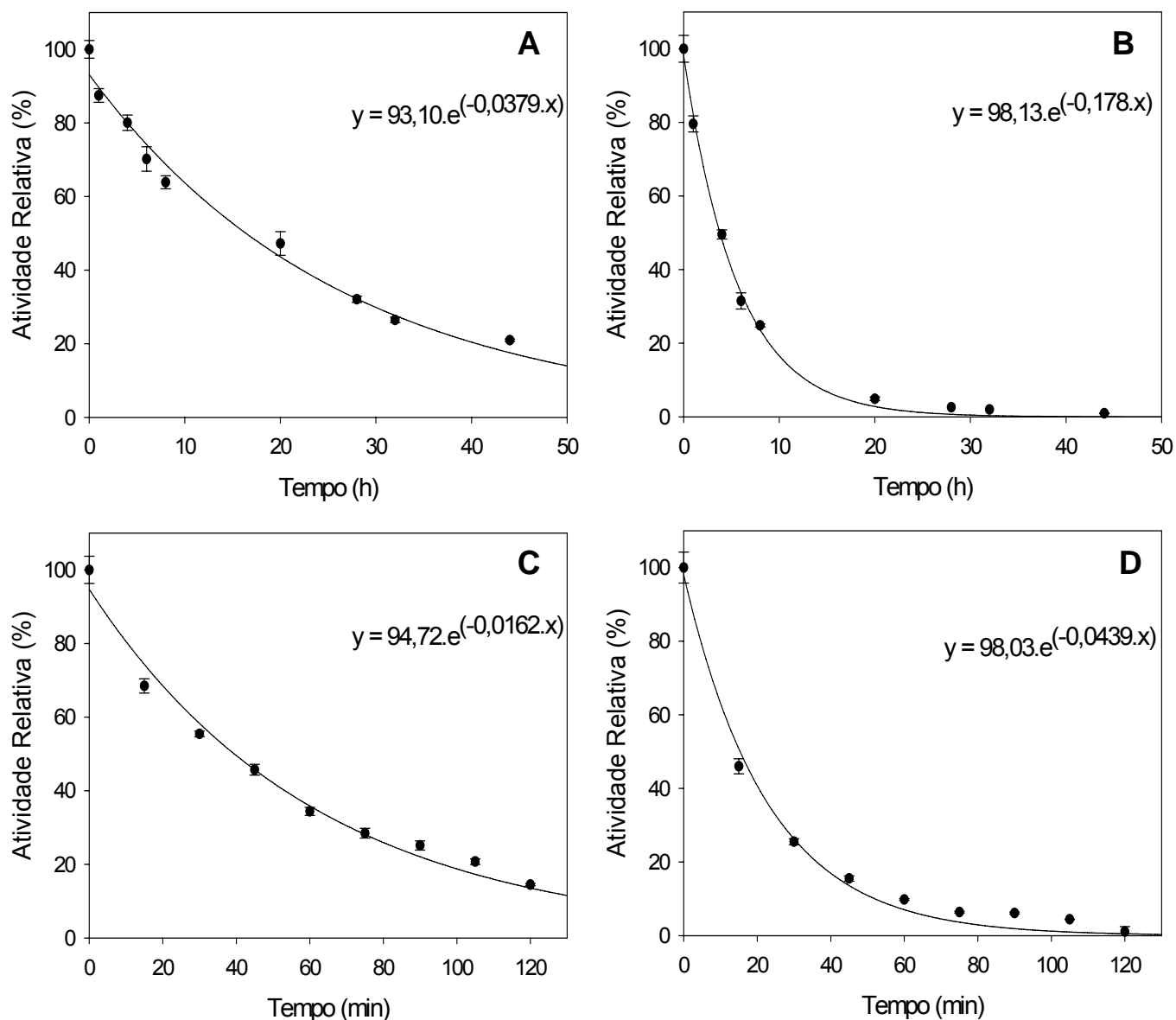


Figura 18: Estimação da meia-vida das α -galactosidasés do fungo *Penicillium griseoroseum*. α -Gal I incubada a 40°C (A); α -Gal II incubada a 40°C (B); α -Gal I incubada a 45°C (C), α -Gal II incubada a 45°C (D).

4.6. Determinação das constantes cinéticas

O efeito da concentração dos substratos ρ -NP- α Gal, o-NP- α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose sobre a atividade das enzimas α -Gal I e α -Gal II do fungo *P. griseoroseum* foi avaliado como descrito no item 3.8.3.

Os valores das constantes cinéticas K_M , bem como os valores de V_{max} e da relação $V_{max} \cdot K_M^{-1}$, obtidos para as enzimas α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* para diferentes substratos podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de K_M , V_{max} e $V_{max} \cdot K_M^{-1}$, obtidos para as enzimas α -Gal I e α -Gal II de *P. griseoroseum*, determinados pela curva de Michaelis-Menten para os substratos ρ -NP- α Gal, o-NP- α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose.

Substrato	α -Gal I			α -Gal II		
	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$)	$V_{max} \cdot K_M^{-1}$	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$)	$V_{max} \cdot K_M^{-1}$
ρ -NP- α Gal	1,06	10,57	9,97	0,8	11,42	14,27
o-NP- α Gal	1,31	6,63	5,06	1,26	6,58	5,22
Rafinose	28,74	23,22	0,80	30,46	22,18	0,72
Estaquiose	19,99	17,51	0,87	21,74	17,75	0,81
Melibiose	4,77	5,06	1,06	5,1	6,35	1,24

Segel (1979), afirma que a constante cinética K_M indica a “adequacidade” relativa de diferentes substratos para uma determinada enzima, ou seja, o substrato que apresenta um menor valor de K_M possui uma maior afinidade aparente para a enzima. Da mesma maneira, o valor da relação $V_{max} \cdot K_M^{-1}$, pode ser utilizado como um parâmetro de comparação para medir a eficiência catalítica de uma enzima para diferentes substratos, sendo que, maiores valores da relação $V_{max} \cdot K_M^{-1}$ indicam uma maior eficiência catalítica.

Considerando-se os aspectos cinéticos, as enzimas α -Gal I e α -Gal II apresentaram uma grande similaridade entre si. As α -galactosidases de *P. griseoroseum* mostraram maior afinidade (menor K_M e maior relação $K_M \cdot V_{max}^{-1}$) pelo substrato sintético ρ -NP- α Gal. Os demais substratos podem ser classificados em ordem decrescente de afinidade, para ambas as enzimas, da seguinte maneira: o-NP- α Gal, melibiose, estaquiose e rafinose.

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

a um conjunto de dados que relacionava Velocidade de hidrólise vs Concentração do substrato, utilizando o programa Sigma Plot®, versão 9.0. Os gráficos ajustados para os substratos ρ -NP- α Gal, o -NP- α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose são mostrados nas figuras 19, 20, 21, 22 e 23, respectivamente.

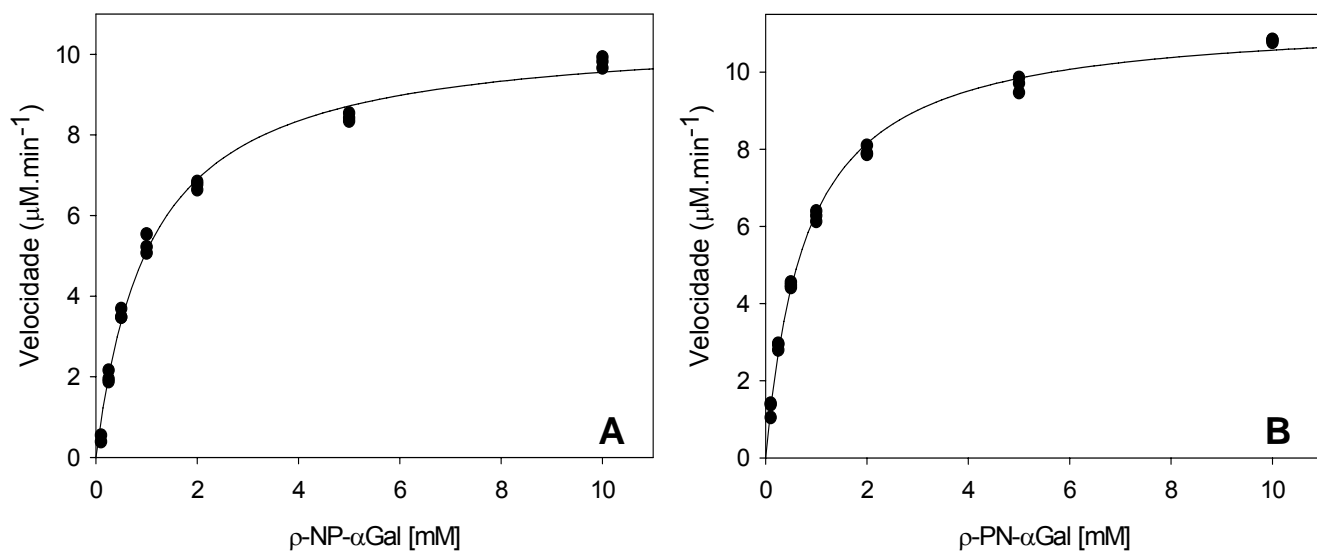


Figura 19: Efeito da concentração do substrato ρ -NP- α Gal na velocidade da reação catalisada pelas enzimas α -Gal I (A) e α -Gal II (B) do fungo *Penicillium griseoroseum*.

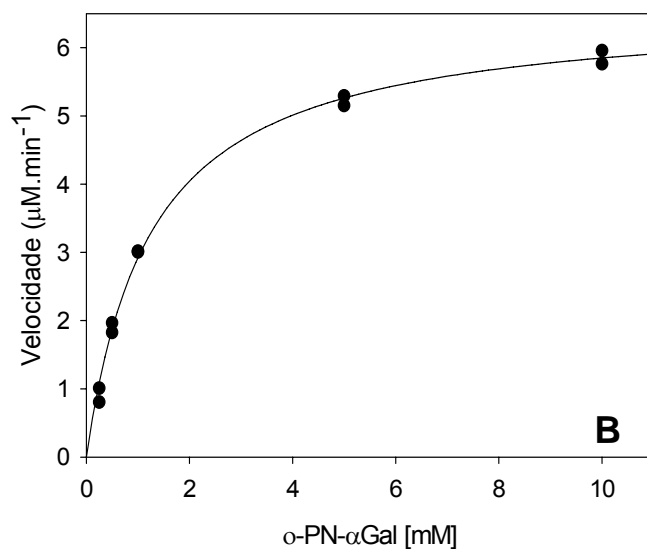
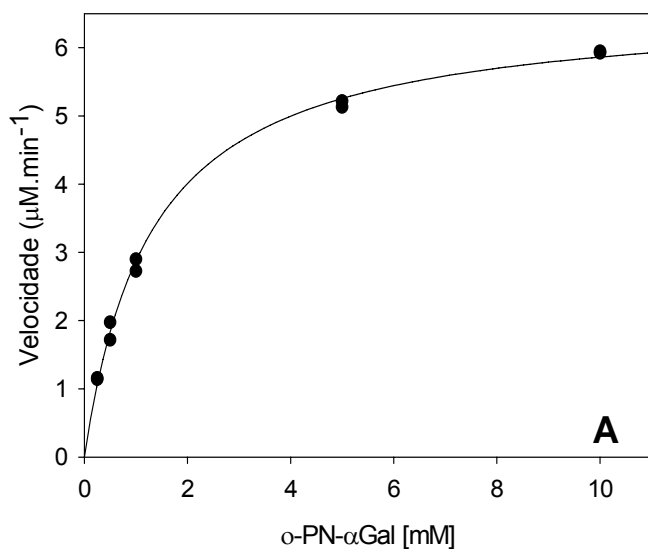


Figura 20: Efeito da concentração do substrato o-NP-αGal na velocidade da reação catalisada pelas enzimas α-Gal I (A) e α-Gal II (B) do fungo *Penicillium griseoroseum*.

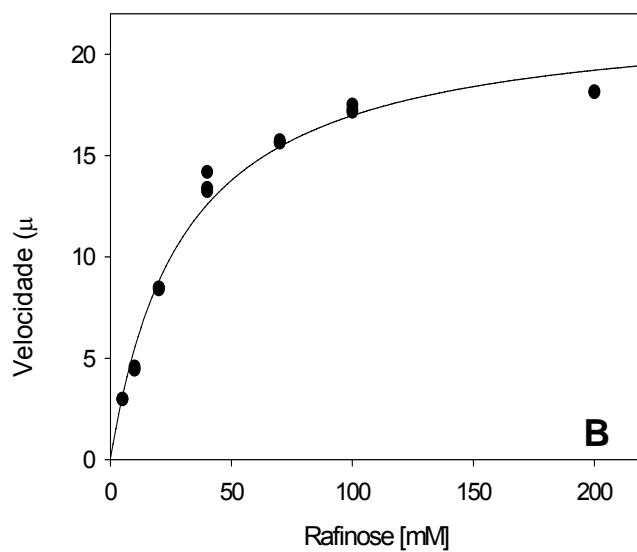
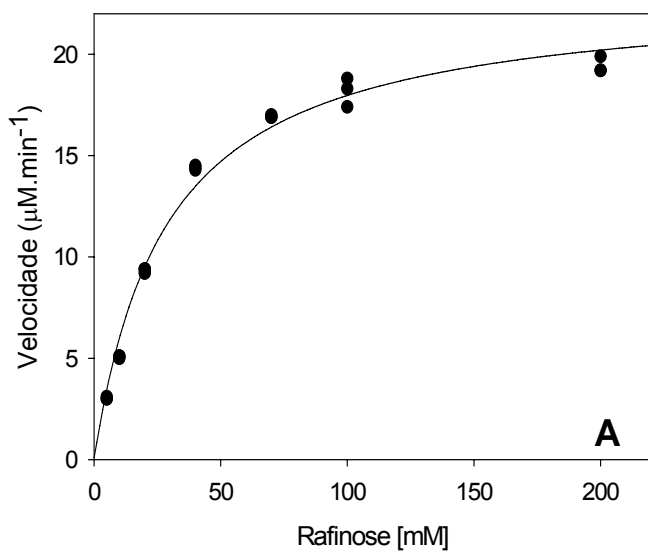


Figura 21: Efeito da concentração do substrato rafinose na velocidade da reação catalisada pelas enzimas α-Gal I (A) e α-Gal II (B) do fungo *Penicillium griseoroseum*.

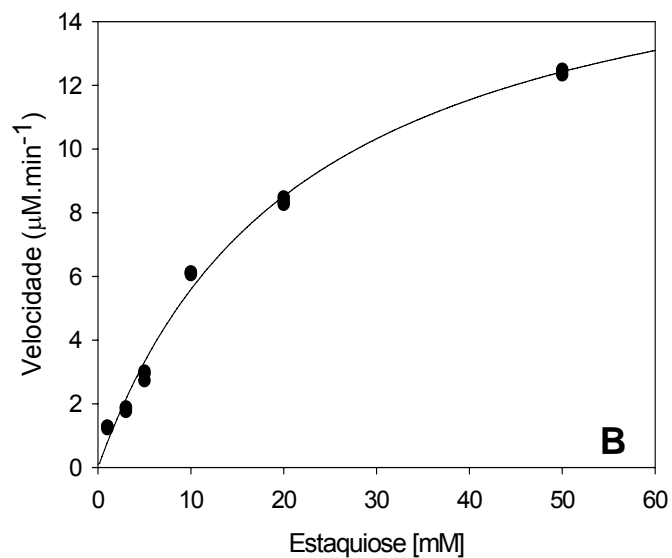
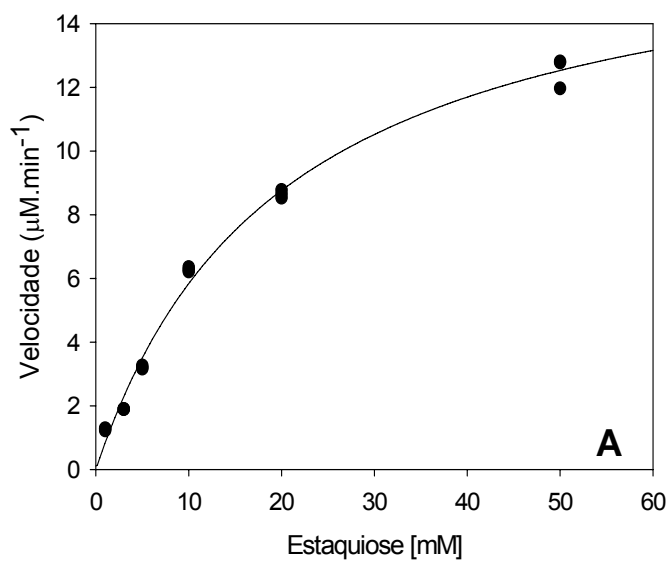


Figura 22: Efeito da concentração do substrato estaquiose na velocidade da reação catalisada pelas enzimas α -Gal I (A) e α -Gal II (B) do fungo *Penicillium griseoroseum*.

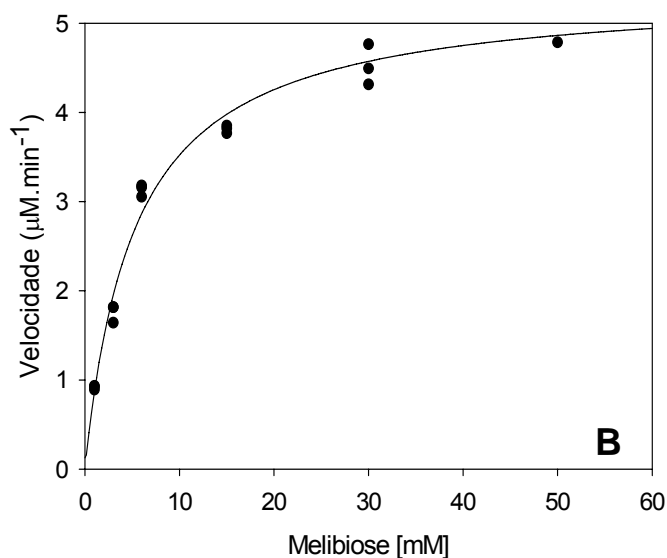
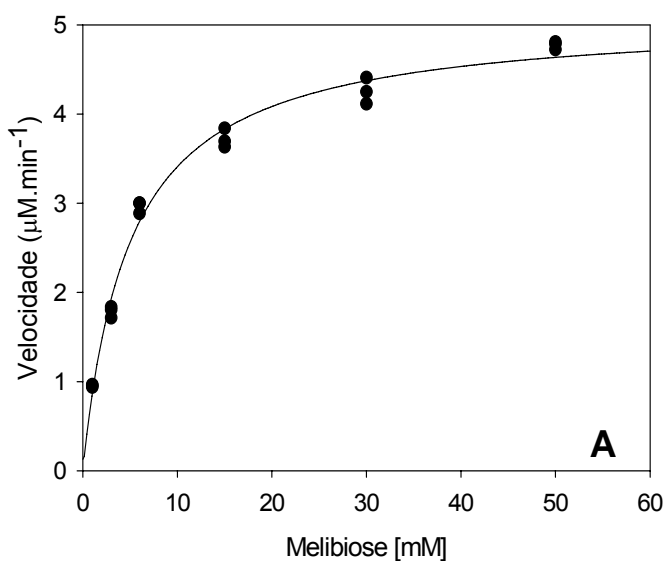


Figura 23: Efeito da concentração do substrato melibiose na velocidade da reação catalisada pelas enzimas α -Gal I (A) e α -Gal II (B) do fungo *Penicillium griseoroseum*.

É frequentemente observado na literatura, que enzimas α -galactosidases apresentam uma maior afinidade pelo substrato sintético p -NP- α Gal. De Resende (1998), avaliando a α -galactosidase produzida por *Aspergillus fumigatus*, determinou uma K_M de 0,38 mM para o substrato p -NP- α Gal. Ademark *et al.* (2001) purificaram e caracterizaram quatro α -galactosidases expressadas por *Aspergillus niger* (α -gal I, α -gal II, α -gal III e α -gal IV) e verificaram que os valores de K_M destas enzimas para o substrato p -NP- α Gal foram de 1,4, 0,22, 0,27 e 0,24 mM, respectivamente.

A α -galactosidase de *Trichoderma reesei* apresentou uma K_M de 0,05 mM para o substrato p -NP- α Gal (Shabalin *et al.*, 2001). Considerando-se ainda o mesmo substrato, verifica-se que as α -galactosidases de *Aspergillus oryzae* (Prashanth & Mulimani, 2005) e de *Thermomyces lanuginosus* (Puchart *et al.*, 2000) apresentam K_M de 0,83 e 0,5 mM, respectivamente.

Considerando-se os demais substratos, Gote *et al.* (2004) descreveram que a α -galactosidase da bactéria termófila *Bacillus stearothermophilus* apresentou uma K_M de 13,33, 6,66 e 3,33 mM para os substratos naturais melibiose, estaquiose e rafinose, respectivamente. A α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii* apresentou valores de K_M iguais a 2,01, 9,66 e 16 mM para os substratos melibiose, estaquiose e rafinose, respectivamente (Viana *et al.*, 2006).

Viana *et al.* (2005) descreveram que a α -galactosidase semi-purificada de *Glycine max* possui uma K_M _{ap} de 0,42 mM para melibiose e de 6,01 mM para rafinose. Shabalin *et al.* (2002) investigaram a comportamento cinético da α -galactosidase de *Thichoderma reesei*, determinando que os valores de K_M desta enzima para os substratos melibiose, rafinose e estaquiose são, respectivamente, 3, 11 e 5 mM.

Também Gherardini *et al.* (1985) descreveram valores de K_M iguais a 98,1 mM para hidrólise de rafinose e de 20,8 mM para a hidrólise de melibiose, estudando α -galactosidase produzida por *Bacteroides ovatus*.

Os dados encontrados na literatura sugerem que o valor absoluto de K_M para um determinado substrato varia essencialmente de acordo com a origem da enzima. Isto pode ser exemplificado, comparando-se os valores de K_M discrepantes encontrados para o substrato rafinose, quando diferentes α -galactosidases são avaliadas. Para este substrato, o valor da K_M da α -

galactosidase de *Pycnoporus cinnabarinus* é de 2,16 mM (Ohtacara *et al.*, 1984). Entretanto, valores de 11, 135 e 197 mM foram determinados para as α -galactosidases de *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces carlsbergensis* e *Streptococcus mutans*, respectivamente (Lazo *et al.*, 1976; Aduse-Opuko *et al.*, 1991; Shabalin *et al.*, 2002).

4.7. Especificidade das α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum*

As enzimas α -Gal I e α -Gal II foram avaliadas quanto à habilidade de hidrolisar outros substratos sintéticos e naturais. Os ensaios foram conduzidos como descrito no item 3.6 e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3.

α -Gal I e α -Gal II possuem especificidades idênticas para todos os substratos avaliados. Ao se analisar os resultados obtidos nos ensaios com substratos sintéticos pode-se observar que ambas as enzimas demonstraram ser altamente seletivas, hidrolisando somente resíduos de D-galactose α -ligados, não sendo observada hidrólise dos substratos que continham resíduos de galactose ligados na configuração β ou de substratos que continham outros açúcares em sua estrutura. Entretanto, pode-se notar que ambas as enzimas não possuem especificidade restrita ao substrato p -NP- α Gal, uma vez que a hidrólise do substrato o -NP- α Gal também foi detectada. Analisando a velocidade de hidrólise destes dois substratos conclui-se que a taxa de hidrólise da enzima α -Gal para o substrato p -NP- α Gal é cerca de 4,96 vezes maior do que para o substrato o -NP- α Gal. Para a enzima α -Gal II, esta relação foi de 4,69 vezes.

Dey & Pridham (1972), estudando a especificidade de enzimas α -galactosidases, afirmam que a habilidade destas enzimas em hidrolisar um substrato qualquer é, fundamentalmente, ligada a dois fatores. Primeiramente, o resíduo do açúcar, que compõem o substrato, deve estar na configuração piranosídica, em segundo, as configurações dos grupos “-H” e “-OH”, que estão ligados aos átomos de carbono 1, 2, 3 e 4, devem ser similares àquelas de uma molécula de α -D-galactose.

Tabela 3: Atividade das enzimas α -Gal I e α -Gal II do fungo *Penicillium griseoroseum* contra substratos sintéticos e naturais.

Substrato Sintéticos ^a	Atividade ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) ^c	
	α -Gal I	α -Gal II
ρ -NP- α Gal	8,44 \pm 0,17	9,10 \pm 0,14
o-NP- β Gal	0,00	0,00
m-NP- α Gal	0,00	0,00
ρ -NP- β Gal	0,00	0,00
o-NP- α Gal	1,70 \pm 0,06	1,94 \pm 0,16
o-NP- β Gli	0,00	0,00
ρ -NP- α Gli	0,00	0,00
ρ -NP- β Gli	0,00	0,00
ρ -NP- α Man	0,00	0,00
ρ -NP- α Ara	0,00	0,00
ρ -NP- β Xil	0,00	0,00
Substratos Naturais ^b	Atividade ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) ^d	
Rafinose	9,37 \pm 0,70	4,63 \pm 0,43
Estaquiose	20,65 \pm 2,32	8,12 \pm 0,76
Sacarose	0,00	0,00
Melibiose	13,58 \pm 0,82	11,21 \pm 1,17
Maltose	0,00	0,00
Lactose	0,00	0,00

^a [S] no ensaio = 0,5 mM

^b [S] no ensaio = 2 mM

^c μM de ρ -NP liberado por minuto

^d μM de galactose liberado por minuto

Kang & Lee (2001) demonstraram que a α -galactosidase produzida por *Vitis vinifera* foi capaz de hidrolisar substratos contendo resíduos de D-galactose, α e β ligados. A mesma enzima também pode hidrolisar resíduos de D-glicose (α e β ligados) e α -D-manose, entretanto, a taxa de hidrólise destes substratos foi muito inferior àquelas detectadas para os substratos contendo α -D-galactose na sua estrutura.

Oliveira (2002) descreveu que as duas α -galactosidases extraídas de sementes germinadas de *Platymiscium pubescens* apresentam especificidade absoluta para galactosídeos α -D ligados. Também Viana *et al.* (2006) determinaram que a α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* tem sua atividade restrita a hidrólise de substratos contendo D-galactosídeos α -ligados.

Guimarães *et al.* (2001) avaliaram a especificidade das α -galactosidases P1 e P2 extraídas de sementes de soja e determinaram que a enzima P2

apresenta especificidade restrita à substratos contendo α -D-galactose em sua estrutura. Entretanto, uma preparação enzimática contendo a α -galactosidase P1 foi capaz de hidrolisar os substratos ρ -NP- α Gal e ρ -NP- β Gal, sendo que a taxa de hidrólise do substrato ρ -NP- α Gal foi cerca de 18 vezes superior àquela determinada para o substrato ρ -NP- β Gal.

A especificidade das α -galactosidases de *P. griseoroseum* também foi avaliada contra substratos naturais. A exemplo do que foi verificado nos ensaios contra os substratos sintéticos, α -Gal I e α -Gal II apresentaram especificidade absoluta para a hidrólise de substratos contendo resíduos terminais de α -D-galactose (rafinose, estaquiose e melibiose).

As taxas de hidrólise foram determinadas quantificando-se a galactose liberada. A enzima α -Gal I apresentou maior atividade contra o substrato rafinose, ao passo que para a enzima α -Gal II, maior atividade contra melibiose foi detectada.

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).

Kim *et al.* (2002), trabalhando com α -galactosidase purificada de *Oryzae sativa*, descreveram que esta enzima hidrolisa os substratos estaquiose, melibiose e rafinose em uma ordem crescente de preferência.

Verbanets *et al.* (2001) determinaram que a α -galactosidase de *Penicillium sp.* hidrolisa equivalentemente os substratos rafinose, melibiose e estaquiose. Estes autores também descrevem que esta α -galactosidase é capaz de hidrolisar resíduos de galactose em ligações do tipo α -1,2 e α -1,3, não sendo capaz, entretanto, de hidrolisar de resíduos de galactose com ligações do tipo α -1,4.

A α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* hidrolisou os galacto-oligossacarídeos na seguinte ordem de preferência: estaquiose, melibiose e rafinose (GOTE *et al.*, 2006). Curiosamente, de Resende (1998) purificou uma α -galactosidase de *Aspergillus fumigatus* que apresentava atividade contra o substrato melibiose, mas que, era incapaz de hidrolisar rafinose.

4.8. Efeitos de íons, agentes redutores e açúcares na atividade das α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum*

Os efeitos de íons, agentes redutores e açúcares sobre a atividade das enzimas α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* foram avaliados como descrito no item 3.8.4. Buscando avaliar de uma maneira mais ampla e segura, o efeito de cada interferente sobre a atividade das α -galactosidases, três concentrações distintas de cada interferente foram testadas para enzimas α -Gal I e α -Gal II. Para os ensaios enzimáticos realizados na presença de íons e agentes redutores, as concentrações de 0,1, 1 e 10 mM foram avaliadas. Já para os ensaios realizados na presença de açúcares, as concentrações avaliadas foram 2, 10 e 30 mM. Os resultados obtidos para os ensaios com as enzimas α -Gal I e α -Gal II podem ser observados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Independentemente da concentração, não foram detectadas alterações significativas nas atividades de α -Gal I e α -Gal II quando estas enzimas foram pré-incubadas com EDTA, $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl, NaCl, β -mercaptoetanol, estaquiose, sacarose, galactose, glicose e frutose. Uma vez que a atividade enzimática praticamente não sofreu alteração pela presença de EDTA, pode-se sugerir que não houve dependência de íons metálicos para a atividade catalítica das enzimas α -Gal I e α -Gal II (Viana, 2006).

Tabela 4: Atividade relativa (%) da enzima α -Gal I do fungo *Penicillium griseoroseum* submetida a íons, agentes redutores e açúcares.

Efetor	Concentração		
	0,1 mM	1 mM	10 mM
Controle	100	100	100
EDTA	104 ± 4,1	100 ± 2,7	98 ± 1,1
MgCl ₂	101 ± 3,0	100 ± 1,8	101 ± 0,8
CaCl ₂	98 ± 1,4	105 ± 1,0	98 ± 1,1
CuSO ₄	34 ± 0,6	0	0
KCl	99 ± 1,9	101 ± 0,3	100 ± 0,7
NaCl	99 ± 2,1	102 ± 0,7	98 ± 1,8
HgCl ₂	0	0	0
AgNO ₃	22 ± 4,4	0	0
FeSO ₄	0	0	0
ZnSO ₄	90 ± 3,6	65 ± 2,5	10 ± 0,9
β -mercaptoetanol	95 ± 2,3	93 ± 3,2	94 ± 2,1
SDS	48 ± 3,0	0	0

Efetor	Concentração		
	2 mM	10 mM	30 mM
Controle	100	100	100
Lactose	93 ± 1,6	66 ± 0,5	44 ± 1,7
Maltose	98 ± 0,5	80 ± 0,4	61 ± 3,5
Melibiose	71 ± 0,5	37 ± 0,7	16 ± 0,8
Rafinose	100 ± 1,3	87 ± 1,7	70 ± 1,7
Manose	95 ± 1,7	68 ± 1,1	51 ± 0,7
Galactose	97 ± 2,3	92 ± 1,4	84 ± 0,2
Estaquiose	97 ± 0,3	89 ± 0,8	80 ± 0,9
Sacarose	95 ± 3,3	98 ± 1,0	87 ± 2,3
Glicose	95 ± 3,8	88 ± 1,8	82 ± 2,4
Frutose	97 ± 1,7	96 ± 1,7	97 ± 2,0

Dey e Pridham (1972) afirmam que galactose é um poderoso inibidor da atividade de enzimas α -galactosidases. Esta afirmativa pode ser confirmada quando se observa que as α -galactosidases produzidas por *Debaryomyces hansenii* (Viana, et al., 2006), *Bacillus stearothermophilus* (Gote, et al., 2006), *Aspergillus niger* (Scigelova & Crout, 2000) e *Glycine max* (Viana et al., 2005) foram fortemente inibidas na presença de galactose. Entretanto, observa-se que, a presença de galactose não interferiu de forma significativa na atividade das enzimas α -Gal I e α -Gal II de *P. griseoroseum*. Resultado semelhante foi encontrado por King et al. (2002) para a α -galactosidase de *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*, cuja inibição na presença de 75 mM de galactose foi de apenas 16%. Os autores ainda afirmam que o fato de

uma enzima α -galactosidase ser fracamente inibida na presença de galactose constitui-se em uma vantagem para a aplicação industrial desta enzima.

Tabela 5: Atividade relativa (%) da enzima α -Gal II do fungo *Penicillium griseoroseum* submetida a íons, agentes redutores e açúcares.

Efetor	Concentração		
	0,1 mM	1 mM	10 mM
Controle	100	100	100
EDTA	98 ± 3,1	93 ± 2,4	99 ± 5,1
MgCl ₂	95 ± 1,7	87 ± 3,5	103 ± 7,8
CaCl ₂	97 ± 1,8	101 ± 3,6	110 ± 5,2
CuSO ₄	38 ± 3,1	0	0
KCl	99 ± 6,1	83 ± 2,5	64 ± 4,6
NaCl	94 ± 6,3	94 ± 0,7	93 ± 1,5
HgCl ₂	0	0	0
AgNO ₃	30 ± 0,3	0	0
FeSO ₄	0	0	0
ZnSO ₄	86 ± 2,4	44 ± 0,4	0
β -mercaptoetanol	92 ± 2,6	95 ± 1,2	94 ± 3,1
SDS	0	0	0

Efetor	Concentração		
	2 mM	10 mM	30 mM
Controle	100	100	100
Lactose	93 ± 5,6	71 ± 1,7	43 ± 2,8
Maltose	104 ± 1,2	87 ± 2,0	67 ± 3,1
Melibiose	84 ± 3,9	51 ± 0,1	20 ± 1,8
Rafinose	95 ± 0,3	88 ± 3,2	69 ± 0,9
Manose	94 ± 1,0	82 ± 1,7	51 ± 3,2
Galactose	102 ± 3,5	98 ± 3,0	67 ± 4,6
Estaquiose	92 ± 0,2	98 ± 3,4	85 ± 1,6
Sacarose	96 ± 2,3	96 ± 5,2	62 ± 5,8
Glicose	98 ± 5,6	96 ± 4,9	85 ± 2,8
Frutose	95 ± 1,2	104 ± 2,1	90 ± 4,1

A atividade das α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* foram parcialmente inibidas na presença de lactose, maltose, melibiose, rafinose e manose, em concentrações iguais ou superiores a 10 mM. Dentre os açúcares estudados, melibiose foi aquele com maior potencial de inibição, observando-se uma atividade residual de 16 e 20% para as enzimas α -Gal I e α -Gal II, respectivamente, quando ensaiadas na presença de 30 mM deste dissacarídeo.

Scigelova & Crout (2000) descrevem que a α -galactosidase de *Aspergillus niger* teve uma redução de 65% de sua atividade quando ensaiada com 10 mM de melibiose. De maneira análoga, a α -galactosidase P2 de soja,

variedade Doko, foi inibida em 36% de sua atividade na presença de 2 mM de melibiose.

A α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* foi parcialmente inibida (15%) na presença de 20 mM de lactose, entretanto, a atividade desta enzima não sofre interferência na presença de glicose, sacarose, frutose, manose, arabinose e xilose a uma concentração igual ou inferior a 20 mM (Gote *et al.*, 2004).

Os íons Ag^+ , Cu^{+2} , Fe^{+2} e Hg^{+2} inibiram fortemente a atividade das α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum*, não sendo detectada atividade enzimática na presença de concentrações iguais ou superiores a 1 mM destes íons. King *et al.* (2002) descreveram que a α -galactosidase de *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* sofreu uma inibição de 31, 51 e 88% quando ensaiada na presença de 1 mM dos íons Cu^{+2} , Fe^{+2} e Hg^{+2} , respectivamente.

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

A α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* foi totalmente inibida na presença de 1 mM dos íons Ag^+ , Cu^{+2} e Hg^{+2} (Gote *et al.*, 2006). Resultado idêntico, também foi verificado em estudos com a enzima α -galactosidase de *Thermus brockianus* (Fridjonsson *et al.*, 1999).

Dey & Pridham (1969) descreveram que a inibição da α -galactosidase de *Vicia faba* por Ag^+ pode ser atribuída a interações com grupos carboxil e/ou resíduos de histidina presentes no sítio ativo da enzima. Os valores das constantes de inibição (K_i) do íon Ag^+ para esta enzima em pHs 4 e 6 foram 4 e 0,59 μM , respectivamente. Este decréscimo no valor de K_i , em concordância com o acréscimo no valor de pH, sugeria que os íons estavam ligando-se a grupos que perdiam prótons por ocasião da alteração no pH. Os autores também concluíram que baixas concentrações de galactose no meio de reação, diminuía o efeito inibitório causado pelo íon Ag^+ . Isto confirmava que o íon reagia com o sítio ativo da enzima.

De acordo com Sundd *et al.* (1998), o íon Hg^{+2} é um forte inibidor de grupos tióis. Desta maneira, o fato de muitas α -galactosidases serem inibidas por este íon, pode estar relacionado com a oxidação de grupos sulfidrilas

presentes nos sítios ativos destas enzimas (Gote *et al.*, 2004). Dey & Pridham (1969) descrevem também, que íons Hg^{+2} possuem alta afinidade por grupos carboxil e imidazólio de histidina, sugerindo que a blindagem destes grupos pelos íons Hg^{+2} podem causar a perda de atividade em α -galactosidases quando eles se encontram no sítio ativo destas enzimas.

A atividade das enzimas α -Gal I e α -Gal II do fungo *P. griseoroseum* foi moderadamente inibida pelo íon Zn^{+2} . Para os ensaios conduzidos na presença de 10 mM do íon, observou-se uma atividade residual de 10% para a enzima α -Gal I. Entretanto, utilizando as mesmas condições de ensaio, nenhuma atividade foi detectada para a enzima α -Gal II. Partindo deste resultado, podemos sugerir que a enzima α -Gal II, possui uma maior sensibilidade à presença de íons Zn^{+2} . King *et al.* (2002), analisando o efeito de íons sobre a atividade da α -galactosidase, descreveram que a enzima foi completamente inibida quando ensaiada na presença de 1 mM do íon Zn^{+2} .

Ambas as α -galactosidases de *P. griseoroseum* perderam completamente suas propriedades catalíticas na presença do agente desnaturante SDS em concentrações iguais ou superiores a 1 mM. Entretanto, para os ensaios conduzidos na presença de 0,1 mM deste detergente, verificou-se que a enzima α -Gal I apresentava ainda 48% de sua atividade, ao passo que nenhuma atividade foi detectada para a enzima α -Gal II. Este resultado sugere que a enzima α -Gal I possui uma maior estabilidade estrutural frente a agentes desnaturantes, fato este, já previamente constatado neste trabalho, quando os efeitos de pH e de temperatura sobre a estabilidade das α -galactosidases de *P. griseoroseum* foram avaliados.

4.9. Determinação da energia de ativação para as α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum*

A energia de ativação provida pelas enzimas α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* para a catálise da hidrólise dos substratos p -NP- α -Gal, rafinose e melibiose foi mensurada como descrito no item 3.8.5. Os gráficos de Arrhenius ($\text{Log } V_{\text{max}} \text{ vs } 1.T^{-1}(\text{°K})$) para a hidrólise de diferentes substratos pelas enzimas α -Gal I e α -Gal II são mostrados nas figuras 24A e 24B, respectivamente.

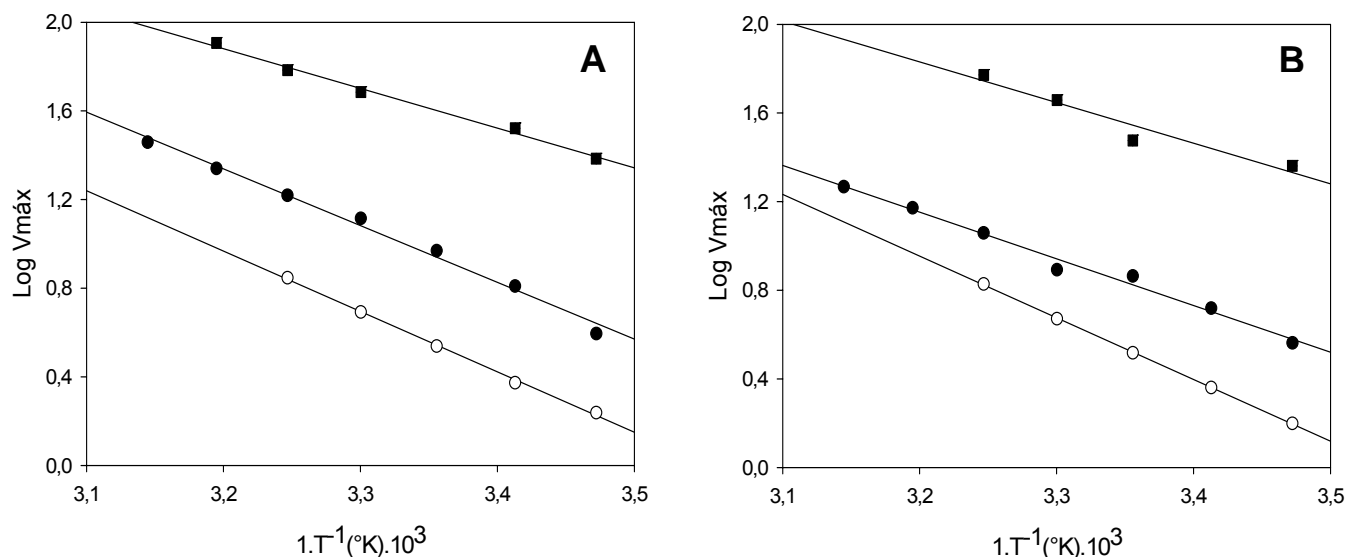


Figura 24: Gráfico de Arrhenius para a hidrólise dos substratos rafinose (■), ρ -NP- α Gal(●) e melibiose (○) pelas enzimas α -Gal I (A) e α -Gal II (B) do fungo *P. griseoroseum*. A energia de ativação (E_a) para cada substrato foi calculada pela equação $E_a = -4,454 \cdot I_R$, onde I_R corresponde ao valor da inclinação de cada segmento de reta.

Os valores das inclinações das retas (I_R) obtidas foram aplicados na equação de Arrhenius ($E_a = -4,454 \cdot I_R$) para a determinação dos valores de energia de ativação para cada substrato. Para a enzima α -Gal I, os valores de E_a estimados para os substratos rafinose, ρ -NP- α Gal e melibiose foram de 51,8, 48,7 e 34,1 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivamente. Os valores estimados de E_a para a enzima α -Gal II foram de 52,9, 40,1 e 34,9 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ para os substratos rafinose, ρ -NP- α Gal e melibiose, respectivamente. Gote *et al.* (2006) descreveram que a E_a , da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* para os substratos ρ -NP- α Gal, rafinose e melibiose foram respectivamente de 97,8, 61,6 e 35,6 $\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

4.10 Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (RO) em extrato desengordurado de soja pelas α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum*

O potencial de utilização das enzimas α -galactosidases do fungo *P. griseoroseum* para hidrólise de RO em derivados de soja foi avaliado em duas condições distintas. Primeiramente, realizaram-se os tratamentos de hidrólise utilizando as enzimas α -Gal I e α -Gal II em solução (enzimas livres). Em um segundo momento, executaram-se os ensaios de hidrólise utilizando a enzima α -Gal I imobilizada sobre sílica modificada com grupamentos aminos (SMGGal).

4.10.1. Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (RO) pelas enzimas livres

O emprego das enzimas α -Gal I e α -Gal II na hidrólise de RO em extrato desengordurado de soja foi avaliado como descrito no item 3.11.2. Alíquotas de 20 mL de extrato desengordurado de soja foram incubadas com 10 U das enzimas α -Gal I e α -Gal II separadamente e acondicionadas em Shaker, a 40 °C, sob agitação constante de 100 rpm. Os teores de rafinose e estaquiose presentes no extrato desengordurado foram mensurados ao longo do tratamento por CLAE, nos tempos de 0, 2, 4, 6 e 8 h, como descrito nos itens 3.12 e 3.13. A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes no extrato desengordurado, em função do tempo de incubação com a enzima. Como controle, o extrato desengordurado de soja foi incubado com igual volume de água destilada, em substituição às enzimas purificadas, nas mesmas condições.

Os resultados de hidrólise obtidos para a enzima α -Gal I, nos tempos de 0, 4 e 8 h, podem ser observados nos cromatogramas comparativos que são mostrados na Figura 25. Foi verificado que após 4 h de incubação, os teores de estaquiose haviam sido reduzidos em 86%, ao passo que os teores de rafinose haviam sofrido um acréscimo de 58%. Após 8 h de incubação, toda a estaquiose contida no extrato desengordurado de soja foi hidrolisada, sendo detectada também, ao final deste tempo de incubação, uma hidrólise de 69% para o oligossacarídeo rafinose.

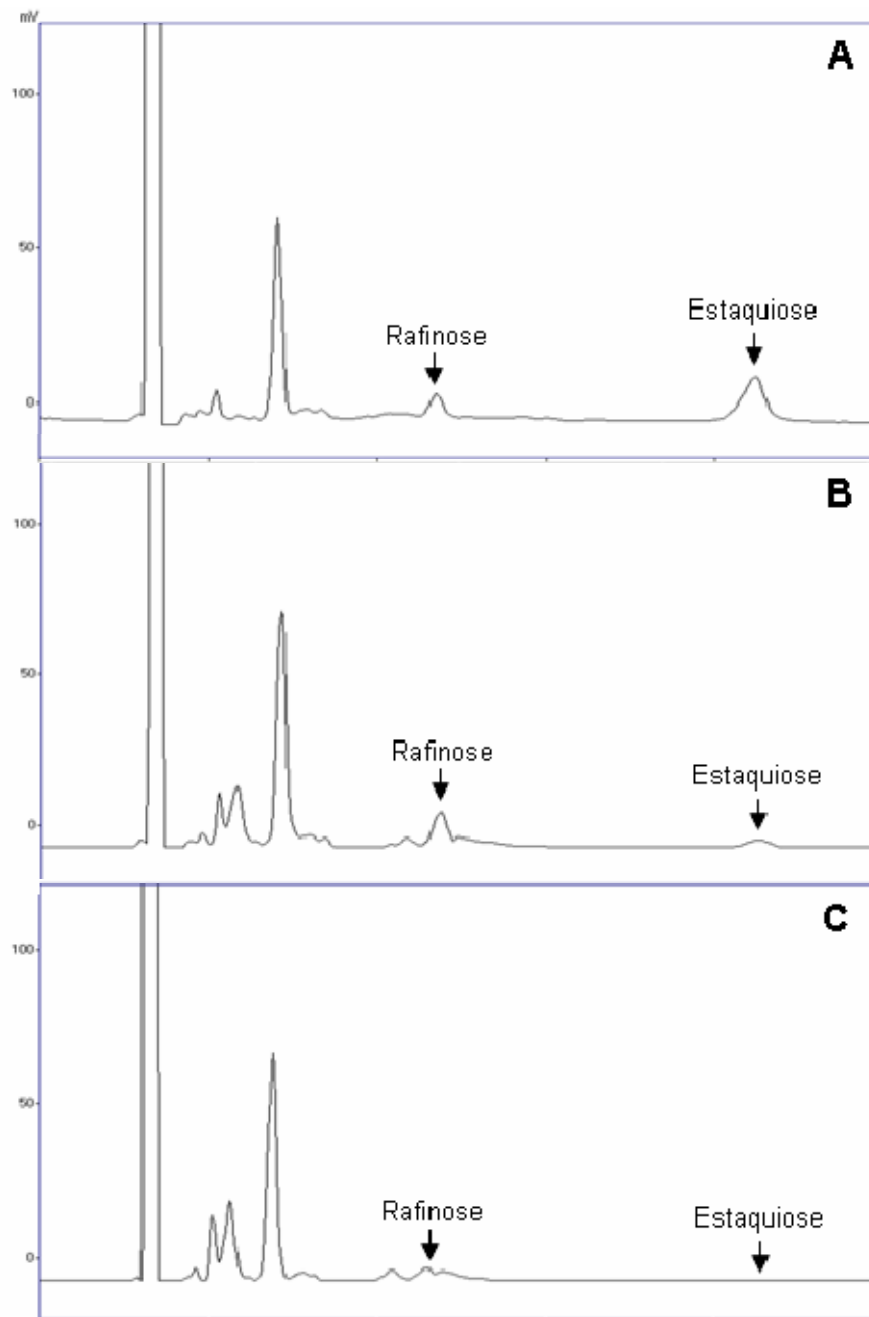


Figura 25: Cromatogramas comparativos da hidrólise de RO em extrato desengordurado de soja pela enzima α -Gal I do fungo *Penicillium griseoroseum* nos tempos 0 h (A), 4 h (B) e 8 h (C).

Os resultados de hidrólise obtidos para a enzima α -Gal II, nos tempos de 0, 4 e 8 h, podem ser observados nos cromatogramas comparativos que são mostrados na Figura 26.

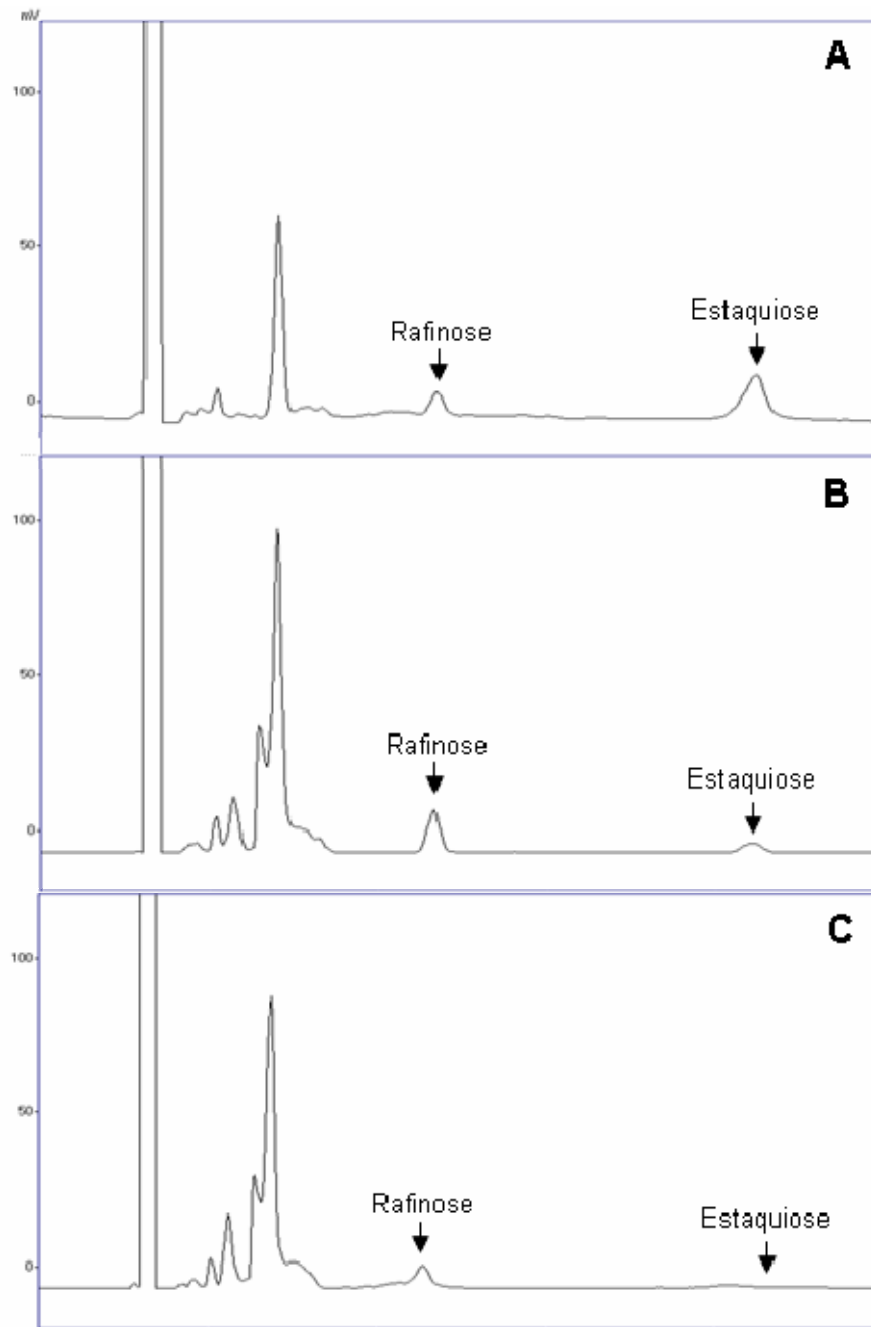


Figura 26: Cromatogramas comparativos da hidrólise de RO em extrato desengordurado de soja pela enzima α -Gal II do fungo *Penicillium griseoroseum* nos tempos 0 h (A), 4 h (B) e 8 h (C).

Pode-se verificar que, após 4 h de incubação, a enzima α -Gal II hidrolisou 80% do açúcar estaquiose. Entretanto, para o caso da rafinose, observou-se um acréscimo de 90% nos teores deste oligossacarídeo, considerando-se o mesmo período de incubação. Após 8 h de tratamento, não foi verificada a presença de estaquiose no extrato tratado com a enzima α -Gal II, entretanto, observou-se uma hidrólise bem mais modesta para rafinose, sendo detectada uma hidrólise de apenas 12 % deste açúcar após este tempo de tratamento.

Os perfis caracterizando o progresso da hidrólise dos açúcares rafinose e estaquiose, ao longo de todo o período de tratamento do extrato desengordurado de soja com as enzimas α -Gal I e α -Gal II do fungo *P. griseoroseum*, podem ser observado na Figura 27.

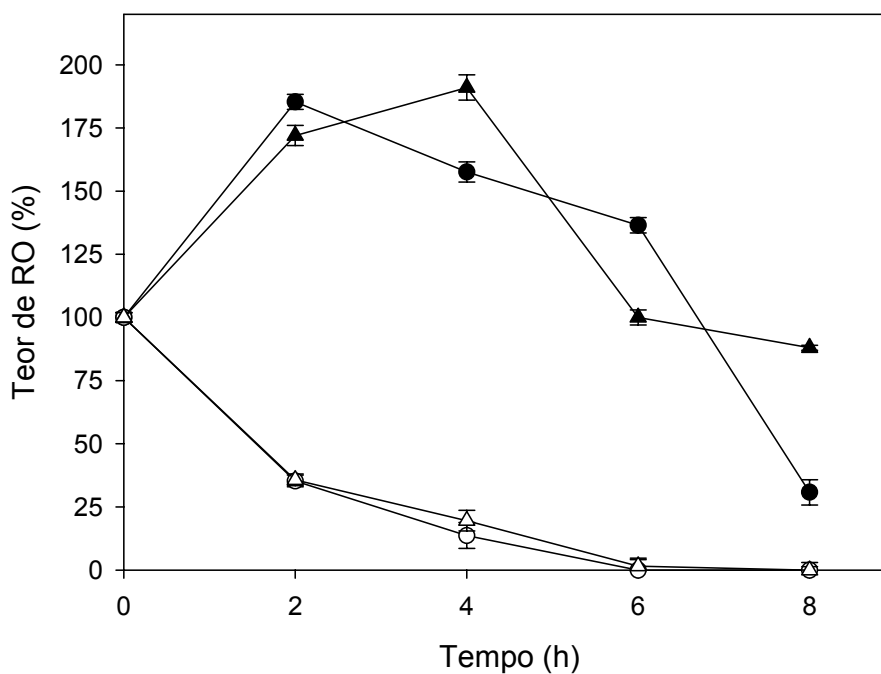


Figura 27: Perfis das hidrólises dos RO contidos em extrato desengordurado de soja tratado com as enzimas α -Gal I e α -Gal II do fungo *Penicillium griseoroseum*. Hidrólise de estaquiose pela α -Gal I (○); hidrólise de estaquiose pela α -Gal II (△); hidrólise de rafinose pela α -Gal I (●); hidrólise de rafinose pela α -Gal II (▲).

Como pode ser observado na figura 27, em ambos os tratamentos, toda a estaquiose presente no extrato desengordurado foi hidrolisado após 6 h de incubação. As análises referentes à rafinose, revelam um acúmulo deste açúcar, em ambos os tratamentos, durante as primeiras 6 h de incubação. Tal fenômeno pode ser justificado pelo fato da rafinose ser um dos produtos da hidrólise da estaquiose. Como já descrito anteriormente nesta dissertação, ambas às enzimas, α -Gal I e α -Gal II, apresentaram uma maior eficiência catalítica (maior relação $V_{max} \cdot K_M^{-1}$) e uma maior afinidade (menor valor de K_M) pelo substrato estaquiose em relação ao substrato rafinose. Este fato possivelmente também contribuiu para uma hidrólise mais lenta da rafinose, favorecendo assim, o acúmulo deste oligossacarídeo nas primeiras horas do tratamento.

Uma maior eficiência hidrolítica foi verificada por Viana *et al.* (2006) analisando a aplicação de 10 U da enzima α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii* na hidrólise de RO contidos em 5 mL de leite de soja. Os autores verificaram que após 4 h de tratamento toda rafinose e estaquiose haviam sido eliminadas das amostras. Falkoski *et al.* (2006), analisando α -galactosidases de várias fontes, determinaram que a α -galactosidase do fungo *Aspergillus terreus* foi capaz de hidrolisar todos os RO contidos em extrato desengordurado de soja após 4 h de tratamento, utilizando uma relação de 1 U de enzima para cada 2,5 mL de extrato.

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

Gote *et al.* (2004) avaliaram o potencial de hidrólise de RO em leite de soja pela enzima α -galactosidase purificada de *Bacillus stearothermophilus*, utilizando uma relação de 1U de enzima para cada 1 mL de leite de soja, obtendo uma hidrólise de 100 e 94% da estaquiose e rafinose respectivamente, em ensaios realizados a 65 °C.

Garro *et al.* (2004) avaliaram a redução de RO em leite de soja por fermentação parcial, utilizando um inóculo contendo os microrganismos *Bifidobacterium longum* CRL 849 e *Lactobacillus fermentum* CRL 215. Os autores determinaram que após 24 h de fermentação os teores de rafinose e estaquiose haviam sido reduzidos em 84 e 85%, respectivamente.

Ambas as α -galactosidases produzidas pelo fungo *P. griseoroseum* apresentaram potencial para utilização na redução de RO em derivados de soja, entretanto, podemos verificar que a enzima α -Gal I mostrou um maior potencial para a hidrólise dos RO, tendo eliminado 100% da estaquiose e 69% da rafinose presente no extrato desengordurado após 8 h de incubação, ao passo que a enzima α -Gal II hidrolisou 100% da estaquiose e apenas 12% da rafinose após mesmo período de tratamento. Um dos fatores que certamente contribuíram para uma menor eficiência de hidrólise da enzima α -Gal II em relação à enzima α -Gal I está ligado a uma menor termoestabilidade da enzima

α -Gal II. Como já descrito anteriormente, α -Gal I apresentou uma meia vida de aproximadamente 16 h a 40 °C, ao passo que para a enzima α -Gal II o valor de meia-vida nesta temperatura foi de 230 min. Esta grande instabilidade da enzima α -Gal II sentencia que a mais da metade da enzima aplicada no ensaio estava provavelmente inativa após 4 h de tratamento.

Devido ao fato da enzima α -Gal I ter mostrado uma maior estabilidade frente a condições desnaturantes (pH, temperatura) e uma maior eficiência hidrolítica para os RO em extrato desengordurado de soja, esta enzima foi escolhida para a realização de testes de imobilização enzimática.

4.11. Imobilização da enzima α -Gal I do fungo *Penicillium griseoroseum*

A enzima α -Gal I foi imobilizada sobre sílica modificada por grupos aminos (SM) como descrito no item 3.10.2. Uma alíquota de 1 g de SM foi ativada em solução de glutaraldeído (5%), lavada 5 vezes com água destilada e posteriormente adicionada a 100 mL de uma solução enzimática contendo 89,2 U ($0,892 \text{ U.mL}^{-1}$) da enzima α -Gal I. Esta mistura foi mantida em agitação por 10 min. Ao final deste processo, a sílica contendo a enzima imobilizada (SMGGal) foi recuperada por decantação e a atividade α -galactosidase residual, contida na solução enzimática utilizada durante o processo de imobilização, foi novamente mensurada. A quantidade de enzima imobilizada foi estimada considerando-se a diferença de atividade α -galactosidase na solução antes e depois do processo de imobilização.

Os resultados obtidos durante o processo de imobilização da enzima α -Gal I sobre SM podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados obtidos para a imobilização da enzima α -Gal I do fungo *Penicillium griseoroseum* sobre 1 g de sílica modificada. As atividades para a enzima livre e imobilizada foram determinadas como descrito na metodologia.

Adicionada (A)	Atividade da Enzima α -Gal I (U)			Rendimento ^a (%)	Fator de efetividade ^b (η)
	Não Imobilizada (B)	Imobilizada (C)	Imobilizada efetiva (D)		
89,2	40,3 \pm 3,5	48,9 \pm 3,5	16,13 \pm 2,68	54,82	0,33

^a Rendimento = $(C \times 100).A^{-1}$

^b Fator de efetividade = $D.C^{-1}$

Como observado na Tabela 6, a enzima α -Gal I foi imobilizada sobre SM obtendo-se uma relação de 48,9 U.g⁻¹ de sílica. A eficiência do processo de imobilização foi avaliada pela determinação do fator de efetividade (η). O fator de efetividade de uma enzima mobilizada representa a relação entre a atividade atual ou real e sua atividade esperada (Miller & Zwing, 1982).

Foi verificado que o valor de η para a imobilização da enzima α -Gal I sobre SM foi de 0,33. Ahmad *et al.* (2001) imobilizaram preparações comerciais das glicoenzimas celulase e amilase sobre lecitina ligada em resina Seralose ativada com brometo cianogênio, encontrando valores de η igual a 0,16 e 0,6 respectivamente. Ettalibi *et al.* (2001) avaliaram o emprego de microesferas porosas de vidro, ativadas por reação de silanização com APTS, para a imobilização da enzima inulinase do fungo *Aspergillus ficum*, determinando um fator de efetividade de 0,72 para esta enzima imobilizada. Bayramoglu *et al.* (2003) descreveram o processo de imobilização da enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae* sobre filmes do polímero poly(2-hidroxietil metacrilato-glicidil metacrilato) relatando valores de η que variavam entre 0,53 e 0,85, dependendo da relação dos constituintes deste polímero.

A perda da eficiência catalítica observada em enzimas imobilizadas pode ser atribuída a vários fatores, dentre os quais podemos destacar: natureza química do suporte, estabilidade estrutural da enzima, limitações na difusão dos componentes envolvidos na catálise e também pela orientação desfavorável de muitas moléculas da enzima imobilizada (Ahmad *et al.*, 2001; Sanjay & Suguman, 2005).

4.11.1. Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (RO) pela SMGGal

Os ensaios de hidrólise com SMGGal foram realizados conforme descrição no item 3.11.3 e os demais procedimentos foram realizados como descrito anteriormente para as enzimas livres.

Os resultados de hidrólise dos RO contidos em 20 mL de extrato desengordurado de soja, após 8 h de tratamento com 10 U (atividade efetiva) da enzima α -Gal I imobilizada podem ser observados no cromatograma comparativo apresentado na Figura 28.

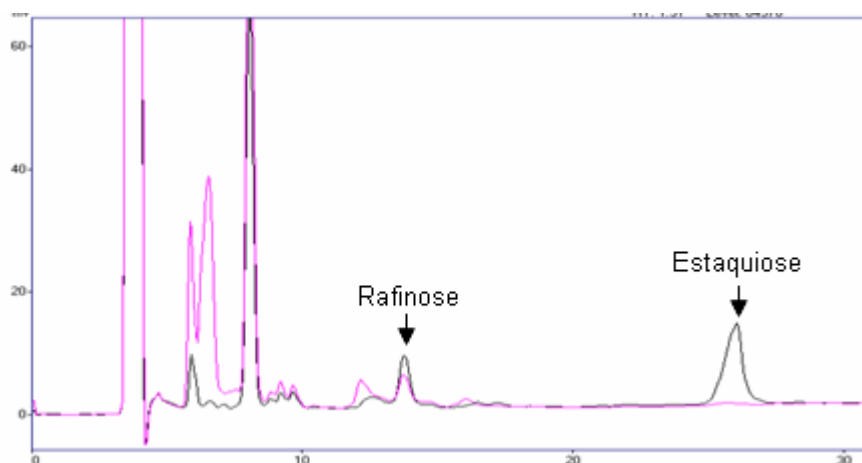


Figura 28: Cromatograma comparativo da hidrólise de RO em extrato desengordurado de soja pela SMGGal. Extrato não tratado (—); extrato após 8 h de tratamento (---).

Após 8 h de tratamento, SMGGal promoveu a hidrólise de 100 e 70% dos oligossacarídeos estaquiose e rafinose, respectivamente.

Os perfis caracterizando o progresso da hidrólise dos açúcares rafinose e estaquiose, ao longo de todo o período de tratamento do extrato desengordurado de soja com a enzima imobilizada, podem ser observados na Figura 29.

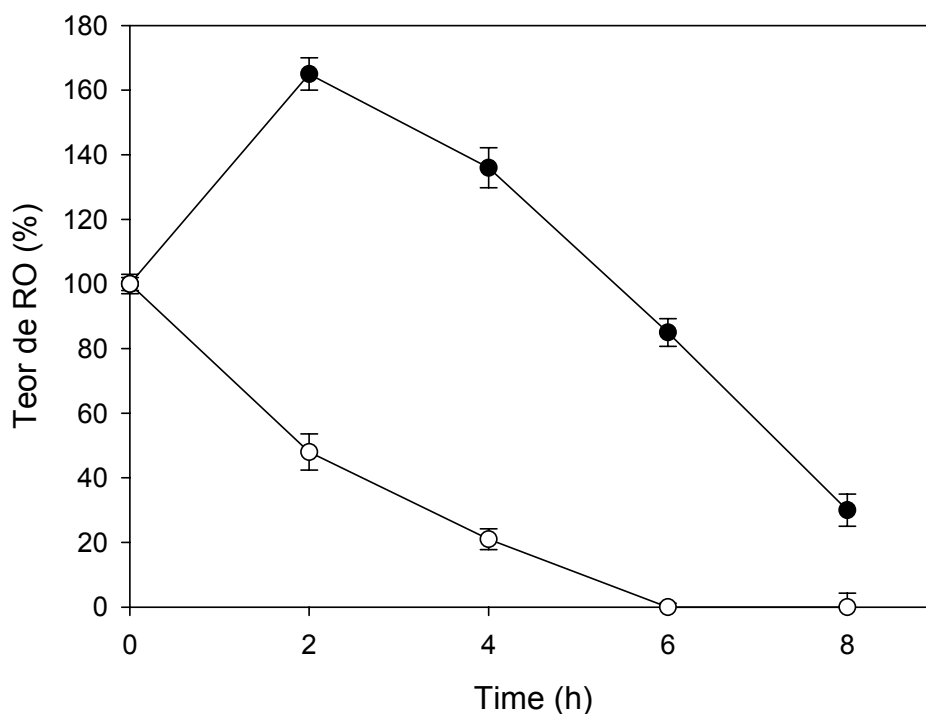


Figura 29: Perfis das hidrólises dos RO contidos em extrato desengordurado de soja tratado com SMGGal. Hidrólise estaquiose (○); hidrólise rafinose (●).

A exemplo do que havia sido descrito para os tratamentos realizados com as enzimas α -galactosidases livres, toda a estaquiose contida no extrato desengordurado de soja foi hidrolisada após 6 h de incubação com SMGGal. Também foi verificado um acúmulo do oligossacarídeo rafinose durante as primeiras horas do ensaio, o que sugere que o processo de imobilização enzimática não afetou de maneira drástica a afinidade e as características cinéticas da enzima α -Gal I.

Viana *et al.* (2006) descreveram o emprego de 40 U da enzima α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* imobilizada sobre sílica modificada por grupamentos aminas na hidrólise de RO em 25 mL de leite de soja. Os autores determinaram que após 4 h horas de tratamento, toda a estaquiose havia sido hidrolisada, entretanto, a mesma eficiência não foi detectada para a rafinose, uma vez que mesmo após 10 h de tratamento a hidrólise deste açúcar havia sido de 64%.

Thippeswamy & Mulimani (2002) obtiveram uma hidrólise de 66% dos RO presentes em extrato hidrossolúvel de soja após 3 h de incubação com a enzima α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi* imobilizada por encapsulação em gel de poliacrilamida.

Prashanth & Mulimani (2005) avaliaram a utilização da enzima α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em alginato de cálcio para a redução dos teores de RO em derivados de soja. Alíquotas de 60 mL de leite de soja foram tratadas com 50 U da enzima imobilizada, sendo detectada uma hidrólise de 79% destes açúcares após 8 horas de incubação.

4.11.2. Avaliação do potencial de reutilização de SMGGal

O potencial de reutilização de SMGGal foi avaliado como descrito no item 3.11.14. Os resultados de hidrólise dos RO durante 8 reutilizações da enzima imobilizada podem ser observados na Figura 30.

Cada ensaio foi conduzido durante 8 h, sendo que não foram detectadas perdas na eficiência hidrolítica para a enzima imobilizada quando a mesma foi reutilizada 8 vezes consecutivamente, em tratamento de hidrólise de RO em extrato desengordurado de soja.

O processo de imobilização enzimática garantiu um grande acréscimo no potencial de utilização da enzima α -Gal I. Foi observado que a estaquiose foi completamente hidrolisada em todos as 8 reutilizações de SMGGal. Da

mesma maneira, as taxas de hidrólise para a rafinose mantiveram-se constantes em todos os ensaios de reutilizações, sendo detectadas reduções deste açúcar que variaram entre 62 (segundo ciclo) e 72% (sétimo ciclo).

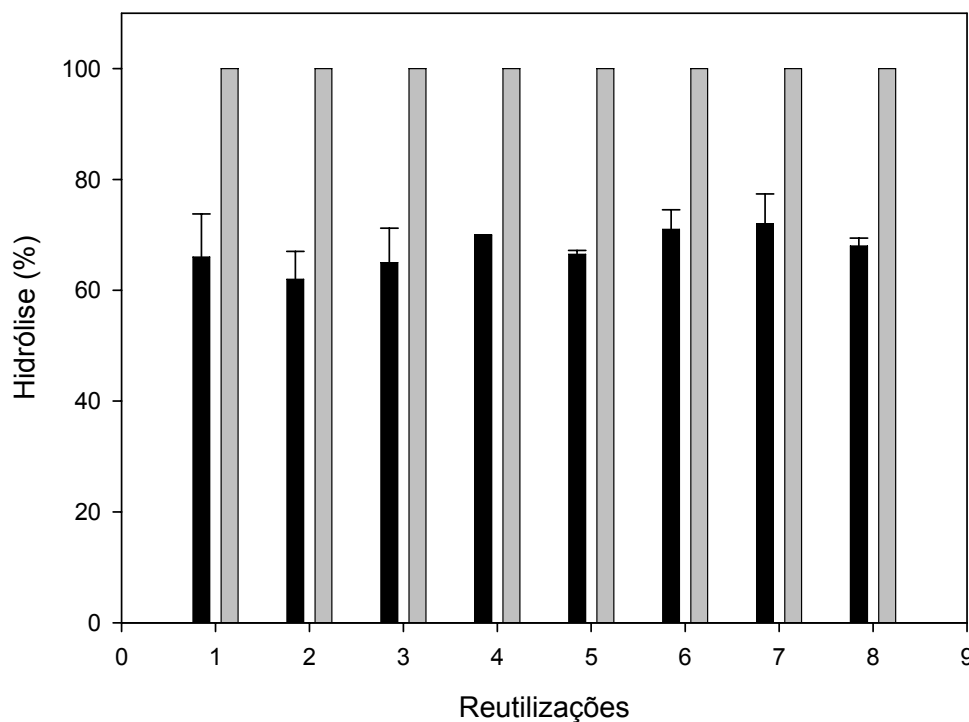


Figura 30 - Hidrólise da rafinose (■) e estaquiose (■) contidos no extrato desengordurado de soja por SMGGal durante 8 reutilizações.

Resultados semelhantes foram descritos por Prashanth & Mulimani, (2005), avaliando o potencial de reutilização da enzima α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em alginato de cálcio. Estes autores determinaram que a enzima imobilizada manteve 75% de sua atividade rafinolítica após 6 reutilizações em tratamentos de hidrólise de RO contidos em leite de soja.

Emregul *et al.* (2005) verificaram que a enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada por encapsulação em polímero de poliacrilamida-gelatina não apresentou perda de atividade após 20 reutilizações consecutivas em tratamentos de hidrólise de soluções ricas em sacarose.

Sanjay e Sugunan (2005) avaliaram o potencial de reutilização da enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada sobre partículas de argila modificadas por grupamentos aminas, verificando que a enzima

imobilizada pode ser utilizada 15 vezes consecutiva sem detecção de perdas em suas propriedades catalíticas.

O uso de enzimas imobilizadas para aplicações em processos biotecnológicos é amplamente preferido em relação ao uso de enzimas livres, uma vez que os processos de imobilizações permitem que uma mesma preparação enzimática seja utilizada inúmeras vezes (Isik *et al.*, 2003). A utilização de enzimas imobilizadas também permite uma fácil separação da enzima do meio reacional, evitando que o produto formado seja contaminado pela enzima (Arica *et al.*, 1995). Além destas vantagens, pode-se citar outros aspectos positivos da utilização de enzimas imobilizadas, tais como, controle do produto formado, maior estabilidade da enzima frente a agentes desnaturantes como pH e temperatura e possibilidade de construção de biorreatores em sistemas de fluxo contínuo (Klibanov, 1979).

A enzima α -Gal I imobilizada sobre sílica modificada por grupos aminas mostrou um grande potencial para aplicações em hidrólises de RO, apresentando características compatíveis com as exigências para o desenvolvimento de um processo de redução dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose presentes em derivados de soja.

5. CONCLUSÕES

- O fungo filamentoso *Penicillium griseoroseum* produziu, em meio contendo galactomanana, duas enzimas α -galactosidases oligoméricas, α -Gal I e α -Gal II.
- A enzima α -Gal I possui uma massa molecular aproximada de 408,4 kDa, sendo constituída por subunidades idênticas de massa molecular aproximada de 72,4 kDa.
- A enzima α -Gal II possui uma massa molecular aproximada de 330,3 kDa, sendo constituída por subunidades idênticas de massa molecular aproximada de 68,2 kDa.
- Ambas as α -galactosidases apresentaram atividades máximas em pH 5 para o substrato p -NP- α Gal, sendo extremamente instáveis quando expostas a temperaturas superiores a 45 °C.
- A enzima α -Gal I foi mais termoestável, comparada com α -Gal II, mantendo 48% de sua atividade original por 20 h, a 40 °C, enquanto que, α -Gal II reteve somente 5% de sua atividade original após mesmo tempo de incubação a 40 °C.

- Ambas as α -galactosidases foram completamente inibidas na presença de 1 mM dos íons Cu^{+2} , Ag^{+1} e Hg^{+2} .
- As enzimas α -Gal I e α -Gal II demonstraram ser altamente seletivas, apresentando especificidades absolutas para a galactose em posição α .
- As α -galactosidases de *Penicillium griseoroseum* foram 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 enzima α -Gal manteve sua capacidade de hidrolisar RO, viabilizando o uso desta enzima em biorreatores.
- A enzima α -Gal I imobilizada pode ser reutilizada pelo menos 8 vezes consecutivamente sem apresentar perda de atividade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ademark, P.; Larsson, M.; Tjerneld, F.; Stalbrand, H. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*. Purification, characterization and substrate specificities. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.441-448, 2001.
- Aduse-Opoku, J.; Tao, L.; Ferretti, J.; Russell, R. Biochemical and genetic analysis of *Streptococcus mutans* α -galactosidase. **Journal of Genetic Microbiology**, v.137, p.754-764, 1991.
- Ahmad, S.; Anqar, A.; Saleemuddin, M. Immobilization and stabilization of invertase on *Cajanus cajan* lectin support. **Bioresource Technology**, v.79, p.121-127, 2001.
- Anderson, J.J.B.; Anthony, M.; Messina, M.; Garner, S.C. Effects of phyto-oestrogens on tissues. **Nutrition Reviews**, v.12, p.75-116, 1999.
- Archer, D.B.; Peberdy, J.F. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.33, p.273-306, 1997.
- Arica, M. Y.; Hasirci, V.; Alaeddinog, I. N. G. Covalent immobilization of α -amylase onto pHEMA microspheres: preparation and application to fixed bed reactor. **Biomaterials**, v.15, p.761-768, 1995.

- Baik, H.S.; Saito, K.; Yokota, A.; Asano, K.; Tomita, F. Molecular cloning and high-level expression in *Escherichia coli* of fungal α -galactosidase from *Absidia corymbifera* IFO 8084. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.90, p.168-173, 2000.
- Baracat, M.C.; Valentim, C.; Muchovej, J.J.; Silva, D.O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. **Biotechnology Letters**, v.11, p.899-902, 1989.
- Baracat-Pereira, M.C.; Coelho, J.L.C.; Minussi, R.C.; Chaves-Alves, V.M.; Brandão, R.L.; Silva, D.O. Cyclic AMP and low molecular weight effector(s) present in yeast extract are involved in pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. **Appliance Biochemistry and Biotechnology**, v.76, p.129-141, 1994.
- Bayramoglu, G.; Akgöl, S.; Bulut, A.; Denizli, A.; Arica, M. Y. Covalent immobilization of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. **Biochemical Engineering Journal**, v.14, p.117-126, 2003.
- Bellaver, C.; Snizek, J.P.N. Soybean processing and its implications on swine and poultry feeding. Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR. **Anais**, p.183-199, 1999.
- Birk, Y. Protein protease inhibitors of plant origin and their significance in nutrition. Workshop on Antinutritional Factors of Legumes, **Anais**, Wageningen, 1989.
- 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.
- 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.
- Canella, M. e Sodini, G. Extraction of gossypol and oligosaccharides from oil seed meals. **Journal of Food Science**, v.42, p.1218-1219, 1977.
- Cardoso, P.G. **Isolamento e caracterização parcial de gene que codifica pectina liase em *Penicillium expansum***. Viçosa, MG: UFV,83p. (Tese M.S.), 2000.
- Chibata, L.; Wingard, L.B. Immobilized microbial cells. **Applied Biochemistry and Bioengineering**, v.4, p.1-11, 1983.
- Chibata, L. Production of L-amino acids. **Immobilized Enzymes: Research and Development**, New York: John Wiley and Sons, p.168-178, 1978.
- 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.
- Dalbøge, H. Expression cloning of fungal enzyme genes; a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p.2942, 1997.
- De Lumen, B.O. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legume. **Food Structure**, v.11, p.33-46, 1992.
- De Rezende, S.T. **Teores de oligossacarídeos de rafinose em soja, purificação e caracterização de invertases e α -galactosidases de microrganismos**. Brasília, DF: UnB, 157p. (Tese D.S.), 1998.
- Desjardins, M.L.; Roy, D.; Goulet, J. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.299-307, 1990.

- Dey, P. M.; Pridham, J. B. Biochemistry of α -galactosidase. **Advances in Enzymology**, v.36, p.91-130, 1972.
- Dey, P.M.; Pridham, J.B. Substrate specificity and kinetic properties of α -galactosidase from *Vicia faba*. **Biochemistry Journal**, v.115, p.47-54, 1969.
- Do Canto, W.L.; Menezes, T.J.B. Estudos Econômicos – Alimentos Processados. **Produção, usos e mercado de enzimas**, Campinas: Ital, 123p, 1995.
- Duffus, C.M.; Slaughter, J.C. **Seeds and their uses**. New York: John Wiley and Sons, 200p, 1980.
- East, J.W.; Nakayama, T.O.M.; Parkman, S.B. Changes in stachyose, raffinose, sucrose and monosaccharides during germination of soybeans. **Crop Science**, v.12, p.7-9, 1972.
- Emregul, E.; Sungur, S.; Akbulut, U. Polyacrylamide–gelatine carrier system used for invertase immobilization. **Food Chemistry**, p.1-7, 2005.
- Ettalibi, M. & Baratti, J.C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. **Enzymes and Microbial Technology**, v.28, p.596-601, 2001.
- Faber, K. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**, 3 ed., Cap. 1, 2 e 3, Berlin, Germany, Springer-Verlag, 1997.
- Falkoski, D.L.; Guimarães, V.M.; Callegari, C.M.; Reis, A.P.; de Rezende, S.T. Processing of soybean products by semipurified plant and microbial alpha-galactosidases. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v.27, p.10184-90, 2006.

- Falkoski, D. L.; Guimarães, M. B.; Oliveira, M. G. A.; Neves, M. A. S. ; de Rezende, S. T. Purification and characterization of galactosidases from transformant *Penicillium griseoroseum* Pg/644. In: XXXII Reunião Annual da sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Caxambu, MG, **Anais**, p.138, 2003.
- Fernandez-Salomão, TM.; Amorim, A.C.R.; Alves, V.M.C. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Review Microbiology**, v.27, p.15-18, 1996.
- Frankenfield, C.L.; Patterson, R.E.; Horner, N.K. Validation of soy food-frequency questionnaire and evaluation of correlates of plasma isoflavone concentrations in post-menopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.674-680, 2003.
- Fridjonsson, O.; Watzlawich, H.; Gehweiler, A.; Mattes, R. Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB 3621: cloning, sequencing and characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v.176, p.147-153, 1999.
- Gandhi, N.N. Applications of Lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.74, p.621-634, 1997.
- Garro, M.S.; Valdez, G.F.; Giori, G.S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. **Food Microbiology**, v.21, p.511-518, 2004.
- Gherardini, F.; Babcock, M.; Salyers, A. Purification and characterization of two α -galactosidases associated with catabolism of guar gum and other α -galactosidase by *Bacteroides ovatus*. **Journal of Bacteriology**, v.161, p.500-506, 1985.

- Golubev, A.M.; Nagem, R.A.P.; Neto, J.R.B.; Neustrov, K.N.; Eneyskaya, E.V.; Kulminskaya, A.A.; Shabalin, K.A.; Savel'ev, A.N.; Polikarpov, I. Crystal Structure of α -Galactosidase from *Trichoderma reesei* and Its Complex with Galactose: Implications for Catalytic Mechanism. **Journal Molecular Biology**, v.339, p.413-422, 2004.
- Gote, M.M.; Khan, M.I.; Gokhale, K.B.; Bastawde, J.M. Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). **Process Biochemistry**, v.41, p.1311-1317, 2006.
- Gote, M.; Umalkar, H.; Khan, I.; Khire, J. Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk. **Process Biochemistry**, v.39, p.1723-1729, 2004.
- Grossman, G.A.; Terra, W.R. α -Galactosidases from the larval midgut of *Tenebrio molitor* and *Spodoptera frugiperda*. **Comparative Biochemistry**, v.128, p.109-122, 2001.
- Guimarães, V.M.; De Rezende, S.T.; Moreira, M.A.; Barros, E.G.; Felix, C.R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v.58, p.67-73, 2001.
- Hartmeier, W. **Immobilizes Biocatalysis - An Introduction**, Cap 1 e 2, Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1998
- Havel, E.; Tweeten, T.N.; Seib, P.A.; Wetzel, D.L.; Liang, Y.T. Oligosaccharides released during hydration of textured soy as determined by high performance liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v.42, p.666-668, 1977.
- Huhn, S. **Efeito do íon cúprico no sabor do leite de soja**. Viçosa, MG: UFV, 42p. (Tese M.S.), 1977.

- Isik, S.; Alkan S.; Toppare L.; Cianga I.; Yagci Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. **European Polymer Journal**, v.39, p.2375-2381, 2003.
- Kang, H.C.; Lee, S.H. Characteristics of an α -galactosidase associated with grape flesh. **Phytochemistry**, v.58, p. 231-239, 2001.
- Kim, W.D.; Kobayashi, O.; Kaneko, S. Sakakibara, Y.; Park, G.G.; Kusakabe, I.; Tanaka, H.; Kobayashi, H. α -Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) cells. **Phytochemistry**, v.61, p.621-630, 2002.
- King, M.R.; White, B.A.; Blaschek, B.M; Mackie, R.I.; Cann, I.K.O. Purification and characterization of a thermostable α -galactosidase from *Thermoanaerovacterium polysaccharolyticum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.5676-5682, 2002.
- 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.
- Klibanov, AM. Enzyme stabilization by immobilization. **Analytical Biochemistry**, v.93, p.1-25, 1979.
- Kobayashi, H.; Suzuki, H. Studies on the decomposition of raffinose by α -galactosidase of mold II. Formation of mold pellet and its enzyme activity **Journal of Fermentation Technology**, v. 50, p.625-632, 1972.
- Ku, S.; Wei, L.S.; Steimberg, M.P.; Nelson, A.I.; Hymowitz, T. Extraction of oligosaccharides during cooking of whole soybean. **Journal of Food Science**, v.41, p.361-364, 1976.
- 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. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.1, p.31-67, 1994.
- Liener, J.E. Trypsin inhibitors: Concern for human nutrition or not? **Journal Nutrition**, v.116, p.920-923, 1986.
- Lima, A.W. O; Angnes, L. Biocatálise em meios-aquo-restritos: Fundamentos e Aplicações Analíticas. **Química nova**, v.22, p.229-243, 1999.
- McIlvaine, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v.49, p.183-186, 1921.
- Mesing R. **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors**, Academic Press, 1995.
- 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.
- Minussi, R.C.; Soares-Ramos, J.R.L.; Coelho, J.L.C.; Silva, D.O. Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*, **Review Microbiology**, v.29, p.246-250, 1998.
- 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.
- Morais, A.A.C.; Silva, A.L. **Soja e suas aplicações**. Belo Horizonte: Medsi, 259p,1996.
- Moreira, A.M. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR, **Anais**, p.99-104, 1999.

- Muller, J. & Zwing, T. An experimental verification of the theory of diffusion limitation of immobilized enzymes. **Biochemistry Biophysical**, v.1041, p.117-123, 1982.
- Ohtacara, A.; Mitsutomi, M.; Uchida, Y. Purification and enzymatic properties of α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.48, p.1319-1327, 1984.
- Oliveira, G. **Purificação parcial de caracterização bioquímico-cinética da α -galactosidase de sementes de tamboril da mata (*Platymiscium pubescens*)**. Viçosa-UFV, 63p, (Tese, MS), 2002.
- Omosaiye, O.; Cheryan, M.; Matthews, M.E. Removal of oligosaccharides from soybean water extracts by ultrafiltration. **Journal of Food Science**, v.43, p.354-360, 1978.
- Pai, V.B.; Khan, S.A. Gelation and rheology of xanthan/enzyme-modified guar blends. **Carbohydrates Polymers**, v.49, p.207-216, 2002.
- Paice, M.G. e Jurasek, L. Removing hemicellulose from pulps by specific enzyme hydrolysis. **Journal Food Chemistry Technology**, v.4, p.187-198, 1984.
- Peberdy, J.F.; Caten, C.E.; Ogden, J.E.; Bennett, J.W. **Applied Molecular Genetics of Fungi**. Cambridge: Cambridge university, p.28-43, 1991.
- 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.
- Porter, J.E.; Ladisch, M.E.; Herrmann, K.M. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p.356-363, 1991.

- Potter, S.M.; Baum, J.A.; Teng, H.; Stillman, R.J.; Shay, N.F.; Erdman, J.W. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.1375-1379, 1998.
- Prashanth, S.J.; Mulimani, V.H. Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* galactosidase immobilized in calcium alginate. **Process Biochemistry**, v.40, p.1199-1205, 2004.
- 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.
- Pzsczola, D.E. From soybeans to spaghetti: the broadening use of enzymes. **Food Technology**, v. 55, p.54-62, 2001.
- Rackis, J.J. Biological and physiological factors in soybean. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.51, p.161-174, 1974.
- Ribon, A.O.B. **Organização e regulação de genes que codificam poligalacturonase me *Penicillium griseoroseum***. Viçosa, MG: UFV, 67p. (Tese D.S.), 2001.
- Ribon, A.O.B.; Queiroz, M.V; Araújo, E.F. Structural organization of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. **Genetic Molecular Biology**, v.25, p.489-493, 2002.
- Ribeiro, J.B. **Produção de poligalacturonase por linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum***. Viçosa, MG: UFV, 76p. (Tese D.S.), 2005.
- Richardson, M. Protein inhibitors of enzymes. **Food Chemistry**, v.6, p.235-253, 1981.
- Roessing, A.C.; Lazzaroto, J.J. Criação e empregos pelo complexo agroindustrial da soja. **Documento 233** (www.embrapa.gov.br), 54p, 2004.

- 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.
- Sanjay, G. & Sugunan, S. Invertase immobilised on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching. **Catalysis Communications**, v.6, p.81-86, 2005.
- Scheppach, W.; Luethrs, H.; Melcher, R.; Gostner, A.; Schaubert, J.; Kudlich, T. Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. **Clinical Nutrition Supplements**, v.1, p.51-58, 2004.
- Scigelova, M.; Crout, D.H.G. Purification of α -galactosidase from *Aspergillus niger* for application in the synthesis of complex oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis**, v.8, p. 175-181, 2000.
- Sediyama, T.; Pereira, M.G.; Sediyama, C.S.; Gomes, J.L.L. **Cultura da Soja**. Viçosa: UFV, 75p, 1989.
- Segel, I. H. **Bioquímica. Teoria e Problemas**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 527p, 1979.
- Sgarbieri, V.C. Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações, São Paulo: Edunicamp, 517p, 1996.
- Shabalín, K.A.; Kulminskaya, A. A.; Savel'ev, A.N.; Shishlyannikov, S.M.; Neustroev, K.N. Enzymatic properties of α -galactosidase from *Trichoderma reesei* in the hydrolysis of galactooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.231-239, 2002.
- Sirtori, C.R. Risks and benefits of soy phytoestrogens in cardiovascular diseases, cancer, climacteric symptoms and osteoporosis. **Drug Safety**, v.24, p.665–68, 2001.

- 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.
- Steggerda, F.R.; Dimmick, J.F. Effect of bean diet on concentration of carbon dioxide in flatus. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.19, p.120-124, 1966.
- Stenberg, D.; Vijaykumar, P.; Reese, E.T. β -glucosidase: microbiology of production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Canadian Journal Microbiology**, v.23, 139-147, 1970.
- Suarez, F.L.; Springfield, J.; Furne, J.K.; Lohrmann, T.T.; Kerr, P.S.; Levitt, M.D. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.135-139, 1999.
- Sugimoto, H.; Van Buren, J.P. Removal of oligosaccharides from soymilk by enzyme from *Aspergillus saitoi*. **Journal Food Science**, v.35, p.655, 1970.
- Sundd, M.; Kundu, S.; Pal, G.P.; Medicherla, J.V. Purification and characterization of a highly stable cysteine protease from the latex of *Ervatamia coronaria*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.62, p.1947-1955, 1998.
- Thananunkul, S.; Tanaka, M.; Chichester, C.O.; Lee, T.C. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of α -galactosidase within polyacrylamide gel. **Journal of Food Science**, v.41, p.173-175, 1976.
- Thippeswamy, J.S.; Mulimani, V.H. Enzymatic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujiduroi*. **Process Biochemistry**, v.38, p.635-640, 2002.

- Trigui-Lahiani, H.; Gargouri, A. Cloning, genomic organisation and mRNA expression of a pectin lyase gene from a mutant strain of *Penicillium occitanis*. **Gene**, v.388, p.54-60, 2007.
- 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.
- Vasimon Ruanglek V.; Sriprang, R.; Ratanaphan, N.; Tirawongsaroj, P.; Chantasigh, D.; Tanapongpipat, S.; Pootanakit, K; Eurwilaichitr, L. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**,2006.
- Viana, P.A.; de Rezende, S.T.; Falkoski, D.L.; Leite, T.a.; José, I.C.; Moreira, M.A.; Guimarães, V.M. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidase. **Food Chemistry**, 2006.
- Viana, P.A.; de Rezende, S.T.; Marques, V.M.; Trevizano, L.M.; Passos, F. M.L.; Oliveira, M.G.A.; Bemquerer, M.P.; Oliveira, J.S.; Guimarães, V.M. Extracellular α -Galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and Its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2385-2391, 2006.
- Viana, S.F.; Guimarães, V.M.; José, I.C.; Oliveira, M.G.A; Costa, N.M.B.; Barros, E.G.; Moreira, M.A.; de Rezende, S.T. Hydrolysis of ologosacchariedes in soybean flour by α -galactosidase. **Food Chemistry**, v.93, p.665-670, 2005.
- Viikari, L.; Ranua, M.; Kantelinen, A.; Sundquist, J.; Linko, M. Bleaching with enzymes. International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, **Anais**, Stockholm, p.67-69, 1986.
- Viola, E.S. Uso de soja integral em dietas de suínos e aves: oportunidades e entraves. Anais do Congresso Brasileiro de Soja, **Anais**, Londrina, 1999.

- Van Beilen, J.B.; Li, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.338-344, 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.; Gumbmann, 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.
- Wang, Y.C.; Yu, R.C.; Yang, H.Y.; Chou, C.C. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. **Journal of Industrial Biology and Biotechnology**, v.31, p.559-564, 2004.
- 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.
- Zhu, A. e Goldstein, J. Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean α -galactosidase, **Gene (Amsterdam)**, v.140, p.227-231, 1994.