

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ALFA-
GALACTOSIDASE DE SEMENTES DE GUAPURUVU (*Schizolobium parahyba*)

GIL AMARO DA SILVA

Brasília – Distrito Federal

2007



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ALFA-
GALACTOSIDASE DE SEMENTES DE GUAPURUVU (*Schizolobium parahyba*)

GIL AMARO DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Felix

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia
Celular do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção
do grau de Mestre em Biologia Molecular

Brasília, Julho de 2007

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Felix

Banca Examinadora

Profa. Dra. Regina Maria Dias Buani dos Santos (FAPDF/UnB) - Examinador Externo

Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas (CEL/UnB) - Examinador Interno

Profa. Dra. Silene de Paulino Lozzi (GEM/UnB) - Suplente

Prof. Dr. Carlos Roberto Felix (CEL/UnB) - Orientador

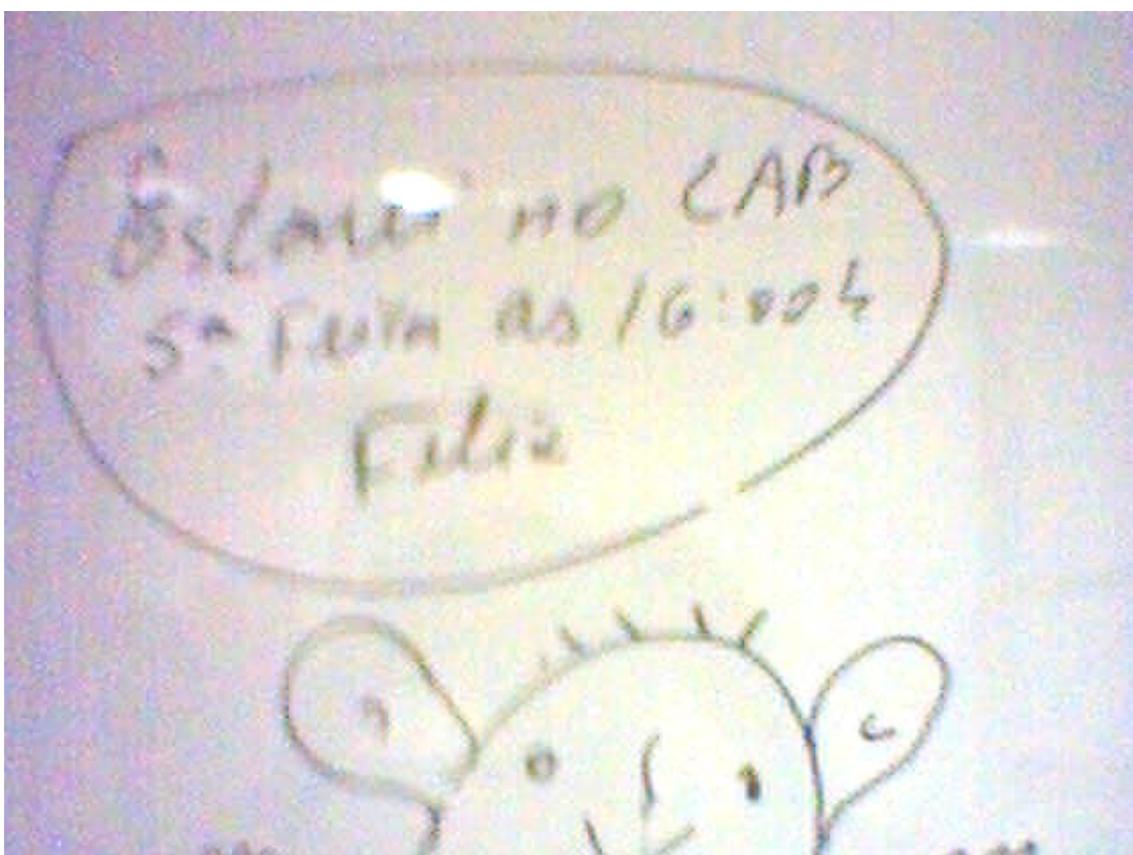
“Felizmente, a Ciência, como a natureza à qual pertence, não é limitada pelo tempo ou pelo espaço. Ela pertence ao mundo, e não a um país ou época. Quanto mais sabemos, mais percebemos nossa ignorância e o quanto ainda temos por descobrir.”

Sir Humphry Davy

Dedico essa dissertação a minha família que, superando várias adversidades, em todos os momentos me estimulou a seguir a carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, e incentivador, Prof. Dr. Carlos Roberto Felix, pela dedicação e extrema paciência durante todas as horas dos mais de 5 anos de convivência; por ter me recebido de braços abertos desde a graduação até o mestrado, contribuindo de maneira ímpar para minha formação e amadurecimento profissional. Se pudesse resumir a magnitude da influência na minha vida, ousaria parafrasear Newton: Pois se pude enxergar mais longe, foi porque me apoiei no ombro de gigantes.



Ao professor Dr. Edivaldo Ximenes, pelas contribuições e amizade.

À minha família, por ter me dado todas as condições para trilhar este caminho, tendo-me apoiado em todos os momentos da minha vida. Especialmente à minha mãe e meu pai pela convivência e carinho.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia, Daniel Paiva, Yara de Fátima Hamu, Janice Lisboa De Marco, Klecius Celestino, Sônia Maria, Werner Bessa, Orlando Cardoso, Roseli Garcia, Bruno Cobucci, Leonardo Sisinho, que sempre se prontificaram a esclarecer (muitas) dúvidas e contribuir de alguma forma com o trabalho no laboratório .

À dupla dinâmica Marísia e Margarete, cuja descrição ficaria aquém do merecido.

Aos amigos Saulo Jose, Marciano Rubbini, Rafael Burtet, Mariana Quezado, Graziella Joanitti e Bruno Arrivabene pelos momentos de descontração, diálogos enriquecedores, auxílio, (muito auxílio) durante essa importante fase da minha vida acadêmica.

Aos professores Drs. Fernando Araripe Torres, Lídia Maria Pepe de Moraes e Regina Maria Dias Buani dos Santos pela expressiva colaboração na qualificação da dissertação.

Ao apurado trabalho das secretárias Ana e Sandra nos trâmites administrativos.

Aos amigos dos laboratórios de Bioquímica e Química de Proteínas, Biologia Molecular, Biofísica, Genética e Morfologia e Microscopia, pelas proveitosas discussões e, principalmente pela amizade.

À CAPES por ter me concedido a bolsa de mestrado, fornecendo o apoio financeiro imprescindível para a realização deste trabalho de pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos durante a fase de execução deste trabalho A todos os meus profundos e sinceros agradecimentos.

RESUMO

Uma das principais características da soja como alimento, é o seu alto teor de proteínas. Todavia a soja e, conseqüentemente, seus derivados, apresentam carboidratos (oligosacarídeos de rafinose: RO) que limitam seu consumo, causando restrições quanto ao seu uso na alimentação em função dos sintomas desagradáveis. Tais açúcares são, portanto, considerados fatores anti-nutricionais. A redução dos teores desses açúcares não digeríveis é de grande importância para a ampliação da utilização da soja.

A redução dos teores dos RO poderá ser conseguida por meio da adição das enzimas α -galactosidases [α -D-galactosil galactohidrolases (E.C. 3.21.22)] ao processamento dos derivados de soja. Essas enzimas, hidrolisam a ligação α -1,6 que une o resíduo de galactose ao de glicose, produzindo galactose e sacarose livres, açúcares facilmente hidrolisados *in vivo* e absorvidos.

Alfa-galactosidases são produzidas por diferentes organismos, entre estes estão leguminosas que produzem alfa-galactosidases durante a germinação das sementes para mobilizar o material de reserva contido no cotilédone. A alfa-galactosidase da semente de Guapuruvu, uma planta nativa da mata atlântica, foi parcialmente purificada com índice de purificação de 148 vezes e rendimento de 1,4%. A atividade máxima da alfa-galactosidase foi detectada em pH 5,5 e 45°C. A enzima manteve 50% da atividade original após incubação por 150 minutos a 40°C. O K_M para pNPGal foi de 1,68 mM e o V_{MAX} foi de 0,18 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$. A atividade enzimática desta enzima foi inibida por FeCl_3 , ZnSO_4 , CuSO_4 , CaCl_2 , SDS, MnCl_2 , AlCl_3 , HgCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2 e AgNO_3 . A enzima não apresenta atividade de transglicosilação. Espectrometria de massa foi utilizada para determinar a massa molecular da enzima. Populações de proteína com valores de massa molecular de 20.179 kDa e 11.543 kDa foram encontrados, além de um possível peptídeo com massa molecular de 6.724 kDa.

SUMMARY

One of the main characteristics of the soy as food, is its high protein content. However the soy and, consequently, its derivatives, present carbohydrates (raffinose oligosaccharides: RO) that limit its consumption, causing restrictions to its use in the feeding in function of undesirable symptom, like the flatulence following ingestion of these soybean sugars. Due to the absence of α 1-,6 galactosidase in the intestinal mucose which is required to hydrolyze the undesirable sugar. Such sugars also known as raffinoseoligosaccharides (ROs) are therefore, considered as anti-nutrient factors. The reduction of amount of these indigestible sugars is of great importance to increase the use of soybean.

The reduction of RO in soybean and in its derivatives may be obtained by means of the addition of α -galactosidases enzymes [α -D-galactosil galactohidrolases (E.C. 3.21.22)] to the soybean derivatives preparation. These enzymes, hydrolyse the α - 1,6 linkages that join the residue of galactose to the glucose present in the ROs, producing free galactose and saccharose, sugars that are easily hydrolyzed *in vivo* and absorbed.

Alpha-galactosidase is produced by different organisms, among them, appears those plants that produces alpha-galactosidades during the germination of the seeds which is required to mobilize the material of reserve contained in the cotyledon. The alpha-galactosidase in the seed of a native plant of the Atlantic Forest, Guapuruvu, was partially purified with a purification factor of 148 times and yielding of 1,4%. Maximal activity of the alpha-galactosidase were detected at pH 5,5 and 45°C.

The partially purified enzyme retained about 50% of the original activity after incubation for 150 minutes at 40°C. K_M values of 1,68 mM and V_{MAX} values of 0,18 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ were determined for conversion of pNPGal by algorithm for determination for non linear parameters. The alpha-galactosidase activity was substantially inhibited by FeCl_3 , ZnSO_4 , CuSO_4 , CaCl_2 , SDS, MnCl_2 , AlCl_3 , HgCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2 and AgNO_3 . The enzyme did not show, transglucosilation activity. Mass spectrometry was performed to determine the molecular mass. The partially purified alpha-galactosidase preparation contain at least 3 proteins with molecular mass of 20,179 kDa e 11,543 kDa and 6,724 kDa.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico da soja	2
1.2 Importância econômica da soja	3
1.3 Impacto ambiental da soja	4
1.4 Intolerância a lactose	5
1.5 Oligossacarídeos de rafinose	6
1.6 Alfa-Galactosidase	7
1.7 Ocorrência da alfa-galactosidase	9
1.8 <i>Schizolobium parahyba</i>	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos gerais	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Obtenção das sementes de leguminosas	14
3.2 Preparação do extrato enzimático	15
3.3 Determinação da atividade de alfa-galactosidase	15
3.4 Determinação do teor de proteína	16
3.5 Determinação do conteúdo e carboidrato	16
3.6 Dosagem de açúcar redutor	16
3.7 Determinação do tempo de maior atividade de alfa-galactosidase durante a germinação	16
3.8 Procedimentos para observação das sementes por microscopia	17
3.9 Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50	17
3.10 Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75	17

3.11 Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100	18
3.12 Teste de adsorção de alfa-galactosidase em resinas para cromatografia de troca iônica.	18
3.13 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose	19
3.14 Análise da termoestabilidade	19
3.15 - Determinação de K_m e V_{max} aparentes	19
3.16 Efeito de íons e açúcares e agentes redutores	20
3.17 Determinação do pH e temperatura ideal	20
3.18 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes	20
3.19 Contrastação do gel de eletroforese	21
3.20 Análise por Espectrometria de Massa em MALDI -TOF	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Determinação do tempo de maior atividade de alfa-galactosidase durante a germinação	22
4.2- Análise histológica das sementes germinadas por 0 e 48 horas	23
4.3- Cromatografias do extrato bruto proveniente de sementes germinadas por 48 horas em 3 colunas de exclusão molecular	25
4.4. Teste de Adsorção de alfa-galactosidase em resinas de troca iônica	28
4.5. Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Sepharose	29
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida	30
4.7. Análise da amostra no MALDI-TOF	31
4.8 – Determinação da Temperatura Ideal	35
4.9 – Determinação da pH Ideal	37
4.10 – Determinação da Termoestabilidade	39
4.11- Efeito de íons, açúcares e agentes redutores.	41
4.12- Determinação dos parâmetros cinéticos da alfa-galactosidase	54

5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	62
7. PERSPECTIVAS	63
8. BIBLIOGRAFIA	64

ABREVIATURAS

[]: Concentração

Abs.: Absorbância

BSA: Albumina sérica bovina

CM-Sepharose: Carboxi metil-Sepharose

EC: Enzyme Commission

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

g: grama

kDa: Kilodaltons

K_M : Constante de Michaelis-Menten

min: minuto

mL: Mililitro

MM: Massa Molecular

MALDI: espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida por matriz

(*matrix-assisted laser desorption / ionization*)

μ L: Microlitro

μ g: Micrograma

μ mol: Micromol

μ m: Micrômetro

nm: Nanômetro

SDS: Dodecil sulfato de sódio

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

pH: Potencial Hidrogeniônico

p-NP: p-nitrofenol

p-NPGal: p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo

p/v: peso/volume

ROs: Oligossacarídeos de Rafinose

TCA: Ácido Tricloroacético

TEMED: N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

TFA: ácido trifluoroacético

TOF: tempo de voo (*time-of-flight*)

UI: Unidade internacional

UnB: Universidade de Brasília

UFV: Universidade Federal de Viçosa

v/v: Volume/volume

V_{\max} Velocidade máxima

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Oligossacarídeos de rafinose e sítios de clivagem para as enzimas hidrolíticas invertase e alfa-galactosidase. Retirado de Rezende, (1998)	8
Figura 2	Plantação de <i>Schizolobium parahyba</i> onde as amostras foram coletadas	14
Figura 3	Atividade (U/ml) de α -galactosidase no extrato bruto de sementes de Guapuruvu germinadas por em diferentes tempos.	22
Figura 4	Corte semifino de semente germinada por 0 hora (A) e 48 horas (B) corado com azul de toluidina 1% . Aumento 10 X	23
Figura 5	Corte semifino de semente germinada por 0 hora (A) e 48 horas (B) corado com azul de toluidina 1%. Aumento 20 X	24
Figura 6	Corte semifino de semente germinada por 0 horas (A) e 48 horas (B). Aumento 40 X	24
Figura 7	Perfil cromatográfico em coluna de Sephadex G-50, do extrato enzimático contendo atividade de alfa-galactosidase proveniente de sementes de Guapuruvu germinadas por 48 horas.	25
Figura 8	Perfil cromatográfico em coluna de Sephadex G-75, do extrato enzimático contendo atividade de alfa-galactosidase proveniente de sementes de Guapuruvu germinadas por 48 horas.	26
Figura 9	Perfil cromatográfico em coluna de Sephacryl S-100, do extrato enzimático contendo atividade de alfa-galactosidase proveniente de sementes germinadas por 48 horas.	27
Figura 10	Perfil cromatográfico em coluna de DEAE Sepharose, do extrato enzimático contendo atividade de alfa-galactosidase proveniente de cromatografia de exclusão molecular em Sephadex-G75	29
Figura 11	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes, dos extratos resultantes dos processos de purificação. Amostras de 20 μ L com 50 μ g de proteína cada foram aplicadas no gel. A e G- Marcador de peso molecular (10 μ L); B e D- Eluato DEAE-Sehparose; C- Tampão de Amostra; E- Eluato Sephadex G-75; F- Extrato bruto resultante de germinação por 48 horas.	30
Figura 12	Espectro de massa da amostra proveniente da coluna de DEAE	

	Sepharose. A amostra foi dializada contra água e processada de acordo com item 3.20	32
Figura 13	Espectro de massa da amostra enzimática proveniente da coluna DEAE Sepharose. Aproximação da amostra com massa 10086,722 Daltons	33
Figura 14	Espectro de massa da amostra enzimática proveniente da coluna DEAE Sepharose. Aproximação da amostra com massa 20179,042 Daltons.	34
Figura 15	Efeito da temperatura na atividade de alfa-galactosidade do extrato bruto de sementes de Guapuruvu germinadas por 48 horas.	35
Figura 16	Efeito da temperatura na atividade de alfa-galactosidade do eluato da DEAE-Sepharose.	36
Figura 17	Efeito do pH na atividade de alfa-galactosidase do extrato bruto de sementes de Guapuruvu germinadas por 48 horas.	37
Figura 18	Efeito do pH na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose .	38
Figura 19	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima alfa-galactosidase do extrato bruto de sementes germinadas por 48 horas.	39
Figura 20	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose de sementes de Guapuruv germinadas por 48 horas.	40
Figura 21	Efeito do FeSO_4 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.	42
Figura 22	Efeito do FeCl_3 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose. Os ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.	43
Figura 23	Efeito do ZnSO_4 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da	44

	DEAE-Sepharose. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo 3.16.	
Figura 24	Efeito do CuSO_4 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo 3.16.	45
Figura 25	Efeito do CaCl_2 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo 3.16.	46
Figura 26	Efeito do agente redutor SDS na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo 3.16.	47
Figura 27	Efeito do MnCl_2 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo 3.16.	48
Figura 28	Efeito do AlCl_3 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose . Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo 3.16.	49
Figura 29	Efeito do HgCl_2 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo 3.16.	50
Figura 30	Efeito do CuCl_2 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo 3.16.	51
Figura 31	Efeito do CoCl_2 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose. Os ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.	52
Figura 32	Efeito do AgNO_3 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose. Os ensaios realizados de acordo com o protocolo	53

3.16.		
Figura 33	Efeito da concentração do substrato na velocidade da hidrólise pNPGal, os valores de obtidos de K_M e V_{max} foram respectivamente 1,68mM 0,182 micromol.min.	54
Figura 34	Fluxograma de purificação parcial da alfa-galactosidase de sementes de Guapuruvu.	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Soja produzida no Brasil de 1990 a 2006 (em toneladas).	3
Tabela 2	Adsorção da α -galatosidase em diversas resinas de troca iônica. Atividade enzimática não adsorvida (valor superior) e adsorvida (valor inferior) respectiva para cada resina e pH está expressa em UI.	28
Tabela 3	O efeito de íons, açúcares e agentes redutores sobre o eluato da coluna de DEAE-Sepharose	41
Tabela 4	Tabela de rendimento das etapas de purificação parcial da alfa-galactosidase de <i>Schizolobium parahyba</i> .	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DA SOJA

Do ponto de vista botânico, a soja pertence à família *Leguminosae* e ao gênero *Glycine*, que compreende cerca de 15 espécies, sendo a comercial a *Glycine max*. Acredita-se que sua antecessora selvagem tenha sido a *Glycine ussuriensis*, uma planta, oriunda do Nordeste asiático, que através dos séculos sofreu e acumulou mutações genéticas. A soja se tornou conhecida no Ocidente no final do século XIX, quando o departamento de Agricultura dos Estados Unidos introduziu algumas variedades da leguminosa naquele país. No entanto, é um dos mais antigos vegetais usados na alimentação do homem, sendo consumida há séculos em diversas regiões do Continente Asiático (Rutledge e O'Neil 2006). A história do cultivo da soja no mundo iniciou-se há mais de 5 mil anos, na Ásia, transformando-se em um dos principais grãos que serviram de base à alimentação da civilização (Bolzon, 2005).

Os grãos de soja são duros, geralmente amarelados e têm formato semelhante ao de uma ervilha (CARGILL 1996). No Brasil, a soja chegou por meio da Escola de Agronomia da Bahia, que em 1882 realizou testes de avaliação com os cultivares utilizados nos Estados Unidos. O instituto Agrônomo de Campinas deu seguimento a essas primeiras pesquisas, distribuindo, em 1901, as primeiras sementes de soja para produtores paulistas e gaúchos (Nogueira, 2002).

Apesar de ser uma planta nativa de regiões de clima temperado, a soja mostrou excelente adaptação à zona tropical. Similar ao que ocorreu nos Estados Unidos, a soja deixou paulatinamente de ser cultivada como forrageira, entre os anos 1940 e 1960, passando a ser cultivada exclusivamente para obtenção de grãos para alimentação animal. A partir de 1961, a soja do estado de São Paulo começa a ser comercializada, com aumento expressivo das lavouras registrado no início dos de 1970. O crescimento exponencial do cultivo de soja no Brasil, relacionou-se à crise do mercado internacional de insumos protéicos destinados à alimentação animal: a redução de pesca de anchovas no Peru, em virtude de pescas não sustentáveis; a safra de grãos de soja na Rússia e China reduzidas por adversidades climáticas; queda de produção do amendoim no continente africano em função de um longo período de seca.

Para suprir a demanda por fonte de alimentações animal, a cultura de soja expandiu-se em todo o mundo, principalmente no Brasil, onde a soja é plantada desde o extremo Sul, nas fronteiras com a Argentina, até os cerrados do Norte.

Além do estímulo dos preços altos nos mercados, outros fatores tiveram peso significativo na expansão da cultura da soja no Brasil a partir de 1970: a disponibilidade de tecnologias adequadas, a adoção de práticas culturais mais apuradas, o uso de sementes selecionadas e de agrotóxicos, ao lado de modernos equipamentos de plantio e colheita. O rendimento da produção de soja subiu de 1,28 toneladas por hectare em 1973 para 2,812 toneladas por hectare em 2007 (Bolzon, 2005; Embrapa, 2006; CONAB, 2007;).

Para os Estados Unidos, o Brasil e a China, os três maiores produtores mundiais, a soja tem peso considerável na atividade econômica. A soja está incorporada aos hábitos alimentares das famílias brasileiras, na forma de óleos refinados, margarinas, alimentos elaborados com gorduras vegetais e muitos outros. O farelo de soja, um importante ingrediente na formulação de rações, contribui para a maior produção de carne, leite e ovos. Fora do campo da alimentação, é cada vez maior o uso de soja em produtos industriais como glicerina, tintas, sabões, plásticos tintas de impressão.

1.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SOJA

Por longo período, a soja foi cultivada no Brasil em bases experimentais. No final da década de 50, começou a ser plantada, primeiro como adubo verde, depois para fazer a rotação com o trigo, que passou a receber grandes incentivos do governo federal. Mas foi nos anos 70, com a crescente demanda do mercado interno e externo e o conseqüente aumento nos preços de grãos oleaginosos e seus derivados, que a soja adquiriu prestígio de produto de primeira grandeza no mercado mundial e deu a sua grande arrancada em nosso país (Cortarelli, 2005; Bolzon, 2005; Embrapa, 2006).

Em 1970, a produção brasileira estava próxima de 1 milhão de toneladas, No decorrer dessa década, ano após ano, foram quebrados recordes, até que em 1980 o Brasil já produzia 15 milhões de toneladas e assumia o segundo lugar entre os grandes produtores mundiais. A Tabela 1 evidencia a produção de soja em toneladas por ano, de 1990 até 2006.

Tabela 1 – Soja produzida no Brasil de 1990 a 2006 (em toneladas)..

(Embrapa 2006)

Ano - Safra	Toneladas de Soja
1990	19.897.804
1991	14.937.806
1992	19.214.705
1993	22.590.978
1994	24.931.832
1995	25.682.637
1996	23.166.874
1997	26.392.636
1998	31.307.440
1999	30.987.476
2000	32.907.259
2001	42.107.618
2002	51.919.440
2003/2004	49.781.600
2004/2005	61.163.300
2005/2006	53.430.000

A área cultivada com soja foi de 20,64 milhões de hectares em 2007, representando 44,86% de área cultivada com grãos. As boas condições climáticas ocorridas durante o desenvolvimento da cultura elevaram a produtividade média de 2.419 kg/ha na safra passada para 2.812 kg/ha na atual, incremento de 16,2%. Todos os estados brasileiros, tiveram ganhos de produtividades significativos apesar de veranicos localizados e da ferrugem asiática que tem sido melhor controlada a cada safra (CONAB, 2007).

A alimentação animal é um importante elo da agroindústria brasileira (Opalinski, 2006). O setor consome cerca de 65% da produção nacional de milho e 45% da oferta de farelo de soja (CONAB, 2007), constituindo-se assim em um dos principais clientes da produção agrícola nacional, além de movimentar a indústria química para o fornecimento de insumos, como vitaminas, aminoácidos e microingredientes para nutrição animal. É também um importante pólo de desenvolvimento tecnológico,

voltado à produção de proteína animal, destinada à alimentação humana, pois está na base da produção de carnes, ovos e leite.

A casca da soja, subproduto das indústrias de processamento da soja, constitui uma fonte alternativa de alimento para ruminantes e, devido ao seu alto teor de fibra digestível e valor energético, pode substituir parcial ou totalmente forragens ou ingredientes tradicionais como o milho. Em 2001, a indústria de alimentação animal movimentou 38,8 milhões de toneladas de grãos, que representaram cerca de US\$ 7,0 bilhões, gerando em torno de 65.000 empregos diretos (Bútolo, 2002).

1.3 IMPACTO AMBIENTAL DA SOJA

Segunda dados da CONAB (2007), a soja é a cultura que mais ocupa área de plantio com 44,9% (20,64 milhões de hectares), seguido pelo milho com 30,1% (13,84 milhões de hectares), pelo feijão com 9,1% (4,18 milhões de hectares), pelo arroz com 6,4% (2,97 milhões de hectares), pelo trigo com 3,8% (1,76 milhão de hectares), pelo algodão com 2,4% (1,09 milhão de hectares) e pelas demais culturas com 3,3% (1,53 milhão de hectares).

Ano após ano, a soja vem mostrando todo o seu potencial como geradora de divisas. Desde que o Brasil se tornou o segundo maior produtor e exportador mundial, as receitas cambiais da soja somaram bilhões de dólares. A importância econômica da soja não se limita à exportação. A soja é responsável pela criação de um segmento da mais alta relevância para a economia brasileira. Aliada à expansão ou plantio da soja, instalaram-se dezenas de indústrias de processamento que produzem óleos e farelos de soja.

Estudos do USDA (2006) demonstram que a média de crescimento de área plantada de Soja no Brasil é de 1,860 milhões de hectares por ano, contribuindo positivamente para a balança comercial do Brasil, porém a expansão da fronteira agrícola consome áreas de preservação ambiental, ameaçando a biodiversidade brasileira (Thompson, 2003).

A fronteira agrícola tem avançado cada vez mais sobre o bioma Cerrado. Pesquisas da organização não-governamental Conservação Internacional (CI-Brasil) estima que o Bioma Cerrado perde área correspondente a 2,6 campos de futebol por minuto, de sua cobertura vegetal, o equivalente a 3 milhões de hectares/ano.

Os impactos no clima podem alterar a precipitação anual, quantidade de nitrogênio e influenciar nas propriedades organolépticas da soja (Kacprzak, Reviakine, Kaupp, 2007). O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), órgão da Onu, publicou em 2007 estudos sobre o efeito estufa e seus corolários, o aumento da temperatura no planeta devido a emissões de CO₂ e devastação do bioma natural pode levar ao aumento de 1,8 a 4 graus celsius até 2100. Tal evento levaria a mudanças drásticas no rendimento do plantio de leguminosas, entre elas a soja.

1.4 INTOLERÂNCIA A LACTOSE

Um dos fatores impulsionadores da produção de soja, é a intolerância a lactose (Tuula, 2000) apresentada por parte significativa da população (Preto et al, 2002). A lactose do leite de origem animal deve ser hidrolisada por uma β -galactosidase e uma β -fructofuranosidase (EC 3.2.1.23/26), antes de ser absorvida (Gunn, 2003). Os produtos de degradação (glicose e galactose) são absorvidos pelo organismo. A hidrólise da lactose é realizada por uma beta-galactosidase, conhecida como lactase. Na maioria da população mundial, após o desmame, há um declínio gradual na atividade da lactase. Esse fenômeno, denominado hipolactasia primária do tipo adulto, é a forma mais comum de deficiência de dissacaridase determinada geneticamente (Auricchio e Troncone, 2000).

A persistência da atividade enzimática na vida adulta tem herança autossômica dominante, enquanto a hipolactasia é herdada de forma autossômica recessiva. A má absorção de lactose é o fenótipo predominante nas populações nativas da Austrália, Oceania, leste e sudeste da Ásia, África Tropical e Américas. O declínio nos níveis de lactase é progressivo durante a infância e a adolescência, havendo um aumento nas taxas de má absorção de acordo com a idade (Abrizis et al, 1995; Leis *et. al*, 1997; Petro, 2002).

Depois do período de lactação, existe uma redução da atividade da lactase em algumas pessoas. Tais indivíduos sofrem de intolerância à lactose, também conhecida como deficiência de lactase adquirida, intolerância secundária à lactose, ou intolerância tardia à lactose (Camilleri *et al*, 2002). A produção da lactase durante a vida adulta é determinada por um gene localizado no cromossomo 2 (Kruse et al, 1998). Populações descendentes do norte da Europa geralmente tem níveis altos da enzima lactase durante a vida adulta, todavia, mais de 1 bilhão de pessoas no mundo possuem intolerância a

lactose em algum grau. Simoons, (1973b), Johnson, Kretchmer, Simoons, (1974) e Gunn (2003), sugeriram que se estimule a ingestão de derivados do leite, pobres em lactose em lugares onde há alta prevalência de malabsorção de lactose do adulto, substituindo os alimentos com lactose, por preparados comerciais com menores teores de lactose, ou outros livres de lactose, como a ingestão de leite com lactose hidrolisada (Cheng et al, 1979; Rosensweig, 1979). Uma alternativa encontrada em diversos países foi a substituição de alimentos com lactose, por soja e seus derivados, principalmente o leite de soja.

O mercado indiano, por exemplo, representa uma grande oportunidade para os produtores de soja brasileiros. Entre 1996 e 2005 houve crescimento de 360% no consumo de soja na Índia. Uma das idéias é a de introduzir produtos a base de soja no cardápio indiano. Com a segunda maior população do mundo (1,08 bilhão de habitantes), a Índia registra um baixo consumo per capita de soja (1,7 kg por ano). No Brasil, o consumo chega a 48,9kg ano (AgroAnalysis, 2007).

1.5 – OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE

Uma das principais características da soja como alimento, é o seu alto teor de proteínas. Farinhas desengorduradas, farinhas integrais, concentrados e isolados protéicos, proteína texturizada, leite, carne, molho, queijo são alguns dos subprodutos da soja. O mais conhecido é o leite de soja, usado há séculos no Oriente. Todavia a soja apresenta carboidratos que limitam o consumo da soja e seus derivados (Leblanc, 2004).

Segundo Diogo (2000) a soja é uma excelente fonte de proteína vegetal e de fibras solúveis. Existe, entretanto, restrições quanto ao seu uso na alimentação em função da presença de teores de açúcares considerados responsáveis por sintomas desagradáveis, tais como flatulência, que seguem a ingestão de leguminosas. A farinha de soja contém níveis substanciais de açúcares solúveis, particularmente sacarose, rafinose, e estaquiose (Bach-Knudsen, 1991).

Nas sementes de soja, os açúcares solúveis constituem aproximadamente 10% do peso seco. Sacarose, estaquiose e rafinose constituem a maioria dos açúcares solúveis. Dentre estes açúcares, destacam-se os α -galactosídeos ou oligossacarídeos de rafinose (RO), [O- α -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-D-Glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo], formados pela polimerização de sacarose a resíduos de galactose (Figura 1).

Portanto, o extrato de soja, bem como seus derivados, contém estes açúcares, que quando ingeridos pelas pessoas e animais monogástricos durante a alimentação, induzem o fenômeno da flatulência. Isto ocorre porque na mucosa intestinal de humanos e outros animais monogástricos, a enzima α -galactosidase, que é necessária para a hidrólise dos RO, não está presente. Conseqüentemente, os ROs não são degradados e assim passam para a parte final do intestino onde são fermentados anaerobicamente a CO_2 , H_2 e CH_4 pela microbiota intestinal (Price et al, 1988; Suarez et al, 1999), causando desconfortos gastrintestinais, flatulência e diarreia.

Tais açúcares são portanto, considerados fatores anti-nutricionais. A redução dos teores desses açúcares não digeríveis é de grande importância para a ampliação da utilização da soja. De acordo com Góes e Ribeiro (2002) no intuito de aumentar a aceitabilidade da soja na alimentação, vários métodos são usados para a redução do teor destes oligossacarídeos: o tratamento enzimático (Cruz, et al 1981; Sakai,1987; Shivanna; 1989; Maity, Paul, 1991; Ruiz, et al, 1995; Mulimani Ramalingan, 1995; LeBlanc, 2004), a hidratação dos grãos (Mulyowidarso et al, 1991; Mulimani, et al, 1997; Sanni, et al, 1997), o cozimento (Silva, Braga, 1982; Mulimani, et al, 1997), a fermentação (Suparmo, 1987; Rehms Barz, 1995), a germinação (Reddy; 1980; Abdullah, 1984; Yaklich, 1985; Bau *et al* 1996) seleção de culturas com teores reduzidos de oligossacarídeos (Hitz, et al, 2002; Meiset al, 2003; Neus, et al; 2005) e desenvolvimento de plantas transgênicas (Plant Genetics Research Unit - Research Project 3622-21000-029-01, dados não publicados) e RNA de interferência. Até o presente momento, entre os diversos métodos para redução dos teores de oligossacarídeos, o tratamento enzimático tem sido o mais indicado, por sua especificidade e condições brandas de processamento (Ruiz, 1995; LeBlanc, 2004; Graham, 2005, Rezessy-Szabó, 2007).

1.6 ALFA GALACTOSIDASE

A redução dos teores dos RO poderá ser conseguida por meio da adição das enzimas α -galactosidasas (figura.1) [α -D-galactosil galactohidrolases (E.C. 3.21.22)] ao processamento dos derivados de soja. Essas enzimas, hidrolisam as ligações α -1,6 que unem o resíduo de galactose ao de glicose presente nos ROs, produzindo galactose e sacarose livres, que são facilmente hidrolisados *in vivo* e absorvidos.

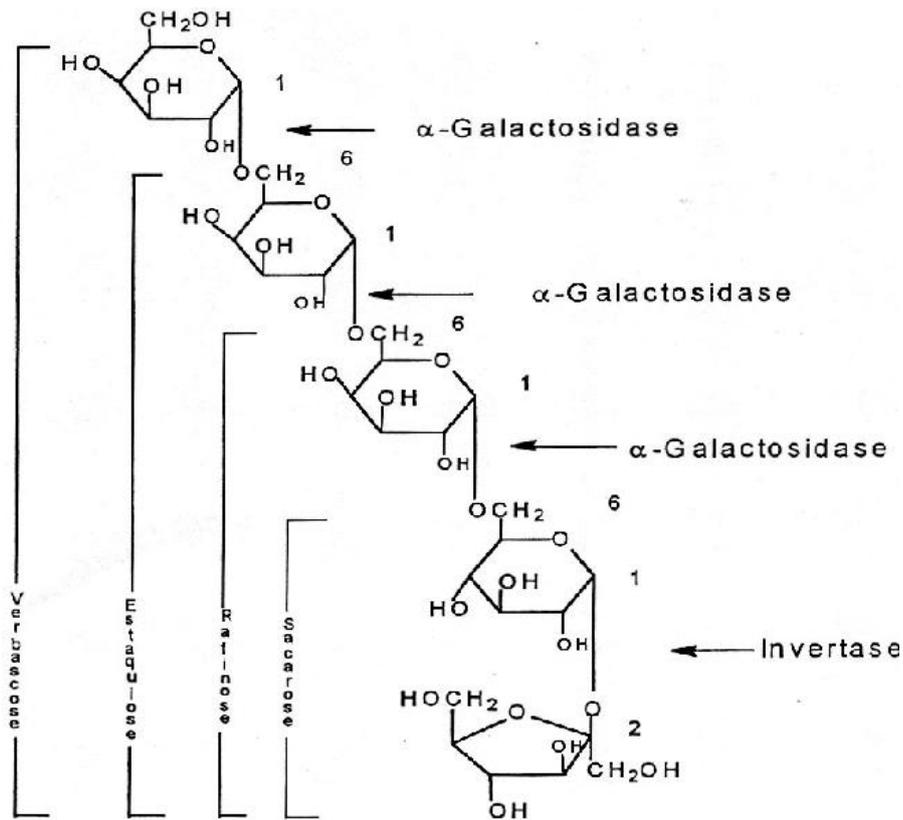


Figura 1 – Oligossacarídeos de rafinose e sítios de clivagem para as enzimas hidrolíticas invertase e alfa-galactosidase. Retirado de Rezende, (1998)

A enzima alfa-galactosidase encontrada em vegetais, apresenta funções variadas, estando presente em todos os tecidos que contém alfa-galactosídeos (Alani; Smith, Markakis, 1989). Estudos realizados por Dopico, Nicolás e Labrador (1989) demonstram que na parede celular de alguns vegetais ocorrem reações enzimáticas que promovem a hidrólise de glucanos armazenados e a quebra das ligações de seus polissacarídeos.

Esta é uma característica da autólise para promoção do crescimento das plantas, com a participação da alfa-galactosidase neste processo para o crescimento da planta. Durante o processo de germinação, a hidratação dos tecidos durante a embebição promove, entre outros eventos, a reorganização de organelas e membranas, aumento na atividade respiratória, síntese de proteínas e de mRNAs e ativação de enzimas, resultando no início da mobilização de reservas, entre elas o galactomanano (Ferreira e Borghetti, 2004).

A alfa-galactosidase atua no reconhecimento celular, no transporte de açúcares e como glicoproteína na organização de sistemas multi-enzimáticos (Góes, Ribeiro,

2002). Porter et al, (1992) relata a ação da alfa-galactosidase da planta como antibiótico em resposta ao processo de infecção. O microorganismo *Didymella applanata* contém substâncias alfa-galactosídicas fitotóxicas que são utilizadas durante o processo de infecção.

Em processos práticos esta enzima apresenta ainda diversas aplicações tais como, estudo da estrutura molecular de açúcares; melhoramento da sacarose extraída de beterraba para diminuir o teor de rafinose, já que esta impede a cristalização da sacarose (Annunziato et al, 1986; Mulimani e Ramalingam, 1995); eliminar o sabor desagradável de feijão cru, do leite de soja, além de desodorizá-los (Ruiz, Acosta e Cisneiros, 1995) Cruz e Park (1982) indicam o uso em produtos à base de soja, para promover a diminuição o teor dos oligossacarídeos que causam flatulência. Converter glicolipídeos para conversão de grupo sanguíneo. Existe ainda a possibilidade do uso terapêutico para a doença de Fabry (Ishii et al, 2007; Ziegler et al. 2007), uma doença metabólica de transmissão ligada ao cromossoma X, causada por uma deficiência na transcrição do gene que codifica a enzima lisossomal alfa-galactosidase.

1.7 OCORRÊNCIA DE ALFA-GALACTOSIDASE

A alfa-galactosidase pode ser obtida a partir de bactérias, fungos ou vegetais. Procurando otimizar a produção e obtenção desta enzima, estas diferentes fontes têm sido estudadas (Shivanna, et al; 1989, Rezessy-Szabó, 2007). Segundo Manzanares, Graaff e Visser (1998), a enzima de origem bacteriana apresenta vantagens sobre a enzima de origem fúngica, uma vez que sua produção é maior. No entanto, galactosidases de fungos são obtidas mais facilmente devido à sua localização extracelular e seu amplo perfil de estabilidade, sendo, portanto, viável sua produção em grande escala (Annunziato, et al, 1986; Somiari e Balogh, 1992). Segundo Keller e Pharr (1996), esta enzima apresenta diferentes formas (Fujimoto et al 2003), podendo ser monomérica ou tetramérica, com pH, termoestabilidade e conformação diretamente relacionadas à estrutura da proteína (Porter et al, 1992).

A maioria das alfa-galactosidases produzida por fungos é glicoproteína, sendo encontrados resíduos de glucose e manose na enzima da soja (Porter et al, 1992; Zeilinger et al, 1993). Said e Pietro (2004) mostraram que galactosidases fúngicas são, em geral, as mais adequadas para usos biotecnológicos devido a sua localização extracelular, alta estabilidade. A grande vantagem do uso de leveduras para produção

dessas enzimas é que muitas delas, especialmente *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, classificados como organismos considerados seguros sendo atribuído o termo GRAS (“generally regarded as safe”), não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica.

Em plantas, essa enzima vem sendo investigada uma vez que é necessária durante a germinação na hidrólise de resíduos de galactosil em galacto-oligosacarídeos de galactomananas (Fujimoto et al, 2003). Mulimani et al (1997) realizaram experimentos com farinha de soja e chegaram à conclusão de que a alfa-galactosidase de *Cyamopsis tetragonolobus* atuou melhor na redução dos oligossacarídeos que a enzima de origem microbiana. Existem múltiplas formas de alfa-galactosidase, com diferentes propriedades bioquímicas e cinéticas. Na soja, a galactose protege parcialmente o sítio catalítico da enzima, em sua forma tetramérica, contra a desnaturação pelo calor, sendo esta proteção pH-dependente. Uma vez que o processo de redução de ROs em soja e seus derivados representa uma demanda de mercado, torna-se necessário a procura por novas fontes e diferentes alfa-galactosidades no intuito de otimizar a redução dos açúcares.

Irving et al (1997) relatam mudanças na atividade de alfa-galactosidases durante o desenvolvimento de *Cucurbita maxim*. Duas alfa-galactosidases uma alcalina e outra ácida apresentavam atividades diferentes, porém a atividade enzimática após um máximo decrescia rapidamente durante o desenvolvimento. Chrost and Schmitz (1997) obtiveram resultados similares com alfa-galactosidases de *Cucurbita melo*, e uma aumento transiente da atividade das duas alfa-galactosidases durante a germinação.

Pharr and Hubbard (1994) correlacionam a presença de duas enzimas e a atividade enzimática diferencial com o nível de estaquiose e rafinose. Em *Cucumis sativus* a degradação da estaquiose está mais relacionada com a atividade da alfa-galactosidase alcalina do que com a ácida.

Phar and Hubbard (1994) propõem ainda que, a hidrólise de estaquiose em *C. sativus* seria determinada predominantemente por um tipo de alfa-galactosidase com atividade ótima em pH alcalino. Todavia, Gao e Schaffer (1999), já purificaram alfa-galactosidases alcalinas com preferência pelo substrato rafinose.

Segundo Gao e Schaffer (1999) é possível que o metabolismo de rafinose e estaquiose necessite de um processo de 2 etapas onde uma enzima tem atividade ótima em pH alcalino e outra, no pH ácido e, para que esse processo ocorra a produção

enzimática em compartimentos celulares separados poderia ser utilizada pela planta. As formas diferenciadas da enzima podem estar relacionadas ao estágio fisiológico da semente, (Zeilinger et al., 1993).

Muitos microorganismos, plantas e animais produzem alfa-galactosidases em múltiplas formas. Genes que codificam diferentes alfa-galactosidases já foram clonadas a partir de fungos, bactérias e plantas; A maioria da alfa-galactosidases de fungos são classificadas na família 27 e família 36 (Henrissat, 1991, 1993), enquanto bactérias predominam na família 27 .

Trabalhos de cristalografia realizados (Foucault. 2006) evidenciam a diferença entre resíduos de aminoácidos de alfa-galactosidases extraídas do mesmo organismo. Todavia, poucos trabalhos relatam clonagem (Li et al, 2007) sequenciamento e cristalografia de alfa-galactosidases provenientes de plantas. Um fator diferencial é o processo de purificação laborioso, e a atividade e estabilidade das enzimas de plantas, fungos termofílicos apresentam enzimas com maior potencial para aplicação biotecnológica pois estas apresentam maior estabilidade térmica.

Outros trabalhos da literatura isolaram alfa-galactosidases de sementes de leguminosas em germinação e obtiveram, somente quando separado o cotilédone do eixo-embrionário, duas enzimas alfa-galactosidases, uma enzima do cotilédone e outra do eixo embrionário.

É grande o interesse por alfa-galactosidases de diversas fontes, entre elas de plantas, visando sua aplicação em processos industriais. Já foram purificadas, a partir de plantas alfa-galactosidases de sementes de *Phaseolus vulgaris* (Dhar et al., 1994); de *Lens culinaris* (Corchete e Guerra, 1987); de *Cassia sericea*. (Bhaskar Ramachandra, Virupaksha, 1990); de *Coffea canephora* (Haibach et al., 1991); de *Lupinus albus* (Lahuta et al., 2000a); de *Glycine max* (Porter, Herrmann e Ladish 1990; Guimarães et al, 2001); de *Ceratonia siliqua* (Kontos e Spyropoulos, 1996); de *Cyamopsis tetragonoloba* (Meier e Reid, 1982); de *Coffee bean* (Courtois e Petek, 1958); de *Trifolium repens* (Willians, Villarroya, Petek, 1977); de *Cucumis melo* (Gao e Schaffer, 1999); *Platymiscium pubescens* (Oliveira et al, 2005) *Helianthus annuus* (Kim, 2003), *Ganoderma lucidum* (Sripuan, Aoki, 2003) *Sesbania marginata* (Falco, Durrant, Franco, 2000); de *caesalpinia peltophoroides* (Borges et al, 2005); de caule de *Colocasia esculenta* (Chen e Lin-Chu, 1991) e de raízes de *Verbascum thapsus L.* (Bom et al. 1998); *Oryza sativa* (Kim et al, 2002) e *Rehmannia glutinosa* (Zhao et al, 2006).

No entanto, a identificação de novas fontes vegetais, especialmente leguminosas nativas do Brasil, capazes de produzir alfa-galactosidases, é de grande importância, tanto a respeito do conhecimento da composição bioquímica dessas sementes, como das características cinéticas e moleculares das alfa-galactosidases, além de agregar valor a biodiversidade brasileira. Esses conhecimentos deverão fornecer novos subsídios para o desenvolvimento de um processo industrial, que vise a redução dos teores de RO em produtos de soja e de outras leguminosas. Conseqüentemente, a identificação de novas alfa-galactosidases poderá contribuir no sentido de maximizar o uso da soja e seus derivados, como alternativa protéica destinada ao consumo humano, e na formulação de ração animal.

1.8 SCHIZOLOBIUM PARAHYBA

Estudos de árvores brasileiras (Fialho, 2002) revelaram a presença de alfa-galactosidase na semente da planta da mata atlântica *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioidea, e também conhecido por Guarapuvu. Outros nomes populares incluem faveira, pataqueira, bacuruva, birosca, faveira, bandararra.

Schizolobium significa legume duro (Carvalho, 2003; Freire, 2005), o termo *parahyba*, se refere ao rio Paraíba, onde a espécie foi avistada pela primeira vez. É uma planta decídua, heliófita, característica e exclusiva da mata atlântica. Apresenta dispersão irregular e descontínua; bastante freqüente nas planícies aluviais ao longo de rios. Está entre as plantas nativas de mais rápido crescimento.

É muito utilizada para recuperação de áreas degradadas, é fonte de inibidor de quimiotripsina (Teles *et al*, 2005), utilizada para confecção de caixas, forros, pranchetas, palitos para fósforo, brinquedos, paisagismo (Backes, Irgang 2004) aeromodelismo (Sobrinho, 1996) e em reflorestamentos mistos. (Carneiro, 1996). Sua casca era muito utilizada por índios para fazer canoas (Freire, 2005).

Durante a germinação das sementes de Guapuruvu ocorre a expressão de genes de enzimas que são utilizadas na degradação dos polímeros de carboidratos presentes no cotilédone. A degradação da substância de reserva contida nos cotilédones fornece substrato para o desenvolvimento da planta. Como os ROs constituem uma parcela das substâncias de reserva na planta, para mobilização dessa substância de reserva, a planta

Guapuruvu apresenta atividade crescente de alfa-galactosidase durante o processo de embebição e germinação.

A mobilização de polissacarídeos foi estudada em outras espécies de leguminosas, sendo detectada a presença de três enzimas hidrolíticas (alfa-galactosidase, endo- β -mananase e β -manosidase), confirmando que a mobilização dos polissacarídeos ocorrem por hidrólise, e em todos os casos estudados, o polissacarídeo é degradado até seus monossacarídeos constituintes concomitante com a produção de sacarose, sugerindo a hipótese que a sacarose seria o açúcar de transporte que levará os produtos da mobilização da reserva até o embrião em crescimento, de acordo com Ferreira e Borghetti (2004)

Visando a redução enzimática de ROs presentes na soja, a planta *Schizolobium parahyba* torna-se um candidato ideal para a elaboração de um protocolo de produção, extração, purificação, caracterização de alfa-galactosidase presente nessa espécie durante o processo de germinação das sementes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral a purificação da enzima alfa-galactosidase de sementes de Guapuruvu, e caracterizar bioquimicamente a enzima visando, posteriormente o estabelecimento de um processo biotecnológico para redução enzimática dos teores de oligossacarídeos de rafinose.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos Específicos são propostos:

- Quantificar a atividade da alfa-galactosidase em sementes de Guapuruvu, em diversos estádios da germinação;
- Estabelecer um protocolo de purificação de uma ou mais alfa-galactosidases;
- Caracterizar a cinética de conversão de substratos;
- Determinar a massa molecular relativa da alfa-galactosidase;
- Analisar o efeito da temperatura, do pH, de íons e agentes redutores e monossacarídeos na atividade da alfa-galactosidase;

- Determinar os valores de Km e de Vmax para hidrólise de p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo a alfa-galactosidases;
- Estabelecer condições ótimas (quantidade de enzima, tempo de hidrólise, pH, e temperatura) visando a otimização de eliminação enzimática dos oligossacarídeos de rafinose no extrato hidrossolúvel de soja;

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das sementes de leguminosa



Figura 2 – Plantação de *Schizolobium parahyba* onde as amostras foram coletadas.

As sementes de Guapuruvu (*Schizolobium parahyba*) foram fornecidas pelo Laboratório de Silvicultura da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais) e posteriormente coletadas a partir de espécimes presentes no Campus da Universidade de Brasília.

A similaridade quanto a espécie da planta e estado de dormência das sementes coletadas no campus da Unb e no da UFV foi comprovada no laboratório de Termobiologia da Universidade de Brasília.

3.2 Preparação do extrato enzimático de sementes

Os extratos enzimáticos foram obtidos macerando-se as sementes descascadas e germinadas por 48 horas, utilizando-se 15 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 para cada grama de semente e centrifugando, sob refrigeração, a 14000 rpm por 7 minutos em um centrífuga Sorvall RC-5B. O sobrenadante obtido foi utilizado como fonte de α -galactosidase.

3.3 Determinação da atividade de α -galactosidase

O ensaio enzimático de α -galactosidase foi constituído de 700 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 50 μ L do extrato enzimático e 250 μ L de p-nitrofenilgalactopiranosídeo (p-NPGal) 2,0 mM. Esta mistura de reação foi incubada a 37°C por 15 min, e após esse tempo a reação foi interrompida pela adição de 1mL de Na_2CO_3 0,5 M. A absorbância das amostras foram então, determinadas a 405 nm, e a atividade de α -galactosidase foi medida determinando a quantidade de p-nitrofenilato formado utilizando uma curva padrão construída com p-nitrofenilato (pNP). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 01 μ mol de pNP por minuto.

Como controle da reação foi realizado um sistema idêntico ao ensaio enzimático, porém com o extrato enzimático fervido por 15 minutos antes da adição do mesmo ao sistema.

Para realizar o ensaio de atividade no extrato bruto, o experimento controle da reação foi modificado, uma vez que foi detectada atividade residual da enzima mesmo após 15 minutos à 96°C. A atividade do controle para todos os ensaios realizados com o extrato bruto foi determinada para dois controles. Para o primeiro deles foi considerado o protocolo 3.3 modificado, na presença do substrato pNPGal sem enzima (controle da enzima). Para o segundo controle, foi considerado o protocolo 3.3 modificado, na presença da enzima, porém sem o substrato (controle do substrato). A soma das absorbâncias dos controles da enzima e do substrato para a reação enzimática foi utilizado apenas para os ensaios com o extrato bruto.

3.4 Determinação do teor de proteína pelo método Bradford

A concentração de proteína presente nos extratos enzimáticos foi determinada pelo método de Bradford (1976). O ensaio constitui-se de 10µL do extrato, 90 µL de água destilada e 1 mL de reagente de Bradford. Após 10 minutos, a absorbância das amostras foram medidas espectrofotometricamente a 595 nm e a quantidade de proteína determinada, utilizando uma curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA).

3.5 Determinação de conteúdo de carboidrato

A determinação do conteúdo de carboidrato da amostra de alfa-galactosidase foi feita pela da adição de 500 µL de solução enzimática a 500 µL de fenol 5% (p/v) e 2,5mL de H₂SO₄ concentrado. A reação ocorreu durante 30 minutos e a leitura espectrofotométrica foi feita a 490 nm (Dubois, 1956). Uma curva de calibração de glicose foi utilizada como padrão para determinar a quantidade de resíduos de glicose presentes na proteína.

3.6. Dosagem de açúcar redutor

A dosagem de açúcar redutor consistiu em reagir 100µL de amostra enzimática com 300µL de reagente DNS (Miller, 1959). Após imersão dos tubos em banho de água fervente por 10 minutos, adicionou-se 1,0 mL de água destilada. A quantidade de produto liberado foi determinada espectrofotometricamente a 550nm. Uma curva de calibração de glicose foi utilizada como padrão para determinar a quantidade de resíduos de glicose presentes na proteína.

3.7 Determinação do tempo de maior atividade de alfa-galactosidase durante a germinação.

As sementes de *Schizolobium parahyba* tiveram seu tegumento escarificado na extremidade oposta à saída da radícula e, posteriormente, fervidas por 5 minutos para quebrar a dormência. A germinação ocorreu a temperatura ambiente e frações foram retiradas de acordo com o protocolo 3.2 nos tempos de 0; 24; 48; 72; 96; e 120 horas, com o objetivo de determinar o tempo em que a enzima alfa-galactosidase apresentasse maior atividade durante a germinação.

3.8 Procedimentos para observação das sementes por microscopia

As sementes germinadas por 0 e 48 horas foram fixados em 2% glutaraldeído-2% paraformaldeído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio pH 7.3 contendo 5% de sacarose, durante 2 h e pós-fixados em 1% tetróxido de ósmio-0.8% ferricianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M , pH 7.3, 5 mM de cloreto de cálcio durante 1 h. Em seguida, realizou-se a contrastação in block com acetato de uranila 0,5% durante tempo mínimo de 12 horas. A desidratação foi realizada em gradiente crescente de acetona (30 a 100%) e posterior inclusão em resina Spurr. O protocolo utilizado seguiu metodologia de preparo de amostras para microscopia eletrônica (Souza, 1998), embora as amostras tenham sido analisadas no microscópio ótico. Após inclusão na resina foi submetida à microtomia no ultramicrotomo Reichert Supernova em cortes semi-finos com espessura aproximada de 1,5-2,0 µm. Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina é 1% e observados em microscópio de luz AxioPhot Zeiss Microscope com câmera AxioCam MRc 5 acoplada para obtenção da imagem utilizando o programa Axiovision 4.6.

3.9 Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50

As amostras enzimáticas contendo maior atividade de alfa-galactosidase obtidas da germinação, foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel) em uma coluna (50,0 x 3,0 cm) de Sephadex G-50 equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas com 400 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A eluição foi realizada com um fluxo de 30 mL/h e coletados em frações de 2 mL.

3.10 Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl G-75

As amostras enzimáticas contendo maior atividade de alfa-galactosidase obtidas da germinação, foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel) em uma coluna (70,0 x 3,0 cm) de Sephacryl G-75 equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas com 600 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A eluição foi realizada com um fluxo de 30 mL/h e coletados em frações de 2 mL.

3.11 Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100

As amostras enzimáticas contendo maior atividade de alfa-galactosidase obtidas da germinação, foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel) em uma coluna (62,0 x 3,0 cm) de Sephacryl S-100 equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas com 360 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A eluição foi realizada com um fluxo de 30 mL/h e coletados em frações de 2 mL.

3.12. Teste de adsorção de alfa-galactosidase em resinas para cromatografia de troca iônica.

O eluato proveniente da coluna de cromatografia de exclusão molecular com maior rendimento de purificação (G-75) foi concentrado e submetido ao teste de adsorção em resinas de troca iônica tipo catiônica (CM-Sepharose e S-Sepharose) e aniônica (Q-Sepharose e DEAE-Sepharose). Cada uma das 4 resinas foram previamente ativadas de acordo com instruções do fabricante e equilibradas com 500µL de tampão atendendo a faixa de o pH de 3,0 a 8,0:

- Tampão Acetato de Sódio, 50mM, pH 3,0; 4,0; e 5,0;
- Tampão Fosfato de Sódio, 50mM, pH 6,0; e 7,0;
- Tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 .

Posteriormente 100µL de amostra contendo atividade enzimática de alfa-galactosidase foi aplicada em um sistema contendo 500µL de resina de troca iônica previamente equilibrada com diferentes tampões atendendo a faixa de pH de 3,0 a 8,0 em cada resina.

Após a aplicação do amostra, cada sistema foi agitado suavemente por 30 segundos e incubado no gelo por 10 minutos. O sobrenadante contendo a fração protéica não adsorvida foi coletado e a atividade enzimática foi quantificada como descrito no item 3.3.

Foi aplicado às resinas de troca iônica 500µL do respectivo tampão com 0,5 M de NaCl Cada sistema foi agitado suavemente por 30 segundos e após incubação em banho de gelo por 10 minutos o sobrenadante contendo a fração adsorvida foi coletado e a atividade enzimática foi quantificada.

A atividade enzimática obtida do material adsorvido e não adsorvido sob diferentes pH em cada uma das resinas foi utilizado como parâmetro para validar a resina de troca iônica adequada para continuação do processo de purificação.

3.13 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose

A amostra enzimática proveniente da cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75, foi submetida a cromatografia de troca iônica do tipo aniônica em uma coluna (10,0 x 3,0 cm) de DEAE-Sepharose equilibrada previamente com tampão Fosfato de Sódio 50 mM, pH 7,0. As proteínas foram eluídas com 100 mL de tampão Fosfato de Sódio 50 mM, pH 7,0, seguido por um gradiente linear formando por 54 mL de tampão Fosfato de Sódio 50 mM, pH 5,0 e 54 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 contendo 0,5 M de NaCl. A eluição foi realizada com um fluxo de 36 mL/h e coletados em frações de 3,0 mL.

3.14 – Análise da termoestabilidade

A termoestabilidade da atividade de alfa-galactosidase foi testada nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C. Alíquotas do extrato bruto e do eluato da coluna DEAE-Sepharose foram incubadas em cada uma das temperaturas acima mencionadas. Para análise da termoestabilidade foram retiradas amostras de 150 µl da cada amostra a cada 15 minutos, durante os primeiros 120 minutos, a cada 30 minutos, no tempo de incubação entre 180 minutos a 300 minutos a cada 60 minutos, no tempo de incubação entre 360 minutos a 600 minutos, aferindo-se a atividade de acordo com o item 3.3

3.15 - Determinação de K_M e V_{max} aparentes

Para obtenção dos valores de K_M e V_{max} , os ensaios de atividade enzimática foram realizados com diferentes concentrações de substrato. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados como descrito no item 3.3, utilizando concentrações determinadas de p-NPGal. A concentração de p-NPGal variou de 0,25 a 3,0mmol.mL⁻¹. Os valores de K_M e de V_{max} foram determinados utilizando o programa de computador Curve Expert, versão 1.24 para Windows (Hyams, 1997)

3.16 – Efeito de íons e açúcares e agentes redutores na atividade de alfa-galactosidases

Para avaliar-se o efeito de diferentes compostos na atividade da alfa-galactosidase, soluções com concentrações definidas desses compostos foram pré-incubadas com o extrato enzimático por 15 minutos, a 37 °C. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade das enzimas pré-incubadas apenas com o tampão sem qualquer efector, como 100% , conforme item 3.3.

A amostra enzimática foi pré-incubada com cada um dos efetores por 20 minutos. O protocolo 3.3 foi alterado adicionando-se ao tampão acetato de sódio pH 5,0 100 mM os efetores (monossacarídeos, agentes redutores, íons monovalentes, divalentes e trivalentes) de modo que a concentração final dos efetores em cada reação atingisse 1mM e 10mM. Os efetores que alteraram a atividade enzimática em mais de 10% tiveram seu perfil de inibição da atividade enzimática determinado com concentrações variadas. A metodologia supracitada foi utilizada variando-se a concentração final dos entre 0,05mM e 20mM.

3.17 Determinação do pH e temperatura ideal

O efeito do pH na atividade de alfa-galactosidase do extrato bruto e do eluato da coluna DEAE foi determinada modificando o tampão utilizado no item 3.3 com pHs variando de 3,0 a 9,0. Os tampões utilizados foram Acetato de Sódio 100mM para pH entre 3 e 6, Fosfato de Sódio para pH entre 6 a 7,5; Tris-HCl para pH entre 7,5 e 9,0. O efeito da temperatura na atividade da alfa-galactosidase foi determinado em ensaios de acordo com item 3.3 variando-se a temperatura a cada 5°C na faixa de 25 à 95°C

3.18 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

As amostras submetidas a eletroforese foram previamente precipitadas com solução 75% de TCA, lavadas com solução de acetona a 60% e a 100%, respectivamente, ressuspendidas em tampão de amostra desnaturante (Laemmli, 1970). As misturas foram fervidas durante 3 minutos, centrifugadas por 10 segundos a 1000rpm em centrífuga Costar e aplicadas no gel.

A análise eletroforética da amostra de alfa-galactosidase foi realizada conforme procedimento descrito por Laemmli (1970), utilizando um mini-sistema da Sigma Chem. Co. Os géis foram preparados a partir da solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30% (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, para o gel separados, e tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, para o gel concentrador, 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 com uma voltagem constante de 110V. Foram aplicadas no gel alíquotas contendo 30 µg de proteína. Os marcadores de massa molecular usados foram fosforilase-b (97kDa) BSA (66 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina 20,1. KDa- e lisozima (14,3 kDa). As massas moleculares das frações protéicas foram estimadas correlacionando-se, por meio de uma curva-padrão, os perfiz de migração das proteínas-padrão (mobilidade relativa no gel) com o logaritmo da massa molecular e também através de espectrometria de massa (item 3.20).

3.19 Coloração do gel de eletroforese

Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987). O gel foi fixado com metanol a 50% (v/v), ácido acético a 12% (v/v) por um período mínimo de 2 horas, sob agitação. Nova fixação com álcool etílico 50%(v/v) 3 vezes de 20 minutos cada. Em seguida, o gel foi submetido a sensibilização por tiosulfato de sódio a 0,02% (p/v) por 1 minuto, seguido de 3 lavagens de 20 segundos com água Milli-Q. Posteriormente os géis foram impregnados por 20 minutos em nitrato de prata a 0,2% (v/v) e formaldeído a 0,075% (v/v), lavados por 40 segundos com água e as proteínas reveladas com carbonato de sódio a 6% (p/v) e formaldeído a 0,05% (v/v). A reação de revelação foi parada com a mesma solução utilizada para a primeira fixação e os géis foram armazenados até a digitalização da imagem.

3.20 Análise por Espectrometria de Massa em MALDI -TOF

Após diálise contra água e a secagem a vácuo, a fração protéica proveniente da DEAE-Sepharose foi solubilizada em 10 µL de TFA (ácido trifluoroacético), 0,1%. Por fim, misturou-se 1 µL do solubilizado a 1 µL de matriz de ácido alfa-ciano-4-

hidroxicinâmico (10 mg.mL⁻¹ em 50% de acetonitrila e TFA 0,1%) e aplicou-se na placa de aço do espectrômetro de massa. A fração protéica foi dessalinizada antes da aplicação na placa utilizando-se microcolunas de fase reversa Zip Tip (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante. A massa da amostra foi analisada no espectrômetro de massa.

4- RESULTADOS

4.1- Determinação do tempo de maior atividade de alfa-galactosidase durante a germinação

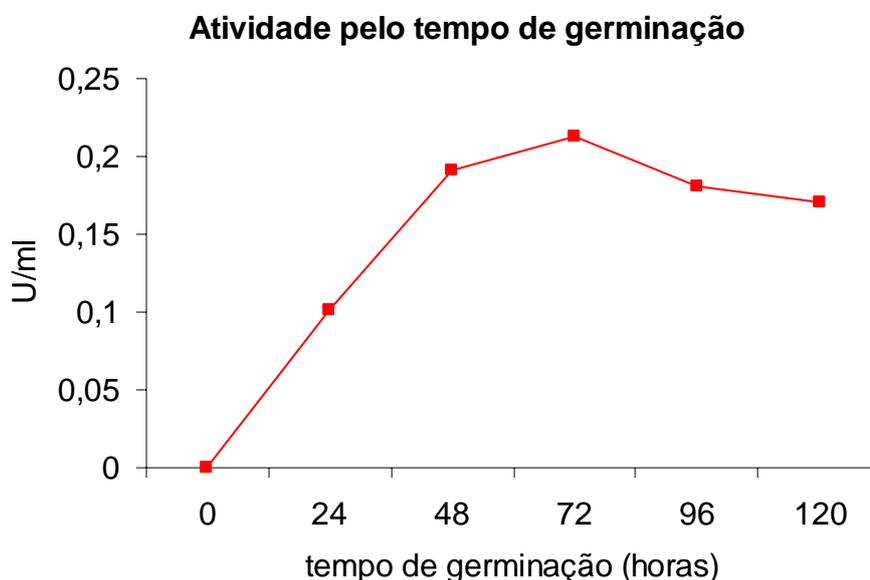


Figura 3 – Atividade (U/ml) de α -galactosidase no extrato bruto de sementes de Guapuruvu germinadas por em diferentes tempos.

A germinação em diferentes tempos expôs um perfil de atividade enzimática crescente nos embriões da leguminosa Guapuruvu, embora a atividade tenha sido aparentemente maior com 72 horas, o extrato bruto foi obtido a partir de enzimas germinadas por 48 horas. Com esse procedimento evitou-se a redução da atividade da enzima que após 72 horas entra em declínio.

O extrato bruto após germinado por 48 horas foi utilizado como fonte de alfa-galactosidase. O extrato bruto foi ultrafiltrado e concentrado e amostras foram

submetidas a 3 colunas de exclusão molecular, de modo a determinar o melhor protocolo cromatográfico a ser utilizado.

4.2- Análise histológica das sementes germinadas por 0 e 48 horas

Sementes germinadas por 0 horas e 48 horas foram processadas de acordo com o item 3.8 para análise histológica em microscopia de luz. Com base na literatura, o material de reserva da semente é constituído principalmente por polissacarídeos (Ferreira e Borghetti, 2004). A comparação do preparo histológico de sementes germinadas por diferentes tempos, mostra uma redução na quantidade de material intracelular, evidenciando uma redução da reserva de polissacarídeo da planta.

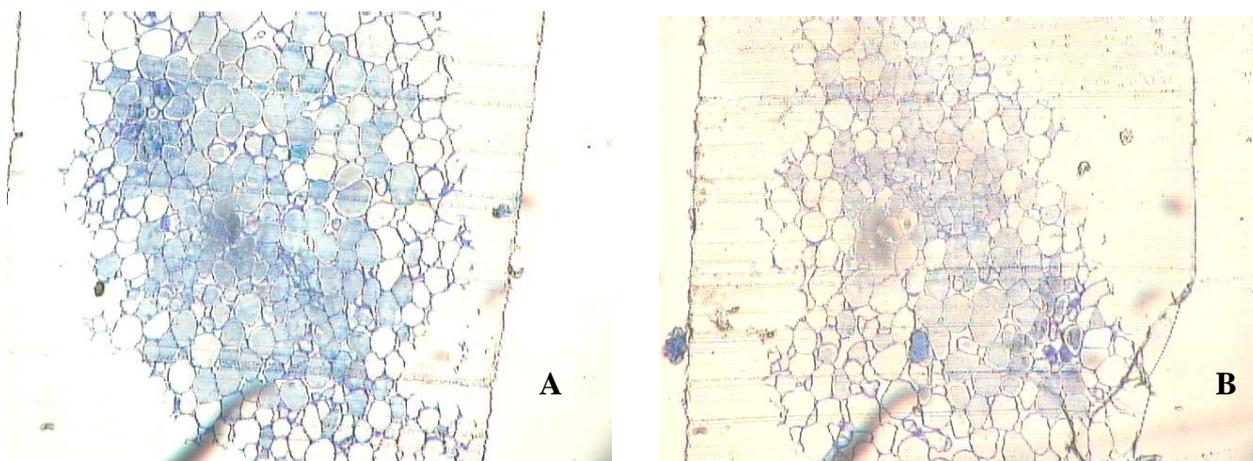


Figura 4 - Corte semifino de semente germinada por 0 hora (A) e 48 horas (B) corado com azul de toluidina 1%. Aumento 10 X

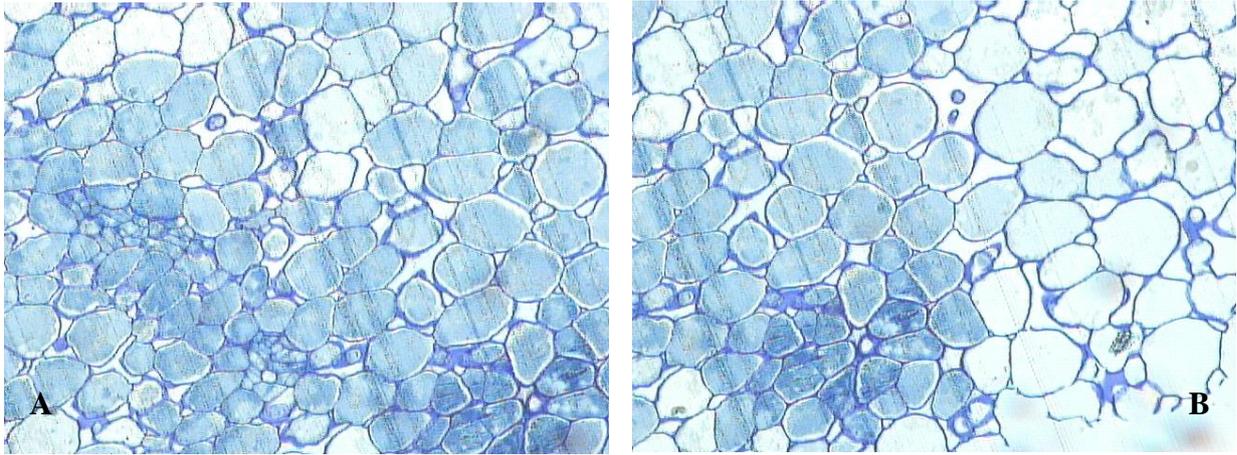


Figura 5 Corte semifino de semente germinada 0 hora (A) e 48 horas (B) corado com azul de toluidina 1%. Aumento 20 X

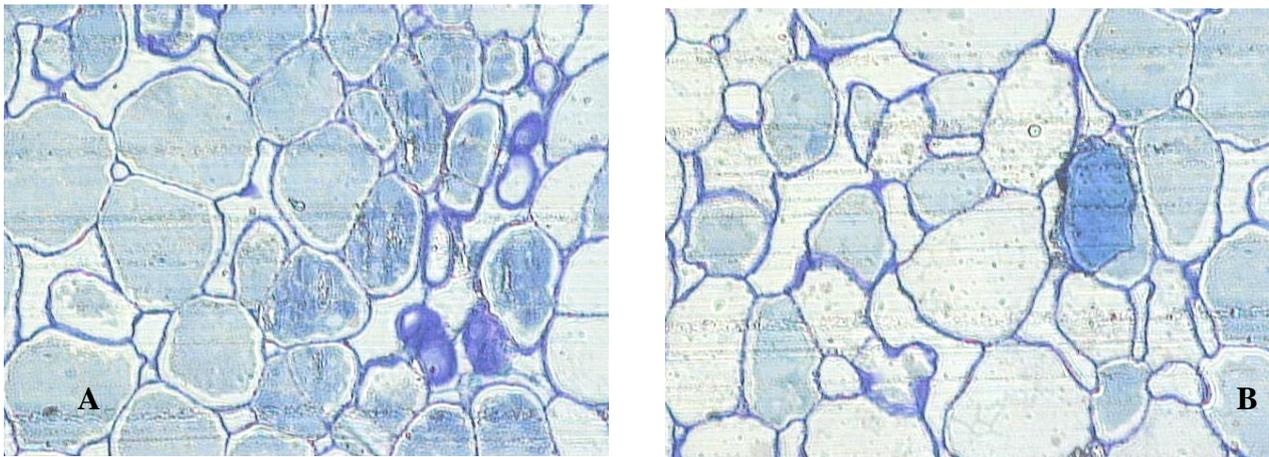


Figura 6 - Corte semifino de semente germinada 0 horas (A) e 48 horas (B) aumento 40 X

A análise histológica da semente evidencia a redução dos grânulos de material de reserva. Verifica-se através de análise histológica com aumentos sucessivos uma diminuição da coloração do material de reserva, Pietrobom, (2003) e Ferreira e Borghetti, (2004) demonstram que há redução dos carboidratos durante a germinação de leguminosas

4.3- Cromatografias do extrato bruto proveniente de sementes germinadas por 48 horas, em 3 colunas de exclusão molecular.

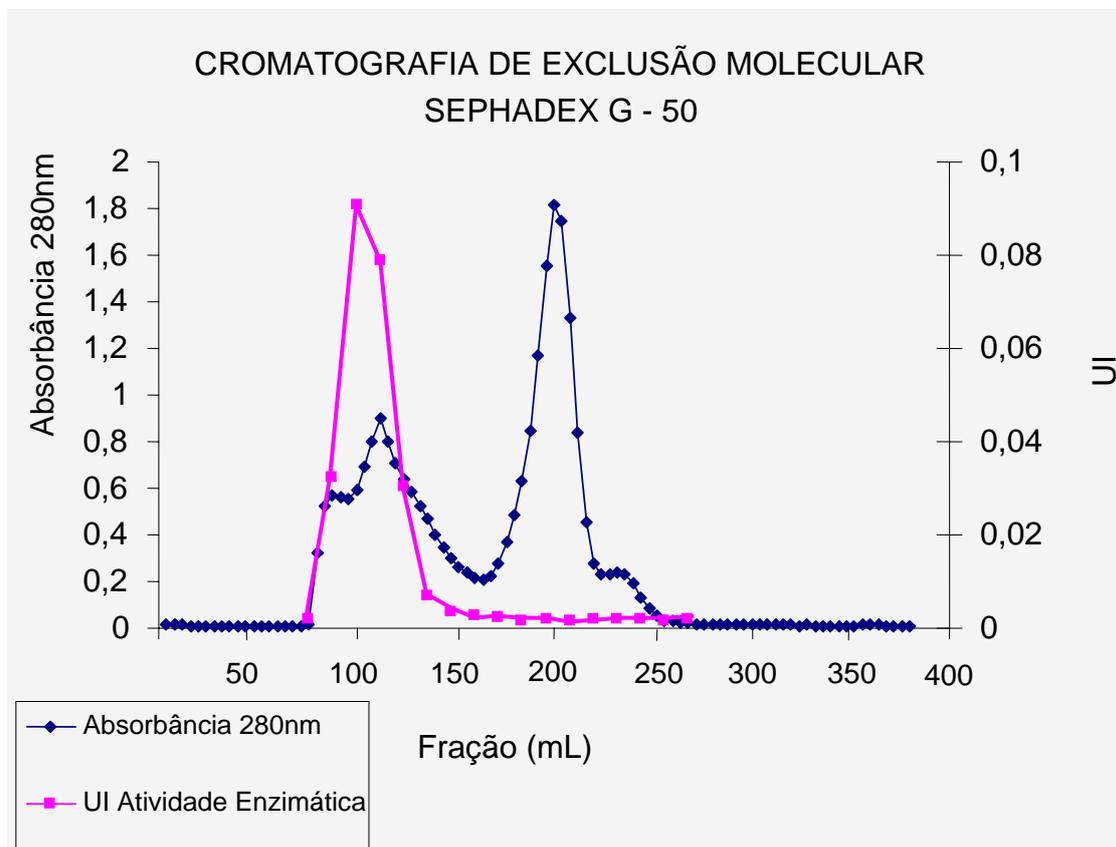


Figura 7 – Perfil cromatográfico em coluna de Sephadex G-50, do extrato enzimático contendo atividade de alfa-galactosidase proveniente de sementes de Guapuruvu germinadas por 48 horas.

As frações eluídas apresentaram 4 picos protéicos e 1 pico com atividade enzimática de alfa-galactosidase. O eluato contendo atividade enzimática de alfa-galactosidase foi reunido para determinação da pureza.

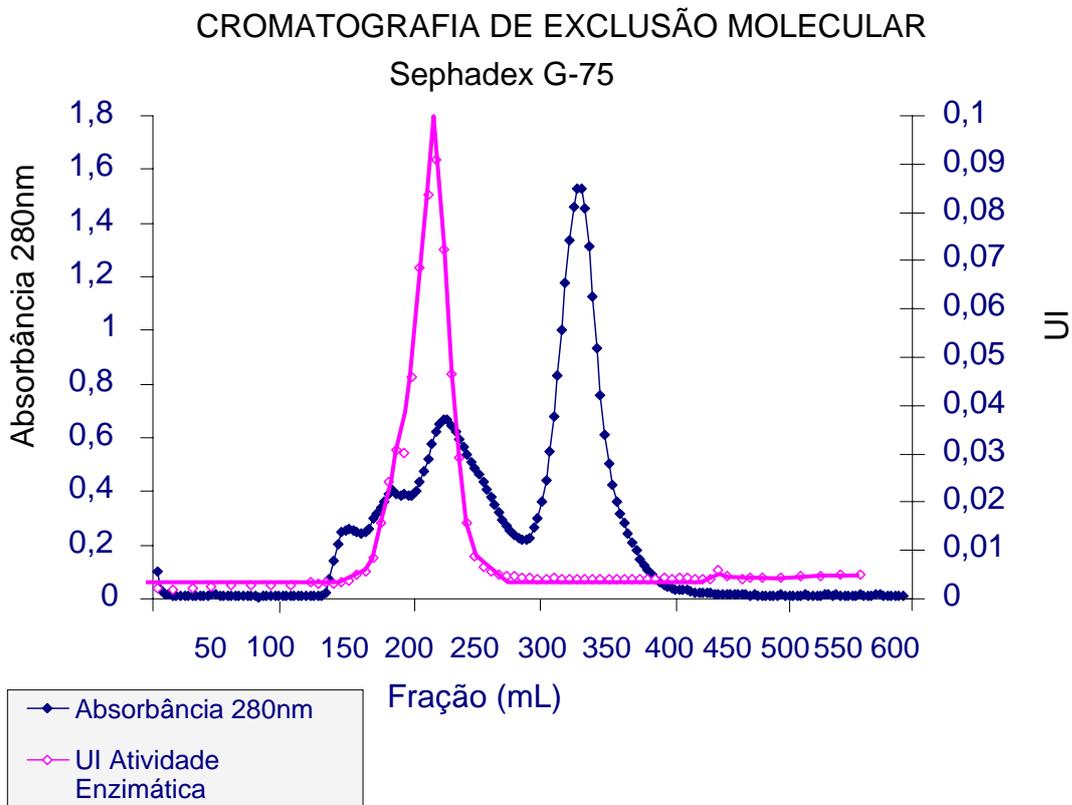


Figura 8 - Perfil cromatográfico em coluna de Sephadex G-75, do extrato enzimático contendo atividade de alfa-galactosidase proveniente de sementes de Guapuruvu germinadas por 48 horas.

As frações eluídas apresentaram 4 picos protéicos e 1 pico com atividade enzimática de alfa-galactosidase. O eluato contendo atividade enzimática de alfa-galactosidase foi reunido para determinação da pureza.

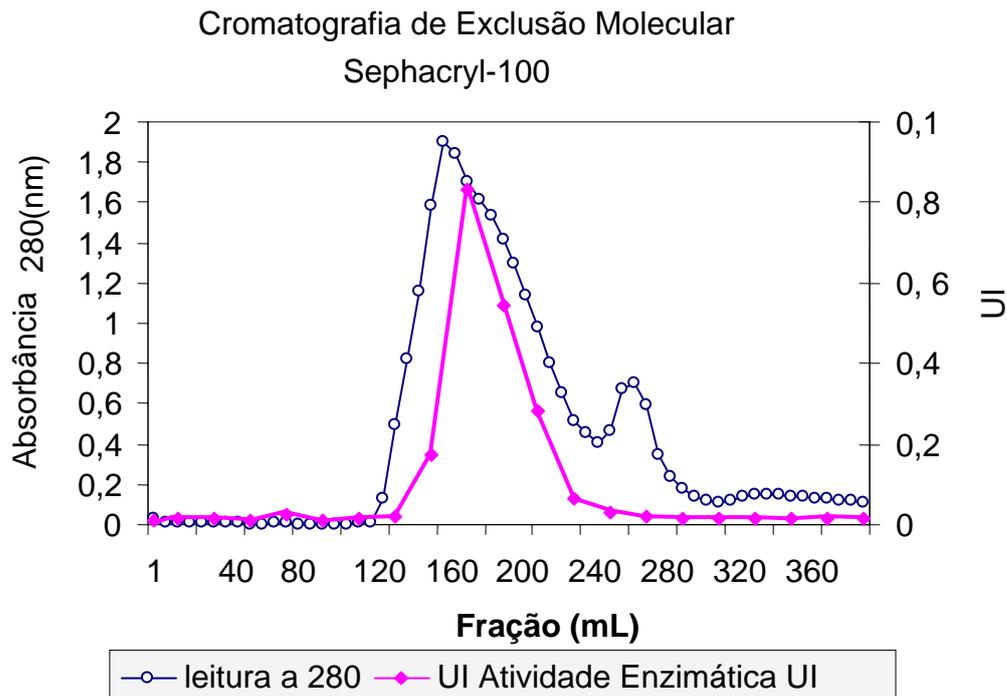


Figura 9 - Perfil cromatográfico em coluna de Sephacryl S-100, do extrato enzimático contendo atividade de alfa-galactosidase proveniente de sementes de Guapuruvu germinadas por 48 horas.

As frações eluídas apresentaram 2 picos protéicos e 1 pico com atividade de α -galactosidase. O eluato contendo atividade enzimática de alfa-galactosidase foi reunido para determinação da pureza.

Embora todas as resinas de exclusão molecular tenham purificado parcialmente o extrato enzimático, a que apresentou melhor rendimento de purificação foi a resina Sephadex G-75 a taxa de rendimento dessa etapa em atividade enzimática (UI) e percentual de proteína determinada pelo método de Bradford (1976) evidencia que a resina Sephadex-G75 apresenta melhor rendimento quanto ao protocolo proposto de purificação da enzima, uma vez que o pico contendo atividade enzimática de alfa-galactosidase pode ser melhor diferenciando dos perfis protéico que não continham atividade de alfa-galactosidase,

O extrato bruto remanescente foi então submetido a cromatografias adicionais e o eluato contendo atividade de alfa-galactosidase proveniente dessa coluna de cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75) foi concentrado e submetido a eletroforese em gel de poliácridamida para comprovar a pureza dessa amostra. A

eletroforese em gel de poliacrilamida revelou a presença de proteínas diversas no eluato proveniente da coluna de cromatografia Sephadex G-75. A amostra foi então submetida a um teste de adsorção em colunas de troca iônica para averiguar a resina ideal para a etapa cromatográfica a ser utilizada.

4.4 Teste de Adsorção em Resinas de Troca Iônica

O Ensaio enzimático de adsorção da α -galactosidase em diversas resinas de troca iônica realizado com o eluato concentrado proveniente da cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-75 está representado na tabela 2.

Tabela 2. Ensaio enzimático de adsorção da α -galactosidase em diversas resinas de troca iônica. Atividade enzimática não adsorvida (valor superior) e adsorvida (valor inferior) respectiva para cada resina e pH está expressa em UI.

	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0
CM-Sepharose (catiônica)	0.002446 ----- 0.021200	0.004029 ----- 0.005576	0.015971 ----- 0,004963	0.019856 ----- 0,006872	0.016547 ----- 0,005337	0.01741 ----- 0,00716
S-Sepharose (catiônica)	0.001871 ----- 0,002603	0.003741 ----- 0,002214	0.025468 ----- 0,009171	0.036691 ----- 0,008601	0.019712 ----- 0,004454	0.02777 ----- 0,00781
Q-Sepharose (aniônica)	0.013669 ----- 0,001487	0.021583 ----- 0,002356	0.004892 ----- 0,019487	0.008633 ----- 0,022651	0.003885 ----- 0,026998	0.003885 ----- 0.021226
DEAE- Sepharose (aniônica)	0.007338 ----- 0,02994	0.023022 ----- 0,007962	0.005612 ----- 0,030080	0.00777 ----- 0,02955	0.004029 ----- 0,049962	0.004027 ----- 0,04002

A análise do teste de adsorção em resinas de cromatografias de troca iônica permitiu a definição do protocolo de purificação para alfa-galactosidase. O eluato proveniente de cromatografias em resina Sephadex G-75 foi concentrado e submetido a cromatografia de troca iônica em resina DEAE Sepharose. pH 7,0. Essa faixa de pH apresentou a melhor razão entre atividade adsorvida (0,049962) e não adsorvida (0,004029).

4.5 Cromatografia de Troca Iônica DEAE-Sepharose

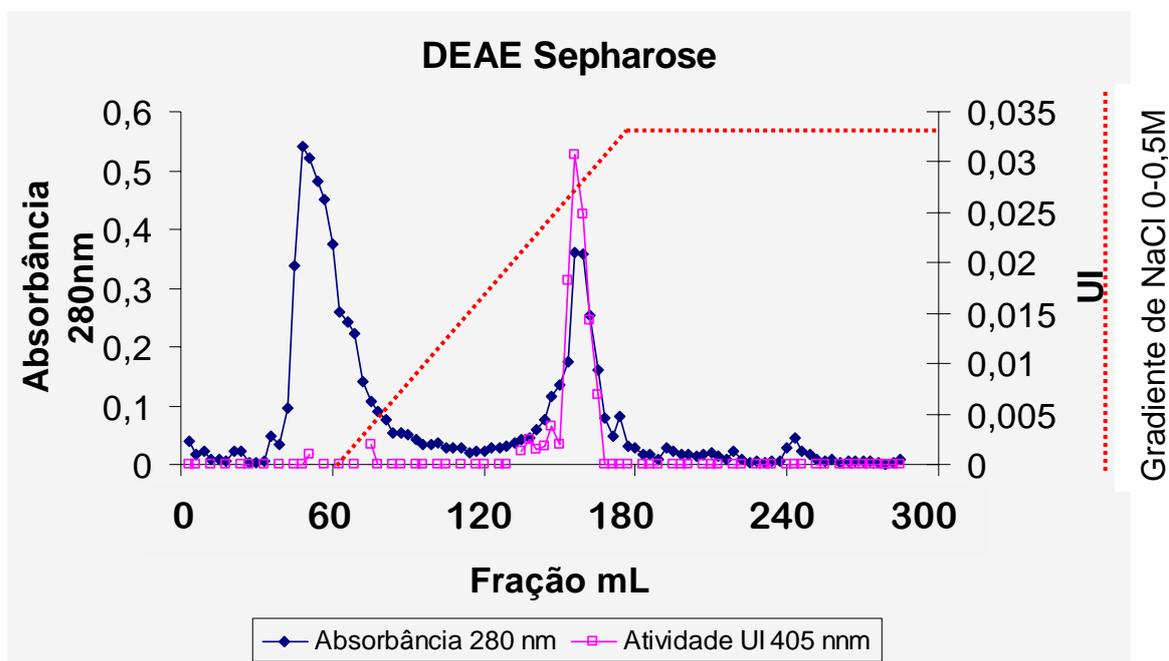


Figura 10 – Perfil cromatográfico em coluna de DEAE Sepharose, do extrato enzimático contendo atividade de alfa-galactosidase proveniente de cromatografia de exclusão molecular Sephadex-G75.

A fração contendo atividade enzimática proveniente de coluna de exclusão molecular Sephadex-G75 foi concentrada e aplicada na resina de troca iônica DEAE Sepharose. A fração protéica foi eluída com 100 mL de tampão Fosfato de Sódio 50 mM, pH 7,0, seguido por um gradiente linear formando por 54 mL de tampão Fosfato de Sódio 50 mM, pH 5,0 e 54 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 contendo 0,5 M de NaCl seguido de eluição com 120 mL de tampão acetado de sódio 50 mM, pH 5,0 contendo 0,5 M NaCl

O eluato proveniente da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE Sepharose, foi dialisado uma vez que a fração com atividade de alfa-galactosidase foi eluída da resina somente após aplicação de um gradiente crescente de Tampão Fosfato de Sódio 100mM pH 7,0 NaCl (0-0,5M). Após diálise, o perfil protéico foi analisado por meio do SDS-PAGE de acordo com o item 3.18 e 3.19 para averiguar inicialmente a pureza da amostra.

4.6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

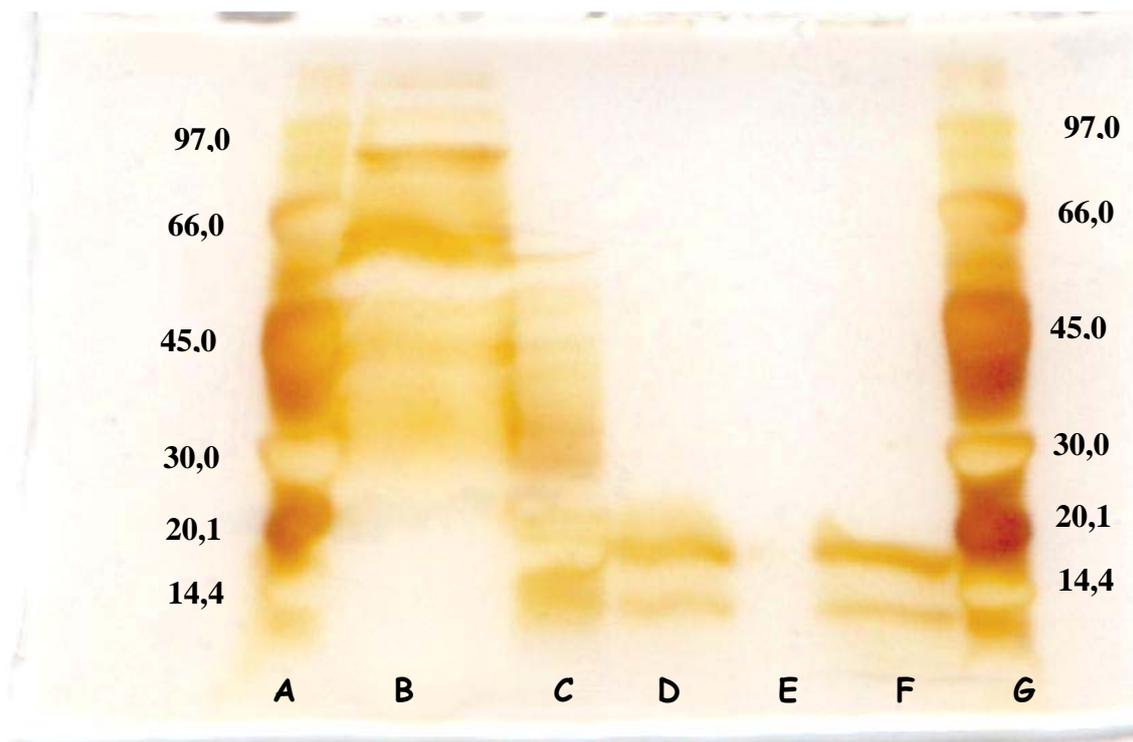


Figura 11- Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes dos extratos resultantes dos processos de purificação. Amostras de 50 μ L de proteína foram aplicadas no gel. A e G- Marcador de peso molecular (10 μ L); B - Extrato bruto resultante de germinação de sementes de Guapuruvu por 48 horas.; C- Eluato Sephadex G-75; D e F - Eluato DEAE-Sepharose E - Tampão de Amostra; E-

Os perfis eletroforéticos das amostras obtidas pelas etapas de purificação evidenciaram a presença de diversas espécies protéicas no extrato bruto (B, figura 11). Ocorre uma redução das espécies protéicas após cromatografia em coluna de exclusão molecular. Entretanto as frações resultantes dos processos cromatográficos evidenciam espécies protéica de baixa peso molecular, as quais não são evidentes no perfil eletroforético do extrato bruto, levantando a hipótese de uma dissociação de subunidades da alfa-galactosidase ou concentração durante as etapas de purificação. Já que a presença de outras proteínas também é quantificada pelo Bradford no ensaio de proteína total. Para averiguar a possibilidade de subunidades e determinar com exatidão a massa molecular da alfa-galactosidase a amostra proveniente da DEAE-Sepharose, foi submetida à espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida por matriz.

4.7 – Análise da amostra no MALDI-TOF

A amostra apresentada na figura 12 foi processada de acordo com item 3.20. O espectro evidencia a presença de mais espécies protéicas que a eletroforese em Gel de poliacrilamida. As massas de 10.086,722 Da e 5.774,953 Da poderiam ser a dupla carga do 20.179,022 Da e 11.543 Da, respectivamente. A diferença da massa de uma amostra duplamente carregada é um múltiplo da monocarregada, pois a massa molar da proteína é constante e os valores de z são números inteiros que diferem entre si por uma unidade. ($z=1$, $z=2$, $z=3$)

Embora a massa da dupla carga não coincida exatamente com o espectro protéico monocarregado, a determinação de conteúdo de carboidrato da amostra proveniente da coluna DEAE-Sepharose determinado de acordo com o protocolo do item 3.5, revelou a presença de glicosilação da proteína, que apresentou 0,32 μ g de açúcar por mg de proteína. De acordo com Cunha (2003) o processo de modificação pós-traducional de adição de glicosilação em proteínas pode apresentar um padrão diversificado em uma mesma proteína, resultando na existência de muitas glicofomas. A análise do espectro correspondente a massa de 10.086,722 Da e 20.179,042 quando visto em escala maior revela a presença de massa protéicas de 9.965,596 Da (fig. 13) e 19.960,00 Da (fig. 14), possivelmente glicofomas da proteína.

Considerando-se a diversidade de combinações possíveis existentes entre carboidratos, há proteínas com mais de 100 tipos diferentes de glicanas ligadas a um mesmo sítio de glicosilação (Cunha, 2003). Para corroborar a hipótese de glicofomas e de subunidades faz-se necessário análises adicionais da amostra, como verificar padrão de glicosilação ou reduzir e alquilar amostra e analisar espectro de massa para verificar presença da subunidade.

O espectro de massa revelou a presença do que poderia ser um contaminante e que não foi detectado na eletroforese em gel de poliacrilamida. Com massa igual a 6.724,639 Da (fig. 12).

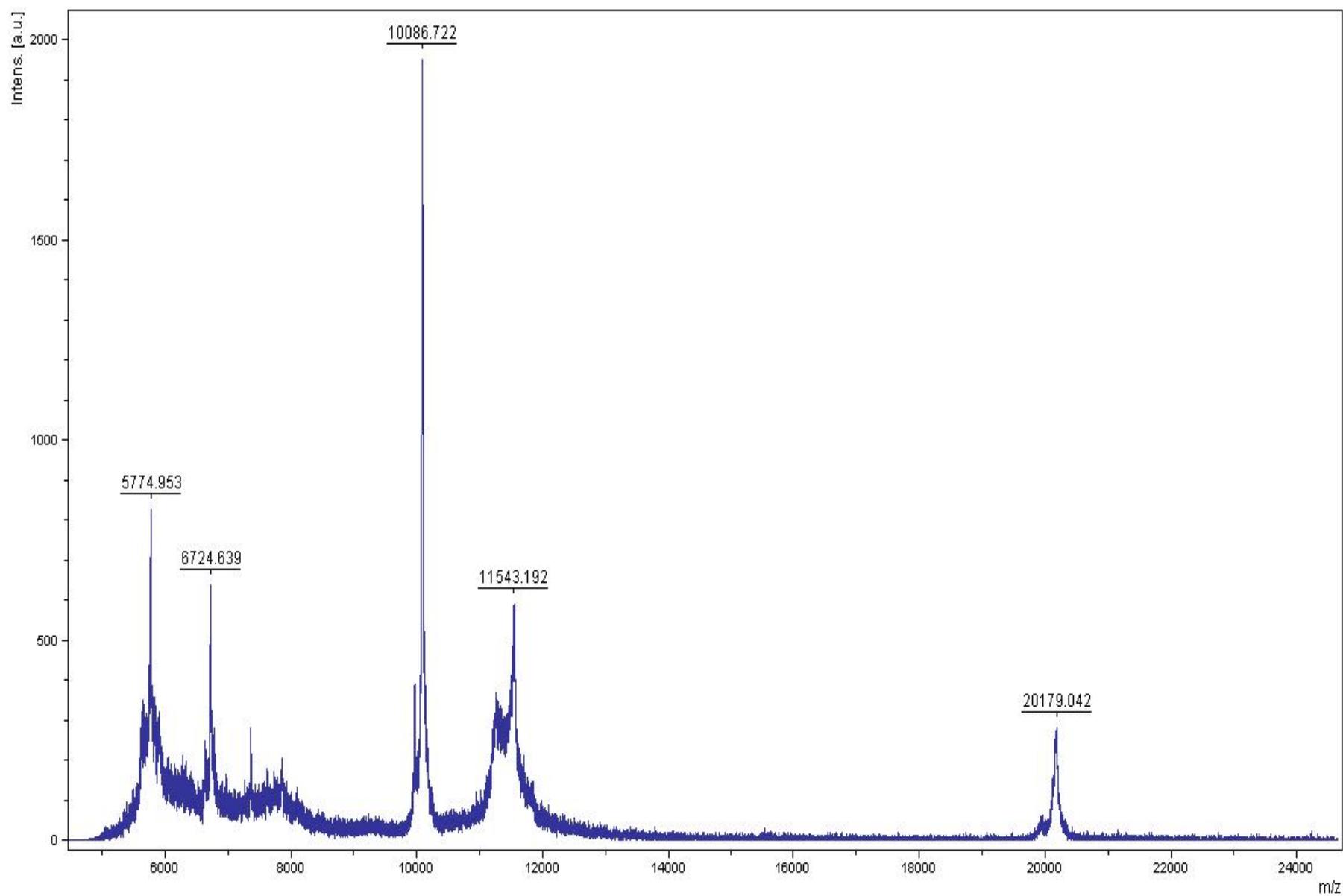


Figura 12 – Espectro de massa da amostra proveniente da coluna DEAE Sepharose. A amostra foi previamente dializada contra água e processada de acordo com item 3.20.

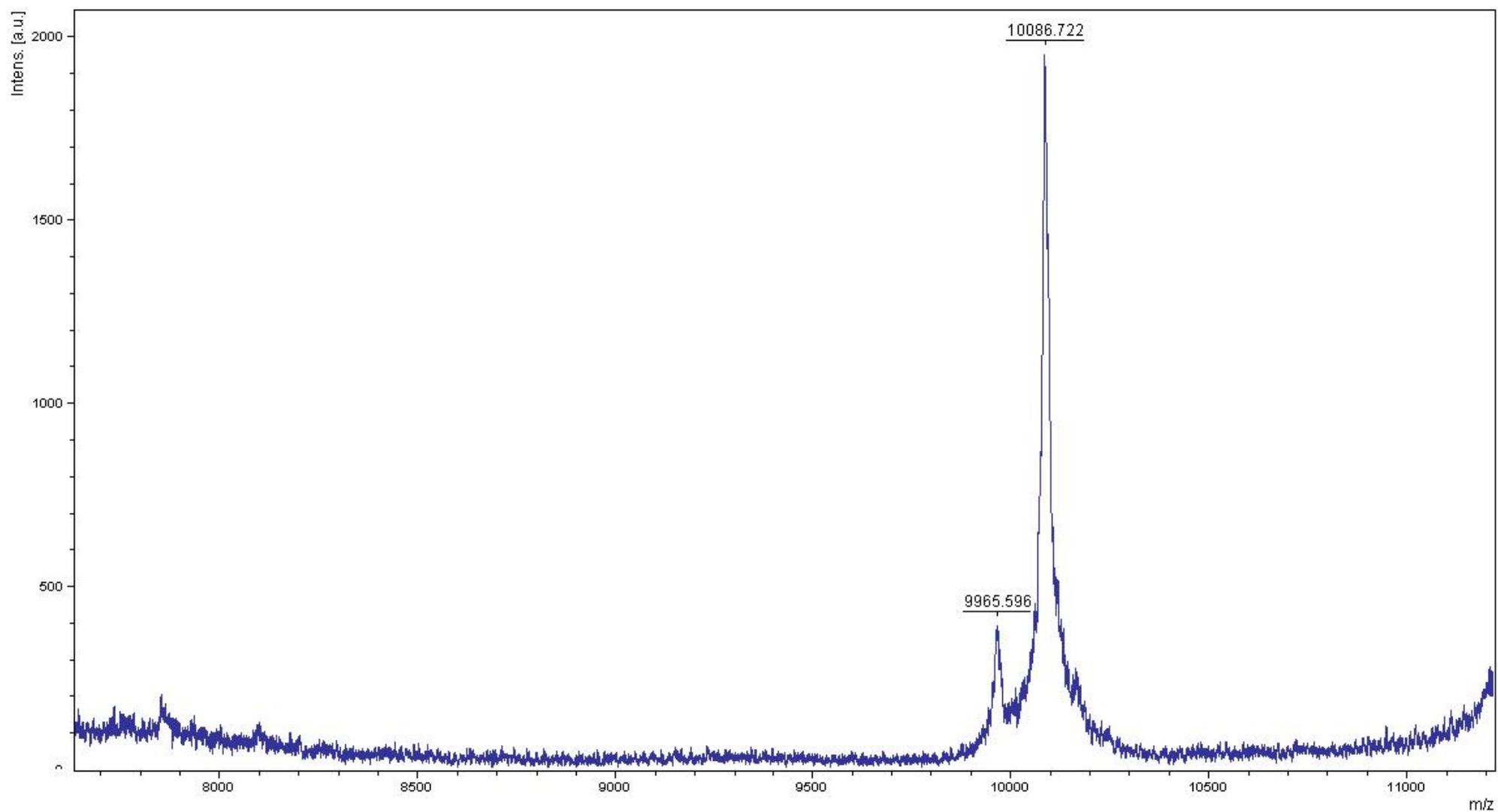


Figura 13 – Espectro de massa da amostra enzimática proveniente da coluna DEAE Sepharose. Aproximação do pico com massa 10086,722 Daltons.

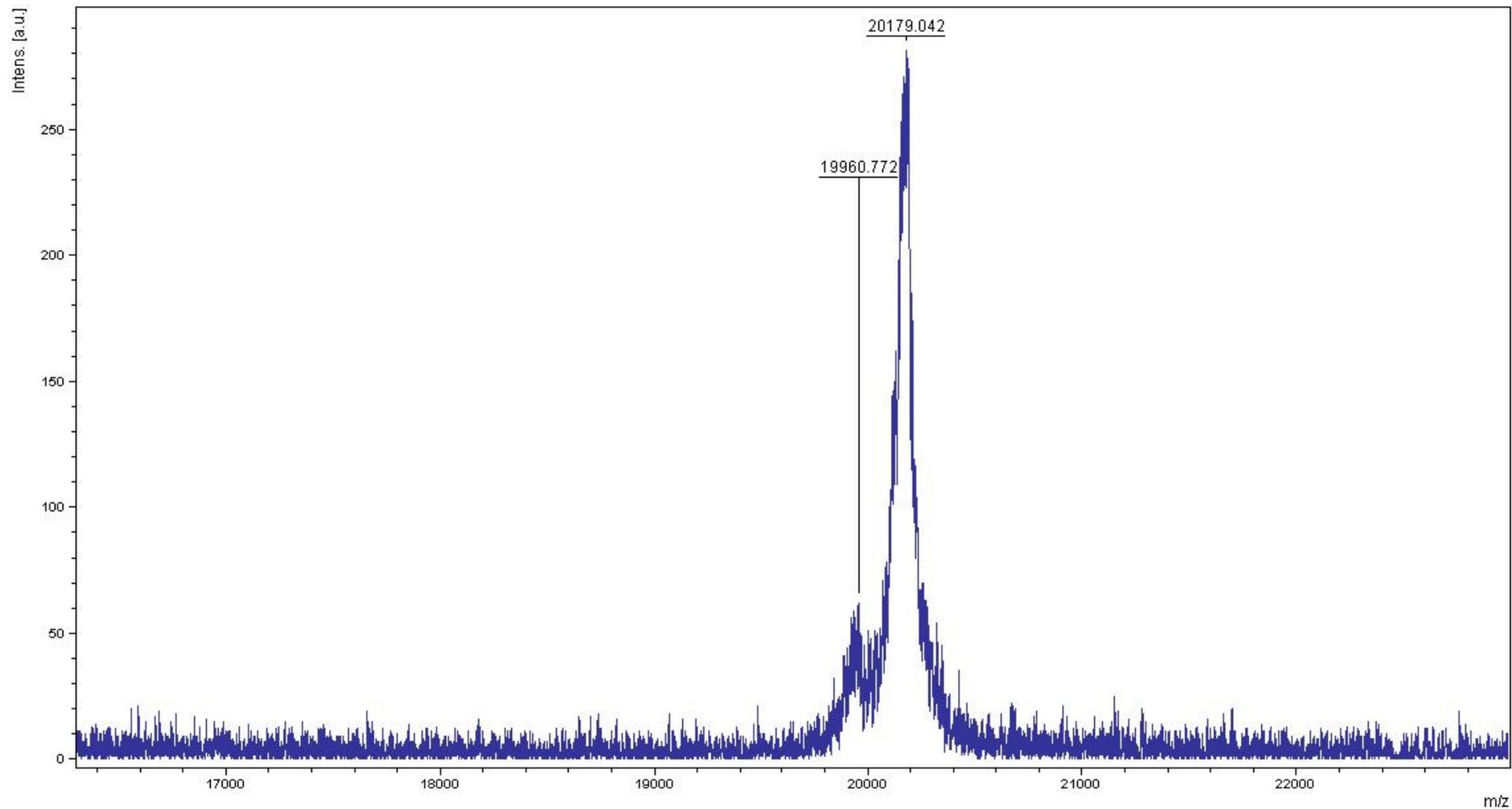


Figura 14 – Espectro de massa da amostra enzimática proveniente da coluna DEAE Sepharose. Aproximação do pico com massa 20179,042 Daltons.

4.8 – Determinação da Temperatura Ideal

Para o extrato bruto, a maior atividade de alfa-galactosidase foi encontrada em 40°C (2,8 U/mL). A atividade decresce com o aumento da temperatura sendo 10 vezes menor a 95°C conforme mostra a figura 15.

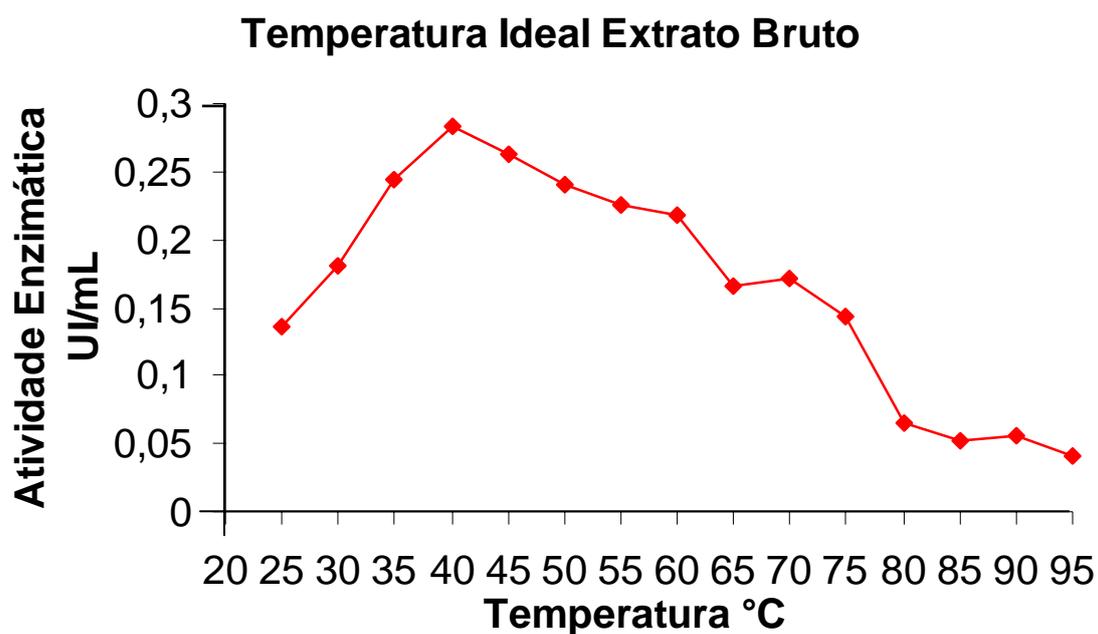


Figura 15 - Efeito da temperatura na atividade de alfa-galactosidase do extrato bruto obtido por germinação da sementes por 48 horas.

Para o eluato da DEAE-Sepharose, a maior atividade de alfa-galactosidase foi encontrada em 45 °C (0,07 U/mL). A atividade decresce em temperatura maior do que 45°C, atingindo valores mínimos em temperatura acima de 60°C (Figura 16).

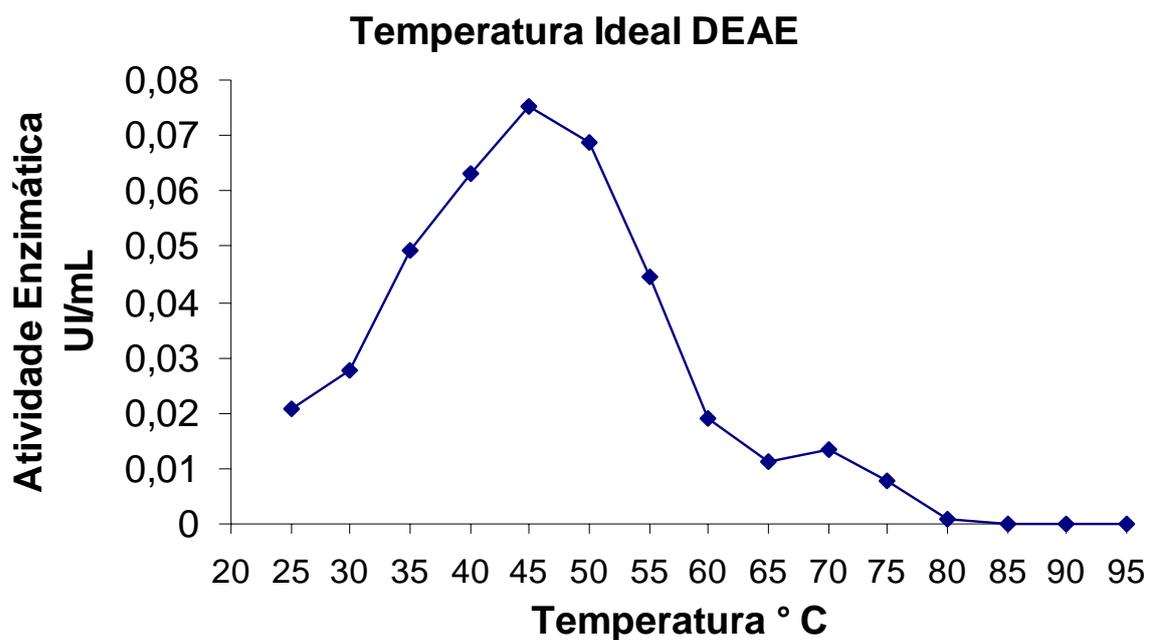


Figura 16 - Efeito da temperatura na atividade de alfa-galactosidase eluída em coluna de DEAE-Sepharose.

4.9 – Determinação da pH Ideal

Para o extrato bruto, a maior atividade de alfa-galactosidase apresentou uma faixa de pH ótimo predominantemente ácido onde a maior atividade foi obtida no pH 5,5 (0,18 U/mL) conforme mostra a figura 17.

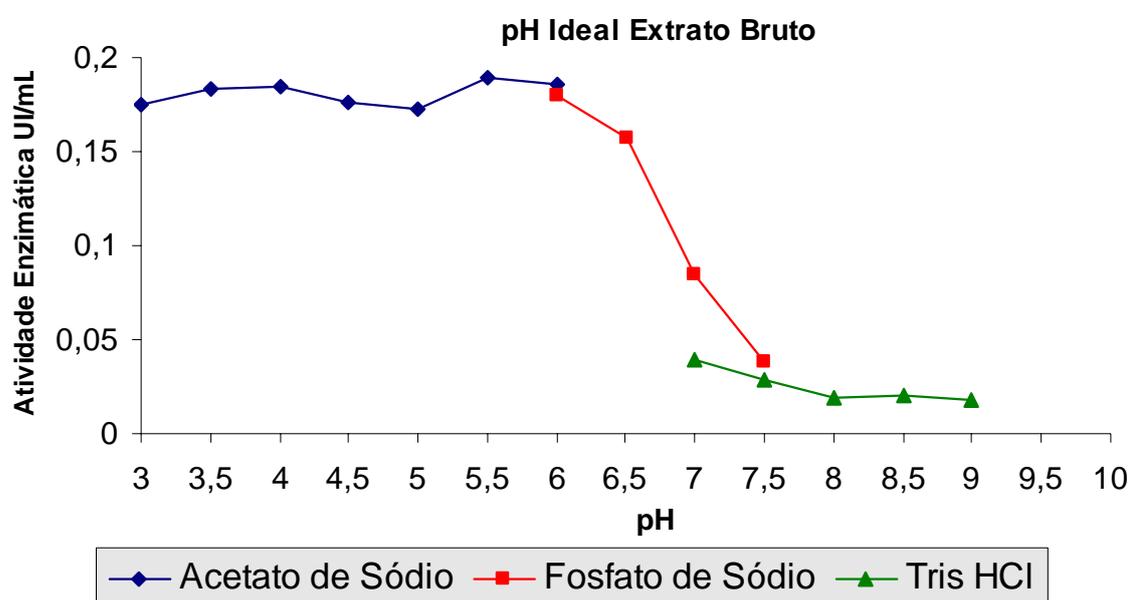


Figura 17: Efeito do pH na atividade de alfa-galactosidase do extrato bruto obtido de sementes de Guapuruvu germinadas por 48 horas.

Para o eluato da DEAE-Sepharose, as maiores atividades de alfa-galactosidase foram encontradas em faixa de pH predominantemente ácido onde a maior atividade (pH ótimo) foi obtida no pH 5,0 (0,063 U/mL). Diferente do extrato bruto, em pH 6,0 o tampão fosfato de sódio obteve maior atividade enzimática. (Figura 18).

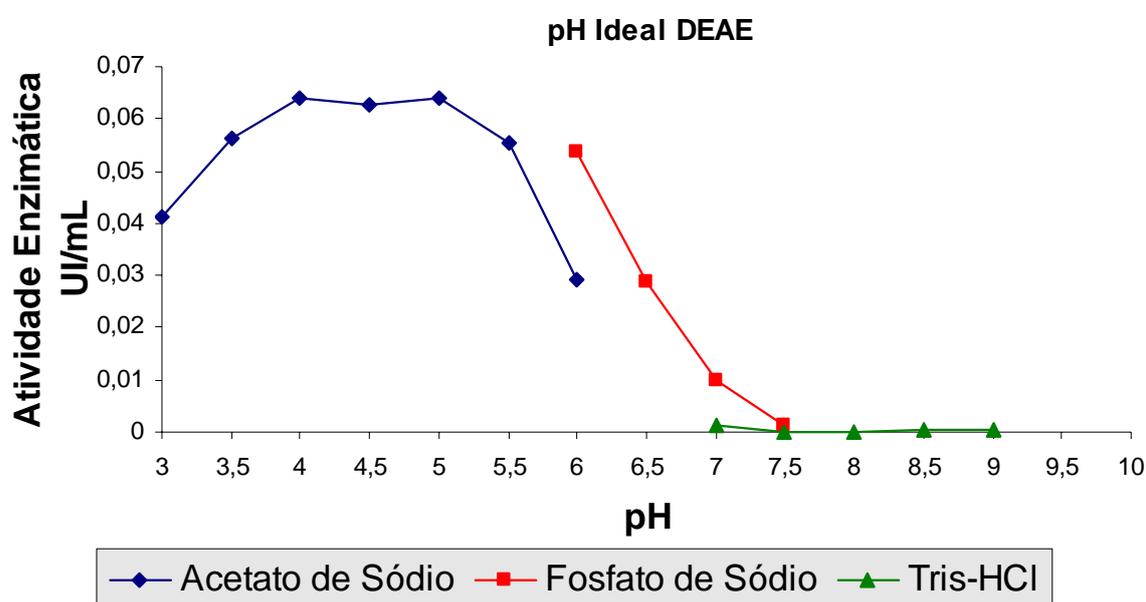


Figura 18: Efeito do pH na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose obtido de sementes de Guapuruvu germinadas por 48 horas.

4.10 – Determinação da Termoestabilidade

Para observar o efeito da temperatura na estabilidade da enzima, o extrato bruto contendo atividade enzimática foi pré-incubado a 40°C, 50°C e 60°C e 70°C e alíquotas foram retiradas em tempos determinados em consonância com o item 3.14 para análise de atividade enzimática de acordo com item 3.3. A atividade da amostra não incubada foi considerada como sendo 100%. Na temperatura de 40°C não houve redução significativa da atividade mesmo após 5760 minutos (96 horas), atingindo a meia vida somente após 10080 minutos (168 horas). A 50°C a atividade decresce vagarosamente enquanto a amostra pré-incubada a 60°C e 70°C a atividade apresenta um redução brusca até 50% e posterior redução gradativa da atividade. Após 9 horas a atividade da amostra incubada a 60 °C corresponde a 36% da atividade original. Figura 19.

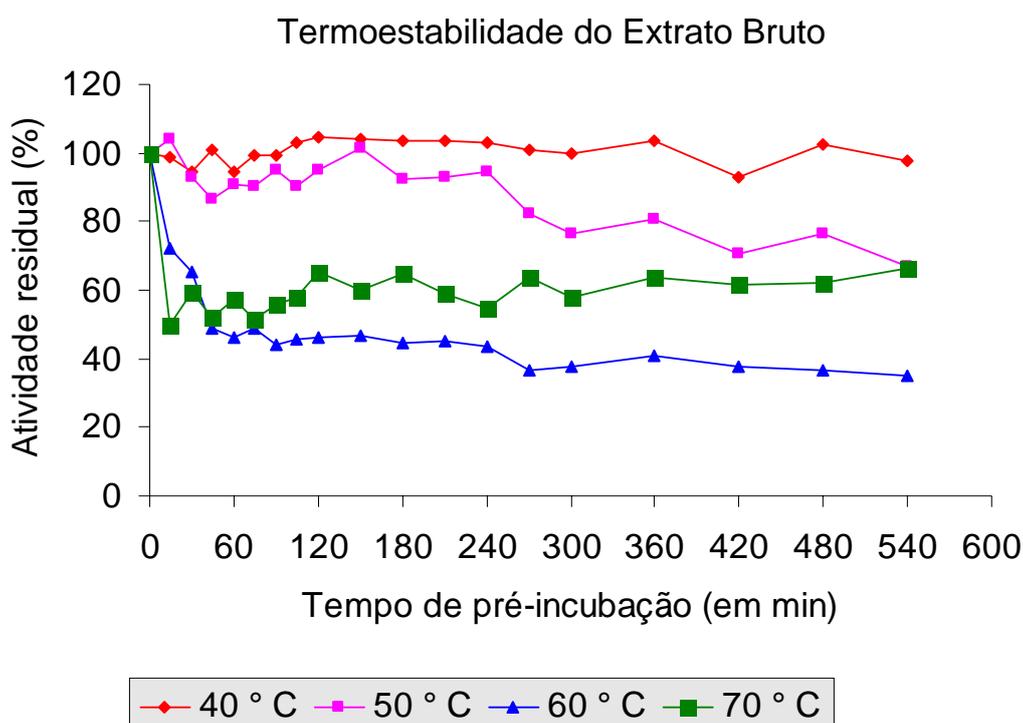


Figura 19: Efeito da temperatura na estabilidade da enzima alfa-galactosidase do extrato bruto de sementes de Guapuruvu germinadas por 48 horas.

Para observar o efeito da temperatura na estabilidade da enzima, o eluato da DEAE-Sepharose contendo atividade enzimática foi pré-incubado a 40°C, 50°C e 60°C e 70°C e alíquotas foram retiradas em tempos determinados em consonância com o item 3.14 para análise de atividade enzimática de acordo com item 3.3. A maior atividade foi encontrada na amostra pré-incubada a 40 °C que decaiu gradativamente, perdendo totalmente a atividade à 270 minutos. Quando pré-incubada a 50, 60 e 70°C a atividade decaiu rapidamente para 15% do valor inicial e diminuiu gradativamente de acordo com a figura 20.

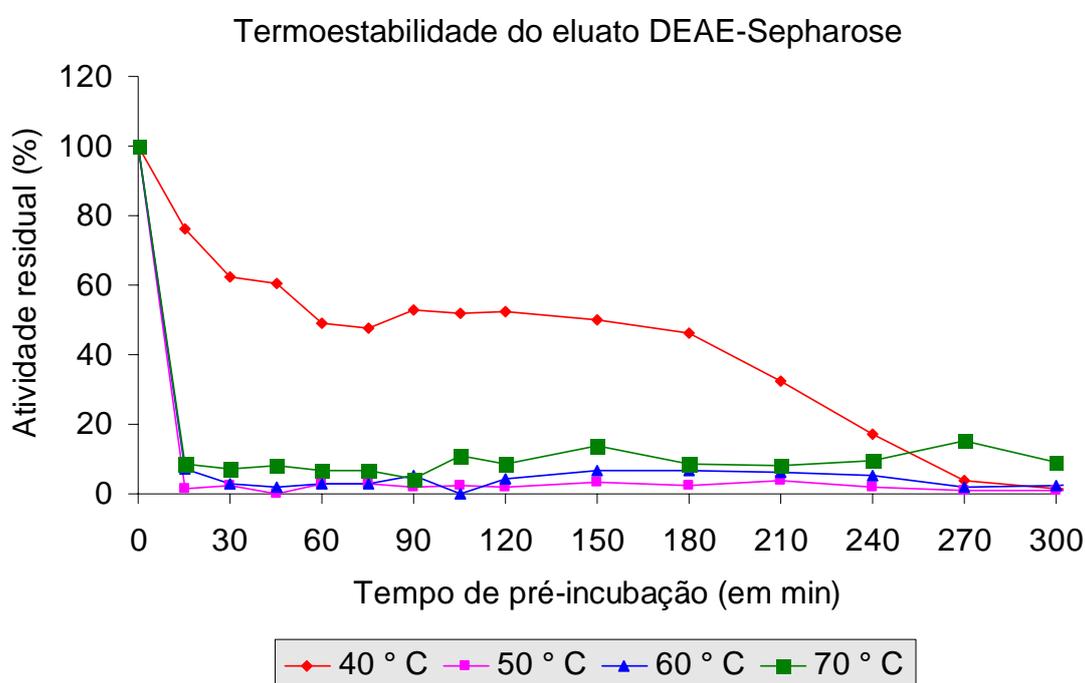


Figura 20: Efeito da temperatura na estabilidade da enzima alfa-galactosidase do eluato da DEAE=Sepharose de sementes germinadas por 48 horas.

4.11- Efeito de íons, açúcares e agentes redutores.

Tabela 3- O efeito de íons, açúcares e agentes redutores na atividade enzimática do eluato da DEAE-Sepharose

Reagentes	mM	Atividade Enzimática (mU/mL)	Atividade Relativa (%)
Controle	-	122,3	100
CuCl ₂	1	66	54
	10	44	36
HgCl ₂	1	25,1	21
	10	12,2	10
NaCl	1	112,5	92
	10	106,4	87
KCl	1	107,7	88
	10	107,5	88
MgSO ₄	1	125,9	103
	10	103	85
MgCl ₂	1	112,6	92
	10	102,8	84
SDS	1	25,8	21
	10	0	0
EDTA	1	108,9	89
	10	102,73	84
DTT	1	104,5	85
	10	103	84
AgNO ₃	1	0	0
	10	0	0
CaCl ₂	1	111	90
	10	93,1	76
AlCl ₃	1	69,7	57
	10	30,2	24
FeSO ₄	1	79,8	65
	10	6,1	5
CoCl ₂	1	109	90
	10	84,8	69
FeCl ₃	1	18,4	15
	10	24,2	19
MnCl ₂	1	95,4	78
	10	67,4	55
ZnSO ₄	1	74,5	61
	10	37,6	34
CuSO ₄	1	42	41
	10	0	0
D-Glicose	2	109,1	89
D-Galactose	2	91,9	75
Sacarose	2	104,9	85
Frutose	2	115	94

Os efetores que alteraram significativamente a atividade enzimática foram utilizados em novo ensaio para determinar o perfil de inibição de cada efetor da atividade de alfa-galactosidase. Uma vez que 10mM de FeSO_4 reduziu 95% da atividade enzimática, seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,5 a 4 mM. (figura 21)

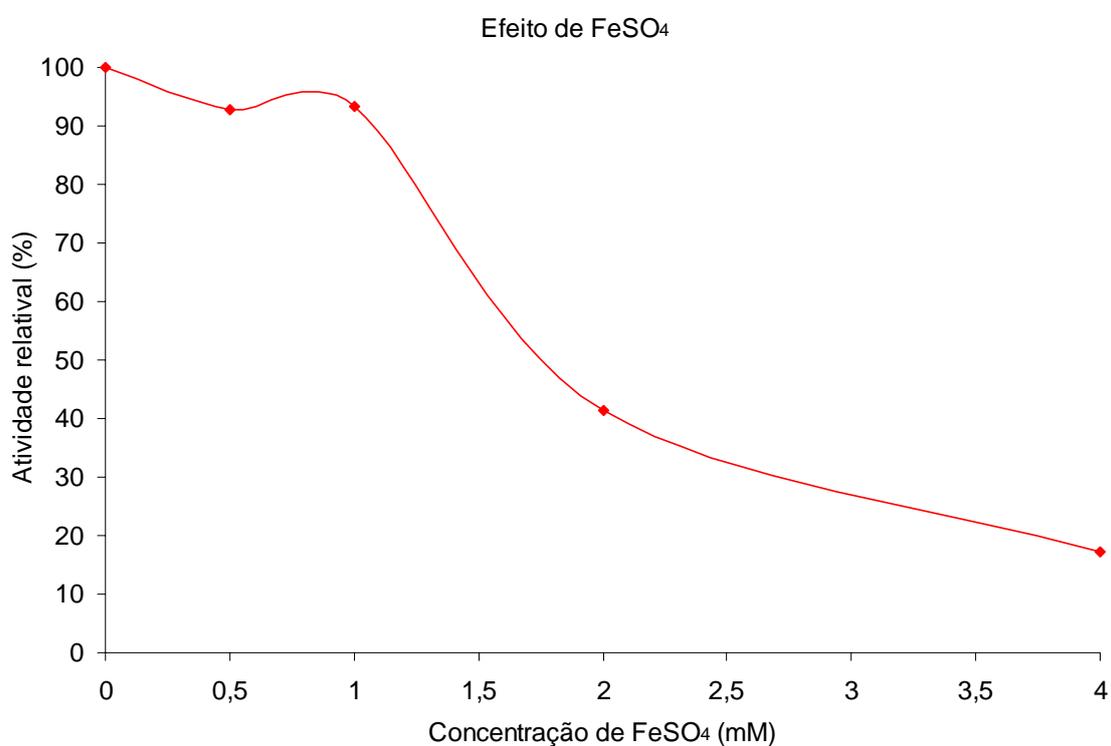


Figura 21: Efeito de FeSO_4 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

A concentração final de 10mM de FeCl_3 reduziu 81% da atividade enzimática, seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,5 a 20 mM. (figura 22)

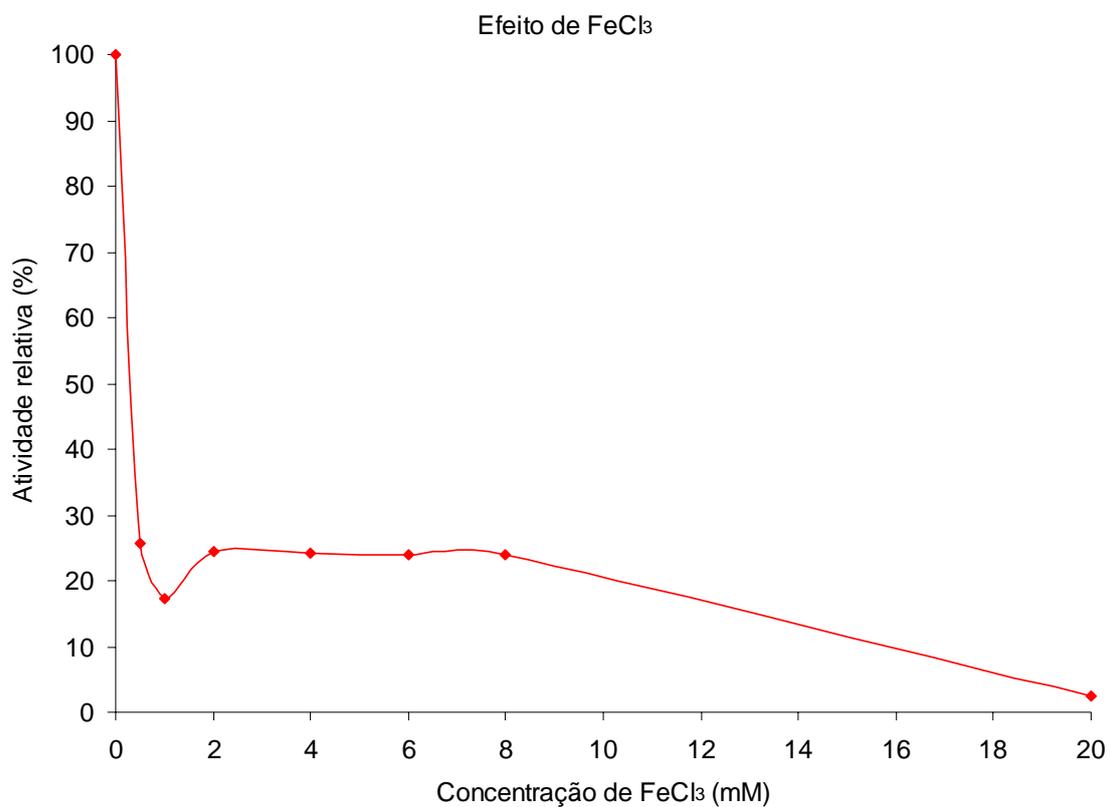


Figura 22: Efeito do FeCl_3 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

A concentração final de 10mM de ZnSO₄ reduziu 76% da atividade enzimática, seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,5 a 8 mM. (figura 23)

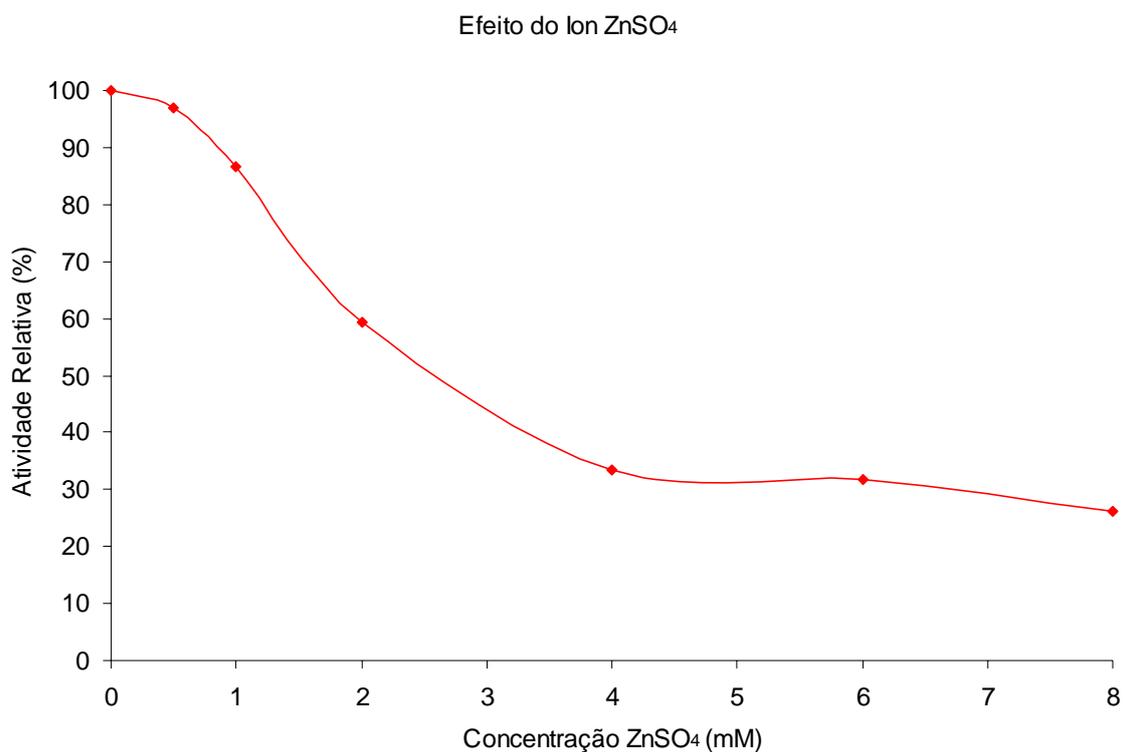


Figura 23: Efeito de ZnSO₄ na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

O efeito inibitório de íon bivalente Cu^{2+} na concentração final de 10mM eliminou totalmente a atividade enzimática, por isso seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,05 a 2 mM. (figura 24)

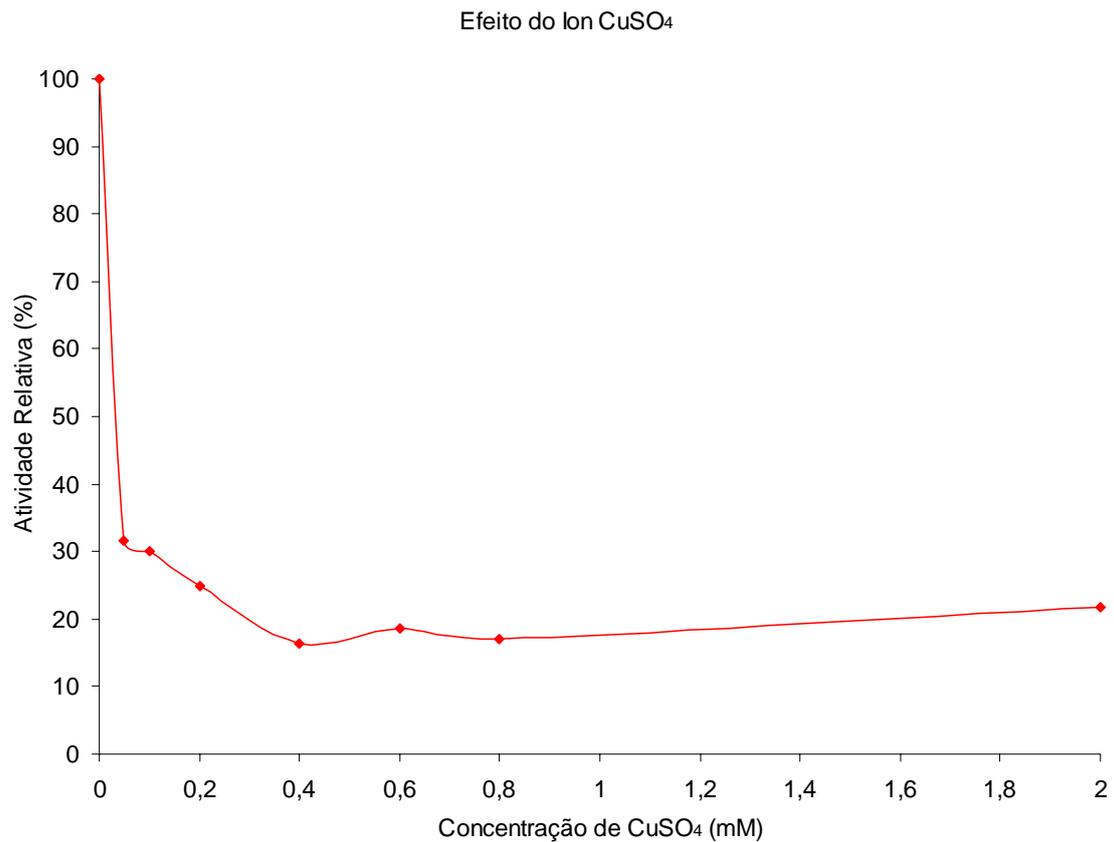


Figura 24: Efeito do CuSO_4 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Separose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

O efeito inibitório do CaCl_2 na concentração final de 10mM reduziu 24% da atividade enzimática, por isso seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,5 a 20 mM. (figura 25)

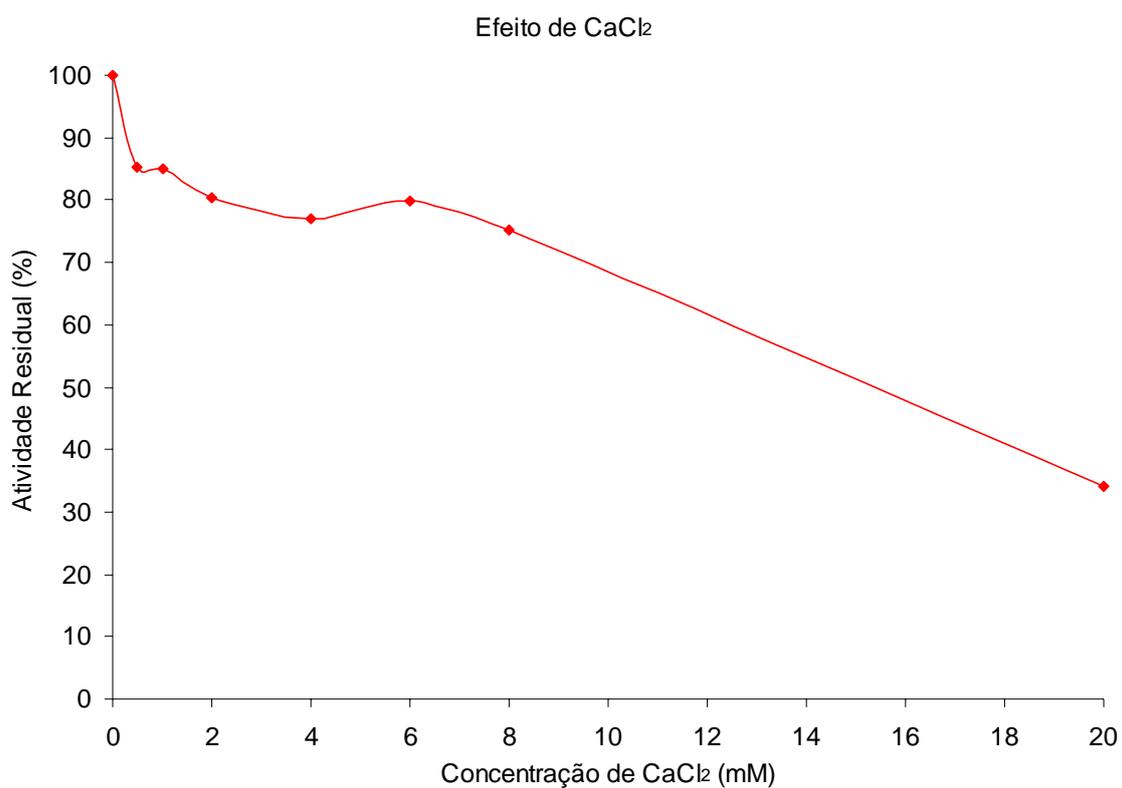


Figura 25: Efeito do CaCl_2 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

O efeito inibitório de agente redutor SDS (concentração final de 10mM) eliminou totalmente a atividade enzimática, por isso seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,05 a 2 mM. (figura 26)

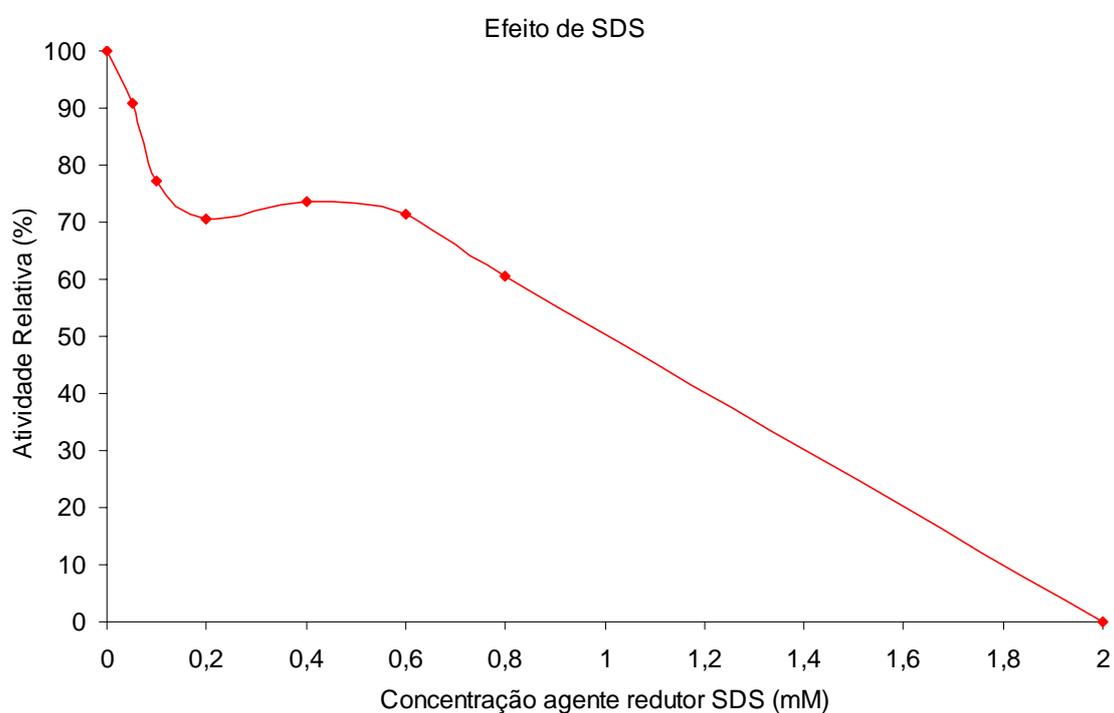


Figura 26: Efeito do agente redutor SDS na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

O efeito inibitório de MnCl_2 na concentração final de 10mM diminuiu 45% da atividade enzimática, por isso seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,5 a 20 mM. (figura 27)

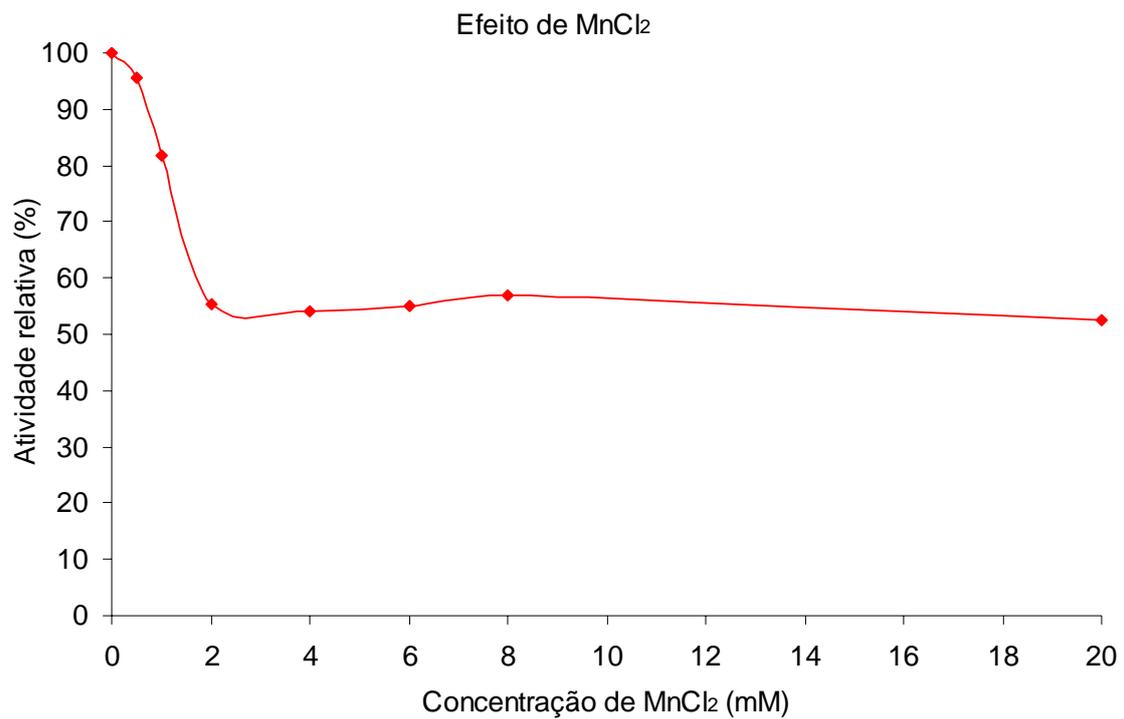


Figura 27: Efeito do MnCl_2 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

O efeito inibitório do AlCl_3 na concentração final de 10mM diminuiu 56% da atividade enzimática, por isso seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,5 a 20 mM. (figura 28).

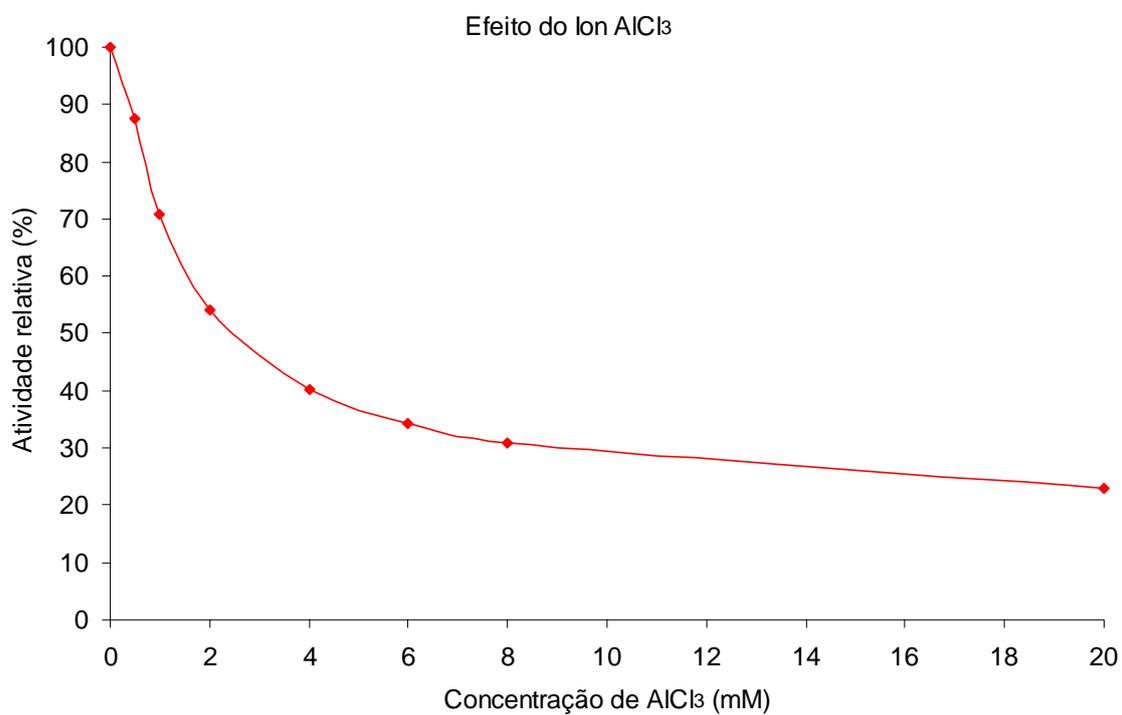


Figura 28: Efeito do AlCl_3 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

O efeito inibitório do HgCl_2 na concentração final de 10mM diminuiu 90% da atividade enzimática, por isso seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,05 a 2 mM. (figura 29)

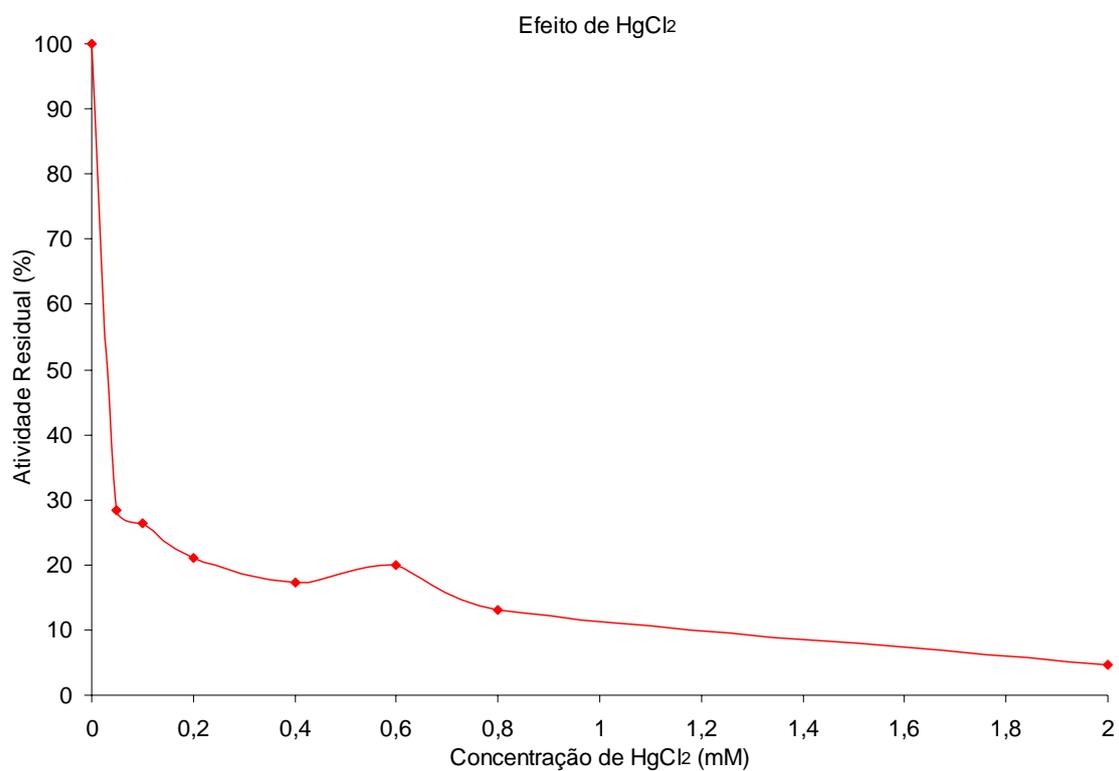


Figura 29: Efeito do HgCl_2 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

O efeito inibitório do CuCl_2 na concentração final de 10mM diminuiu 64% da atividade enzimática, entretanto seu perfil apresentou um inibição anômala. A reação foi conduzida com concentrações do íon de 0,05 a 2 mM. (figura 30)

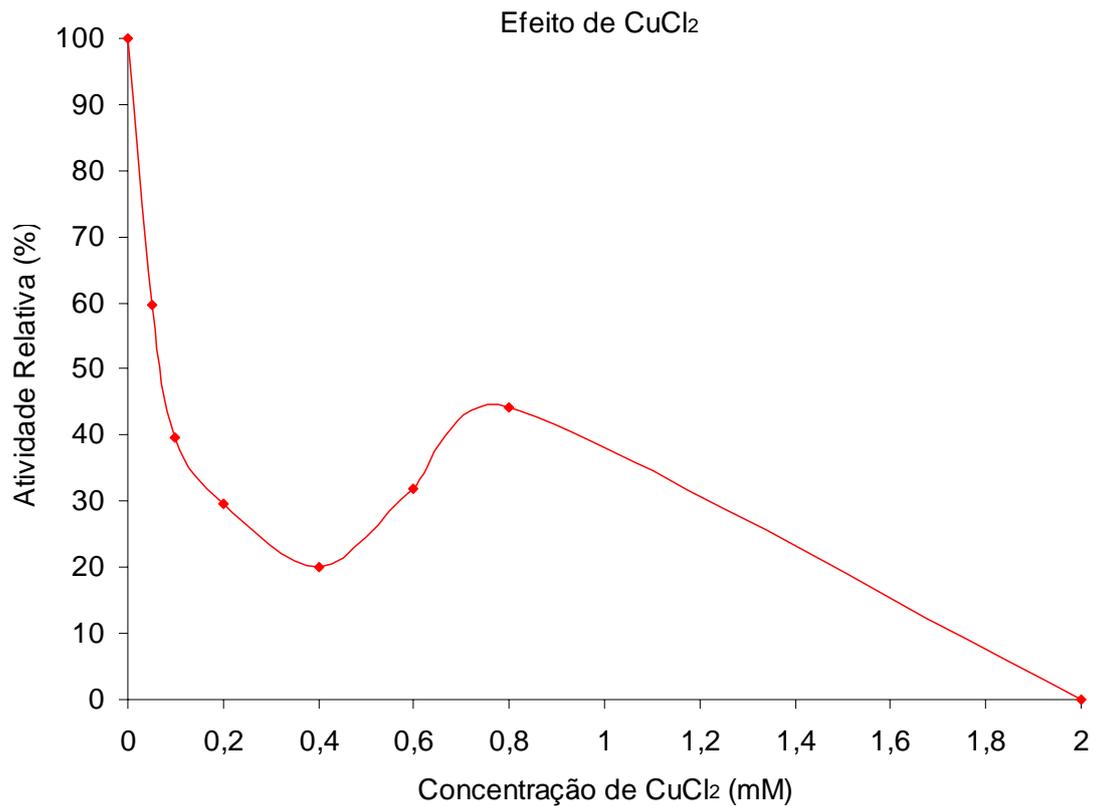


Figura 30: Efeito do CuCl_2 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

O efeito inibitório do CoCl_2 na concentração final de 10mM diminuiu 31% da atividade enzimática, por isso seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,05 a 2 mM. (figura 31)

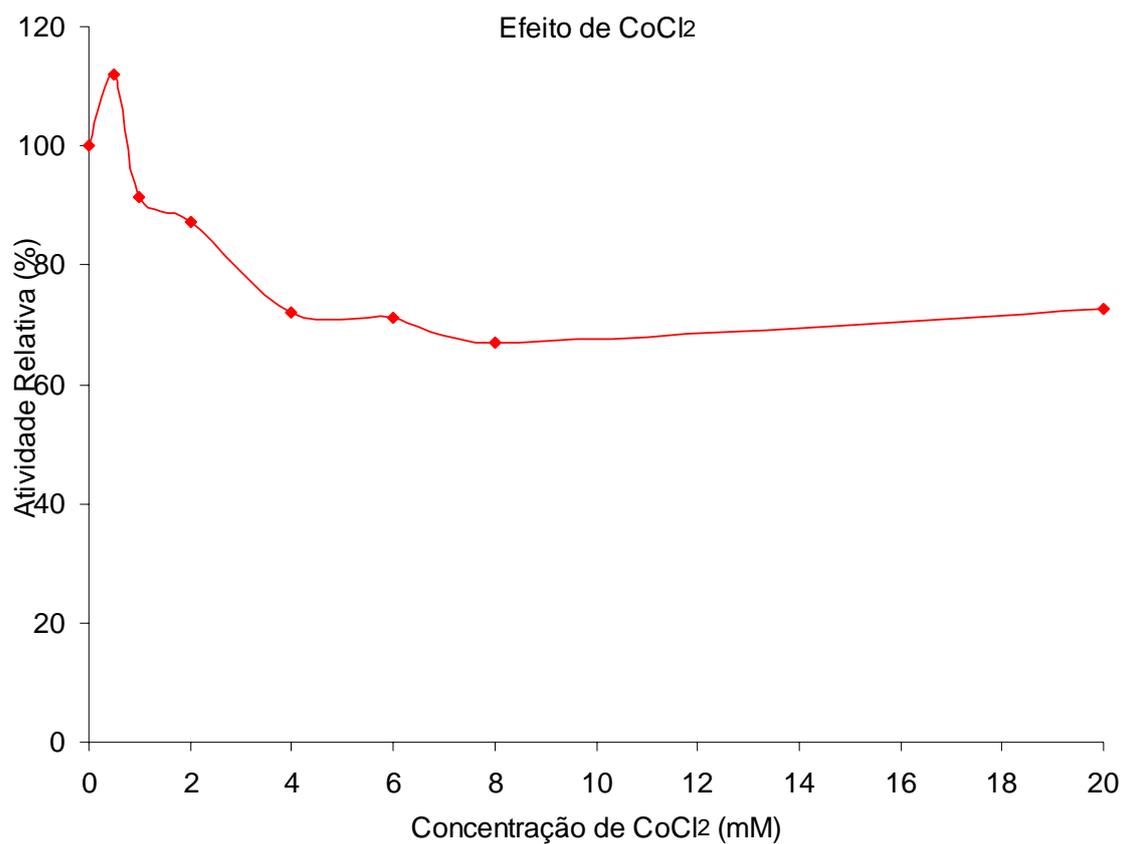


Figura 31: Efeito do CoCl_2 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

O efeito inibitório do AgNO_3 (concentração final de 1mM) eliminou totalmente a atividade enzimática, por isso seu perfil de inibição foi verificado em concentrações de 0,0025 a 1 mM. (figura 32).

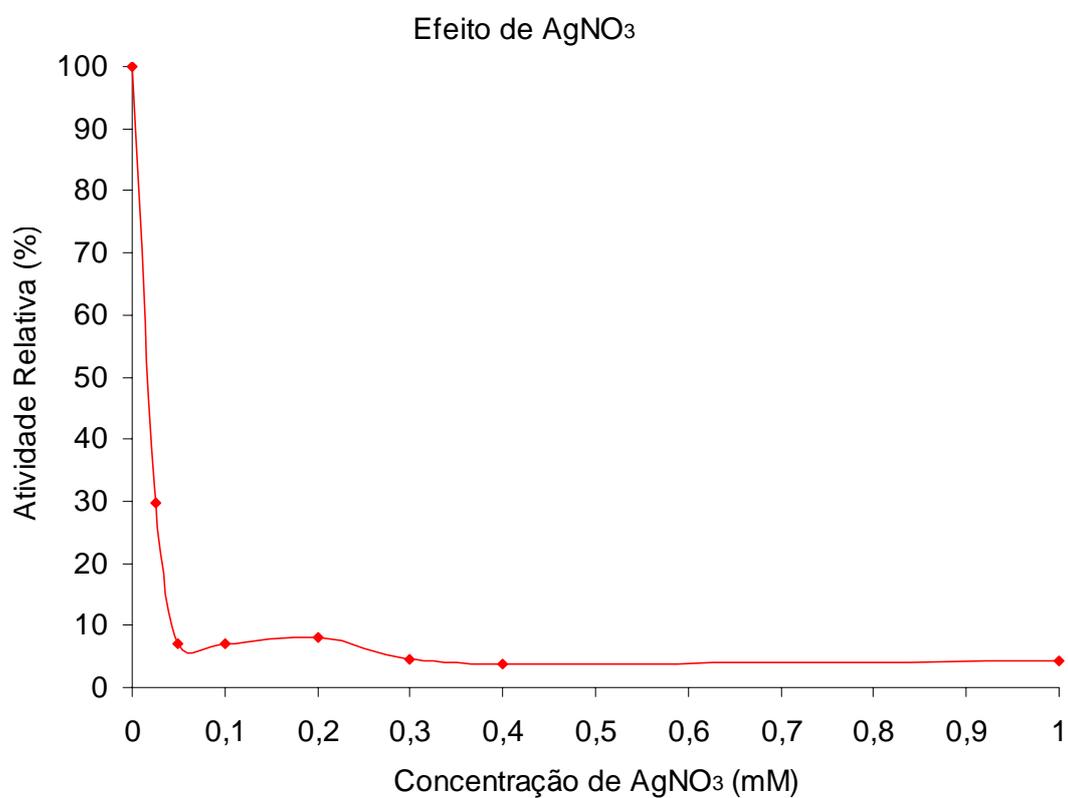


Figura 32: Efeito de AgNO_3 na atividade de alfa-galactosidase do eluato da DEAE-Sepharose com ensaios realizados de acordo com o protocolo 3.16.

4.12 - Determinação dos parâmetros cinéticos da alfa-galactosidase

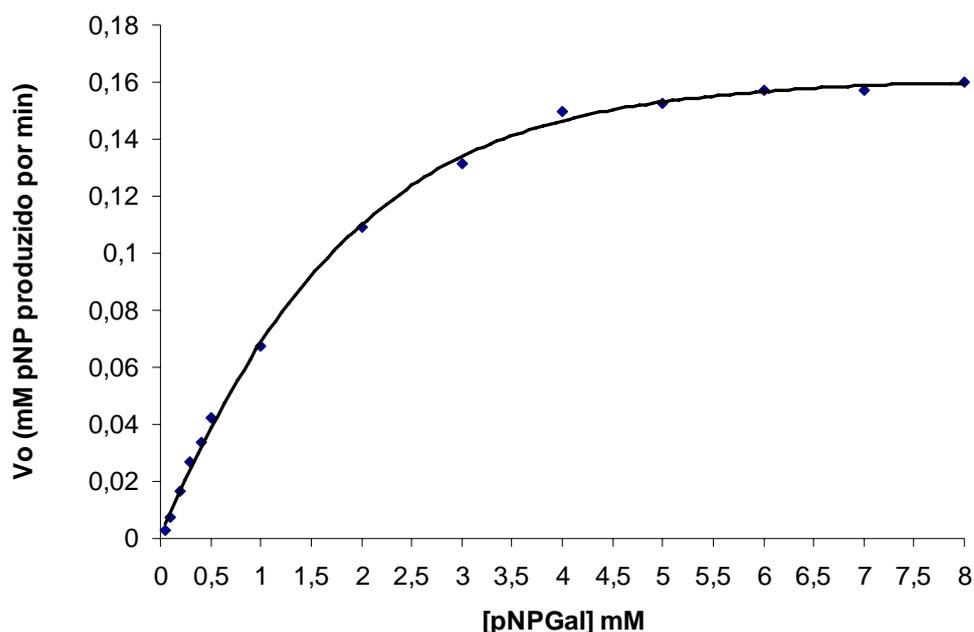


Figura 33 – Efeito da concentração do substrato na velocidade da hidrólise pNPGal, os valores de obtidos de K_M e V_{max} foram 1,68mM 0,182 micromol.min, respectivamente

Tabela 4 Tabela de rendimento das etapas de purificação parcial da alfa-galactosidase de *Schizolobium parahyba*.

Etapas	Proteína Total (g)	Atividade Total (U)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	372,2826	179,281	0,481572332	1	100
Sephadex G-75	2,37772	98,532	41,43969853	86,05083	54,95953
DEAE-Sepharose	0,035326	2,525335	71,48658975	148,4441	1,408591

1U = 1 μ mol de pNPGal hidrolisado por minuto

U.mg⁻¹ = μ moles de pNPGal hidrolisado, por minuto, por mg de proteína.

Os dados contidos na tabela 4, revelaram que a enzima alfa-galactosidase foi parcialmente purificada com um rendimento de 1,4% e com fator de purificação de 148,44 vezes. Durante o processo a atividade enzimática total da proteína sofreu uma redução durante as etapas cromatográficas, embora a atividade específica tenha aumentado, de modo geral, a redução na atividade resultou no valor baixo do rendimento.

5 - DISCUSSÃO

A germinação em diferentes tempos (Figura 3) resultou um perfil de atividade enzimática crescente nos embriões da leguminosa Guapuruvu, embora a atividade tenha sido máxima com 72 horas, o extrato bruto foi obtido a partir de enzimas germinadas por 48 horas, com esse procedimento evitou-se a redução da atividade da enzima que após 72 horas entra em declínio, provavelmente pela presença de proteases (Irving et al; 1997).

O material vegetal para extração de proteínas apresenta inconvenientes. Ele é rico em proteases, polissacarídeos, lipídios, fenóis, parede celular rígida o que ocasiona dificuldades em análise proteômica. A presença de metabólitos secundários como fenóis aliado ao baixo poder de extração do tampão utilizado dificultam o isolamento e purificação de proteína Zhao et al (2006).

O processo de produção da enzima alfa-galactosidase foi acompanhado por análise de amostras das sementes germinadas por da microscopia ótica (Figura 4, 5 e 6). A amostra foi preparada para resina “spurr”, por esta apresentar baixa viscosidade e a propriedade excepcional de embebição de tecidos, minerais e outras estruturas densas freqüentemente observadas em microscópio Vanetti (2005). As resinas epoxies comuns são muito viscosas e não penetram tão facilmente paredes celulares, membranas e tecidos duros, pedras e outros minerais. A resina “spurr” infiltra rapidamente todos eles e tem sido usada com sucesso em um grande número de espécimes incluindo endospermas com alto conteúdo de lipídio, tecidos com paredes duras e lignificadas, tecidos parenquimatosos altamente vacuolados de frutos maduros.

O azul de toluidina utilizado na coloração das sementes germinadas não é específico para carboidrato, a redução do material biológico intracelular observado nas lâminas corresponde a uma mobilização do material de reserva constituído de açúcares e outros componentes (Pietrobon, 2003) essenciais para suprir a demanda energética de Guapuruvu durante os estádios iniciais da germinação. A redução do conteúdo intracelular (figura 4, 5 e 6) mostra um aspecto qualitativo da redução e mobilização do material de reserva contido no cotilédone da semente de Guapuruvu, por diversas enzimas que foram produzidas durante a germinação, entre elas a alfa-galactosidase. A correlação da redução enzimática de oligossacarídeos só pode ser confirmada com análise mais específicas, como microscopia com coloração específica para carboidrato

ou análise do material e seus produtos de hidrólise contidos na semente por cromatografia líquida de alta performance (Guimarães et al 2001).

Para obtenção do extrato bruto todo o material vegetal contido no tegumento da planta foi macerado e utilizado para detecção. Uma vez que no presente trabalho a extração do material contido na semente para obtenção do extrato bruto foi realizado homogenizando-se os tecidos referente ao cotilédone e ao eixo embrionário, poder-se-ia esperar a presença de, no mínimo, 2 isoformas da proteína.

Lima et al (2004) e Oliveira (2002) demonstraram que algumas leguminosas possuem duas enzimas alfa-galactosidases, uma localizada no eixo embrionário e outra no cotilédone. Trabalhos recentes da literatura demonstram que estas enzimas apresentam massa molecular, K_M e V_{MAX} diferentes (Reis, 2003) e agem de modo complexo na mobilização dos resíduos de carboidratos presentes na semente, viabilizando o desenvolvimento do embrião. Esse fato poderia explicar a presença de 2 espécies protéicas no gel de eletroforese resultante da cromatografia em DEAE-Sephrose (Fig 11).

A caracterização cinética revela uma faixa de pH ótimo (Fig 17) e uma faixa de temperatura ótima ampla (Fig 18). Uma vez que a análise tenha sido realizada com a enzima parcialmente purificada, essa amplitude de estabilidade seria justificada pela presença de mais de uma proteína, que até o presente momento não revelou em nenhum perfil cromatográfico diferenças de migração ou adsorção nas resinas.

As amostras aplicadas nas 3 colunas de cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-50 (Fig. 7), Sephadex G-75 (Fig. 8) e Sephacryl S-100 (Fig. 9) foram eficientes na separação de proteínas do extrato bruto. Todavia a taxa de rendimento, avaliada pela atividade enzimática (UI) e percentual de proteína (determinada pelo método de Bradford, 1976) mostrou que a resina Sephadex-G75 (Figura. 8) apresentou melhor rendimento para purificação da enzima.

As amostras obtidas de cromatografias adicionais em Sephadex-G75 (Figura 8) foram concentradas por liofilização e depois submetidas ao teste de adsorção em resinas de troca iônica. Normalmente as alfa-galactosidases são purificadas em 5 ou 6 etapas (Porter, Ladisch; 1992) Entretanto para aplicação industrial, é fundamental o baixo custo durante a etapa de purificação, principalmente quando a amostra enzimática é aplicada pura para reagir com o substrato desejado ou adsorvida em sistemas de biorreatores. A pureza da proteína é fundamental para determinar a atividade da enzima

para substratos específicos. Portanto quanto menor a número de etapas para a purificação, menor o custo de obtenção da enzima purificada.

Para reduzir o número de etapas, é necessário otimizar o processo e purificação. Visando reduzir o número de processos cromatográficos, foi realizado um teste de adsorção de resinas de troca iônica utilizando 4 tipos de resinas sendo 2 catiônicas (CM-Sepharose e S-Sepharose) e 2 aniônicas (DEAE-Sepharose e CM-Sepharose) (Tabela 2)

Com a variação de pH e resinas ficou demonstrado que a resina DEAE-Sepharose apresentou uma razão alta entre o conteúdo protéico adsorvido e a atividade enzimática e a fração não adsorvida e protéica sem atividade enzimática conforme exposto na Tabela 2. A razão entre proteína adsorvida e não adsorvida na resina DEAE-Sepharose em pH 7,0 foi 12 vezes maior comparado a outras resinas testadas. Baseado nesse resultado, após, todo o eluato submetido às cromatografias adicionais na DEAE-Sepharose foi dialisado, para retirada do sal, e o perfil protéico contendo atividade foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 11) o que permitiu a visualização de 2 bandas protéicas, entretanto para determinar se as duas espécies protéicas são isoenzimas é necessário uma caracterização mais detalhada da amostra completa purificada, e análise adicionais dos parâmetros cinéticos das possíveis proteínas.

A análise do grau de pureza e das massas moleculares foi realizada de aplicando-se as amostras proveniente da cromatografia em DEAE-Sepharose em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e, também, submetendo a amostra à espectrometria de massa. O gel de poliacrilamida revelou a presença de uma proteína com espécie molecular aproximadamente de 20,0 kDa e uma proteína com mobilidade eletroforética aproximada de 11,0 kDa (Figura 11). Entretanto quando essa amostra foi submetida à espectrometria de massa, o espectro apresentou 5 picos de proteína com massas diferentes, entre elas dois picos com amostras correspondendo a 2 proteínas com suas respectivas duplas cargas e um perfil protéico com outra proteína de 6,7 kDa. A terceira espécie protéica visualizada na espectrometria de massa e não visualizada no gel de eletroforese em poliacrilamida poderia ser explicada pela extrema precisão da técnica de espectrometria de massa. A análise no espectômetro de massa revelou 5 espectros com massa de 5.774,953, 6.724,639, 10.086,722 11.543,192 e 20.179,022 Daltons. As massas de 5.774,953, e 10.086,722 correspondem a forma duplamente carregada das espécies protéicas com massa 11.543,192 e 20.179,022 Daltons,

respectivamente. O processo pós-traducional de glicosilação de proteínas, pode resultar em glicofomas correspondendo a isoformas com pequenas diferenças de massa molecular. de uma mesma proteína e por isso apresentar um perfil protéico com mais de uma massa. Picos de proteína com 10.086,722 Daltons foram observados (Fig. 13) próximos de um pico protéico com massa de 9.965,596 Daltons, foram também encontrados próximo ao espectro de 20.179,022 Daltons um pico protéico de 19.960,00 Daltons (Fig 14) possivelmente as massas de 9.965,596 e 19960,0 seriam glicofomas monocarregada e duplamente carregada da proteína com glicosilação diferencial. Os picos protéicos com diferentes massas monocarregadas podem ser também monômeros de uma proteína ou mais proteínas, a literatura evidencia a presença de alfa-galactosidases como polímeros sendo encontradas, na maioria das vezes como tetrâmeros (Soh et al, 2006; Keller e Pharr, 1996), porém nunca heterodímeros. Caracterização molecular de alfa-galactosidases purificadas até hoje, mostram diferentes massas para esta enzima, cujas massas moleculares são de 52 e 170kDa kDa (Soh et Al, 2006) 56 a 295 KDa (Sripuan, Aoki. 2003) 60 kDa (Viana, et al, 2006);

Dificuldades podem ser apontadas para cada um dos métodos usados na determinação da massa. Na abordagem eletroforética, as principais dificuldades se relacionaram ao ajuste à amostra de um protocolo de extração que fornecesse um perfil protéico o mais completo possível. As amostras resultante das etapas de purificação foram previamente dialisadas e aplicada em gel não desnaturante para contrastações. Comassie blue e nitrato de prata foram utilizados embora a visualização das bandas correspondentes às proteínas gel não tenha sido satisfatória.

A caracterização da enzima alfa-galactosidase proveniente do extrato bruto e do eluato da DEAE-Sepharose foi parcialmente caracterizada sob o ponto de vista bioquímico. O extrato bruto evidencia um perfil de atividade na temperatura (Figura 15) e pH (Figura 17) ideais mais alta que a enzima parcialmente purificada (Figura 16 e Figura 18). A termoestabilidade demonstrou que a atividade enzimática do extrato bruto permaneceu por mais de 5.000 minutos (Fig 19). Apresentando meia vida com 10.080 minutos (168 horas). Essa estabilidade térmica é perdida quando comparada a termoestabilidade de alfa-galactosidase proveniente de DEAE-Sepharose onde a meia vida é de apenas 150 minutos (Figura 20). A osmolaridade pode, também, influenciar na perda da estabilidade térmica da enzima, porque a purificação reduz a quantidade de elementos presentes no extrato bruto, expondo a enzima do eluato da DEAE-Sepharose

à ação da temperatura e pH, sem proteção de outros elementos presentes no extrato bruto.

A alfa-galactosidase estudada nesse trabalho apresenta pH ótimo na faixa de 5,5 (Figura 18). Porém, alfa-galactosidases de diferentes fontes têm sido caracterizadas como múltiplas formas e, sendo classificadas como alfa-galactosidases ácidas e alcalinas de acordo com o pH ótimo de degradação do substrato. Durante a germinação, existe uma predileção de enzimas alcalinas e ácidas em estágios específicos e substratos específicos (Gaudreault and Webb, 1982, 1983, 1986). A forma alcalina é a mais rara e apresenta alta afinidade para o substrato estaquiose e baixa afinidade para o substrato rafinose quando comparada à alfa-galactosidases ácidas. Para aplicações biotecnológicas da enzima, essa variação no pH ótimo é um fator diferencial: visando a otimização de processos biotecnológicos, as enzimas com variações na afinidade pelo substrato podem influenciar no custo do processo total, já que para adequar o pH do meio até o pH ideal da enzima, acarreta em custo adicional ao processo biotecnológico, inviabilizando o uso de uma enzima com características de pH ótimo dissonante do pH da etapa do processo industrial à qual será aplicada. Thanaunkul et al (1976) descreve que, como o pH do extrato hidrossolúvel de soja é de 6,2-6,4. O uso da alfa-galactosidase de *Mortariella vinaceae*, cujo pH ótimo é de 4,0-4,5, exige, para uma otimização do processo, um aumento da acidez do extrato hidrossolúvel de soja. Este aumento da acidez resulta na precipitação de proteínas, diminuindo propriedades organolépticas do leite de soja.

Neste trabalho, a alfa-galactosidase contida na amostra proveniente da DEAE-Sephrose (Tabela 3) foi pouco inibida por glicose e sacarose e frutose, Na^+ , K^+ , EDTA, DTT, Ca^{2+} , mas altamente inibida por Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , SDS, Hg^{2+} , tal resultado vai de acordo com os dados reportados na literatura para outras alfa-galactosidases (Ramalingam et al, 2007; Rezessy-Szabo, 2007; Mi, 2007;). Todavia, o íon Cu^{2+} proveniente do CuCl_2 apresentou uma influência anômala na atividade da alfa-galactosidase quando comparada com inibição do Cu^{2+} proveniente do CuSO_4 . A influência de íons na atividade enzimática é extremamente importante para sua aplicação biotecnológica. A presença de íons no meio de ação enzimática pode alterar significativamente a ação da enzima. No processo de redução enzimática do extrato hidrossolúvel de soja, os minerais encontrados no leite, especialmente o cálcio e o fósforo que são essenciais para a estrutura dos ossos e dentes de indivíduos de todas as

idades, sobretudo para lactantes e crianças. O Ferro, juntamente com o Cálcio e Fósforo encontrados nos extratos hidrossolúveis de soja podem influenciar na atividade enzimática de redução dos oligossacarídeos de rafinose nesse produto.

A enzima alfa-galactosidase também pode ser utilizada como tratamento para a doença de Fabry. Amostras comerciais sob o nome de Replagal comercializado pela Transkaryotic Therapies e Fabrazyme, comercializado pela Genzyme, são utilizados para redução dos sintomas da doença de Fabry (Pravata et al, 1991; Yang, 2007).

A conversão enzimática de eritrócitos do tipo B em eritrócitos do tipo O in vitro pode ser efetuada pela enzima alfa-galactosidase (Chen, Lin-Chu, 1991; Zhang *et al* 2007). Portanto a caracterização completa inclusive de aminoácidos envolvidos na atividade (Comfort et al, 2007) da enzima é necessária para atender perfeitamente possíveis demandas biotecnológicas dos diferentes usos desta enzima.

A atividade de transglicosilação da alfa-galactosidase (Dey, 1969, 1979; Koizumi et al, 1995) não foi detectada quando utilizada concentrações de 10 mM substrato glicose, sacarose e frutose, galactose. Tal afirmação precisa ser confirmada por meio da análise do ΔG de formação do produto, pois o ensaio para determinação da atividade de transglicosilação realizado constou de tubos contendo os carboidratos supracitado como substratos, e, a presença da atividade de transglicosilação foi indicada de acordo com protocolo 3.6. pela não redução do teor de poder redutor (Miller, 1959) no tubo de reação após ensaio

A caracterização das constantes cinéticas K_m e V_{max} foram determinadas para a amostra parcialmente purificada, o K_M aparente foi de 1.68 mM e V_{MAX} 0,18 mmol.min⁻¹.mL⁻¹.(Figura 33).

Não obstante diversas variações de procedimentos ou seqüências de procedimentos cromatográficos tenham sido realizadas com a amostra proveniente de Guapuruvu, nenhuma destas foi satisfatória para a obtenção da enzima purificada neste trabalho. A purificação parcial foi realizada com rendimento de 1,4% e fator de purificação de 148 vezes (Tabela 4). O fluxograma da Figura 34 resume os procedimentos utilizados neste trabalho.

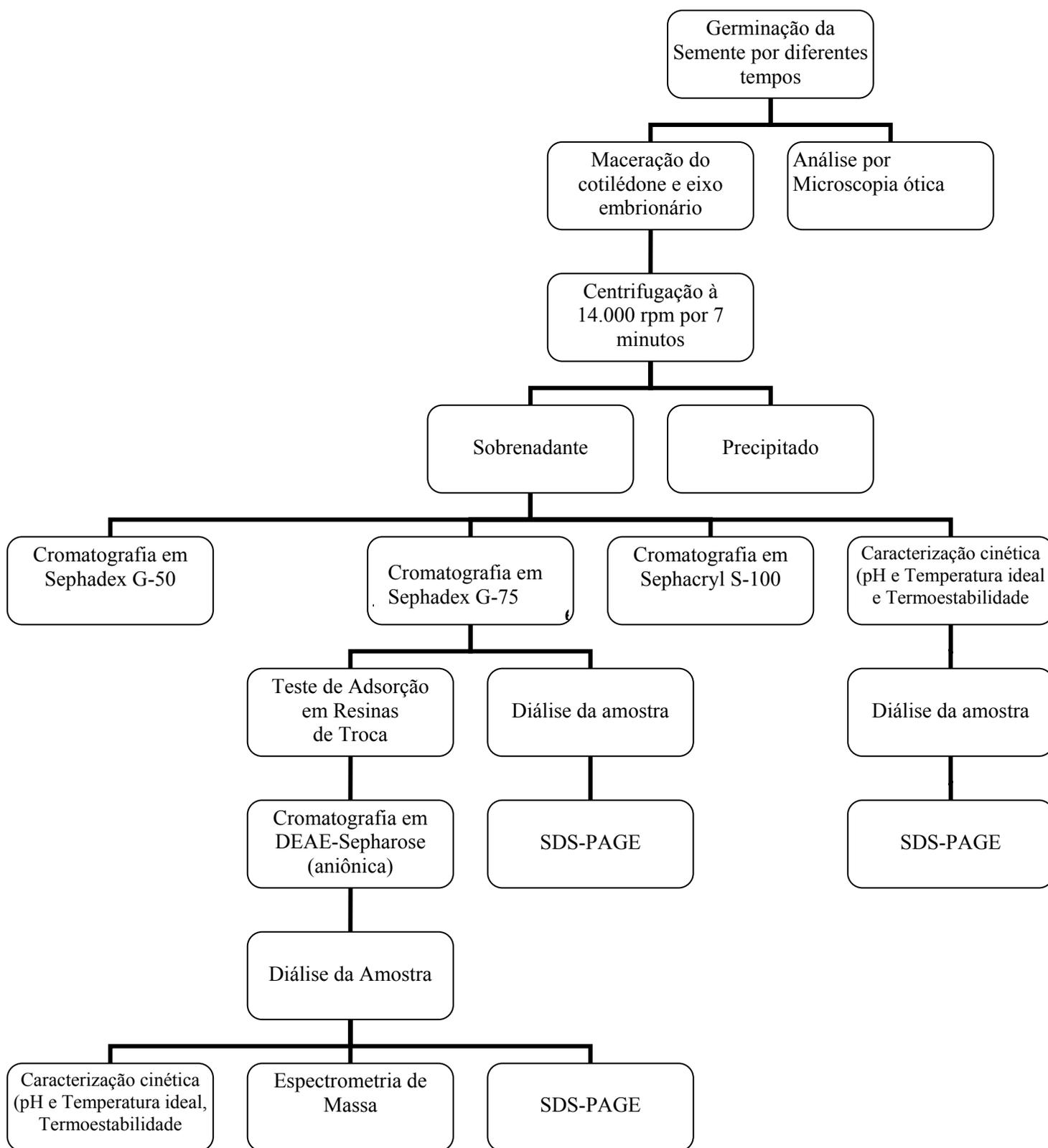


Figura 34 - Fluxograma de purificação parcial da alfa-galactosidase de sementes de Guapuruvu.

6. CONCLUSÕES

- Em face dos resultados apresentados nesse trabalho, pode-se concluir os seguintes pontos:
- A atividade máxima da alfa-galactosidase foi detectada em sementes de Guapuruvu germinadas por 72 horas.
- Concomitante com o aumento da atividade enzimática, ocorre uma redução do material de reserva contido no cotilédone.
- A temperatura ótima da atividade presente no extrato bruto foi obtida a 40°C
- A alfa-galactosidase presente no extrato bruto apresenta uma estabilidade térmica de mais de 5760 minutos (96 horas) quando pré-incubada a 40 °C
- A temperatura ótima da alfa-galactosidase parcialmente purificada foi obtida a 45°C.
- A alfa-galactosidase parcialmente purificada perdeu totalmente a atividade quando pré-incubada a 40°C por 270 minutos.
- A enzima alfa-galactosidase parcialmente purificada apresenta uma faixa de pH ótimo predominantemente ácida com atividade ótima no pH 5,5.
- A enzima proveniente do eluato da DEAE-Sepharose, apresentou atividade de alfa-galactosidase máxima a 45 °C.
- A alfa-galactosidase parcialmente purificada foi inibida por FeCl₃, ZnSO₄, CuSO₄, CaCl₂, SDS, MnCl₂, AlCl₃, HgCl₂, CuCl₂, CoCl₂, AgNO₃,
- A enzima não apresenta atividade de transglicosilação nas condições avaliadas

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem novas possibilidades de trabalhos adicionais nas seguintes linhas:

- Purificação total da alfa-galactosidase em questão;
- Desenvolver estudos bioquímicos e estruturais visando a elucidação dos mecanismos de produção diferencial de enzimas em cotilédone e eixo embrionário;
- Obter quantidade de proteína pura suficiente para experimentos de caracterização molecular estrutural desta alfa-galactosidase;
- Desenvolvimento de metodologias racionais visando estabelecer um processo biotecnológico de redução dos teores de oligossacarídeos em extrato hidrossolúvel de soja;

8. BIBLIOGRAFIA

ABRIZIS F. L. et al, (1995) A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose hydrolyzed milk by people with self-reported severe lactose intolerance. *Journal of Medicine*, Volume 333 JULY 6, Number 1.

AGROANALYSIS (2007). - A revista de agronegócios da FGV Fundação Getúlio Vargas - Volume 27, numero 06, junho. [www,agroanalysis.com.br](http://www.agroanalysis.com.br).

ALANI, S. R.; SMITH, D. M.; MARKAKIS, P (1989) α -galactosidases of *Vigna unguiculata*. *Phytochemistry*, New York, v.28, n.8, p.2047-2051.

ANNUNZIATO, M. E.; MAHONEY, R. R.; MUDGETT, R. E. (1986) Production of α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* grown in solid state culture. *Journal of Food Science*, Chicago, v.51, n.5, p.1370-1371.

AURICCHIO S, TRONCONE R, (2000) Genetically determined disaccharidase deficiencies. In: Walker WA, Durie P, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB, editors. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. Ontario: BC Decker Inc; p.677-700.

BACH-KNUDSEN, K & LI, (1991) Determination of oligosaccharides in protein-rich feed-stuffs by gas liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 689-694,

BACKES, P.; IRGANG, B. (2004) *Árvores do sul: guia de identificação & interesse ecológico*. Instituto Souza Cruz,. 326p.

BAU, H. M et al. (1996) Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components and nutritional value of seeds and biological characteristics in rats. In: *International Symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease*, 2th , Brussels.

BHASKAR, B.; RAMACHANDRA, G.; VIRUPAKSHA, T. K. (1990) Alpha-galactosidase of germinating seeds of *Cassia sericea*. Journal of Food Biochemistry, Westport, v.14, p.45-49.

BOLZON, A. (2005) Eldorado Insustentável: a soja e a conquista do oeste brasileiro. Dissertação de Mestrado do Centro de Desenvolvimento Sustentável. Universidade de Brasília.

BOM, I. *et al.* (1998) Hybrid affinity chromatography of alpha-galactosidase from *Verbascum thapsus* L. J Chromatogr A, v.808, n.1-2, May 29, p.133-9.

BORGES, E. E. L et al (2005). Caracterização de alfa-galactosidase e sua relação com a germinação das sementes de *caesalpinia peltophoroides* (*leguminosae caesalpinioideae*) *Revista Árvore*, julho-agosto, año/vol. 29, número 004 Sociedade de Investigações Florestais Vicosa, Brasil pp. 525-533

BRADFORD M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254

BUTOLO, J. E. (2002) Qualidade de ingredientes na alimentação animal. Campinas: [s.n.],. 430 p.

CAMILLERI M, et al (2002) Consensus report: clinical perspectives, mechanisms, diagnosis and management of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*;16:1407–30.

CARGILL, Fundação; 1996 Soja - uma caminhada sem fim. Como a soja conquistou o mundo. E o Brasil. São Paulo: CARGILL.

CARNEIRO M. A. C. 1996, *SCIENTIA FORESTALIS*, n. 50, p. 21-36, dez., 1996. Mycorrhizal fungi and superphosphate on growth of tropical woody species.

- CARVALHO, P.E.R. 2003. Espécies Arbóreas Brasileiras. Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas,. 1039p.
- CHEN, S.H.; LIN-CHU, M. (1991) The conversion of group B red blood cells into group B by an alpha-galactosidase from taro (*Colocasia esculenta*). Carbohydrate Research, Oxford, v.217, p.191-200.
- CHROST AND SCHMITZ , (1977). Changes in soluble sugar and activity of alpha-galactosidase and acid invertase during muskmelon (*Cucumis melo L.*) fruit development". J. of Plant Physiology, 151:41-50, 1977
- COMFORT, *et al.* (2007) Biochemical analysis of *Thermotoga maritima* GH36 alpha-galactosidase (TmGalA) confirms the mechanistic commonality of clan GH-D glycoside hydrolases. Biochemistry, v.46, n.11, Mar 20, p.3319-30.
- CONAB, 2007. Acompanhamento da safra brasileira : grãos : décimo levantamento, julho .Companhia Nacional de Abastecimento. 1. Safra. I. Companhia Nacional de Abastecimento.
- CORCHETE, M.P.; GUERRA, H (1987) α and β -galactosidase activities during germination of lentil seeds. Plant Physiology and Biochemistry, v. 25, p. 105-109,
- CORTARELLI, A.O. 2005, Trabalho apresentado na VI Semana de Iniciação Científica na FECILCAM – Faculdade Estadual de Ciências e Letras de Campo Mourão.
- CRUZ, R.; BATISTELA, J. C.; WOSIACKI, G. (1981). Microbial alfa-galactosidase for soymilk processing. Journal of Food Science, Chicago, v.46, p.1196-1200,.
- CRUZ, R.; PARK, Y. K. (1982) Production of fungal a-galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. Journal of Food Science, Chicago, v.43, p.1973-1975,

CUNHA, R. B. (2003) – Caracterização e sequenciamento de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa. Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília. Fevereiro,.

DEY, P. M. (1969) Inhibition, transgalactosylation and mechanism of action of sweet almond α -galactosidase. *Biochim Biophys Acta.*;191(3):644–652

DEY, P. M. (1979) Transgalactosylation activity of sweet almond α -galactosidase: Synthesis of saccharides. *Phytochemistry*, 18, 35–38

DHAR et al., (1994) Purification and characterization of *Phaseolus vulgaris* α -D-galactosidase isozymes. *Biochemistry and Molecular Biology Intl*, 34:1055-1062.

DIOGO, M. R. (2000). Estabelecimento de um método colorimétrico para determinação da atividade de galactinol sintase de sementes de soja e purificação e caracterização da enzima. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

DUBOIS, M. et al. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Analytical Chemistry*, Washington, n.9, p.77-103,.

EMBRAPA, (2006) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Londrina: Embrapa,

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

FERREIRA, A. G; BORGHETTI, F. (2004). Germinação, do básico ao aplicado. Porto alegre: Editora Artmed, Capítulo 10. pág 163.

FIALHO, L.S.; et al. (2002). Prospecção e estudo de α -galactosidase em sementes de leguminosas. In: Simpósio de Iniciação Científica, 11., Viçosa. Anais.. Viçosa: UFV, p.250.

FOUCAULT M.,. (2006) Watzlawick H, R. Mattes, R. Haser and P. Gouet. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of two thermostable [alpha]-galactosidases from glycoside hydrolase family 36, Acta Crystallographica Section F.

FREIRE, J, M.(2005) Variabilidade genética, morfométrica e germinativa em populações de Guapuruvu (*Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake). Dissertação Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Florestas. Bibliografia: f. 92-109.

FUJIMOTO, Z. et al. (2003). Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. The Journal of Biological Chemistry, v. 278, p. 20313-20318,.

GAO Z ; SCHAFFER, A .A A (1999). Novel Alkaline α -Galactosidase from Melon Fruit with a Substrate Preference for Raffinose¹, Plant Physiology, March 1999, Vol. 119, pp. 979–987,

GÓES, S. P; RIBEIRO, M. L. Luiz. (2002), α -galactosidase: aspectos gerais e sua aplicação em produtos à base de soja. 1 Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 23, n. 1, p. 111-119, jan./jun.

GUIMARÃES, V. M.; et al, (2001). Characterization of alpha-galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligossacharides. Phytochemistry, Oxford, v.58, p.67-73,.

GUNN, 2003. Management of irritable bowel syndrome Postgrad. Med. J. ;79;154-158

HAIBACH et al., (1991) "Purification and characterization of a *Coffea canephora* α -D-galactosidase isozyme" Biochem. Biophys. Res. Comm. 191:1564-1571

HENRISSAT, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, Biochem. J. 280, 309-316

HENRISSAT, B. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293, 781-788

HITZ, W. D. et al (2002) Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds *Plant Physiol*, February, Vol. 128, pp. 650-660

HYAMS, D. (1997) Curve expert 1.3: a comprehensive curve fitting system for Windows. Copyright^(C).

IRVING et al, (1997). Changes in carbohydrates and carbohydrate metabolizing enzymes during the development, maturation and ripening of buttercup squash, *Cucurbita maxima* D. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122: 310-314.

ISHII, et al, (2007), Mutant α -galactosidase enzymes identified in fabry patients with residual enzyme activity: Biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J*, Jun 8

JOHNSON, J.D.; KRETCHMER, N. SIMOONS, F.G. (1974). Lactose malabsorption: its biology and history. *Adv.Pediatr.*, 21: 197-237,

KACPRZAK, S. Reviakine, R. Kaupp, M. (2007). Understanding the EPR Parameters of Glycine-Derived Radicals: The Case of N-Acetylglycyl in the N-Acetylglycine Single-Crystal Environment. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys*. Vol. 111, Issue. 4. Feb. 811-9

KELLER, F. e PHARR, D.M. (1996) Metabolism of carbohydrates in sinks and sources. Galactosyl-Sucrose. Pp.157-184. In: Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships. New York, Marcel Dekker, Inc.

KIM, W. D. et al. (2002) Alpha-Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. *Nipponbare*) cells. *Phytochemistry*, v.61, n.6, Nov, p.621-30.

KIM, W D. et al (2003) "Purification and characterization of α -galactosidase from sunflower seeds." Vol. 25; number 4, pages 353-358 Biotechnology Letters.

KOIZUMI, et al (1995) Isolation and characterization of novel heterogeneous branched cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins) produced by transgalactosylation with α -galactosidase from coffee bean. Carbohydr. Res., 278, 129–142.

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

KRUSE et al. (1988) The human lactase-phlorizin hydrolase gene is located on chromosome 2. FEBS Lett;240:123-6.

LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-693

LAHUTA L.B, et al (2000a). Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus L.*) seeds. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Agronomy, 3(1).

LEBLANC JG, (2004) Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce alpha-galactosidase. Genet Mol Res. Sep 30;3(3):432-40.

LEIS R, et al (1997) Prevalence of lactose malabsorption in Galicia. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1997;25:296-300.

LI, S. et al. (2007) Expression of rice (*Oryza sativa L. var. Nipponbare*) alpha-galactosidase genes in *Escherichia coli* and characterization. Biosci Biotechnol Biochem, v.71, n.2, Feb, p.520-6.

LIMA, E. E. et al. (2004). Characterization of alfa-galactosidase in embryonic axis and cotyledons of *Platymiscium pubescens* seeds. Rev. bras. sementes vol.26 no.2 Pelotas Dec.

MAITY, T. K. ; PAUL, S. C. (1991) Low-oligosaccharide soy milk: application of alpha-galactosidase for hydrolyzing soy-oligosaccharide. Indian Dairyman, New Delhi, v. 43, n.10, p.443-448.

MANZANARES, P.; GRAAFF, L.H.; VISSER, J. (1998) Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel a-galactosidase activity. Enzyme and Microbial Technology, New York, v.22, p.383-390,.

MEIER, H., REID J. S. G. (1982). Reserve polysaccharides other than starch in higher plants, p. 418-471. In F. A. Loewus and W. Tanner (ed.), Encyclopedia of plant physiology, New Series 13 A. Springer-Verlag, New York.

MEIS, S. ;FEHR, W. ;SCHNEBLY, S.R. (2003). Seed source effect on field emergence of soybean lines with reduced phytate and raffinose saccharides. Crop Science. v.43(4):1336-1339.

MILLER, G.L. (1959).Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem., 31, 426.

MULIMANI, V. H. e RAMALINGAN N. (1995). Enzymatic hydrolysis of raffinose and stachyose in soymilk by alpha-galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. Biochemistry and Molecular Biology International, Marrickville, v.36, n. 4, p.897-905,

MULIMANI, V. H.; THIPPESWAMY, S.; RAMALINGAM., N. (1997) Enzymatic degradation of oligosaccharides in soybean flours. Food Chemistry, Oxford, v.59, n.2, p.279-282,.

MULYOWIDARSO, R. K.; FLEET, G. H. ; BUCKLE, K. A. (1991) Changes in the concentration of carbohydrates during the soaking of soybeans for tempe production. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v.26, p.595-606,.

NEUS, J.D. ,FEHR, W.R. ,SCHNEBLY, S.R. (2005) Agronomic and seed characteristics of soybean with reduced raffinose and stachyose. *Crop Science*. v.45(2):589-592

NOGUEIRA, J. M. 2002 Soja no Brasil: uma breve e intensa história, p.6. [S N]

OLIVEIRA, M. G. A, *et al* (2002) Prospecção e estudo de alfa-galactosidase em sementes de leguminosas. In: XI Simpósio de Iniciação Científica - A Ciência: um projeto para o Brasil, Viçosa - MG. v. 1. p. 250-250.

OLIVEIRA, G et al. (2005) Purification and characterization of a-galactosidases from *Platymiscium pubescens Micheli* seeds. *Rev. Árvore* vol.29 no.4 Viçosa July/Aug. 2005.

OPALINSKI M. (2006) Utilização de enzima e soja integral em rações para frangos formuladas com ingredientes alternativos com base em aminoácidos digestíveis e totais Curitiba - Dissertação de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

PHARR M, e HUBBARD N.L. (1994) Melons: biochemical and physiological control of sugar accumulation. In *Encyclopedia of Agricultural Science*, Vol 3. Academic Press, New York, pp 25–37.

PIETROBOM, R. C, V, (2003) - Morfoanatomia e ontogênese do pericarpo de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (*Fabaceae*, *Caesalpinioideae*).

PLANT GENETICS RESEARCH UNIT - Research Project n°: 3622-21000-029-01: Lowering Raffinose Family Oligosaccharides in Soybeans, Location: Plant Genetics, Project Type: Reimbursable, USDA, Agricultural Research Service.

PORTER, J. E. et al. (1992) Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean α -galactosidase. *Enzyme Microbial Technology*, New York, v.14, p.609-613,

PORTER, J.E.; HERRMANN, K.M.; LADISH, M.R. (1990) Integral Kinetics of α -galactosidase purified from *Glycine max* for simultaneous hydrolysis of stachyose and raffinose. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 15-22,.

PORTER, J. E.; LADISCH, M. R (1992) Ion-exchange and affinity chromatography costs in α -galactosidase purification. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v.39, p.717-724,

PRAVATA, G., G. N, *et al* (1991). Fabry disease. Classic hemizygote and residual alpha-galactosidase A activity. *Int J Dermatol*, v.30, n.5, May, p.367-9.

PRETTO, F M. et al (2002) Lactose malabsorption in children and adolescents: diagnosis through breath hydrogen test using cow milk. *J. Pediatr (Rio J)* v.78 n.3 Porto Alegre.

PRICE, K.R. et al (1998); Flatulence – causes, relation to diet and remedies. *Nahrung*. 32:609-626,

RAMALINGAM, N. et al. (2007) Purification and properties of alpha-galactosidase from white-rot fungus *Pleurotus florida*. *Indian J Biochem Biophys*, v.44, n.2, Apr, p.76-81.

REHMS, H.; BARZ, W. (1995). Degradation of stachyose, raffinose, melibiose and sucrose by different tempeproducing *Rhizopus fungi*. *Applied Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v. 44, p.47-52,.

REIS, M.R. (2003) Produção de α -galactosidasas para uso na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em produtos de soja. Viçosa: PIBIC/FAPEMIG, UFV,. 29p. (Relatório de Pesquisa).

REZENDE, S. T. (1998) Teores de Oligossacarídeos de Rafinose em Soja, Purificação e Caracterização de Invertases e Alfa-Galactosidases de Microrganismos, Universidade de Brasília, - UnB – Tese de Doutorado.

REZESSY-SZABÓ J M. et al. (2007) A novel thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: Purification and characterization Biochimica et Biophysica Acta 1770-55–62.

ROSENSWEIG, N.S. (1979) On lactose-hydrolyzed milk (editorial). Am.J.Clin.Nutr., 32: 1979, 1979.

RUIZ, A.; ACOSTA, M.; CISNEROS, F. (1995) Utilizacion de enzimas en los procesos de obtencion de leche y derivados de la soya. Alimentaria, Madrid, v.33, p.127-132,.

RUTLEDGE, C. E, O'Neil, R. J. (2006). Soybean plant stage and population growth of soybean aphid. J Econ Entomol. Vol 99, Issue 1, February 60-66

SAID, S. PIETRO, R. C. L. R. (2004) - Enzimas como Agentes Biotecnológicos . Editora Legis Summa. Capítulo 15, página 271.

SANNI, A . I.; ONILUDE, A. A.; OGUNDOYE, O . R. (1997) Effect of bacterial galactosidase treatment on the nutritional status of soybean seeds and its milk derivative. Nahrung: Chemie, Biochemie, Mikrobiologie, Technologie, Ernaehrung, Berlim, v.41, p.18-21.

SHIVANNA, B. D.; RAMAKRISHNA, M.; RAMADOSS, C. S. (1989) Enzymic hydrolysis of raffinose and stachyose in soybean milk by alpha-galactosidase from germinating guar (*Cyamopsis tetragonolobus*). Process Biochemistry, London, v.24, p.197-201,.

SILVA, H. C.; BRAGA, G. L. (1982) Effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). Journal of Food Science, Chicago, v.47, p.924-925,

SIMOONS, F.J. (1973b) New light on ethnic differences in adult lactose intolerance. *Am.J.Dig.Dis.*, 18: 595-611.

SOBRINHO, J A. (1996) Guapuruvu (*Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake: uma espécie de rápido crescimento. *Revista Floresta e Ambiente*, n. 3, p. 184-185.

SOH et al. (2006) Characterisation of an alpha-galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. *Phytochemistry*, v.67, n.3, Feb, p.242-54. 2006.

SOUZA, W. (1998). *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica.

SOMIARI, R. I. ; BALOGH, E. (1992) Hydrolysis of raffinose and stachyose in cowpea (*Vigna unguiculata*) flour, using a-galactosidase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v.8, p.564-566.

SRIPUAN, T., K. AOKI, et al. (2003) Purification and characterization of thermostable alpha-galactosidase from *Ganoderma lucidum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, v.67, n.7, Jul, p.1485-91.

SUAREZ, F. L, et al (1999) Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 69, No. 1, 135-139, January

SUPARMO, (1987) Tempeh prepared from germinated soybeans. *Journal of Food Science*, Chicago, v.52, n.6, p.1736-1737,

UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). (2006) "Production, Supply and Distribution." Available at: <http://www.fas.usda.gov/psd/Psdselection.asp>.

TELES, R. C., A. et al. (2005). "pH dependence thermal stability of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds." *Biophys J* 88(5): 3509-17.

THOMPSON. (2003) “Soybean Port Expands.” Corn and Soybean Digest, April, pp. 24-25.

TUULA H. V. et al (2000) Lactose Intolerance Journal of the American College of Nutrition, Vol. 19, No. 2, 165S–175S

VANETTI, C. A. (2005) Protocolos e comentários sobre resinas usadas em embocamento de espécimes para observação em microscopia eletrônica de transmissão - resinas para inclusão de material para uso em microscopia eletrônica de transmissão. Campus da Universidade Federal de Viçosa 36571-000 - Viçosa/MG – Brasil.

VIANA, P. A. et al. (2006). Extracellular alpha-galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. J Agric Food Chem, v.54, n.6, Mar 22, p.2385-91.

YAKLICH. R. W. (1985) Effect of aging on soluble oligosaccharide content in soybean seeds. Crop Science, Madison, v.25, p.701-704.

YANG, J. Y (2007) Diagnosis and treatment of Fabry disease. Zhonghua Er Ke Za Zhi, v.45, n.2, Feb, p.149-52.

WILLIAMS, J, Villarroya, H, Petek F. (1997) Purification and properties of an alpha-D-galactoside galactohydrolase from the seeds of *Trifolium repens* (white clover). Biochem J. March 1; 161(3): 509–515.

ZEILINGER, S. et al. (1993) Conditions of formation, purification, and characterization of an alpha-galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. Appl Environ Microbiol, v.59, n.5, May, p.1347-53

ZHAO, Y., X. et al. (2006) Extraction and salting-out purification of alpha-galactosidase and beta-glucosidase from fresh roots of *Rehmannia glutinosa*. Zhong Yao Cai, v.29, n.2, Feb, p.137-9

ZHANG, Y. P., F. (2007) B to O erythrocyte conversion by the recombinant alpha-galactosidase. *Chin Med J (Engl)*, v.120, n.13, Jul 5, p.1145-50.

ZIEGLER, R. J. *et al.* (2007) Correction of the Biochemical and Functional Deficits in Fabry Mice Following AAV8-mediated Hepatic Expression of alpha-galactosidase A. *Mol Ther*, v.15, n.3, Mar, p.492-500.