

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA α -GALACTO
SIDASE DE SOJA (*Glycine max*, L.) E DE FEI
JÃO (*Phaseolus vulgaris*, L.)

20/85

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Parcer

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Vera Lúcia Signoreli
Baldini e aprovada pela Comissão Jul-
gadora em 29.10.85.

Campinas, 29 de outubro de 1985

J. C. O.
Presidente da Banca

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA α -GALACTOSIDASE DE SOJA
(GLYCINE MAX, L.) E DE FEIJÃO (PHASEOLUS VULGARIS, L.).

VERA LÚCIA SIGNORELI BALDINI
FARMACÊUTICA-BIOQUÍMICA

ORIENTADOR:
PROF. DR. YONG KUN PARK

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALI-
MENTOS E AGRÍCOLA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS,
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE "MESTRE" EM CIÊNCIAS DE ALI-
MENTOS.

- 1985 -

UNIAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



Aos meus pais,
pelo apoio, incentivo pelo saber
e compreensão constantes.

Aos meus irmãos e sobrinhos,
pela união, amizade e pela cons-
tante participação.

E, àqueles que com seu estímulo e de-
dicação tornaram realidade este
trabalho.

A G R A D E C I M E N T O S

A somat6ria de esfor7os para a concretiza76o de um trabalho transcendem no tempo, acumulando-se dia ap6s dia. Assim, na impossibilidade de agradecer a todos que de alguma forma auxiliaram nesta pesquisa, deseja-se expressar gratid6o em especial a:

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, pela orienta76o segura e dedicada, e confian7a na realiza76o deste trabalho.

6 Dra Iacy dos Santos Draetta, por sua contribui76o no aperfei7oamento de um esp6rito cr6tico e, tamb6m, pelo interesse, paci6ncia, amizade, entusiasmo e incentivo em todas as horas.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, na pessoa de seu Diretor Geral Dr Rodrigo Ot6vio Teixeira Neto, pela oportunidade e facilidades concedidas.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agr6cola.

Ao Dr. Arlindo Moreira Sales, chefe da Se76o de Bioqu6mica do ITAL, pela afei76o, apoio e pelas condi76es oferecidas para a realiza76o deste trabalho.

Ao Instituto Agron6mico de Campinas, pela cess6o das amostras.

6 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecu6ria (EMBRAPA), pelo aux6lio financeiro na fase inicial do curso de p6s-gradua76o.

À Merenice Roberto Sobrinho, técnica do laboratório da Seção de Bioquímica do ITAL, pela amizade, grande cooperação e auxílio técnico.

À Alzira Carvalho Martins e Maria Lúcia Ferreira da Silva, pelo dedicado trabalho de datilografia.

À Dora Regina Duarte Chiaramonte pelo trabalho de desenho dos originais.

Aos amigos e colegas da Seção de Bioquímica do ITAL e do laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEAA-UNICAMP, que, de alguma forma, contribuíram para a realização do presente trabalho.

A todos aqueles que, com seu apoio e compreensão, tornaram possível a consecução desta pesquisa.

Í N D I C E

RESUMO	1
SUMMARY	2
1- INTRODUÇÃO	3
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3- MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1- Matéria-prima	25
3.2- Reagentes	25
3.3- Equipamentos	26
3.4- Preparação dos extratos de soja e feijão	27
3.5- Determinação da atividade de α -galactosidase	27
3.6- Purificação da α -galactosidase	28
3.6.1- Fracionamento com sulfato de amônio	28
3.6.2- Cromatografia em coluna de Sephadex G-25	29
3.6.3- Cromatografia em DEAE-celulose	29
3.6.4- Cromatografia em coluna de Sephadex G-100	30
3.6.5- Electroforese em gel de poliacrilamida	30
3.7- Caracterização da α -galactosidase purificada	31
3.7.1- Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima	31
3.7.2- Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da enzima	31
3.7.3- Determinação da energia de ativação	32

3.7.4-	Efeito da concentração de substrato	32
3.7.5-	Ação de inibidores	33
3.7.6-	Determinação do peso molecular	33
4-	RESULTADOS	34
4.1-	Níveis de atividade de α -galactosidase em diferentes cultivares de soja e feijão	34
4.2-	Purificação da α -galactosidase	35
4.2.1-	Fracionamento com sulfato de amônio	35
4.2.2-	Cromatografia em Sephadex G-25	35
4.2.3-	Cromatografia em DEAE-celulose	38
4.2.4-	Filtração em Sephadex G-100	38
4.2.5-	Electroforese em gel de poliacrilamida	38
4.3-	Caracterização da enzima	44
4.3.1-	Influência do pH	44
4.3.2-	Comportamento em função da temperatura	44
4.3.3-	Energia da ativação	50
4.3.4-	Efeito da concentração de substrato	50
4.3.5-	Ação de inibidores	58
4.3.6-	Peso molecular	62
5-	DISCUSSÃO	67
6-	CONCLUSÕES	75
7-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

RESUMO

As propriedades das α -galactosidases da soja e do feijão, purificadas por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em DEAE-celulose e filtração molecular em Sephadex G-100 foram examinadas.

A filtração em Sephadex G-100 produziu duas frações, designadas I e II, com diferentes pesos moleculares. As formas I e II de cada amostra mostraram diferenças em seus valores de pH e temperatura ótima, energia de ativação, Km e Vmax com PNPG, melibiose ou rafinose como substratos. Não se observaram diferenças em suas estabilidades ao calor e à variação de pH.

As enzimas apresentaram atividade máxima entre pH 5,0 e 6,0 e foram estáveis na faixa ao redor do pH ótimo; os valores de temperatura ótima ficaram entre 45 e 55°C e as atividades enzimáticas permaneceram estáveis até 50°C e todas elas mostraram maior especificidade para o PNPG.

Íons metálicos como Ag^+ e Hg^{+2} causaram completa perda de atividade; entretanto, as enzimas não foram sensíveis aos reagentes sulfidrílicos, sugerindo não haver necessidade de grupos-SH para a atividade catalítica. As enzimas foram inibidas competitivamente por glicose, mais intensamente por galactose e não competitivamente por frutose. As duas formas enzimáticas do feijão foram inibidas por altas concentrações de PNPG.

SUMMARY

α -Galactosidases from soybean (*Glycine max*) and feijão (*Phaseolus vulgaris*) seeds were purified by ammonium sulfate fractionation, chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration on Sephadex G-100, and studied their characteristics. It was found that α -galactosidase was multiple forms which consisted of two fractions (fraction I and II).

Fractions I and II of each sample exhibited differences in their optimal pH and temperature, activation energy, K_m and V_{max} values with PNPG, melibiose or raffinose as substrates. The properties of the enzymes from these seeds resembled each other with respect to their pH and thermal stabilities. The enzymes showed maximum activity between pH 5.0 and 6.0 and were stable in and around this range. The optimal temperature values were observed between 45 and 55°C and the enzymes were stable up to 50°C. All forms were more specific for PNPG.

Metal ions such as Ag^+ and Hg^{+2} caused complete loss of activity and sulfhydryl reagents had no effect on the enzyme activities, indicating that the -SH group is not involved in the catalytic site. Glucose and galactose inhibited the enzymic activities competitively, whereas fructose had a non-competitive effect. Two forms of *Phaseolus vulgaris* α -galactosidase were inhibited by PNPG at high concentrations.

1- INTRODUÇÃO

As sementes de leguminosas, em suas diferentes variedades, são conhecidas como o alimento básico em muitos países. O feijão (*Phaseolus vulgaris*, L) é um dos principais itens da alimentação brasileira. A soja (*Glycine max*, L) é, atualmente, um dos produtos agrícolas mais abundantes no Brasil e representa uma das matérias-primas de mais baixo custo e de alto valor nutricional, além de conferir propriedades funcionais adequadas a produtos como análogos de carne, alimentos infantis e pães, entre outros. Entretanto, o consumo de soja e seus produtos é limitado pela presença de fatores anti-nutricionais e de substâncias causadoras de sabores e odores indesejáveis, que devem ser reduzidos ou eliminados para melhorar suas qualidades nutricionais e aceitação organoléptica. Fatores como inibidores de enzimas e a atividade de lipoxigenase podem ser removidos por tratamento térmico, ao passo que este mesmo tratamento não é eficaz contra outros fatores indesejáveis, como o ácido fítico e os oligossacárides (56).

Os oligossacárides da família da rafinose, encontrados em sementes de leguminosas, se apresentam em quantidades variadas, conforme o estágio de maturação da planta e segundo a variedade consi-

derada. Os principais oligossacárides são rafinose, estaquiase e verbascose, que contêm ligações α -galactosídicas e são não redutores (69) (Figura 1).

Existem evidências de que estes oligossacárides sejam os fatores responsáveis pela flatulência e por problemas gastrointestinais frequentemente associados ao consumo de sementes de leguminosas (62, 63, 75). Quando estes açúcares são ingeridos, são necessárias duas enzimas, invertase (E.C. 3.2.1.26) e α -galactosidase (E.C. 3.2.1.22) para sua completa hidrólise (47, 64). A ausência de α -galactosidase no trato digestivo no homem e em outros mamíferos previne a metabolização destes oligossacárides e, conseqüentemente, passam para o intestino grosso, onde são fermentados anaerobicamente por ação da microflora intestinal, com produção de gás (17, 40, 62, 66).

Embora a incidência de flatulência não possa ser prevista, porque ela também depende do estado físico e fisiológico de cada indivíduo e do tipo de dieta, os oligossacárides geralmente são considerados indesejáveis e inúmeras tentativas para a sua eliminação têm sido realizadas.

Alguns pesquisadores têm investigado a remoção de oligossacárides por diferentes processos de extração aquosa ou alcoólica, germinação, ajuste do pH, temperatura e teor de umidade (10, 26, 38, 58, 62, 71, 72).

PAZUR *et alii* (59), em 1962, observaram que as concentrações de rafinose e de estaquiase diminuïram rapidamente durante a germinação. EAST *et alii* (26), em 1972, e HSU *et alii* (33), em 1973 relataram que rafinose e estaquiase desapareciam em decorrência da germinação da soja. Este decrêscimo pode ocorrer em diferentes proporções, devido a diferenças na origem e nas cultivares, bem como nas diferenças dos níveis de α -galactosidase endôgena em diferentes sementes (68).

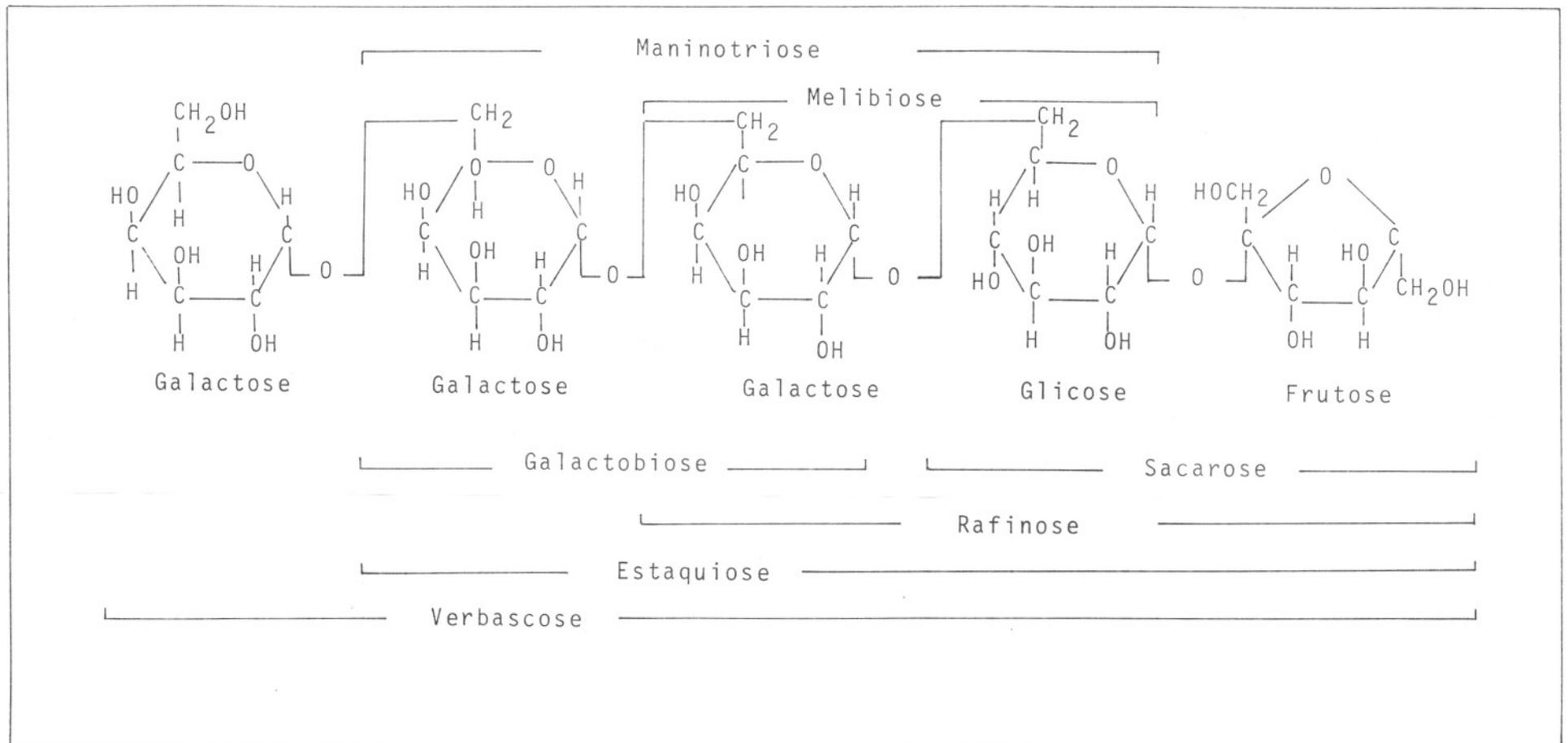


FIGURA 1- Relações estruturais dos oligossacãrides da família da rafinose.

KIM *et alii* (38), em 1973, observaram que 2/3 de rafinose e estaquiase poderiam ser removidos pela combinação de maceração e germinação. Num estudo semelhante, KU *et alii* (40), em 1976, obtiveram a remoção de cerca de 59% destes açúcares em grãos integrais de soja, mediante extrações aquosas em condições variáveis de tempo, temperatura e proporção soja: água. OMOSAIYE *et alii* (56), em 1978, usando ultrafiltração, obtiveram um concentrado protéico de soja com 60% de proteínas e somente 0,6% de oligossacárides, com propriedades adequadas para a formulação de alimentos infantis.

Processos fermentativos, utilizados principalmente nos países orientais, na produção de *miso*, *shoyu*, *ontjon*, resultam em produtos isentos ou com quantidades reduzidas de rafinose, estaquiase e outros oligossacárides, porém, com teores consideráveis de galactose, glicose e frutose (17, 76), monossacárides que entram na constituição daqueles açúcares. Isto sugere a presença das enzimas invertase e α -galactosidase, necessárias à degradação dos oligossacárides, durante a elaboração destes produtos.

MITAL *et alii* (50, 51), em 1973 e 1975, mediante fermentação com bactérias lácticas (*Lactobacillus fermenti*, *L. cellobiosis* e *L. plantarum*), conseguiram reduzir sensivelmente o teor de galactoligossacárides em extratos de soja.

A aplicação de α -galactosidase produzida por microrganismos vem sendo utilizada, tentativamente, na remoção de oligossacárides em bebidas de soja e também na indústria açucareira de beterraba, para a eliminação de rafinose, que impede a completa cristalização da sacarose. SUZUKI *et alii* (79), em 1969, relataram que a rafinose presente no melão de beterraba poderia ser decomposta continuamente pela α -galactosidase produzida por *Mortierella vinacea* em cultura submersa. SUGIMOTO & VAN BUREN (77), em 1970, usaram preparações comerciais de *Aspergillus saitoi*, possuindo atividade de α -galactosidase

e invertase, para a degradação de oligossacáridos até seus monossacáridos. Estes autores observaram que, na faixa de pH em que o extrato de soja é normalmente obtido, a adição de pequenas quantidades da preparação enzimica resultou na completa hidrólise dos galactoligossacáridos e o produto final foi organolepticamente aceitável devido à ausência de proteases no extrato enzimico. THANANUNKUL *et alii* (80) e SMILEY *et alii* (73), trabalhando respectivamente com α -galactosidase de *Mortierella vinacea* e de *Aspergillus awamori* em um processo contínuo, obtiveram graus de sucesso variados para a hidrólise dos oligossacáridos.

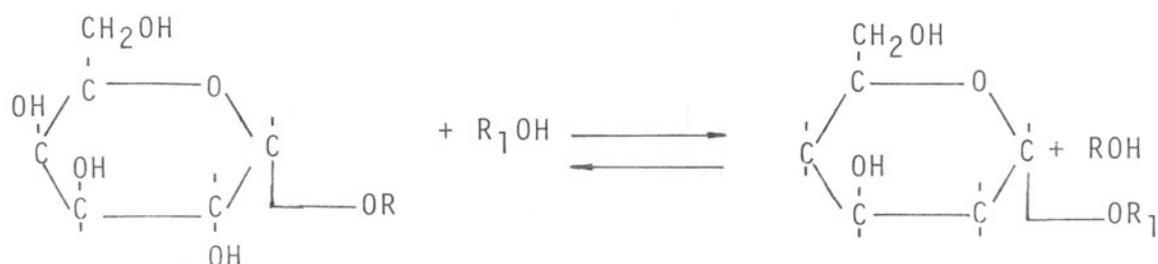
Com base na literatura consultada e considerando a parcela de importância que as sementes de leguminosas desempenham na alimentação, o presente trabalho se propõe a estudar, comparativamente, as condições de extração, purificação e caracterização de alguns parâmetros bioquímicos da α -galactosidase em variedades de soja (*Glycine max*, L) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, L).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para a hidrólise de ligações glicosídicas há necessidade de enzimas específicas, as glicosidases. As enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações galactosídicas são denominadas galactosidases, existentes sob duas formas α e β -galactosidases, dependendo da configuração do átomo de carbono anomérico da molécula de substrato.

Os primeiros experimentos envolvendo a atividade de α -galactosidase ou α -D-galactosídeo - galactohidrolase (EC. 3.2.1.22) (13) remontam do século passado, tendo sido obtida a partir de extratos de leveduras selvagens (25). Devido à capacidade de hidrólise sobre a melibiose foi, inicialmente, chamada melibiase; posteriormente passou a ser denominada α -galactosidase devido à grande afinidade por compostos contendo resíduos de α -D-galactose.

A α -galactosidase catalisa reações, de acordo com o seguinte modelo, onde normalmente a molécula receptora de hidroxila é a água, embora R e R₁ possam ser radicais aromáticos ou alifáticos (25).



Em outras palavras, isso significa que a enzima pode hidrolisar vários α -D-galactosídeos simples, como também moléculas mais complexas como oligo-e polissacárides.

Entretanto, dois fatores determinam a ação hidrolítica da α -galactosidase sobre o substrato. Primeiro, a estrutura do anel deve ser piranoidal e, segundo, as configurações dos hidrogênios (-H) e das hidroxilas (-OH) dos átomos de carbono 1, 2, 3 e 4 devem ser semelhantes às da galactose. A mudança na configuração de grupos -H ou -OH em qualquer átomo de carbono de um substrato glicosídico poderá reduzir ou inibir completamente a ação hidrolítica da enzima. Assim sendo, a atuação da enzima pode se dar, além da galactose, sobre compostos que possuam outros glicosídeos, desde que preencham as propriedades que determinam a ação hidrolítica da enzima. Este fato foi demonstrado por DEY & PRIDHAM (24), ao estudarem a hidrólise de galactosídeos e outros glicosídeos, entre eles o p-nitrofenil - α -D-fucosídeo e p-nitrofenil - β -L-arabinosídeo, pela ação de α -galactosidase de *Vicia faba*. MALHOTRA & DEY (46) também comprovaram este efeito em relação à hidrólise do p-nitrofenil - β -L-arabinosídeo pela α -galactosidase de amêndoas doces.

No estudo da atividade de α -galactosidase, vários α -galactosídeos vêm sendo utilizados como substratos sintéticos, como o metil, etil, n-propil e fenil - α -D-galactopiranosídeos (24, 46, 61, 78), o-, m- e p-cresil, p-aminofenil, m-clorofenil, o-nitrofenil, m-nitrofenil, p-nitrofenil - α -D-galactopiranosídeos (3, 24, 28, 36, 46, 48, 49, 61, 78) entre outros, especialmente os portadores de grupo p-nitrofenil e p-nitrofenil, por serem compostos cromogênicos. Oligossacárides contendo ligações α - (1 \rightarrow 6) como, por exemplo, melibiose, rafinose e estaquiose (1, 24, 30, 36, 46, 48, 61), verbascose, planteose, maninotriose e respectivos álcoois (24, 36, 61, 82) também são considerados substratos da enzima.

A enzima ocorre extensamente na natureza, distribuindo-se entre animais, vegetais e microrganismos. Segundo as revisões efetuadas por WALLENFELS & MALHOTRA (83) em 1961 e por DEY & PRIDHAM (25), em 1972, em animais a α -galactosidase já foi localizada em *Astacus fluviatilis*, *Helix pomatia* e em diversos insetos, além de esperma, fluido seminal e órgãos de vários mamíferos. No reino vegetal, sementes de *Brassica oleracea* (25), *Cajanus indicus* (25), *Canavalia ensiformis* (25), *Citrullus vulgaris* (25), *Coffea* sp (15, 60) *Medicago sativa* (48), *Phaseolus vulgaris* (1, 39), *Pisum sativum* (47), *P. elatius* (47), *Prunus amygdalus* (45), *Vicia faba* (23), *Vicia sativa* (61), além das folhas de *Cucurbita pepo* (81) e de *Spinacea oleracea* (28) e tubérculos de *Stachys affinis* (82) são fontes reconhecidas da enzima.

Entre os microrganismos, a α -galactosidase tem sido relatada, entre outros, em *Agaricus bisporus* (25), *Aerobacter aerogenes* (31), *Aspergillus awamori* (49), *A. niger* (6, 41), *A. oryzae* (87), *A. saitoi* (77), *Bacillus* sp (3), *Bacillus stearothermophilus* (21, 65), *Calvatia cyanthiformis* (25), *Cladosporium cladosporioides* (18), *Clostridium* spp (25), *Diplococcus pneumoniae* (42), *Escherichia coli* (12, 36, 70), *Lactobacillus* spp (50) *Micrococcus* sp (3), *Mortierella vinacea* (78), *Penicillium* spp (14), *Streptococcus bovis* (7, 8).

Apesar de haver α -galactosidase de natureza constitutiva em certos grupos de microrganismos, sua formação também pode ocorrer por indução, pela presença de D-galactose ou D-galactosídeos no meio de cultura. A ocorrência da enzima de natureza constitutiva tem sido identificada especialmente em bactérias; por outro lado, não se tem referências quanto à sua existência em fungos. BAILEY, R.W. (8), em 1963, e LI *et alii* (42), trabalhando, respectivamente, com *Streptococcus bovis* e *Diplococcus pneumoniae* conseguiram isolar a α -galactosidase a partir de meios de cultura contendo apenas glicose como

fonte de carbono. Em 1973, MITAL *et alii* (50) obtiveram resultados semelhantes em suas investigações com diferentes linhagens de *Lactobacillus*, sugerindo tratar-se de uma enzima constitutiva, presente na fração solúvel da célula. AKIBA & HORIKOSHI (2), utilizando diferentes carboidratos como fonte de carbono, para promover o crescimento de uma cepa de *Bacillus* sp, detectaram atividade de α -galactosidase em todos os meios ensaiados, independente do açúcar usado.

Alguns microrganismos como *Escherichia coli* (11, 36, 70), *Aerobacter aerogenes* (31), *Corticium rolfsii* (34, 35) podem produzir a enzima por indução, mediante a presença de D-galactose ou D-galactosídeos como fonte de carbono no meio de cultura. BURSTEIN & KEPES (12), em 1971, e KAWAMURA *et alii* (36), em 1976, trabalhando com diferentes linhagens de *E. coli*, observaram que essas bactérias possuíam uma considerável capacidade de produzir a enzima adaptativamente, desde que inoculadas em meios de cultura contendo somente α -D-galactosídeos como fonte de carbono.

Em 1974, DELENTE *et alii* (21) obtiveram uma cepa de *Bacillus stearothermophilus*, isolada a partir de amostras de solos cultivados com soja, capaz de biossintetizar α -galactosidase quando inoculada em meios de cultura contendo indutores como melibiose ou rafinose. Os mesmos autores observaram que a produção da enzima poderia ser diminuída ou mesmo inibida pela presença de outros carboidratos que não α -galactosídeos. Semelhante comportamento foi apresentado pelo *Lactobacillus plantarum*, de acordo com estudos realizados por MITAL *et alii* (51, 52).

COURTOIS *et alii* (14), em 1959, trabalhando com diversas linhagens de *Aspergillus* e *Penicillium* conseguiram a produção de enzima somente quando estaquiose e/ou rafinose estavam presentes ao meio de cultura. Os resultados positivos foram obtidos para *Penicillium jantah*, *P. paxillus*, *Aspergillus niger*, *A. rubescens* e *A. terreus*. Pes

quisa análoga foi realizada por WORTHINGTON & BEUCHAT (87), em 1974, trabalhando com 10 linhagens de fungos que são tradicional ou comercialmente utilizadas para a fermentação de sementes oleaginosas e grãos, para o preparo de alimentos fermentados como o *ontjon* (torta prensada e fermentada de amendoim). Entre as linhagens estudadas a que apresentou atividade de α -galactosidase melhor definida, com diminuição dos teores de rafinose e estaquiose do fermento foi *N.sitophila*. *R.oligosporus*, *M.purpureus*, *M.hiemalis* e *A.elegans* não utilizaram estes açúcares ou o fizeram muito lentamente.

SUZUKI *et alii* (79), estudando as possibilidades de melhorar o rendimento na extração de açúcar de beterraba, mediante a remoção, por processos enzimicos, do excesso de rafinose, que previne a completa cristalização da sacarose, obtiveram a produção de α -galactosidase em *Mortirella vinacea*, induzida pela presença de galactose, melibiose, rafinose e lactose. Embora a ligação glicosídica existente na lactose seja de configuração β - (1+4), este açúcar foi o indutor mais efetivo na produção de α -galactosidase de *M.Vinacea* (79). Conduta semelhante foi obtida com *Aspergillus awamori* (49), *Aspergillus oryzae* (58), *Corticium rolfsii* (34), *Streptomyces* sp (54,55) e *Escherichia coli* B (70), porém, isto não ocorreu com *E.coli* subsp *communior* IAM 1272, conforme pesquisa realizada por KAWAMURA *et alii* (36). A lactose também não foi efetiva na produção de α -galactosidase em *Aerobacter aerogenes* (31). A confirmação da existência da atividade de β -galactosidase nos casos em que o indutor tenha sido lactose e em outros onde o indutor fosse um oligossacáride com configuração α - (1+6) parece fortalecer a hipótese de que as enzimas α - e β -galactosidase são componentes de um mesmo operon (25, 83).

Embora a α -galactosidase ocorra amplamente na natureza, são poucos os estudos envolvendo sua purificação e sobre as determinações de suas propriedades com detalhes. A maioria das pesquisas têm sido

realizadas com preparações enzimáticas apenas parcialmente purificadas. Geralmente, as α -galactosidases ocorrem nas células em associação com várias outras glicosidases, e isso normalmente dificulta o fracionamento destas enzimas (5, 6, 28, 34, 42). Para isso, são usados os procedimentos convencionais de isolamento de enzimas como fracionamento com sulfato de amônio e solventes orgânicos, tratamento térmico, acidificação, técnicas de separação por cromatografia de troca iônica, de afinidade, filtração em gel e focalização isoelétrica. Estas técnicas têm sido empregadas, por exemplo, na purificação de α -galactosidase de café (15, 60), *Prunus amygdalus* (45), *Phaseolus vulgaris* (1, 5), *Vicia sativa* (61), *Vicia faba* (23), *Mortierella vinacea* (78), *Corticium rolfsii* (35), *Medicago sativa* (48), *Cyamopsis tetragonolobus* (48), *Escherichia coli* (36), *Micrococcus* sp (3), *Bacillus* sp (3).

Um dos primeiros trabalhos sobre o isolamento da enzima foi realizado por PETEK & DONG (60), em 1961. Eles obtiveram duas frações ativas de α -galactosidase em grãos de café (*Coffea* sp), mediante precipitação do extrato bruto com acetona e adsorção em colunas de alumina. Resultados análogos foram obtidos por COURTOIS & PETEK (15), em 1966, em suas pesquisas com grãos de café verde.

MALHOTRA & DEY (45), em 1967, em estudos realizados com amêndoas doces, alcançaram um produto em torno de 2.000 vezes mais puro que o extrato bruto inicial, após sucessivas etapas de purificação envolvendo tratamento com sulfato de manganês, fracionamento por insolubilização pela mudança de pH, adição de acetona e sulfato de amônio, além de separações em colunas de CM-celulose e filtração em Sephadex G-75.

No ano seguinte, AGRAWAL & BAHL (1, 5) relataram o isolamento, a partir de sementes germinadas de *Phaseolus vulgaris*, de várias glicosidases, que foram obtidas numa forma altamente ativa. As eta-

pas utilizadas no isolamento e purificação foram simples, envolvendo precipitação com sulfato de amônio, fracionamento em colunas de DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50 e alumina. Em 1969, PETEK *et alii* (61), utilizando sementes germinadas de *Vicia sativa* e sucessivas etapas de fracionamento por adição de sulfato de amônio, separação em colunas de hidroxiapatita e de Sephadex G-75, conseguiram uma fração enzimática com atividade específica 1.100 vezes maior que o extrato bruto e com um rendimento de 10% do material original. DEY & PRIDHAM (23), no mesmo ano, isolaram duas formas ativas de α -galactosidase em sementes de *Vicia faba*, com diferentes pesos moleculares, mediante tratamentos sucessivos pela variação de pH, adição de sulfato de protamina e de acetona e, por fim, filtração molecular em colunas de Sephadex G-100 e G-200. THOMAS & WEBB (81), em 1977, também encontraram três formas moleculares, com propriedades distintas, da α -galactosidase isolada de folhas de *Cucurbita pepo*, além da separação entre α - e β -galactosidase, após sucessivas precipitações por tratamento com ácidos, com sulfato de protamina e sulfato de amônio, seguidas por cromatografia em colunas Sephadex G-100 e DEAE-Sephadex A-50.

Pelo tratamento de uma preparação comercial de enzimas de *Aspergillus niger* por filtração em gel de Sephadex G-200 e Bio-Gel P-200 e cromatografia de troca iônica em colunas de DEAE-celulose e DEAE-Sephadex A-50, LEE & WACEK (41) conseguiram separar a α - da β -galactosidase. Quando as frações contendo α -galactosidase foram fracionadas em CM-celulose, houve o aparecimento de três frações ativas, sendo confirmadas posteriormente por eletrofocalização.

GATT & BAKER (28), em 1970, relataram a separação da α - e β -galactosidase extraídas de folhas de espinafre, usando insolubilização pela adição de sulfato de amônio e fracionamento em colunas de DEAE-celulose e Sephadex G-150. Em 1974, McCLEARY & MATHESON (48)

obtiveram resultados semelhantes em estudos com sementes de várias leguminosas. Uma α -galactosidase extraída de tubérculos de *Stachys affinis* (82) mostrou-se cerca de 130 vezes mais pura em relação ao extrato bruto inicial, após fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em DEAE-celulose e filtração em gel de Sephadex G-75.

A α -galactosidase obtida na forma cristalina, a partir de micélios de *Mortierella vinacea* (78), mediante precipitação das frações eluídas da coluna de Bio-gel 200 com sulfato de amônio recristalizado e finamente pulverizado, é a forma mais pura da enzima que se tem conhecimento.

A contrário dos esforços realizados por SUZUKI *et alii* (78) para obter uma forma altamente purificada da enzima, os preparados enzimáticos de *Aspergillus saitoi*, utilizados por SUGIMOTO & VAN BUREN (70) e de *Aspergillus awamori*, citados por MCGHEE *et alii* (49) sofreram tratamento por ultrafiltração e filtração em Sephadex G-75 ou G-200, apenas para a obtenção de um concentrado enzimático contendo α -galactosidase e invertase, para aplicação em extratos de soja.

Os valores de pH e de temperatura em que a atividade da enzima é máxima têm-se mostrado variáveis, de acordo com o substrato utilizado e com a procedência da enzima. O pH ótimo, em alguns casos, pode exibir somente um pico, em outros, dois ou mesmo uma faixa ampla de pH, para o mesmo substrato. A α -galactosidase de *Corticium rolfsii* (34, 35) originou um gráfico de pH versus atividade enzimática com três picos independentes, a pH 2,0, 3,0 e 4,0. Nas revisões publicadas por WALLENFELS & MALHOTRA (83), em 1961, e por DEY & PRIDHAM (25), em 1972, um aspecto comum entre as α -galactosidasas provenientes de fungos e plantas é que apresentam melhor atividade em meio ácido, com valores de pH ótimo situados entre 2,5 e 6,0; entre as α -galactosidasas de bactérias, o ótimo de atividade ocorre em faixas de pH mais próximas da neutralidade, havendo casos em que o pH ótimo situa-se perto de 7,5 (3, 12).

A α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (21) apresentou um pH ótimo em torno de 6,0 a 7,0 para o PNPG, pH 7,0 para melibiose e estaquiose e pH 7,3 para rafinose. Quando a mesma enzima foi submetida à imobilização em um suporte insolúvel, exibiu um pH ótimo de 7,0 para o PNPG, e uma faixa entre pH 7,0 e 7,3 frente à melibiose, rafinose e estaquiose (65). A enzima de *Mortierella vinacea* (78) purificada e cristalizada, quando ensaiada com melibiose como substrato, apresentou um pH ótimo entre 4,0 e 6,0; quando o micélio fúngico foi imobilizado em gel de poliacrilamida (80), a atividade máxima ocorreu em pH 4,0. Os extratos enzimáticos obtidos de *Aspergillus awamori* (49), *A.saitoi* (77), *Cladosporium cladosporioides* (18) tiveram um pH ótimo de 5,0 para a melibiose e rafinose; a enzima de *Cl. cladosporioides* (18), quando ensaiada com PNPG apresentou um ótimo a pH 7,0 e manteve a atividade relativa em torno de 90% em pH próximo a 6,0.

A maioria das α -galactosidases têm um comportamento comum, em que a velocidade da reação catalisada pela enzima aumenta com o aumento da temperatura, até um valor ótimo, quando se inicia sua inativação. A procedência e o estado de purificação da enzima mostram-se importantes, quando se avalia o grau de estabilidade da estrutura proteica da α -galactosidase em relação à temperatura. DEY & PRIDHAM (25), em 1972, descreveram o comportamento da enzima, extraída de uma linhagem de *Escherichia coli*, que se mostrou bastante instável quando no estado bruto; por outro lado, a enzima purificada pode ser liofilizada e estocada a 4°C por mais de dois meses, sem que haja perda de atividade. A estabilidade na estocagem, por um período de três meses a 4°C, também foi verificada para a α -galactosidase de amêndoas doces (45). As enzimas extraídas de várias fontes, purificadas ou não, se mantiveram estáveis por vários meses, sob refrigeração (19, 49, 77, 78); entretanto, a α -galactosidase de *Vicia sativa* (23) se

comportou de modo diferente, sendo totalmente inativada nas mesmas condições. KAWAMURA *et alii* (36) observaram que uma preparação enzimica isolada de uma linhagem de *Escherichia coli*, quando em baixa concentração, mostrou-se muito instável em diferentes valores de pH, à temperatura de 0 a 50°C; por outro lado, a enzima concentrada mostrou-se mais estável.

Os ensaios sobre a estabilidade térmica das α -galactosidases de várias fontes apresentam resultados que dificultam os estudos comparativos, uma vez que, na maioria dos casos, eles têm sido realizados em diferentes condições de tempo e temperatura. Assim, a enzima obtida das folhas de *Spinacea oleracea* (28), quando mantida a 43°C durante 10 minutos, perde 50% de sua atividade; a α -galactosidase de *Aspergillus awamori* (49) perdeu cerca de 8% de atividade, após 15 minutos a 55°C. Quando mantida nesta mesma temperatura, durante 60 minutos, a enzima de *Aspergillus niger* (6, 41) perdeu aproximadamente 35% de sua atividade catalítica. As frações I e II da α -galactosidase de *Vicia faba* (23), após permanecerem a 60°C durante 30 minutos, perderam, respectivamente, 42 e 81% de suas atividades. Por outro lado, a enzima de *Vicia sativa* (61) mostrou-se resistente à inativação térmica, perdendo somente 16% de atividade após 40 minutos a 75°C. A atividade da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (21) também se mostrou termoestável, mantendo-se inalterada após duas semanas a 40°C.

Quando se considera a utilização de uma determinada enzima em alimentos, deve-se observar o seu comportamento em relação ao pH e a termoresistência de sua estrutura protéica. É desejável, para a remoção dos galactoligossacárides em produtos de soja, que se utilizem preparações enzimicas com grande atividade em pH próximo à neutralidade, uma vez que o pH natural dos extratos de soja situa-se em torno de 6,3. Valores de pH ótimo em regiões ácidas (pH < 5,0) são

aril- α -D-galactosídeos do que para os derivados arílicos e os gossacárides. Entre as α -galactosidasas isoladas de *Corticium rolfsii* (35) e *Vicia sativa* (61), estas relações também foram notadas. Nos estudos sobre a especificidade entre enzima e substrato, observou-se que os valores de Km e Vmax não se relacionam entre si, apresentando variações meramente ocasionais. Assim, um substrato com menor valor de Km não foi, necessariamente, o mais rapidamente hidrolisável e substratos com aproximadamente os mesmos valores de Km foram hidrolisados em proporções diferentes. A natureza do substituinte do anel aromático de galactosídeos não exerceu grande efeito na Vmax, no caso das α -galactosidasas de *Vicia faba* (24); entretanto a afinidade da enzima pelo substrato mostrou-se crescente pela presença de substituintes eletrofílicos (24). A velocidade de hidrólise dos α -D-galactosídeos parece ser diminuída pelo aumento da cadeia carbônica (8, 16, 24, 61).

Estas observações, seguidas do fato de que pH e temperatura também afetam diferencialmente os valores de K_m e V_{max} , poderiam sugerir que o K_m é semelhante à constante de dissociação (K_s) do complexo enzima-substrato ($K_m \approx K_s$). Em outras palavras, o K_m representa apenas a dissociação do complexo enzima-substrato (24, 25, 46).

A ação inibidora de diversas substâncias sobre a atividade de α -galactosidase tem sido investigada. DEY & PRIDHAM (23, 24) observaram que a hidrólise do PNPG pelas α -galactosidases I e II de *Vicia faba* era inibida, quando se utilizavam altas concentrações de substrato, ao passo que, em presença de rafinose como substrato, a cinética estabelecida por Michaelis-Menten era obedecida. Resultados semelhantes quanto ao efeito inibidor causado pelo substrato foram observados em α -galactosidases de várias outras fontes (25, 61, 81, 82).

A enzima de uma linhagem de *Escherichia coli* (36) não foi afetada por altas concentrações de PNPG; entretanto, foi inibida, quando melibiose foi o substrato em estudo, podendo-se sugerir que tenha sido causada pela atividade transgalactosilase apresentada pela enzima. Algumas galactosidases, além de exercer uma ação hidrolítica, catalisam a transferência de resíduos de galactose para um receptor apropriado formando ligações α -(1 \rightarrow 6). BLANCHARD & ALBON (11) observaram, durante a hidrólise da melibiose com α -galactosidase de leveduras, o aparecimento de um composto posteriormente identificado como maninotriose (27), formado pela transferência de resíduo de galactose da melibiose para uma segunda molécula de melibiose. A atividade de transferase também foi relatada para várias outras preparações enzimáticas (8, 15, 25, 45, 50, 61, 82).

"Reagentes sulfidrílicos" como o p-cloromercuribenzoato (PCMB), N-etilmaleimida e iodoacetamida inibiram as enzimas de *Aerobacter aerogenes* (31), *Aspergillus awamori* (49), *Aspergillus saitoi* (77), *Ba*

cillus sp (3), *Diplococcus pneumoniae* (42) e de *Micrococcus* sp (3), porém não exerceram qualquer efeito inibidor sobre as α -galactosidasas de *Calvatia cyantiiformis* (25), *Corticium rolfsii* (35), *Mortierella vinacea* (78), *Vicia faba* (23) e de folhas de *Spinacea oleracea* (28). Esta diferença de comportamento frente aos chamados reagentes sulfidrílicos sugere que nem todas as α -galactosidasas dependem do grupo -SH para a sua ação catalítica. As enzimas extraídas de *Prunus amygdalus* (25) e de *Vicia faba* (24) foram inibidas competitivamente por íons prata e mercúrio e, também, inativadas por fotoxidação em presença de azul de metileno. Estes resultados, em conjunto, poderiam sugerir a presença de resíduos de histidina e de grupos carboxílicos. Os íons Ag^+ e Hg^{+2} têm-se revelado inibidores poderosos das α -galactosidasas de *Aspergillus awamori* (49), *A.niger* (41), *A.saitoi* (77), *Bacillus* sp (3), *Corticium rolfsii* (35), *Diplococcus pneumoniae* (42), *Micrococcus* sp (3), *Mortierella vinacea* (78), *Vicia faba* (23) e *Vicia sativa* (61).

Em relação aos açúcares, a galactose, um produto da reação hidrolítica, tem-se comportado como um inibidor competitivo para as α -galactosidasas de diversas fontes (24, 25, 41, 55, 70). As enzimas extraídas de *Bacillus* sp e *Micrococcus* sp (3) não foram afetadas por este açúcar.

Os análogos estruturais da D-galactose como a D-fucose, L-arabinose e m-inositol também inibiram as enzimas competitivamente, ao passo que seus enantiômeros se mostraram ineficazes, confirmando os resultados quanto à especificidade de substrato obtidos por DEY & PRIDHAM (24), onde o p-nitrofenil- β -L-arabinosídeo e o α -D-fucosídeo serviram como substratos. A glicose também se mostrou um inibidor competitivo para várias α -galactosidasas como as de *Aspergillus awamori* (49), *A.saitoi* (77) e de *Mortierella vinacea* (78), porém, não exerceu qualquer tipo de inibição sobre as α -galactosidasas de *Micro-*

coccus sp (3), *Vicia faba* (24) e de várias outras fontes, conforme foi relatado por DEY & PRIDHAM (25), em 1969.

KELEMEN & WHELAN (37) estudaram a ação inibidora de polióis sobre glicosidases e galactosidases e observaram que o D-treitol, que tem configuração semelhante à da galactose entre os carbonos 3, 4, 5 e 6, foi o inibidor mais efetivo da hidrólise de p-nitrofenil- α -D-galactosídeo pela α -galactosidase, e que essa inibição foi do tipo competitivo. Estes resultados confirmam a teoria de que a enzima interage com o substrato entre os átomos de carbono 3, 4, 5 e 6.

Os pesos moleculares das α -galactosidases de diversas fontes têm sido estimados, na maioria dos casos, por técnicas de filtração molecular, comumente em Sephadex G-100 ou G-200 (4), também podendo ser usadas as técnicas de electroforese em gel de SDS-poliacrilamida e ultracentrifugação (48, 61, 85). As α -galactosidases de origem vegetal geralmente se apresentam sob mais de uma forma molecular, uma delas com peso molecular substancialmente maior, variando entre 120.000 e 210.000 dältons e a outra, com peso molecular situado na faixa de 21.000 a 57.000 (9, 25). Normalmente, os valores de peso molecular da α -galactosidase microbiana se situam na faixa superior a 100.000 dältons. AKIBA & KORIKOSHI (3) calcularam os pesos moleculares para *Micrococcus* sp e *Bacillus* sp em 367.000 e 312.000, respectivamente. Outros valores determinados foram 130.000 para *Aspergillus awamori* (49), 290.000 para *A.saitoi* (77).

No Quadro 1 são apresentados os valores de algumas propriedades estudadas para as α -galactosidases de diversas fontes.

As α -galactosidases de plantas têm sido estudadas, especialmente em sementes, onde se acredita que elas estejam envolvidas na degradação de galactomanas e de oligossacárides como rafinose e estaquiose, que servem como fonte de energia prontamente metabolizável durante a etapa de germinação (25, 48). Durante o desenvolvimento

QUADRO 1. Propriedades das α -galactosidases de diversas fontes.

Fonte de enzima	Substrato*	pH		Temperatura		Energia de ativação (Kcal/mol)	Km (mM)	Vmax	Peso molecular	Referência
		Ótimo	Estabilidade	Ótima	Estabilidade					
<i>Aspergillus auxmori</i>	a	5,0	Estável na faixa de pH ótimo	50°C	55°C		6,0	0,3 μ moles/min/5mL	130.000	48
	c	5,0		-			30,0	0,56 μ moles/min/2mL		
	d	5,0		-			36,0	0,86 μ moles/min/2mL		
<i>Aspergillus niger</i>	a	3,8-4,2	3,8-5,8		55°C	16,4	0,35	58,8 μ moles/min/mg		6,41
<i>Aspergillus saitoi</i>	c	5,0-5,5	4,0-8,0	55°C	< 55°C		3,11		290.000	77
<i>Bacillus</i> sp	b	6,5	6,0-8,5	35°C	até 35°C		1,0	100%	312.000	3
	c						7,90	22%		
	d						24,1	9%		
<i>Micrococcus</i> sp	b	7,5	7,5-8,0	40°C	até 35°C		0,47	100%	367.000	3
	c						1,50	32%		
	d						12,60	19%		
<i>Mortierella vinacea</i>	a	4,0-6,0	Estável em pH neutro e alcalino	50°C	até 55°C	12,4	0,43	143,5 moles/min/mg		78, 79
	b	4,0-6,0					0,36	299,9 moles/min/mg		
	c	4,0-6,0					0,39	33,9 moles/min/mg		
	d	3,0-5,0					1,83	19,2 moles/min/mg		
<i>Phascolus vulgaris</i>	a	6,5-6,7	4,6-8,0	35-40°C	até 50°C	13,6	0,657	3,45 μ mol/mg	125.000 (I)	1, 9, 39
	a	5,7-6,1	0,240				39.800 (II)			
	c	4,9-5,3								
<i>Prunus amygdalus</i>	a	5,5-5,7	Estável na faixa de pH ótimo		até 60°C	19,0	0,526	27,0 μ moles/min/mg	33.000	45
	c	5,5-5,7					2,44	1,61 μ moles/min/mg		
<i>Stachys affinis</i>	a	5,2			até 50°C	13,7	0,42	25,6 μ moles/min	42.000	82
	d	5,2					7,89	10,5 μ moles/min		
	e	5,2					11,4	6,9		
<i>Vicia faba</i>	I a	3,0-3,5 e 6,0-6,5			mais estável que II	15,3	0,38	25,53 μ moles/min/mg	209.000	23, 24
	d	3,5-5,5					4,0	28,4 μ moles/min/mg		
II	a	2,5-3,5 e 5,0-5,5			35-45°C	27,2	0,45	2,39 μ moles/min/mg	38.000	
	d	3,5-4,5					5,0	4,18 μ moles/min/mg		

* (a) - PNPG
 (b) - ONPG
 (c) - Melibiose
 (d) - Rafinose
 (e) - Planteose

de várias sementes, há um aumento na atividade de α -galactosidase e no teor de derivados com ligação α -(1 \rightarrow 6) galactosídica, sugerindo um sistema de compartimentação ou inibição endógena (25). BARHAM *et alii* (9), estudando as mudanças em α -galactosidasas durante a maturação e germinação de sementes de *Vicia faba*, propuseram uma relação entre o estado fisiológico das sementes e a predominância de umas das formas moleculares da enzima. A germinação das sementes de *Vicia faba* parece ser um fenômeno reverso da maturação, onde o nível da enzima I decresce rapidamente. Apesar disso, a atividade total da enzima nos tecidos aumenta durante os primeiros dias de germinação. Sementes verdes e/ou que tenham um alto teor de umidade podem não seguir as relações propostas para os níveis das frações I e II (I > II) e, em alguns casos, como em sementes verdes de *Vicia faba*, a forma I pode estar ausente.

Embora rafinose e estaquiose sejam hidrolisadas sob condições normais de germinação das sementes de leguminosas, a galactose livre não pode ser detectada. Parece que as sementes intactas são capazes de utilizar, efetiva e rapidamente, a galactose liberada de oligossacárides pela ação de α -galactosidase. A existência de atividade de galactoquinase pode explicar a rápida conversão dessa galactose a galactose-1-fosfato, que entra na formação da parede celular (39, 59). Aparentemente, esta fosforilação ocorre apenas em sementes intactas, sob condições aeróbias.

Em folhas, as α -galactosidasas podem estar envolvidas no metabolismo de galactolipídeos (28, 67), possuindo também outras enzimas necessárias para o completo desdobramento destes compostos até ácidos graxos, glicerol e galactose. É provável que as α -galactosidasas tenham um papel na regulação do metabolismo de carboidratos durante o desenvolvimento da folha. Em folhas maduras de muitas espécies de plantas, estaquiose e rafinose estão entre os principais

açúcares sintetizados e transportados para as regiões de crescimento da planta (84). Folhas jovens de *Cucurbita* degradam rapidamente rafinose e estaquiase, possivelmente pela atividade de α -galactosidase. A um certo estágio de desenvolvimento da folha, há uma mudança no seu perfil metabólico, que se reflete em acúmulo de sacarose e síntese de estaquiase (84).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Matéria-prima

As cultivares de soja (*Glycine max*, L) utilizadas (IAC-2, IAC-11, IAC-Foscarin, IAS-5, Santa Rosa e Paraná), e as de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L) Carioca comum, Carioca 80, Rosinha G-2, Aroana-80, Aysô e Catu foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), SP (safra 1982/1983).

Nos estudos de caracterização da enzima foram utilizadas as cultivares Paraná e Carioca-80 de soja e feijão, respectivamente. O teor de umidade das amostras de soja variou entre 9,39 e 10,50%, enquanto para as amostras de feijão esta variação ficou entre 9,70 e 11,75%. As amostras foram mantidas em câmaras a 40°C, em condições de umidade relativa controlada.

3.2- Reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica. Os açúcares glicose, frutose, galactose e sacarose, além dos padrões amiloglicosidase, lipase pancreática e polifenoloxidase foram adquiridos da MERCK.

Por outro lado, melibiose e rafinose, bem como as proteínas-padrão lisozima, glicose oxidase e soroalbumina bovina (BSA) foram adquiridos da SIGMA.

O substrato sintético PNPG (p-nitrofenil α -D-galactopiranosídeo) utilizado para avaliar a atividade de α -galactosidase também foi adquirido da SIGMA. A glicose liberada por ação da enzima sobre a melibiose foi determinada pela glicose oxidase-peroxidase-cromogênio (GOD-PAP), da MERCK.

As colunas para cromatografia foram empacotadas com Sephadex G-25 e Sephadex G-100 da PHARMACIA FINE CHEMICALS e DEAE - Celulose DE-52 da WHATMAN.

3.3. Equipamentos

A desintegração das amostras foi realizada em moinho de faca IKA, modelo A-10, provido de câmara de refrigeração; a homogeneização foi efetuada em homogeneizador do tipo VIRTIS "45".

As determinações de pH e as preparações de tampões foram efetuadas em pHmetro ALFATEC modelo 3500d e a execução das pesagens necessárias ao desenvolvimento do trabalho foi realizada em balança analítica ou semi-analítica METTLER. Uma centrífuga BECKMAN, modelo J-21B, foi usada para as operações de centrifugação; para as operações de desenvolvimento das reações enzimáticas utilizou-se de banho-maria, da marca FANEN. A determinação da atividade enzimática e do teor de proteínas, nas várias etapas de purificação foi realizada em espectrofotômetro VARIAN, série 234. As frações separadas das colunas de exclusão (filtração em gel) ou de troca iônica foram coletadas em coletor de frações LKB e o fluxo de eluição foi controlado com uma bomba peristáltica LKB PERPEX; as colunas cromatográficas foram mantidas sob refrigeração, através de um banho termostático, da marca VAN DEN.

3.4- Preparação dos extratos de soja e feijão

Para a obtenção do extrato bruto, foram utilizados 100g de soja ou feijão, previamente desintegrados em moinho de faca, tipo IKA, provido de refrigeração. O material foi homogeneizado com auxílio de homogeneizador tipo VIRTIS, durante 2 minutos em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,0. O homogenato obtido foi filtrado em gaze e o sobrenadante clarificado com solução saturada de acetato de chumbo. Após centrifugação do material a 12.000 x G durante 15 minutos a 50C, o sobrenadante recolhido foi denominado extrato bruto e o resíduo descartado. No extrato bruto foram determinadas a atividade enzimica e a concentração de proteínas. Todas as etapas foram realizadas em câmara frigorífica à temperatura de 40C.

3.5- Determinação da atividade de α -galactosidase

A atividade de α -galactosidase foi determinada utilizando-se de três diferentes substratos: melibiose, rafinose e o substrato sintético PNPG (p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo).

A 2ml de PNPG 0,6mM em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,0, preparado de acordo com GOMORI, G. (29) foram adicionadas alíquotas de 0,1ml de solução enzimica, convenientemente diluída, e incubadas a 500C durante 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 3,0ml de água destilada e 2,0ml de tampão borato 0,1M pH 10,7 (29); o p-nitrofenol (PNP) liberado em decorrência da ação da enzima foi determinado espectrofotometricamente a 400nm. A absortividade molar do p-nitrofenol, nestas condições, foi calculada em $13.270\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

Uma unidade (U) de α -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 μmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições do ensaio.

Quando o substrato foi melibiose, a mistura reativa constituída por 0,5ml de extrato enzimico, 0,5ml de tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,0 e 0,5ml de solução de melibiose 10mM foi incubada em banho-maria a 50°C durante 40 minutos. A quantidade de glicose liberada foi medida pelo método da glicose oxidase-peroxidase-cromogênio, descrito por HOUGH & JONES (32). Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 μmol de glicose por minuto, nas condições do experimento.

Quando foi usada rafinose, a mistura reativa composta de 2,0ml de solução de rafinose 50mM em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,0 e 0,5ml de extrato enzimico foi incubada a 50°C durante 60 minutos. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 0,5ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,3M e 0,5ml de ZnSO_4 0,18M, removendo-se, a seguir, o precipitado por centrifugação a 1.000 x G durante 10 minutos. O teor de galactose liberado em consequência da reação enzimica foi determinado pelo método descrito por SOMOGYI, M. (74) e NELSON, N. (53). Uma unidade (U) de α -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 μmol de galactose por minuto, nas condições descritas.

Para os três substratos, a atividade específica foi expressa como unidades de enzima por mg de proteína, sendo que a concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY *et alii* (44), usando-se a soro-albumina bovina como padrão.

3.6- Purificação da α -galactosidase

3.6.1- Fracionamento com sulfato de amônio

O fracionamento foi realizado a 80% de saturação, pela adição lenta de sulfato de amônio (561g/1000ml) ao extrato bruto, sob agitação lenta e constante, e banho de gelo. Após repouso de 24 ho

ras a 4°C, a amostra foi centrifugada a 13.000 x G durante 20 minutos, sob refrigeração. O precipitado obtido foi dissolvido em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,0.

3.6.2- Cromatografia em coluna de Sephadex G-25

A preparação obtida no item anterior foi aplicada em coluna de Sephadex G-25 (2,5 x 35cm) previamente tratada, segundo especificações do fabricante e equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,0; a enzima foi eluída com o mesmo tampão e as frações dotadas de atividades enzimica foram reunidas e liofilizadas.

A fração liofilizada obtida foi analisada quanto à concentração de proteínas e à atividade enzimica.

3.6.3- Cromatografia em DEAE - Celulose

O eluato obtido após separação em coluna de Sephadex G-25 e liofilizado foi cromatografado em coluna de DEAE-celulose DE-52 (2,5 x 35cm) previamente tratada com solução de ácido clorídrico e hidróxido de sódio, conforme especificação do fabricante e equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 6,0. As frações de proteínas presentes na solução de amostra aplicada à coluna foram eluídas com gradiente de cloreto de sódio (0,05 a 0,3M) no mesmo tampão, coletando-se frações de 5ml por tubo, com um fluxo de 30ml/hora controlado por uma bomba peristáltica. A concentração de proteínas e a atividade enzimica de cada fração foram determinadas. As frações que apresentaram atividade de α -galactosidase foram reunidas e precipitadas com sulfato de amônio a 80% de saturação, nas condições anteriormente descritas, redissolvidas em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 6,0 e, a seguir, dialisadas durante 24 horas a 4°C contra tampão citra-

to-fosfato 0,05M, pH 6,0, com freqüentes trocas de tampão. Posteriormente, esta solução foi cromatografada em coluna de Sephadex G-100.

3.6.4- Cromatografia em coluna de Sephadex G-100

A fração ativa da enzima obtida após separação em coluna de DEAE-celulose foi submetida a fracionamento por filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 (2,5 x 60cm) previamente tratada e equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 6,0. O fluxo foi ajustado para 30ml/hora, controlado por uma bomba peristáltica, coletando-se frações de 5ml.

O volume de exclusão (V_0) da coluna foi calculado após cromatografia de pequena amostra de BLUE DEXTRAN 2.000.

Ao mesmo tempo, amostras de proteínas-padrão foram misturadas na solução da enzima e submetidas à separação em coluna de Sephadex G-100, eluindo-se as proteínas com o mesmo tampão e coletando-se frações de 5ml.

3.6.5- Electroforese em gel de poliacrilamida

O extrato enzimico purificado foi submetido à electroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% e preparado de acordo com o método descrito por ORNSTEIN, L. (57) e DAVIS, B.J. (20), com um tempo de desenvolvimento de 2 horas, com uma corrente de 5 mA/tubo (0,5 x 7,5cm), usando-se solução tampão tris-glicina pH 8,3.

Os géis foram fixados com solução de ácido tricloroacético a 12,5% e as bandas de proteínas foram detectadas por coloração com solução de negro de amido a 0,1% em ácido acético a 7%.

Os géis também foram revelados para a detecção de glicoproteínas e da atividade enzimica. As glicoproteínas foram localizadas,

usando-se o reagente de ácido periódico-fucsina básica, de acordo com o método proposto por ZACHARIUS *et alii* (88).

A banda de proteína com atividade enzimica foi detectada, mediante incubação do gel com PNPg a 50°C e, a seguir, imersão em tampão borato pH 10,7.

3.7- Caracterização da α -galactosidase purificada

3.7.1- Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima

A influência do pH na atividade enzimica nos substratos estudados foi avaliada após incubação dos sistemas reativos em solução tampão citrato-fosfato 0,05M na faixa de pH 3,0 a 8,0.

Por outro lado, a estabilidade da enzima, em função do pH, foi determinada após incubação prévia a 55°C durante 20 minutos ou a 4°C durante 96 horas, medindo, a seguir, a atividade residual sobre o PNPg.

Para a faixa de pH 3,0 a 8,0 foi utilizado tampão citrato-fosfato 0,05M e tampão borato 0,01M, para a faixa de pH 8,4 a 10,7.

3.7.2- Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da enzima

O efeito da temperatura na velocidade de hidrólise enzimica nos três substratos foi verificado ensaiando a enzima em diferentes temperaturas, na faixa de 30 a 70°C, em seu pH ótimo. A estabilidade da enzima ao calor foi avaliada pela medida da atividade enzimica residual, após incubação em diferentes temperaturas, na faixa de 35 a 65°C, durante 15 minutos.

A velocidade de desnaturação da estrutura proteica foi estu-

dada pelo tratamento da enzima a 55, 60, 65 e 70°C. De cada amostra foram tomadas alíquotas de 0,1ml em intervalos de 2 minutos, resfriadas rapidamente em banho de gelo (4°C) e mantidas nesta temperatura para análise da atividade residual. O PNPG foi utilizado como substrato nos estudos de estabilidade e de inativação térmica.

3.7.3- Determinação da energia de ativação

A energia de ativação para a reação da α -galactosidase frente aos substratos PNPG, rafinose e melibiose foi determinada pela medida da velocidade de reação às temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C. Os valores obtidos foram calculados, de acordo com a equação de Arrhenius (86).

3.7.4- Efeito da concentração de substrato na atividade enzimica

O efeito da concentração de substrato na velocidade da reação foi estudado, em condições ótimas de pH e temperatura, numa faixa de 0,1 a 20mM de PNPG; 0,5 a 100mM de melibiose e 5 a 200mM de rafinose.

A constante de Michaelis (k_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram calculadas, mediante distribuição dos dados em gráficos da velocidade de reação versus concentração do substrato, de acordo com o método de LINEWEAVER & BURK (43).

A análise gráfica também foi utilizada para a caracterização do tipo de inibição sofrida pela α -galactosidase, quando diferentes concentrações de PNPG foram incubadas com 10mM de galactose e 50mM de glicose e frutose.

3.7.5- Ação de inibidores sobre a atividade da α -galactosidase

O efeito de inibidores na atividade catalítica da enzima foi determinado por adição dessas substâncias, em diferentes concentrações, ao ensaio enzimico.

Uma mistura reativa constituída de 1ml de solução de PNPG 2,0mM e 1ml de solução do inibidor cujas concentrações são expressas no Quadro 5, foi incubada em condições ótimas de pH e temperatura, com 0,1ml de extrato enzimico.

Os teores de p-nitrofenol liberados foram comparados aos da enzima não submetida ao teste de inibição e os resultados expressos em termos de atividade residual.

3.7.6- Determinação do peso molecular

O peso molecular da enzima foi determinado por filtração em gel, usando-se Sephadex G-100, como proposto por ANDREWS, P. (4). Para calibração da coluna foram utilizadas as seguintes proteínas-padrão: glicose oxidase, polifenoloxidase, amiloglicosidase, soroalbumina bovina (BSA), lipase pancreática e lisozima. As condições de operação e a coluna usada foram descritas no item 3.6.4.

O peso molecular também foi estimado por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida, seguindo-se o método descrito por WEBER & OSBORN (85). Após o desenvolvimento com o tempo de 5 horas e corrente de 5mA/tubo, as bandas de proteínas foram localizadas com solução de *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB).

Os volumes de eluição e as mobilidades electroforéticas das proteínas usadas como referência foram comparados aos da amostra e estes valores utilizados no cálculo estimativo do peso molecular da α -galactosidase.

4- RESULTADOS

4.1- Níveis de atividade de α -galactosidase em diferentes cultivares de soja e feijão

A atividade de α -galactosidase foi testada em várias cultivares de soja e feijão, a fim de selecionar aquelas com maior atividade. Os resultados revelaram que as cultivares de soja e feijão, Paraná e Carioca-80, respectivamente, apresentaram os maiores índices de atividade enzimica e, portanto, foram utilizadas nos estudos posteriores de purificação e caracterização da enzima (Quadro 2).

QUADRO 2. Atividade de α -galactosidase em diversas cultivares de soja e feijão.

Cultivar	Atividade de α -galactosidase (*)	
	μ M/ml/min	Atividade específica (U/mg)
Soja (<i>Glycine max</i>)		
IAC - 2	91,37	9,64
IAC - 11	81,01	10,50
IAC - Foscarin	83,84	10,17
IAS - 5	81,39	9,86
Paraná	120,95	10,46
Santa Rosa	101,92	10,22
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)		
Aroana - 80	73,19	5,98
Aysô	49,36	4,06
Carioca comum	43,99	3,92
Carioca - 80	75,36	6,28
Catu	39,71	5,49
Rosinha G-2	68,11	5,22

(*) Extrato enzimico contendo 10g de amostra/50ml
Substrato: PNPG

4.2- Purificação da α -galactosidase

4.2.1- Fracionamento com sulfato de amônio

Os extratos brutos, obtidos a partir da soja e do feijão, como descrito no item 3.4., apresentaram, inicialmente, uma atividade específica de 11,08 e 5,99 unidades de α -galactosidase por miligrama de proteína, respectivamente. Os Quadros 3 e 4 resumem os resultados alcançados durante as diversas etapas de purificação.

A precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação promoveu uma ligeira purificação, nas duas amostras em estudo, produzindo frações com 13,77 e 6,10 unidades de enzima por mg de proteína, respectivamente.

O processo de fracionamento levou a uma concentração de proteínas praticamente sem perda da atividade enzimica na soja e com 78% de recuperação dessa atividade no feijão.

4.2.2- Cromatografia em coluna de Sephadex G-25

O precipitado obtido na faixa de 80% de saturação com sulfato de amônio foi submetido ao processo de filtração molecular em Sephadex G-25.

Nesta etapa, efetuou-se a remoção de sais e de componentes de baixo peso molecular presentes na amostra.

A filtração em Sephadex G-25 produziu frações 1,86 e 1,22 vezes mais puras que os extratos brutos iniciais da soja e do feijão, respectivamente.

QUADRO 3. Purificação da α -galactosidase da soja.

Etapa	Volume (mL)	Atividade total (U) ($\times 10^3$)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purifica ção
Extrato bruto	250	46,47	4.194,50	11,08	1,00
Precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação	42	45,15	3.278,93	13,77	1,24
Sephadex G-25	45	34,11	1.655,18	20,61	1,86
DEAE - Celulose	28	19,59	98,42	192,85	17,96
Sephadex G-100					
Fração I	10	3,88	13,93	278,70	25,15
Fração II	10	13,13	19,97	657,35	59,33

A atividade foi determinada utilizando-se PNPG como substrato.

QUADRO 4. Purificação da α -galactosidase do feijão.

Etapa	Volume (ml)	Atividade total (U) ($\times 10^3$)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purifica ção
Extrato bruto	250	18,74	3.129,25	5,99	1,00
Precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação	43	14,55	2.385,20	6,10	1,02
Sephadex G-25	50	12,13	1.655,00	7,33	1,22
DEAE - Celulose	32	6,59	66,66	98,90	15,71
Sephadex G-100					
Fração I	10	1,65	14,49	113,79	19,00
Fração II	10	3,60	11,70	307,41	51,32

A atividade foi determinada utilizando-se PNPG como substrato.

4.2.3- Cromatografia em coluna de DEAE-celulose

O eluato obtido após partição em Sephadex G-25 foi fracionado em coluna de DEAE-celulose (2,5 x 35cm). Nesta etapa de purificação, tanto a α -galactosidase da soja quanto a do feijão apresentaram um perfil de eluição com uma única fração ativa (Figuras 2 e 3), contendo 192,85 e 98,90 unidades de enzima por mg de proteína, portanto, com um fator de purificação de 17,96 e 15,71, para a soja e o feijão, respectivamente.

4.2.4- Filtração em Sephadex G-100

As frações eluídas da coluna de DEAE-celulose dotadas de atividade enzimática foram reunidas, concentradas com sulfato de amônio a 80% de saturação e, após diálise, a amostra foi submetida à filtração em coluna de Sephadex G-100 (2,5 x 60cm). Os perfis de eluição obtidos para a soja e o feijão, apresentados nas Figuras 4 e 5, mostram duas frações ativas da enzima.

No extrato enzimático de soja, as frações I e II produzidas foram respectivamente 25,15 e 59,33 vezes mais puras que o extrato bruto inicial. Por outro lado, no extrato obtido a partir do feijão, as frações I e II se apresentaram 19,00 e 51,32 vezes mais puras que a amostra original, respectivamente.

4.2.5- Electroforese em gel de poliacrilamida

As frações de α -galactosidase I e II purificadas foram submetidas à electroforese em gel de poliacrilamida, confirmando o resultado obtido na cromatografia em Sephadex G-100. A Figura 6 mostra o perfil electroforético da α -galactosidase purificada da soja e do feijão.

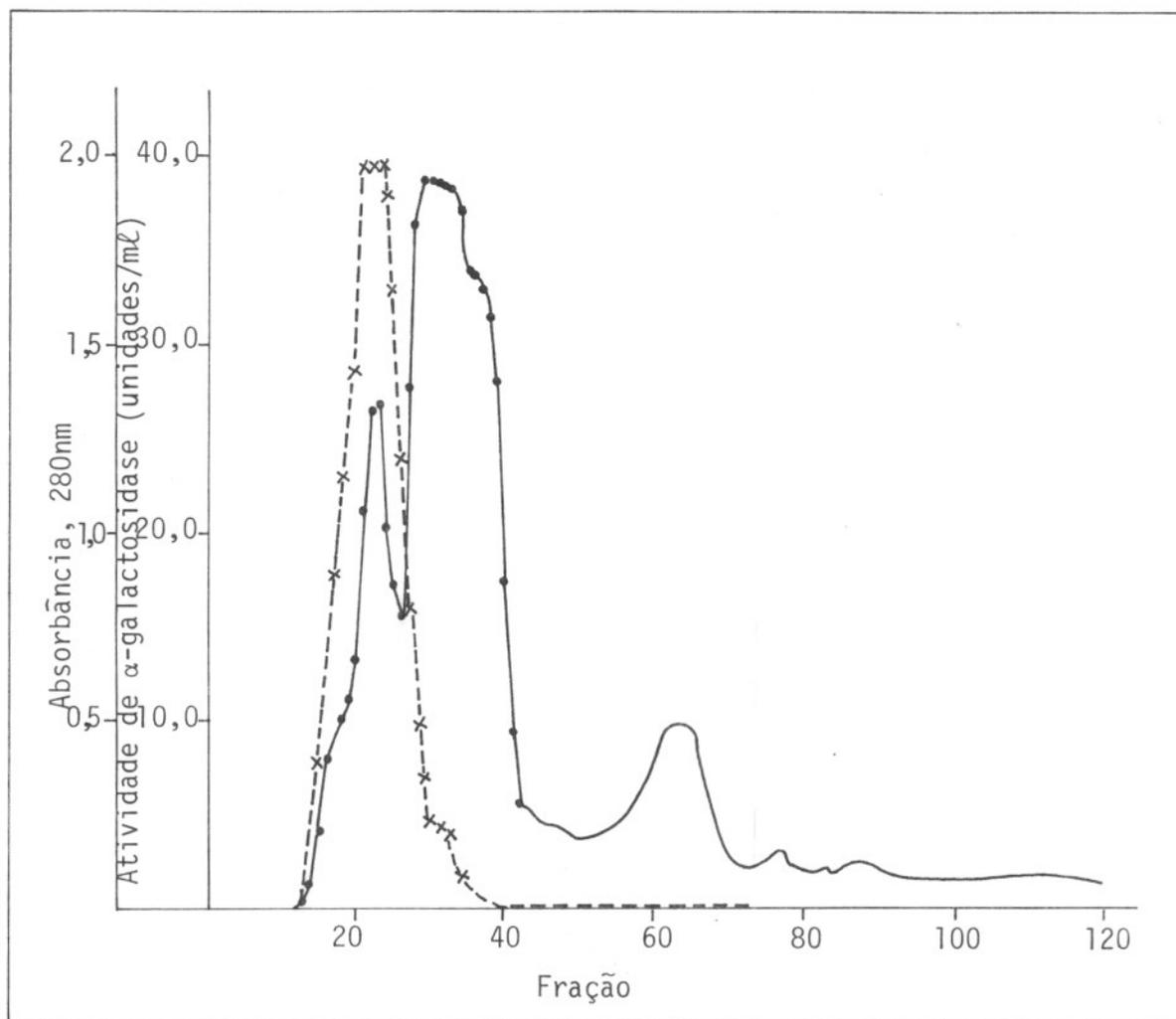


FIGURA 2-Perfil de eluição da α -galactosidase da soja, em coluna de DEAE-celulose (2,5 x 35cm), equilibrada com solução tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0. A enzima foi eluída com gradiente de NaCl(0,05 a 0,3M) com um fluxo de 30ml/hora, coletando-se frações de 5ml/tubo.

(—●—) Absorbância em 280nm; (—x—) Atividade de α -galactosidase.

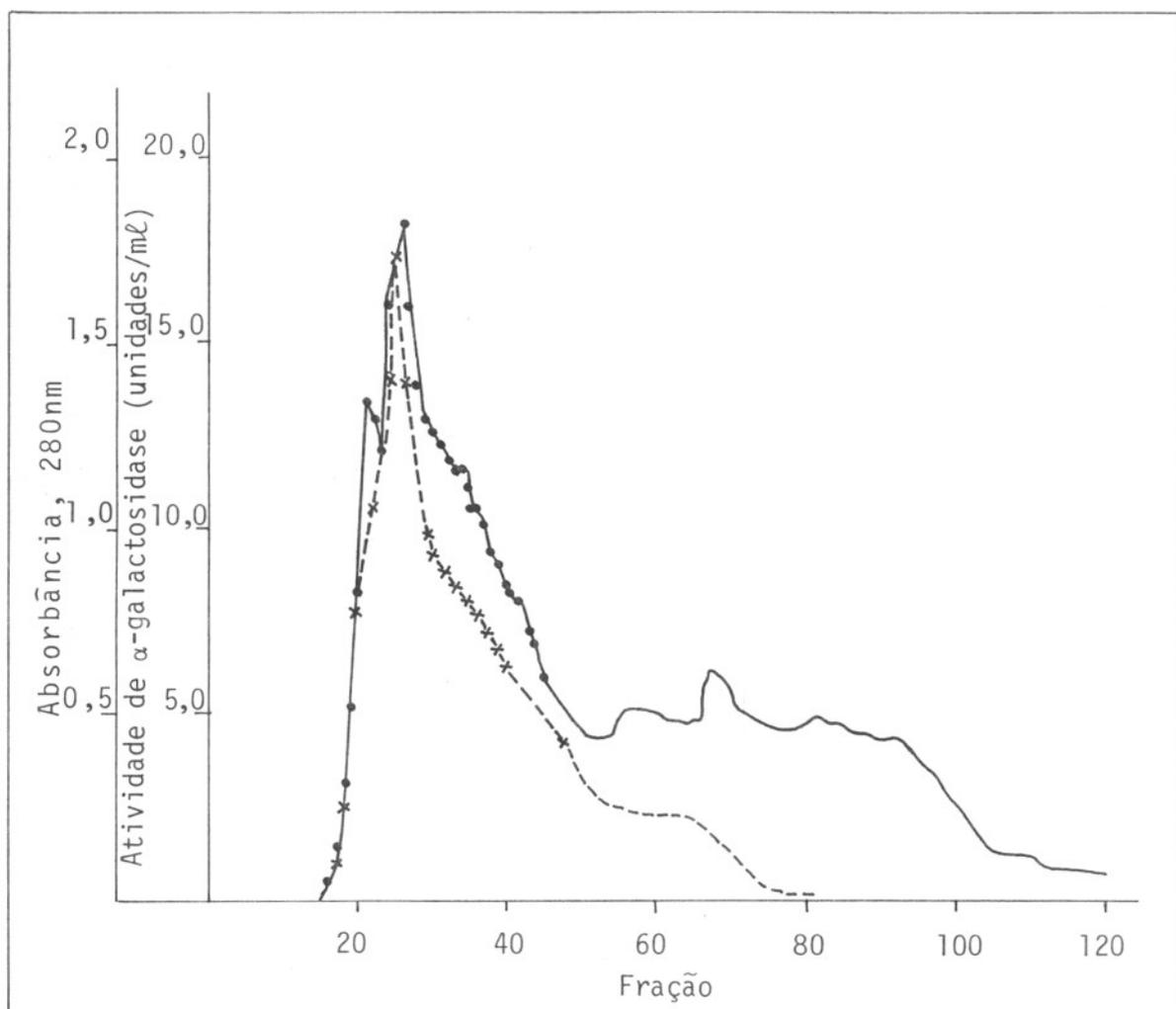


FIGURA 3- Cromatografia da α -galactosidase do feijão em coluna de DEAE-celulose (2,5 x 35cm) equilibrada com solução tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0. A enzima foi eluída com gradiente de NaCl (0,05 a 0,3M) com um fluxo de 30ml/hora, coletando-se frações de 5ml/tubo.

(—●—) Absorbância em 280nm; (—x—) Atividade de α -galactosidase.

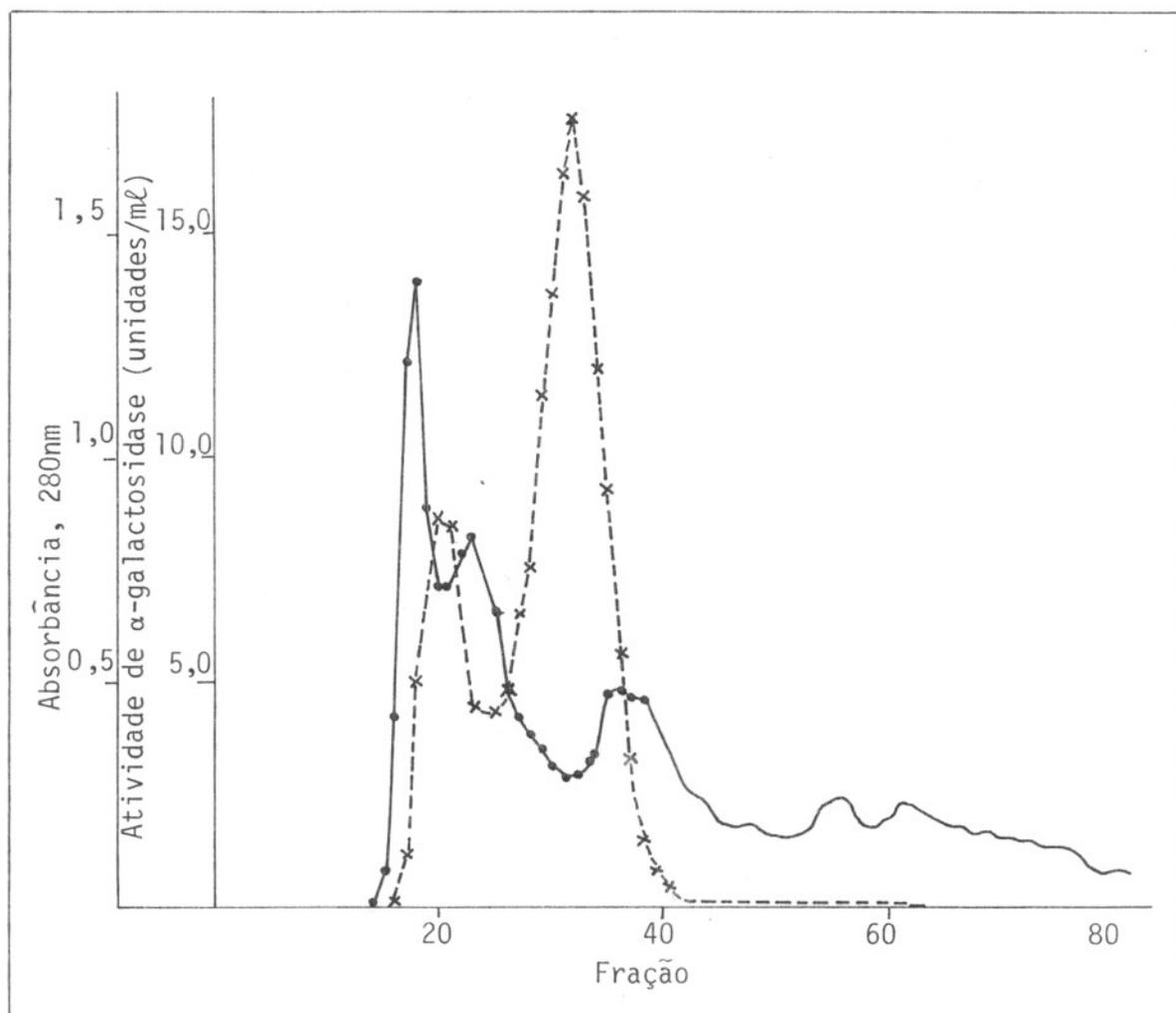


FIGURA 4- Cromatografia da α -galactosidase da soja em coluna de Sephadex G-100 (2,5 x 60cm). A coluna foi equilibrada com solução tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0 e a enzima eluída com o mesmo tampão, coletando-se frações de 5ml, com um fluxo de 30ml/hora.

(—●—) Absorbância em 280nm; (—x—) Atividade enzimática.

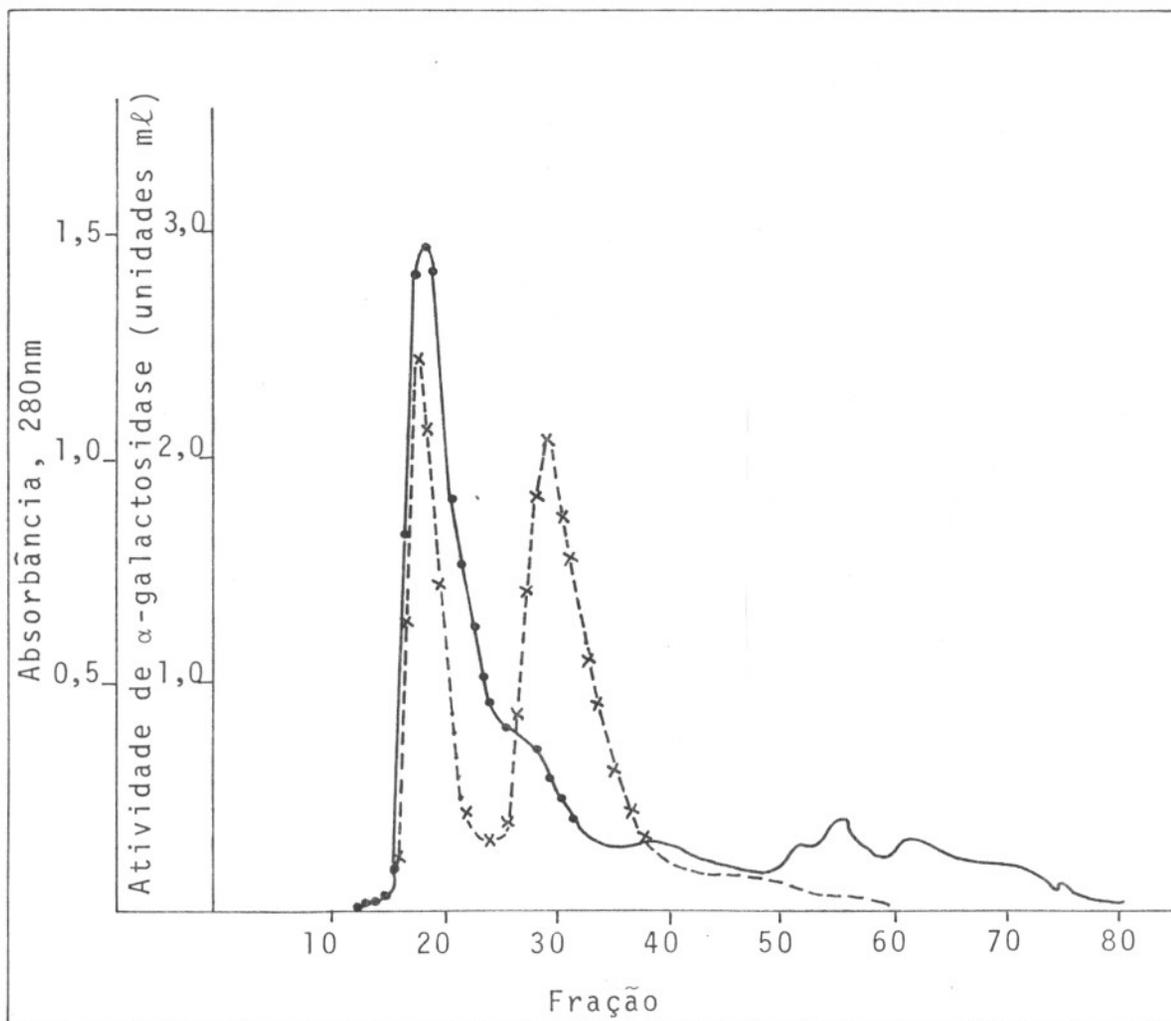


FIGURA 5: Cromatografia da α -galactosidase do feijão em coluna de Sephadex G-100 (2,5 x 60cm). A coluna foi equilibrada com solução tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0 e a enzima eluída com o mesmo tampão. Foram coletadas frações de 5ml com um fluxo de 30ml/hora.

(—●—) Absorbância em 280nm; (—x—) Atividade enzimica.

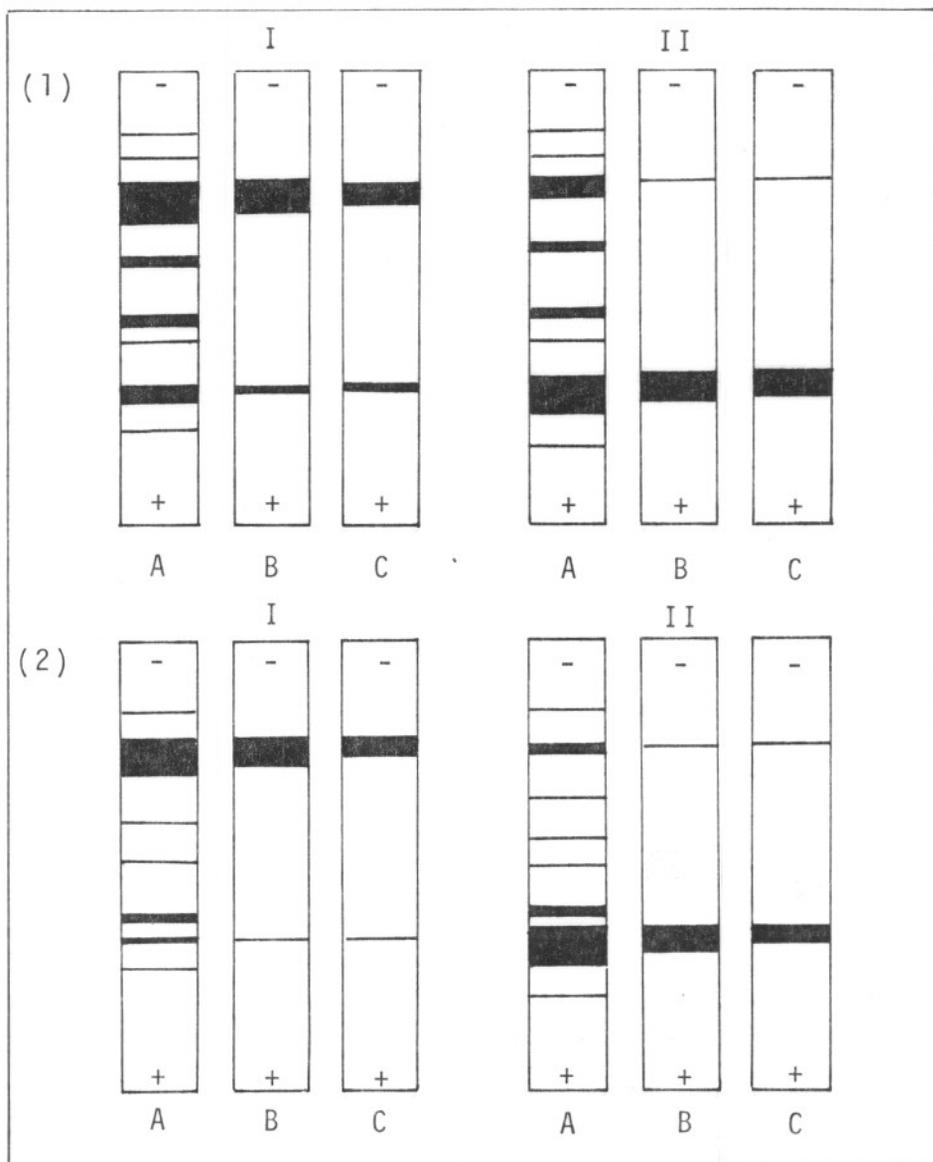


FIGURA 6- Electroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%.
 Os reveladores para proteínas, glicoproteínas e α -galactosidase foram, respectivamente, negro de amido (A); ácido periódico - fucsina básica (B) e PNP-G (C).
 1- Frações I e II da soja após cromatografia em Sephadex G-100; 2- Frações I e II do feijão após cromatografia em Sephadex G-100.

4.3- Caracterização da enzima

4.3.1- Influência do pH na atividade enzimica

No estudo do efeito do pH sobre a atividade da α -galactosidase da soja e do feijão, foram utilizados os substratos PNPG, melibiose e rafinose. As Figuras 7 e 8 mostram curvas características de variação do pH e atividade enzimica. A atividade máxima da enzima da soja foi a pH 5,0, para as frações I e II e para os substratos ensaiados. No feijão, a atividade máxima foi, respectivamente, a pH 5,5 para a fração I e a pH 6,0 para a fração II, nos três substratos estudados.

As Figuras 9 e 10 mostram que a atividade da enzima, em função do pH, manteve-se estável entre pH 4,0 e 7,0 para soja e entre 4,0 e 7,5 para o feijão, quando a mistura reativa enzima-tampão foi mantida a 40°C durante 96 horas. Quando o sistema de reação foi mantido a 55°C durante 20 minutos, a atividade da enzima presente na soja e no feijão não sofreu alteração entre os valores de pH 5,0 e 6,0. As frações I e II, tanto na soja como no feijão, tiveram comportamento semelhante quanto à estabilidade frente às variações de pH.

4.3.2- Comportamento da enzima em função da temperatura

A α -galactosidase foi ensaiada em várias temperaturas, na faixa de 30 a 70°C, em seu pH ótimo. As enzimas I e II da soja apresentaram uma velocidade máxima de hidrólise respectivamente a 45 e 50°C; este comportamento foi semelhante para os três substratos estudados (Figura 11). No estudo do efeito da temperatura sobre a atividade das α -galactosidas I e II do feijão, quando os substratos utilizados foram PNPG, melibiose e rafinose, a atividade hidrolítica máxi-

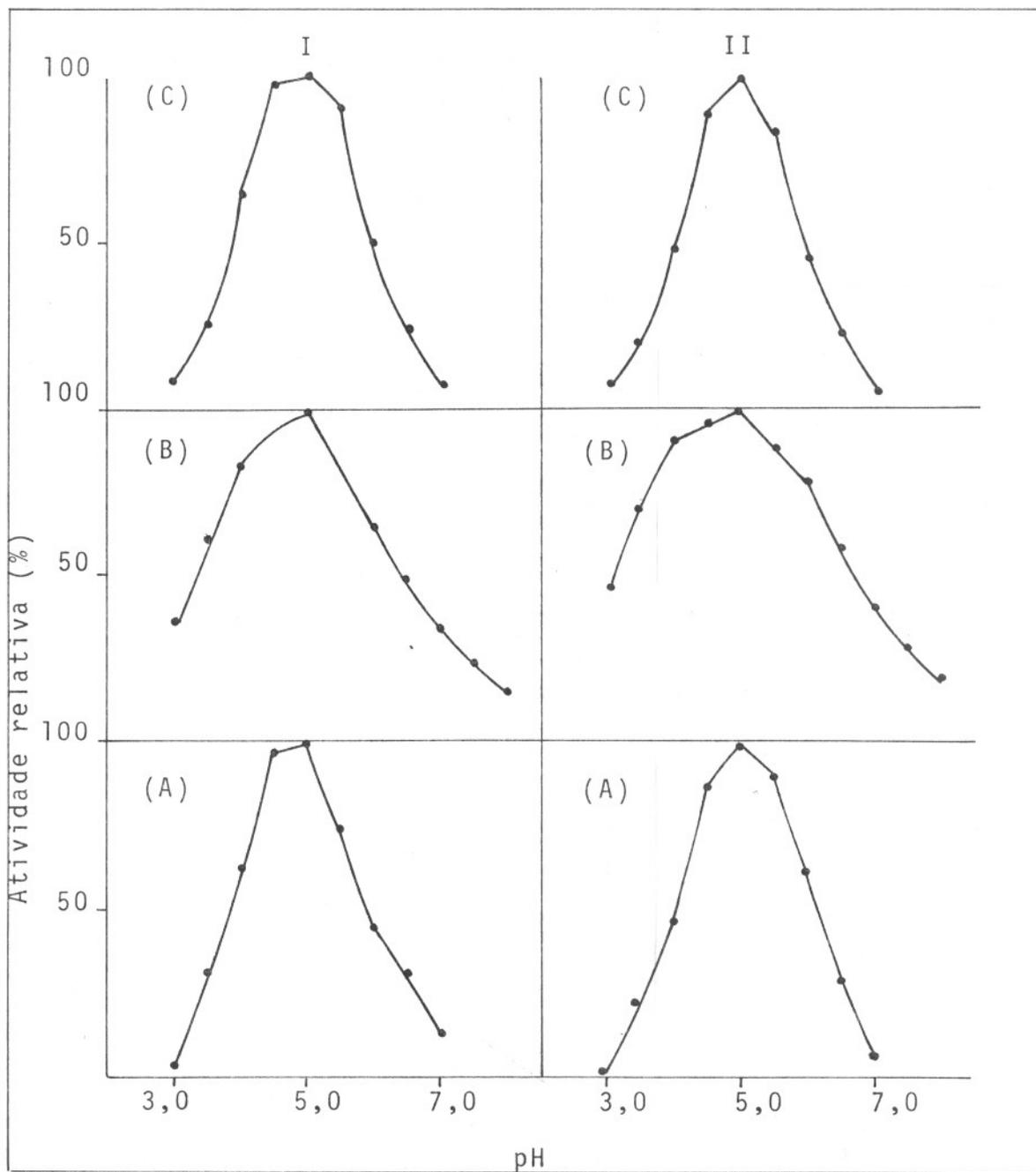


FIGURA 7: - Efeito do pH na hidrólise do PNP-galactose (A), da melibiose (B) e da rafinose (C) pelas α -galactosidases I e II da soja.

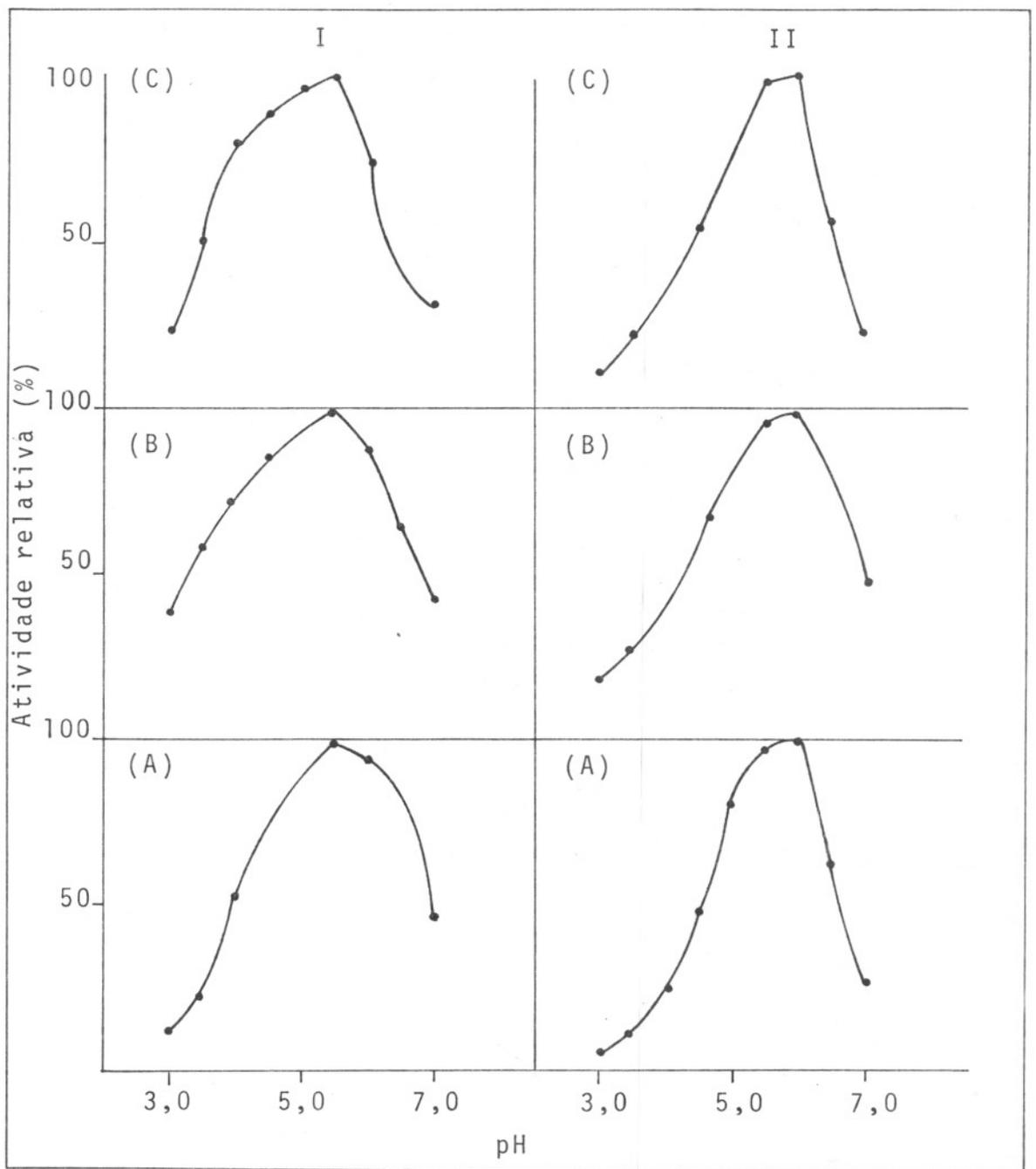


FIGURA 8: - Efeito do pH na hidrólise do PNP (A), da melibiose (B) e da rafinose (C) pelas α -galactosidases I e II do feijão.

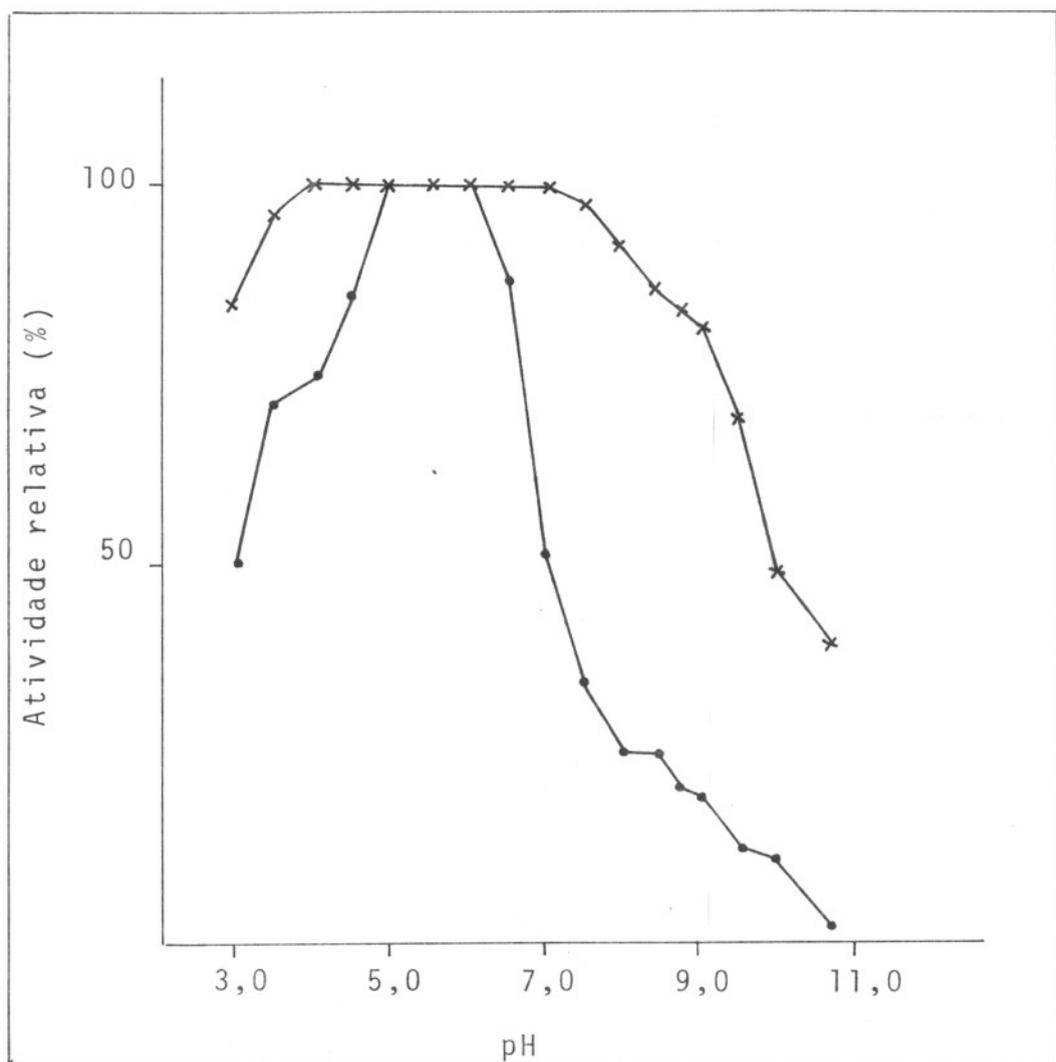


FIGURA 9: - Influência do pH na estabilidade da α -galactosidase da soja.

●—● tratada a 55°C durante 20 minutos.

x—x tratada a 4°C durante 96 horas.

Substrato: PNPG

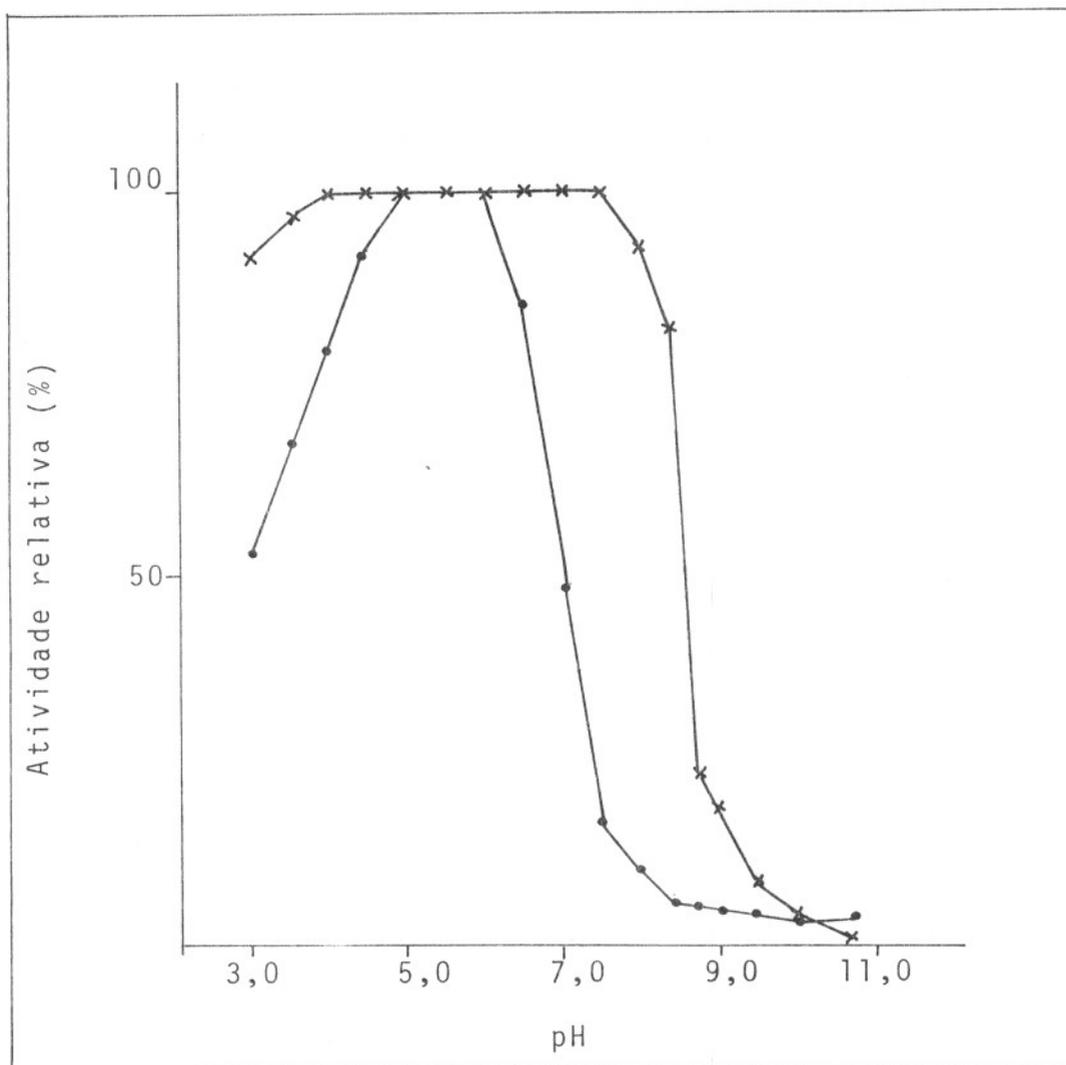


FIGURA 10: - Influência do pH na estabilidade da α -galactosidase do feijão.

●—● tratada a 55°C durante 20 minutos.

x—x tratada a 40°C durante 96 horas.

Substrato: PNPG

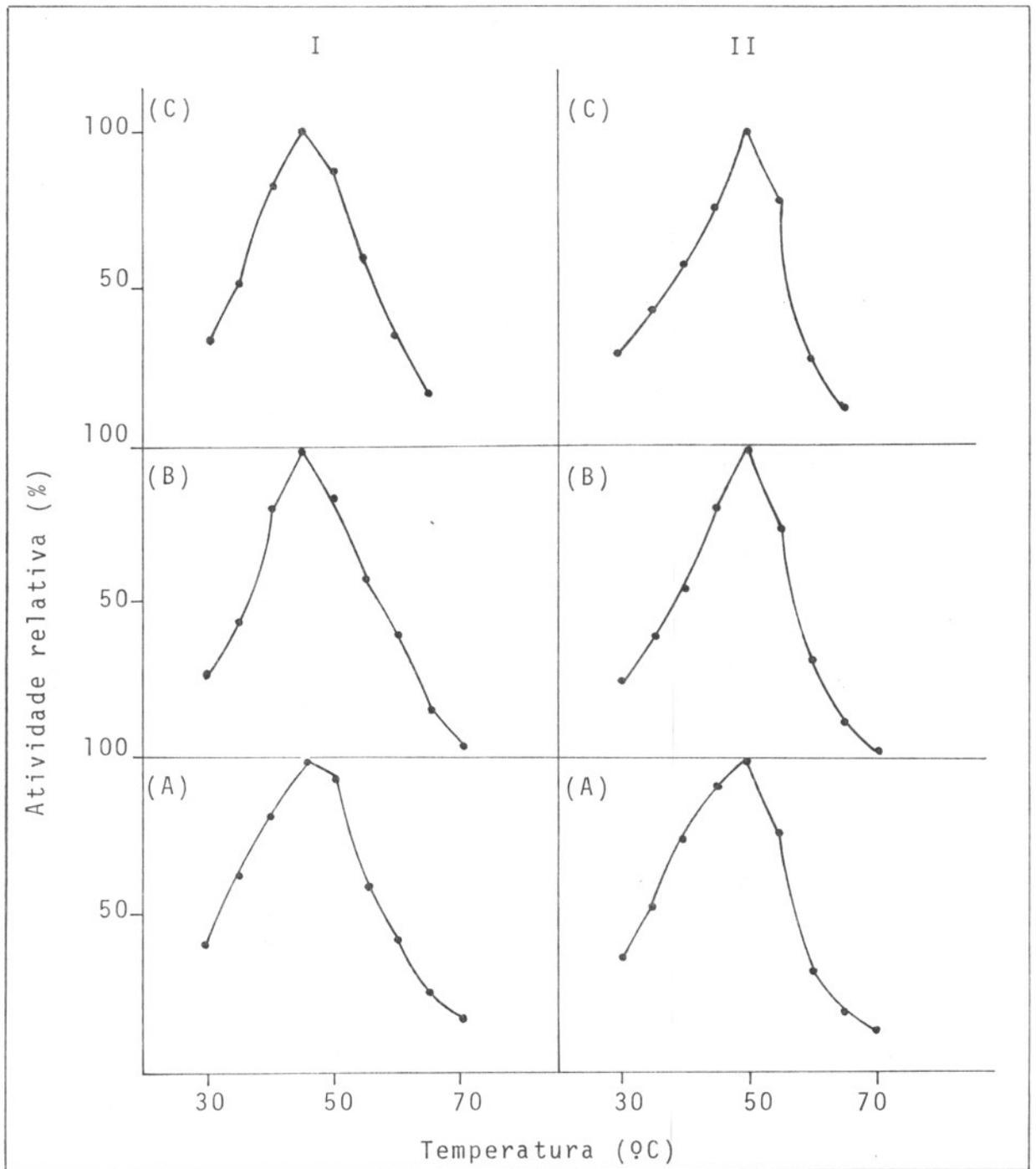


FIGURA 11 - Efeito da temperatura na hidrólise do PNP-G (A), da melibiose (B) e da rafinose (C) pelas α -galactosidases I e II da soja.

ma foi observada a 55°C, sendo que, para o substrato rafinose, houve um decréscimo de cerca de 40% na velocidade de hidrólise a 60°C para as duas frações em estudo (Figura 12).

A α -galactosidase presente nos extratos de soja e de feijão, quando submetida a tratamento térmico, durante 15 minutos, resistiu até 50°C, embora, para o caso da fração I do feijão, tenha havido uma ligeira perda desta estabilidade em temperatura ligeiramente inferior a 50°C, conforme pode ser verificado nas Figuras 13 e 14.

A velocidade de desnaturação da estrutura protéica é ilustrada nas Figuras 15 e 16.

4.3.3- Determinação da energia de ativação (E_a)

A energia de ativação calculada pela inclinação da reta obtida da equação de *Arrhenius* mostrou que a relação $\log V_{max}$ versus $1/T$ (temperatura em graus absolutos, °K) para a faixa de temperatura de 30 a 45°C era linear (Figuras 17 e 18).

Os valores calculados para as frações I e II da enzima presente na soja foram aproximadamente 10,32 e 11,80; 16,22 e 15,04; 14,15 e 12,38 Kcal/mol e para as frações do feijão, 7,03 e 11,58; 9,14 e 15,05; 11,25 e 18,53 Kcal/mol, quando os substratos utilizados foram PNPg, melibiose e rafinose, respectivamente.

4.3.4- Efeito da concentração de substrato na velocidade de catálise enzimica

No estudo do efeito de diferentes concentrações de substrato na velocidade de reação foram utilizados os substratos PNPg, melibiose e rafinose. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados, de acordo com o método de LINEWEAVER-BURK (43) e os gráficos obtidos para

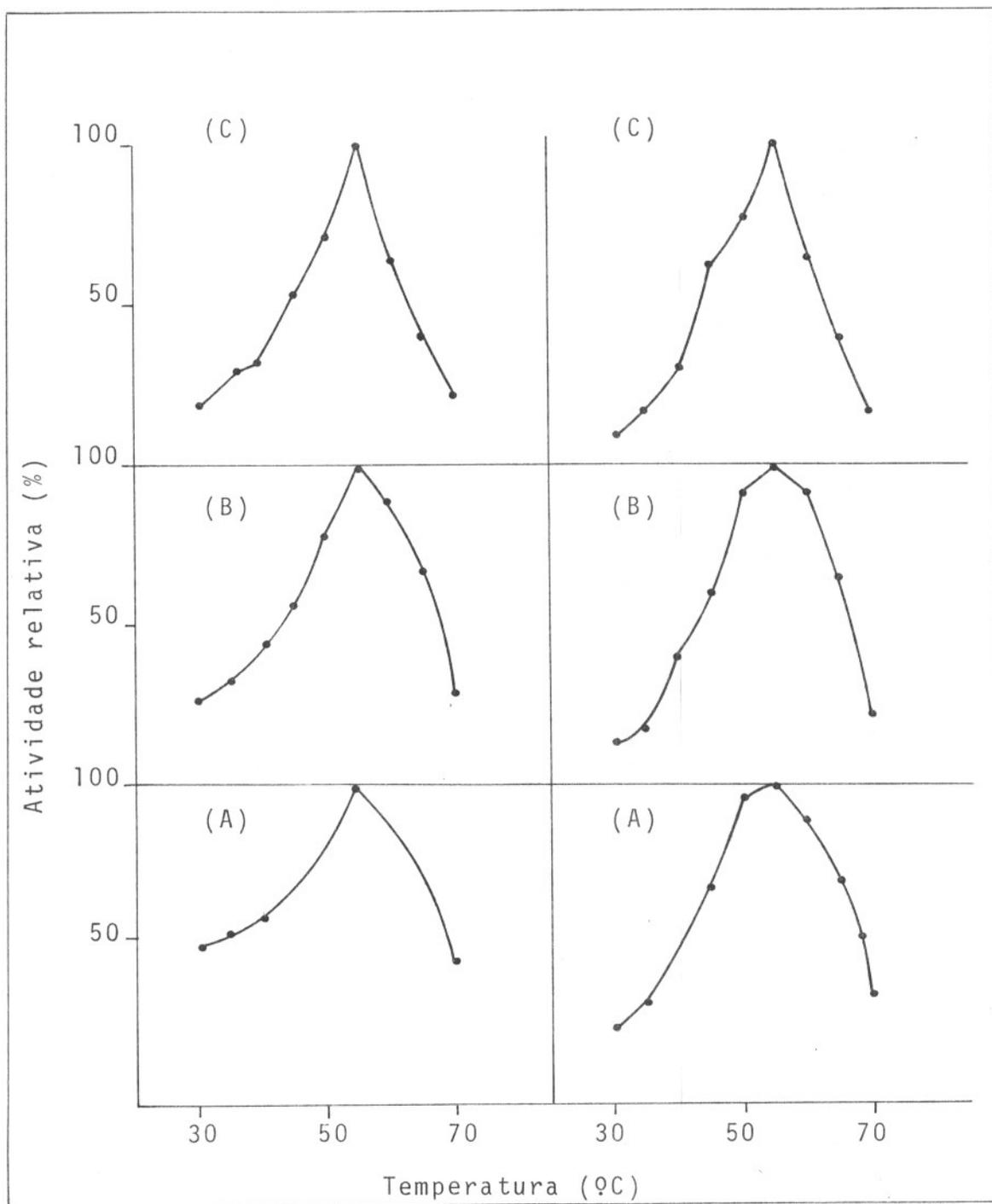


FIGURA 12: Efeito da temperatura na hidrólise do PNP (A); da melibiose (B) e da rafinose (C) pelas α -galactosidases I e II do feijão.

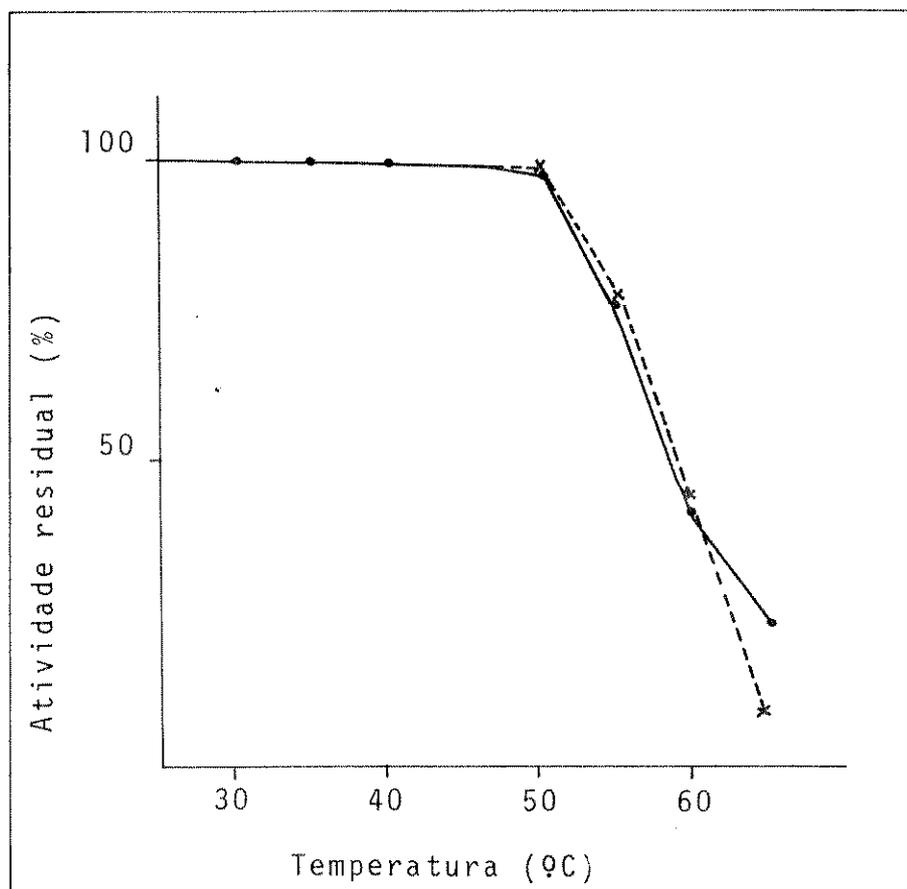


FIGURA 13: - Influência da temperatura na estabilidade das α -galactosidases I (●—●) e II (x—x) da soja.
Substrato: PNPG; 15 minutos de incubação.

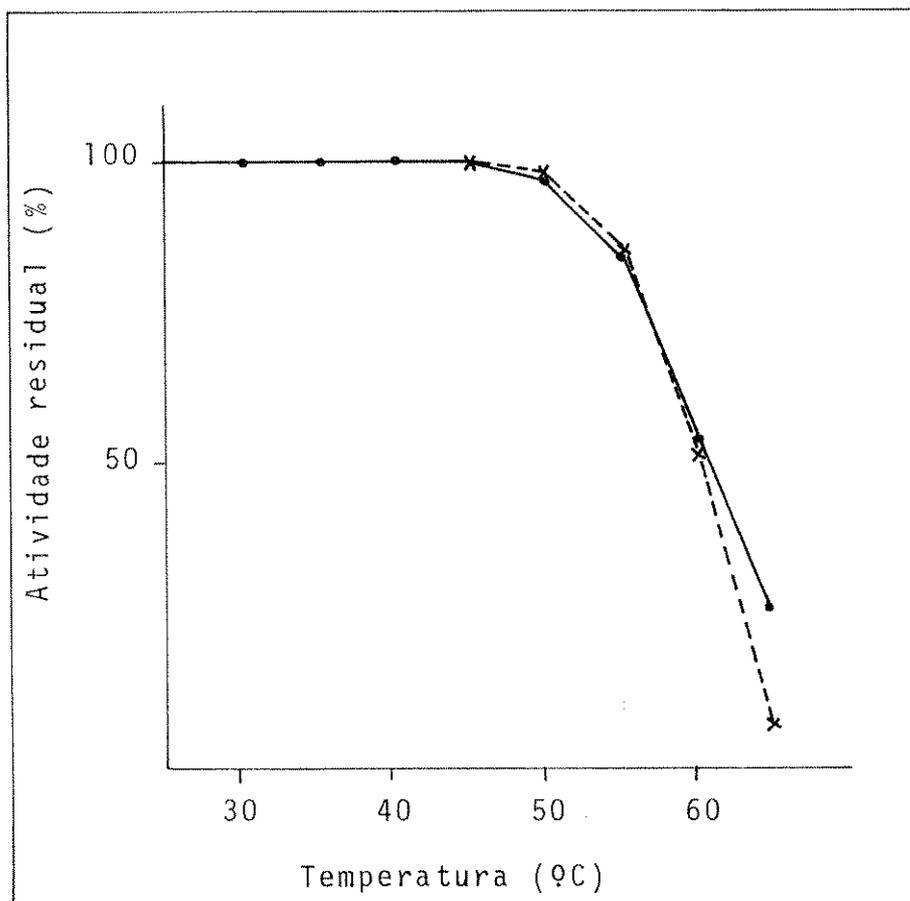


FIGURA 14: - Influência da temperatura na estabilidade das α -galactosidases I (●—●) e II (x—x) do feijão.

Substrato: PNPg; 15 minutos de incubação.

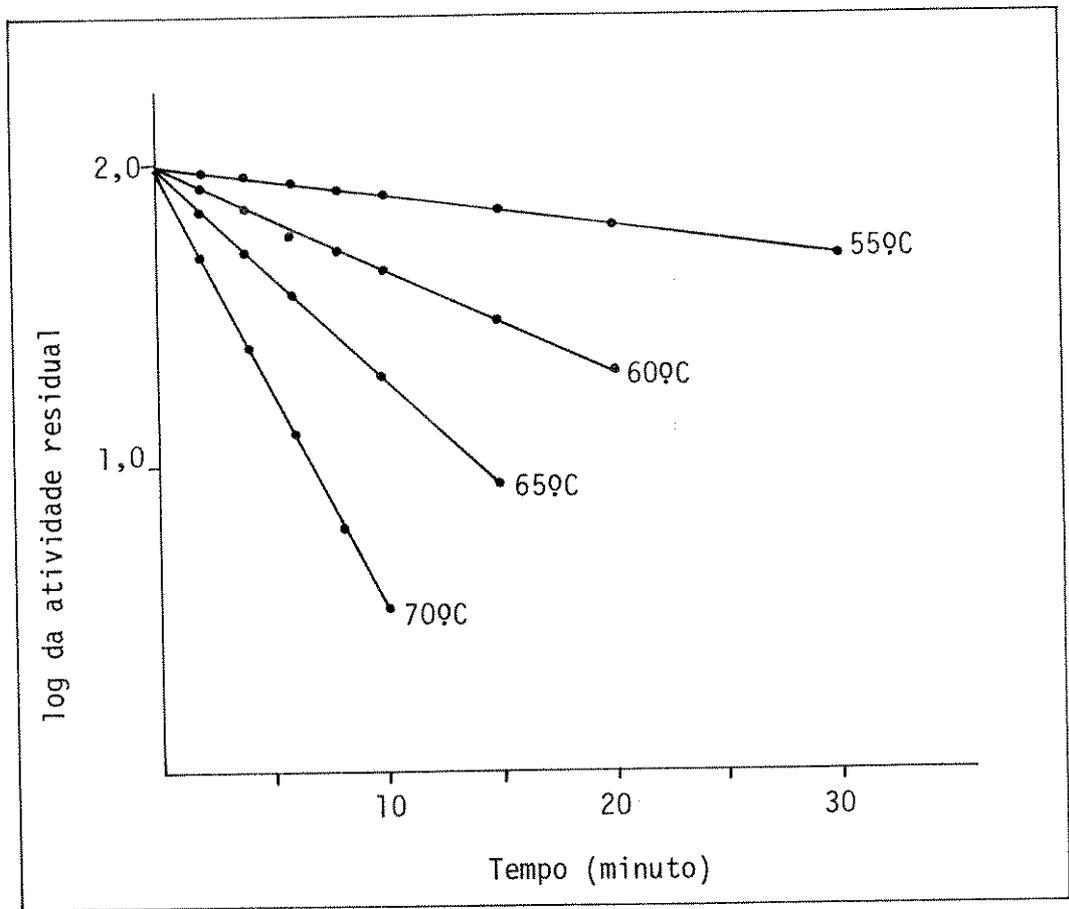


FIGURA 15- Inativação térmica da α -galactosidase da soja.

Substrato: PNPG

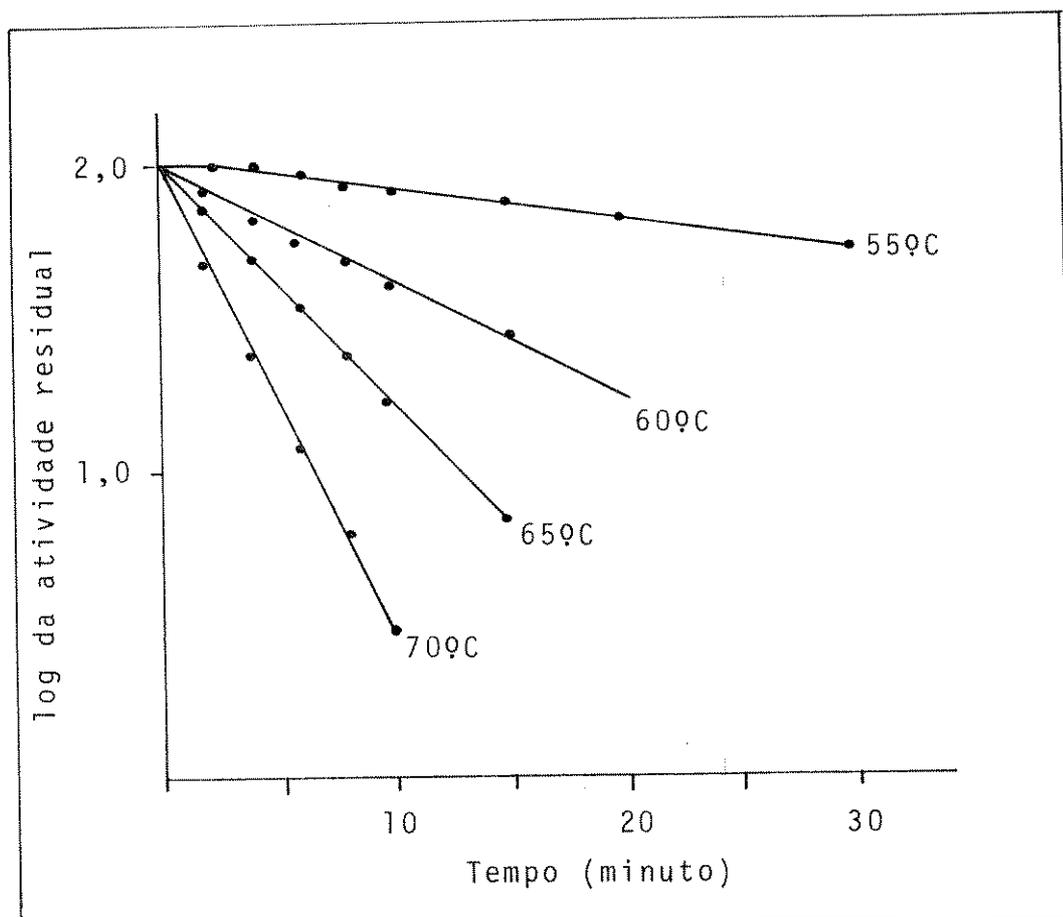


FIGURA 16- Inativação tērmica da α -galactosidase do feijão.

Substrato: PNPG

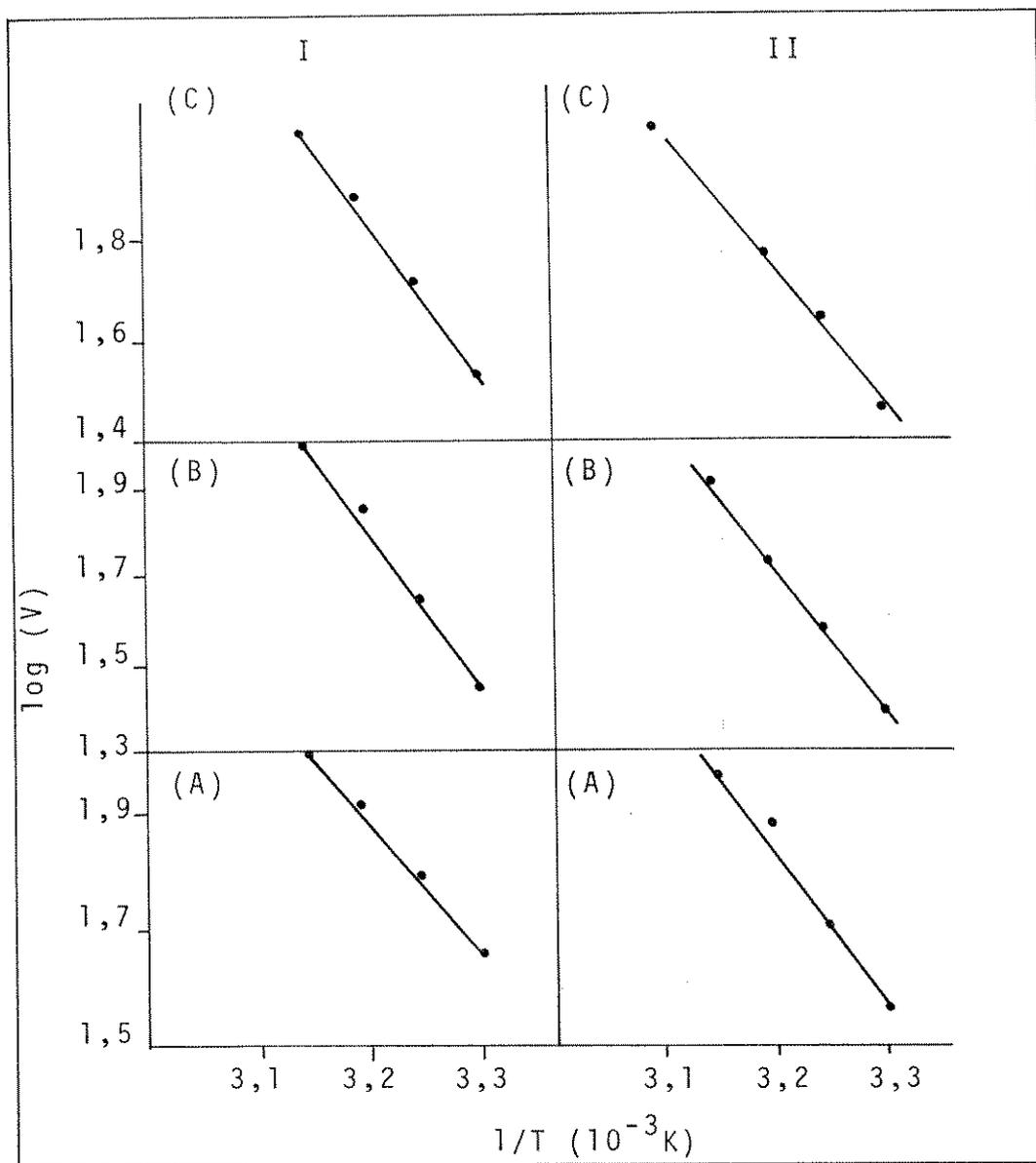


FIGURA 17: - Energia de ativação das α -galactosidases I e II da soja, determinada para os substratos PNPG (A); melibiose (B) e rafinose (C).

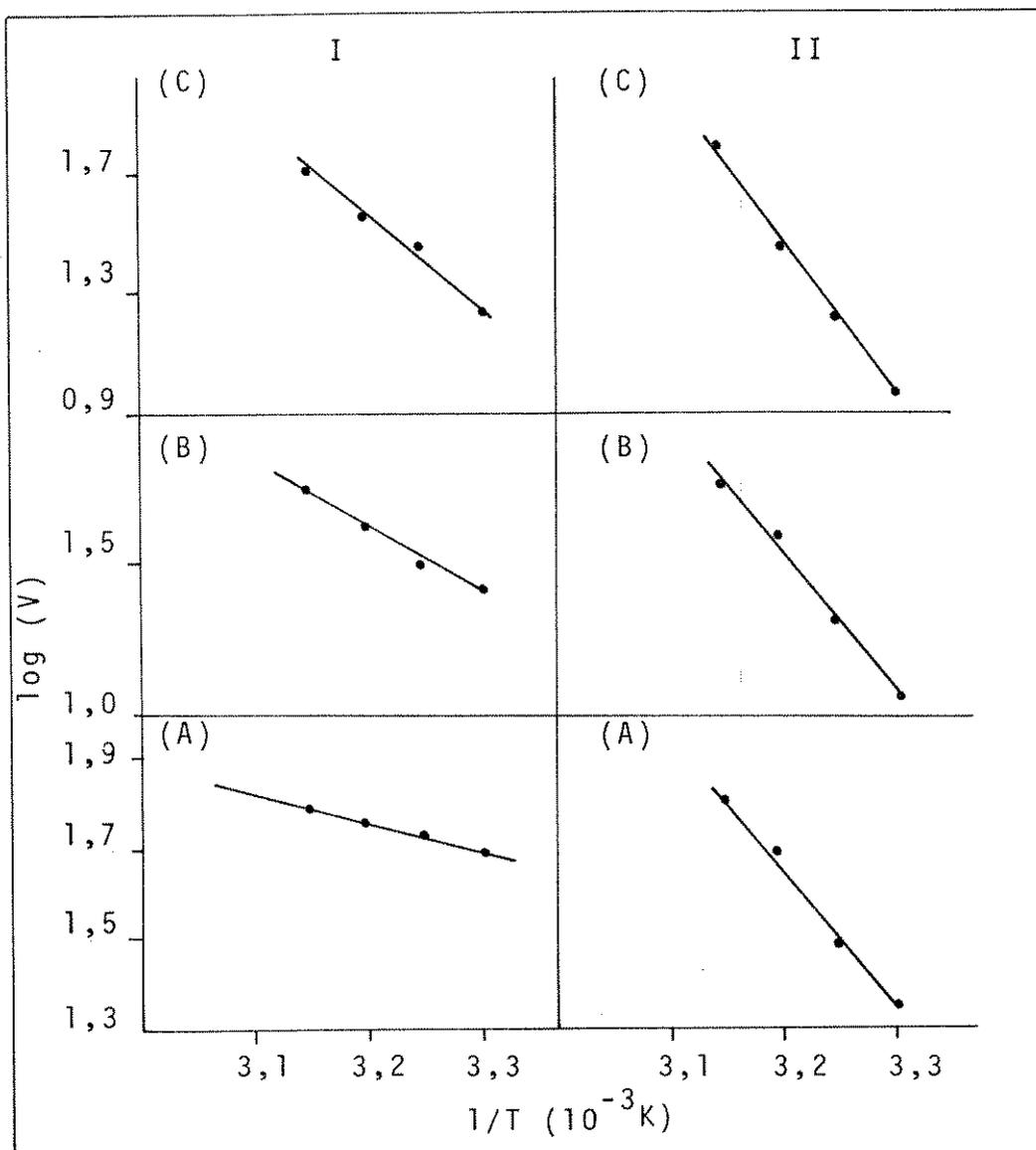


FIGURA 18: Energia de ativação das α -galactosidases I e II do feijão, determinada para os substratos PNPG (A); melibiose (B) e rafinose (C).

as enzimas da soja e do feijão, quando o substrato em estudo foi o PNPG, são apresentados nas Figuras 19 e 20.

Para as α -galactosidases I e II presentes na soja, os valores de K_m encontrados para PNPG, melibiose e rafinose foram 0,857 e 0,706mM; 4,288 e 3,533mM; 74,059 e 60,664mM, respectivamente. Os valores de V_{max} foram calculados em 24,691 e 36,364 μ moles PNP/minuto/mg de proteína; 34,265 e 50,464 μ moles de glicose/minuto/mg de proteína; 58,826 e 86,637 μ moles de galactose/minuto/mg de proteína.

Para as enzimas I e II do feijão, os valores de K_m foram calculados em 0,278 e 0,714mM; 1,004 e 2,578mM; 25,205 e 64,736mM, respectivamente, para PNPG, melibiose e rafinose, enquanto os valores de V_{max} foram 5,195 e 26,316 μ moles PNP/minuto/mg de proteína; 5,742 e 29,086 μ moles de glicose/minuto/mg de proteína; 4,849 e 24,516 μ moles de galactose/minuto/mg de proteína, para os mesmos três substratos.

4.3.5- Ação de substâncias inibidoras sobre a atividade enzimica

Os resultados obtidos para as frações I e II quer da soja, quer do feijão, mostraram comportamento semelhante frente às substâncias utilizadas no teste de inibição. Estas enzimas foram altamente sensíveis a íons de metais pesados como prata (Ag^+) e mercúrio (Hg^{+2}) (Quadro 5).

Iodocetamida não inibiu as α -galactosidases presentes no feijão, mesmo na concentração de 10mM; na soja, o efeito inibidor foi de apenas 9% para a mesma concentração. EDTA, mercaptoetanol e sulfato de manganês, na concentração de 10mM exerceram um leve efeito inibidor sobre as α -galactosidases da soja e do feijão; esse mesmo

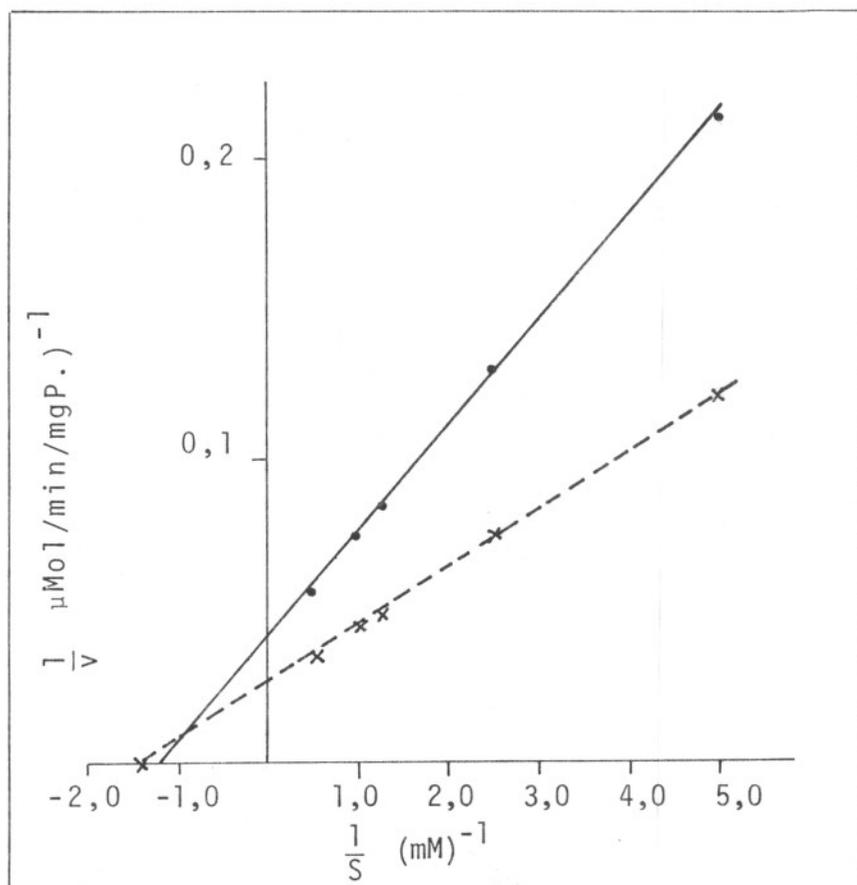


FIGURA 19: Efeito da concentração de substrato na hidrólise do PNPg pelas α -galactosidases I (●—●) e II (x—x) purificadas da soja.

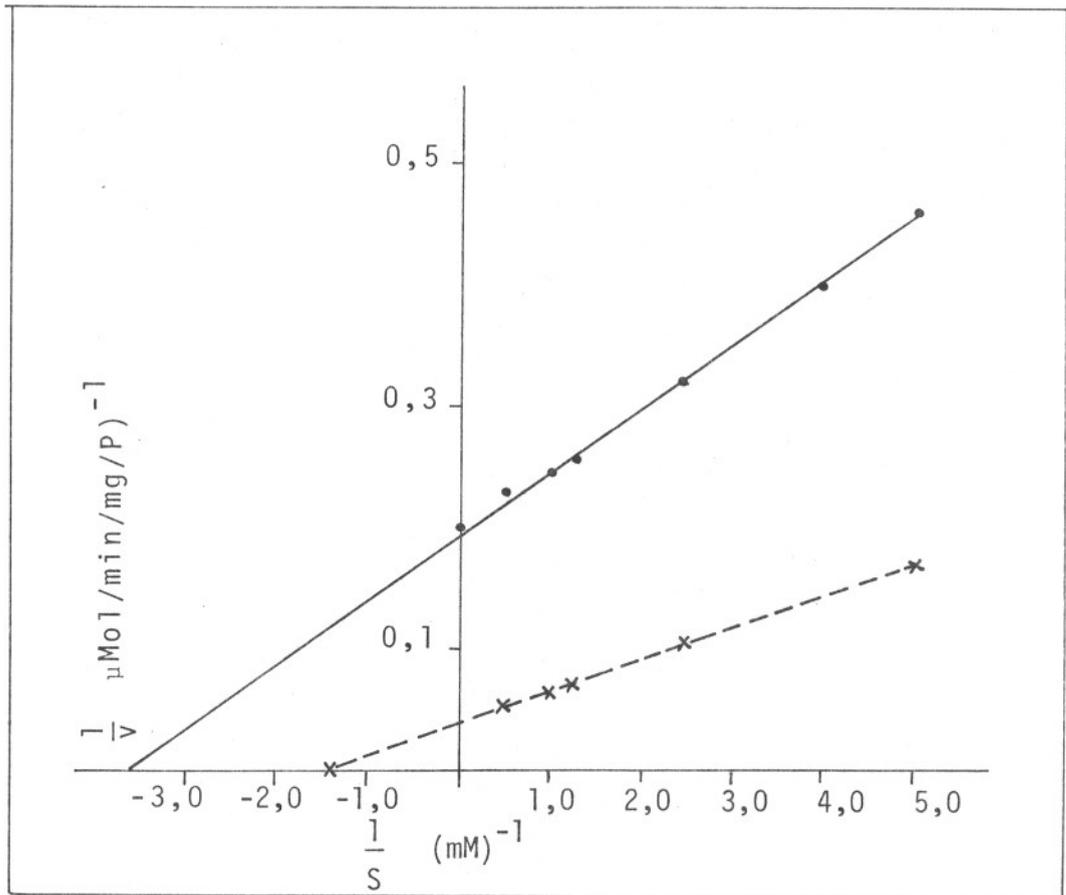


FIGURA 20: - Efeito da concentração de substrato na hidrólise do PNPG pelas α -galactosidases I (●—●) e II (x—x) purificadas do feijão.

QUADRO 5. Inibição da α -galactosidase da soja e do feijão por íons metálicos, monossacárides e outras substâncias.

Inibidores	Concentração (mM)	Atividade residual (%)*		Inibidores	Concentração (mM)	Atividade residual (%)*	
		Soja	Feijão			Soja	Feijão
Sem inibidor	-	100	100				
				Cloreto de cobalto	1,0	95,2	94,1
					5,0	84,1	68,6
					10,0	63,1	48,1
Cloreto de mercúrio	1,0	0	0		1,0	91,3	100,2
Cloreto de prata	1,0	0	0	Cloreto de zinco	5,0	88,3	86,2
Nitrato de prata	1,0	0	0		10,0	73,1	70,8
				EDTA	1,0	98,8	99,7
					5,0	94,9	98,4
					10,0	92,1	93,0
Frutose	5,0	99,5	100,2		1,0	95,3	102,4
	10,0	95,3	100,0	Iodoacetamida	5,0	93,2	100,4
	50,0	93,8	96,6		10,0	90,9	100,0
	100,0	92,2	79,5				
					1,0	93,3	101,2
Galactose	5,0	25,7	23,2	Mercaptoetanol	5,0	88,7	92,4
	10,0	19,8	16,9		10,0	85,4	84,1
	50,0	3,7	3,8				
	100,0	1,3	1,7				
					1,0	92,2	98,0
Glicose	5,0	96,4	102,1	Sulfato de magnésio	5,0	87,4	81,9
	10,0	94,6	101,3		10,0	81,5	72,3
	50,0	90,2	97,4				
	100,0	87,9	92,9				
					1,0	92,7	98,9
Cloreto de cálcio	1,0	88,9	99,6	Sulfato de manganês	5,0	87,4	96,2
	5,0	83,9	97,8		10,0	83,8	93,4
	10,0	75,0	95,4				

(*) Substrato: PNPG.

efeito foi exercido pelo cloreto de cálcio, nas mesmas condições, sobre as enzimas do feijão. Na soja, o cloreto de cálcio causou em torno de 25% de inibição em condições idênticas de concentração.

Os reagentes cloreto de cobalto, cloreto de zinco e sulfato de magnésio na concentração de 10mM inibiram de modo mais acentuado as α -galactosidases, tanto da soja quanto do feijão.

Dentre os reagentes testados, com exceção daqueles contendo os íons prata e mercúrio, todos os demais exibiram apenas um leve efeito inibidor sobre as α -galactosidases da soja e do feijão, quando a concentração dos inibidores usada no ensaio foi de 1mM.

Entre os monossacárides, a glicose e a frutose exerceram um pequeno efeito inibidor, mesmo em concentrações relativamente altas como 100mM, com exceção da frutose que inibiu em cerca de 20% as α -galactosidases do feijão. A galactose, um produto da reação hidrolítica, atuou como um forte inibidor, mesmo na concentração da ordem de 5mM.

Quando os monossacárides foram adicionados ao meio reativo, na concentração de 10mM para o caso da galactose e 50mM para glicose e frutose, contendo diferentes concentrações de PNPG, a glicose e a galactose inibiram competitivamente a hidrólise do substrato pelas enzimas em estudo, provocando alterações do K_m para 1,018 e 0,839 mM; 8,416 e 6,711mM para as enzimas I e II da soja e 0,301 e 0,774mM; 1,806 e 4,639mM para as frações I e II no feijão. A frutose comportou-se como um inibidor não competitivo. As Figuras 21 e 22 mostram o efeito inibidor destes açúcares.

4.3.6- Estimativa do peso molecular

O peso molecular da α -galactosidase foi determinado com base nos volumes de eluição de proteínas com pesos moleculares conheci-

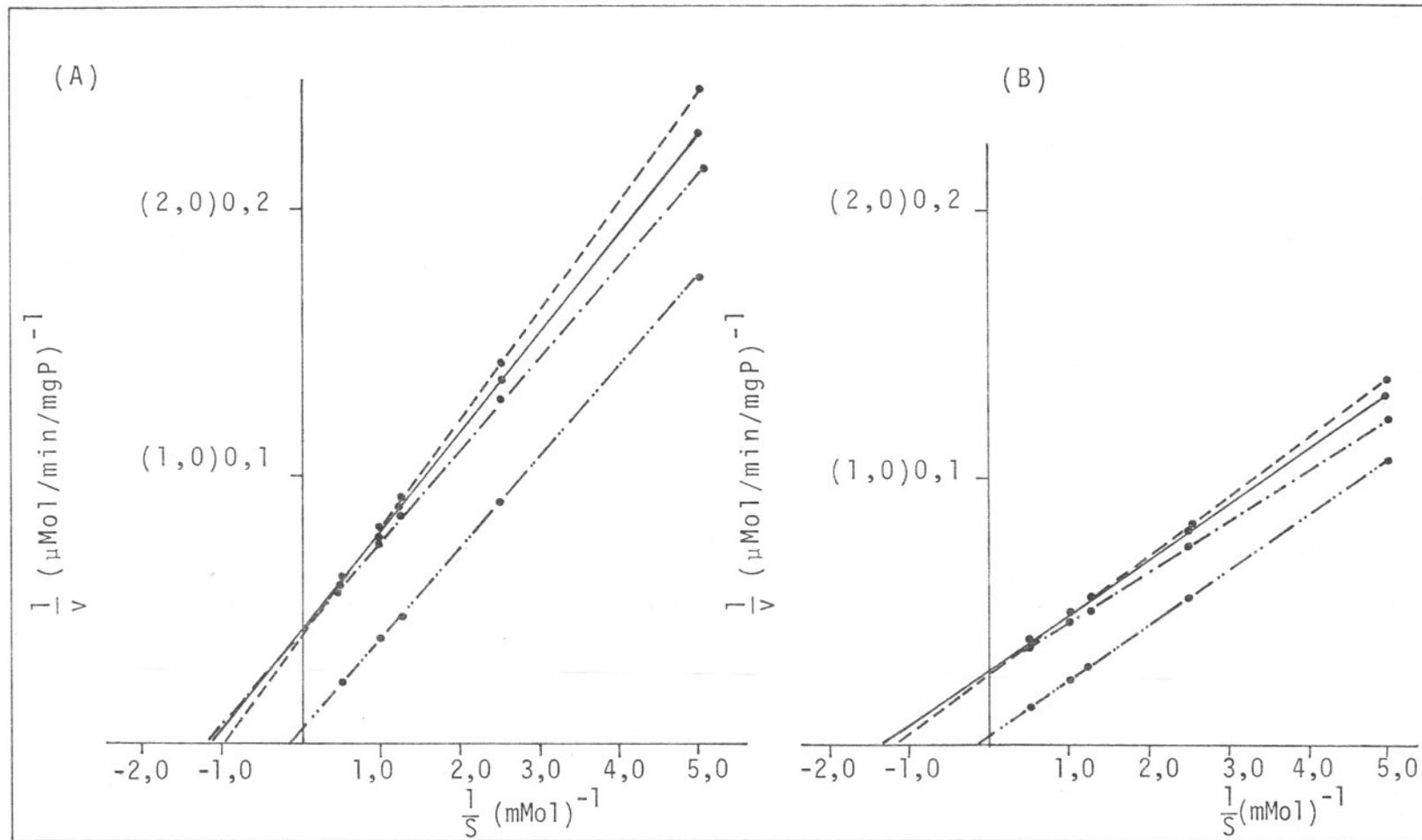


FIGURA 21: - Inibição da α -galactosidase da soja por monossacárides.

●-.-●: sem inibidor; ●- -●: glicose; ●-●-●: frutose; ●-...-●: galactose.

(A) α -galactosidase I; (B) α -galactosidase II.

Substrato: PNPG

Os números entre parênteses se referem à escala utilizada para galactose.

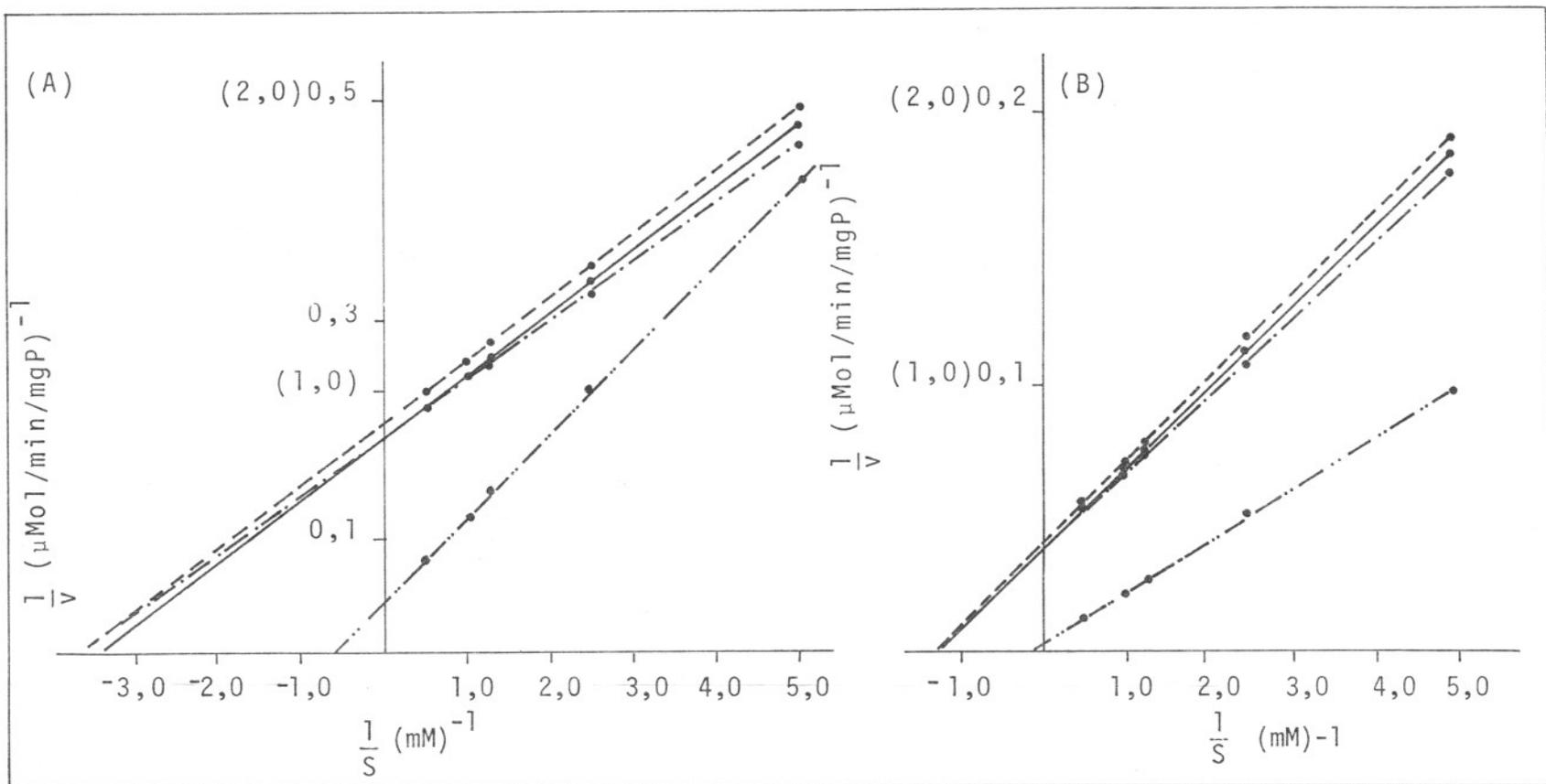


FIGURA 22: - Inibição da α -galactosidase do feijão por monossacárides.

●—●—●: sem inibidor; ●—●: glicose; ●—●: frutose; ●—●—●: galactose.

(A) - Enzima I; (B): Enzima II.

Substrato: PNPg.

Os números entre parênteses se referem à escala utilizada para galactose.

dos, obtidos a partir de filtração em coluna de Sephadex G-100. Na soja, a atividade da enzima foi encontrada num volume de eluição correspondente a um peso molecular aparente de 136.000 dāltons para a fração I e 45.000 dāltons para a fração II. No feijão, os valores obtidos foram 140.000 e 49.000 dāltons para as frações I e II, respectivamente (Figura 23A).

A técnica de electroforese em gel de SDS- poliacrilamida também foi aplicada na determinação do peso molecular, e os valores calculados a partir do gráfico, relacionando o logaritmo do peso molecular contra a mobilidade electroforética (Figura 23B). Os valores estimados para as frações I e II da soja e do feijão foram, respectivamente, 126.000, 44.000; 130.000 e 47.000 dāltons.

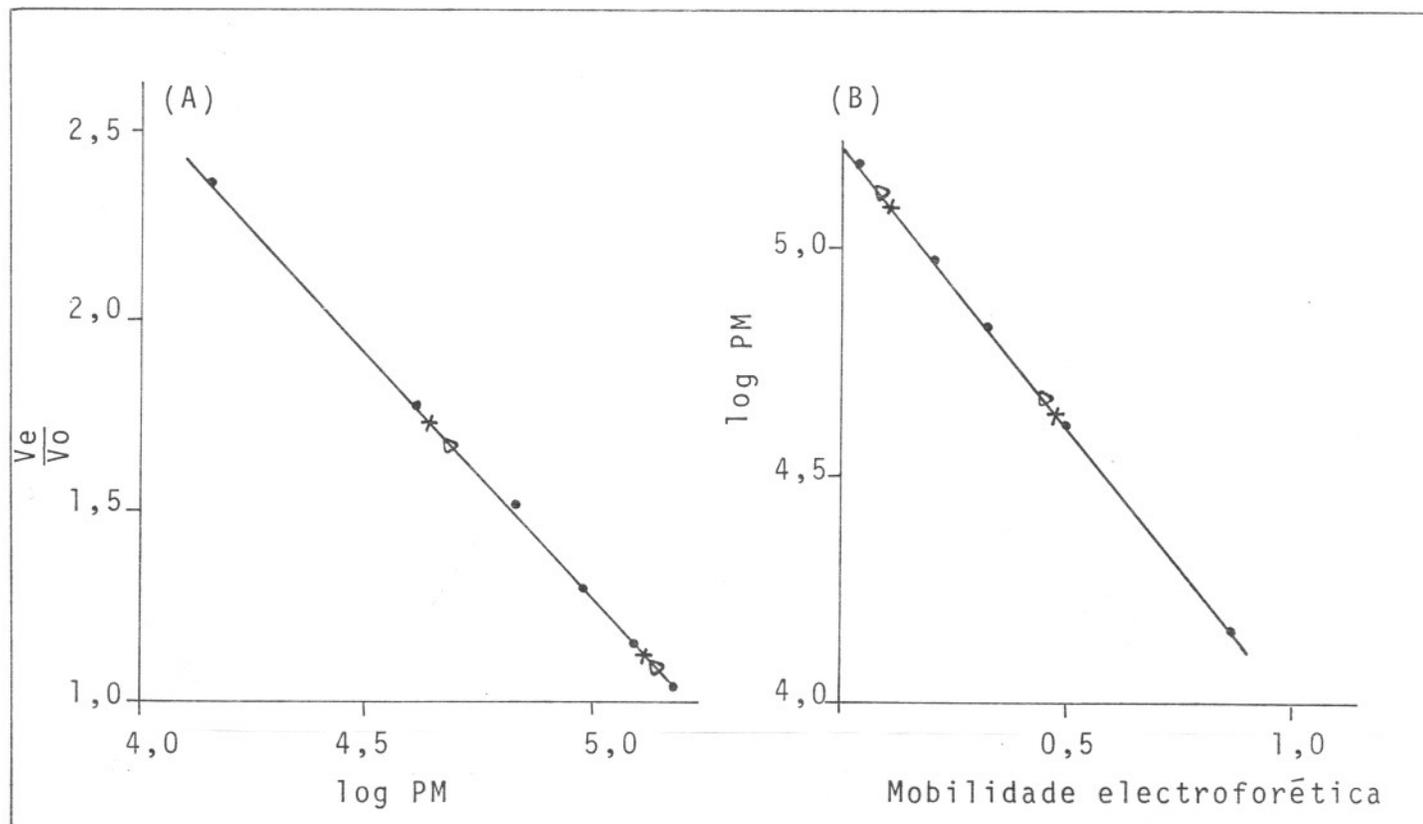


FIGURA 23: - Determinação do peso molecular da α -galactosidase.

(A) - Por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100;

(B) - Por electroforese em gel de SDS- poliácridamida.

x: soja; \blacktriangle : feijão

5- DISCUSSÃO

Embora sejam freqüentes as citações na literatura sobre a ocorrência de oligossacárides em grãos de vegetais e da participação da α -galactosidase na hidrólise destas reservas de energia, são praticamente inexistentes os dados sobre a atividade desta enzima em leguminosas correntemente consumidas por populações brasileiras.

Como afirmado anteriormente, os oligossacárides contendo unidades de α -galactose em suas estruturas, como a rafinose e a estaquiose, estão presentes em sementes de leguminosas em níveis variados, de acordo com a variedade considerada e conforme o estágio de maturação da planta (68, 69). Além disso, a velocidade de hidrólise destes materiais de reserva também é variável.

Como pode ser observado no Quadro 2, a atividade enzimica foi detectada nos extratos brutos de todas as sementes estudadas. De modo geral, as cultivares de soja apresentaram cerca de 40 a 60% mais atividade que as de feijão. A comparação destes dados com os existentes na literatura, para outras sementes, torna-se difícil, tendo em vista os diversos fatores que influenciam na composição da semente e nas diferentes condições experimentais.

Uma vez conhecida a existência, no grão, de atividade de α -galactosidase, foram selecionadas as cultivares Paranã e Carioca-80 de soja e feijão, respectivamente, que apresentaram maior atividade en

zímica, a fim de se realizar estudos de purificação e de se conhecer as propriedades bioquímicas desta enzima.

O tratamento com sulfato de amônio a 80% de saturação e a etapa subsequente, isto é, a cromatografia em coluna de Sephadex G-25 contribuíram para a concentração do teor de proteínas, dessalinização dos extratos e remoção de compostos de baixo peso molecular presentes nas amostras. Analisando os Quadros 3 e 4, observa-se um comportamento diferenciado entre os extratos enzimáticos de soja e de feijão. Na soja, as técnicas de precipitação com sulfato de amônio e de cromatografia em coluna de Sephadex G-25 contribuíram para a obtenção de um extrato aproximadamente 1,86 vezes mais puro que o inicial, recuperando-se em torno de 74% da atividade enzimática. Entretanto, para o feijão, estes mesmos tratamentos levaram a um fator de purificação de apenas 1,22 vezes e uma recuperação da atividade enzimática ao redor de 65%. Este comportamento diferente, provavelmente, seja decorrente dos maiores níveis de galactomanas existentes nos grãos de feijão, que formam soluções viscosas em presença de água, dificultando os procedimentos de purificação (22, 48).

A técnica de fracionamento das α -galactosidases da soja e do feijão, baseada em troca iônica, mostrou que ambas as enzimas não foram adsorvidas pela resina, sendo eluídas em um único pico, logo no início da separação, evidenciando tratar-se de enzimas com predominância de cargas positivas. Estes resultados estão de acordo com experimentos anteriores realizados por AGRAWAL & BAHL (1) com sementes de *Phaseolus vulgaris* (v. Pinto), usando cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50. Por outro lado, quando estes autores submetem a fração contendo α -galactosidase em mistura com outras glicosidases à separação em CM-Sephadex C-50 e em coluna de alumina, a α -galactosidase foi fortemente adsorvida, não sendo resolvida posteriormente.

A completa separação das enzimas em estudo s̄o foi possıvel utilizando-se filtraç̄o molecular em Sephadex G-100. Esta t̄cnica permitiu a separaç̄o de duas fraç̄oes ativas, com proporç̄oes diferentes entre si e entre as amostras estudadas (Figuras 4 e 5).

As enzimas I e II da soja e do feij̄o n̄o pareceram ser artefatos decorrentes das etapas de purificaç̄o, pois ambas as fraç̄oes foram detectadas quando, em ensaios preliminares, os extratos brutos destas amostras foram submetidos à filtraç̄o molecular em Sephadex G-100.

A obtenç̄o de duas formas da enzima est̄a coerente com os trabalhos desenvolvidos com enzimas de origem vegetal (9, 23, 60) e tamb̄m com a produzida por *Mortierella vinacea* (78), que mostram uma resoluç̄o de pelo menos duas formas moleculares da enzima, ap̄s filtraç̄o em gel.

Estes resultados, quando considerados em conjunto com os obtidos na electroforese em gel da poliacrilamida (Figura 6), sugerem que as isoenzimas apresentam diferenç̄as quanto ao peso molecular. Estas diferenç̄as sugeridas foram comprovadas experimentalmente, e os valores dos pesos moleculares obtidos foram diferentes para as duas fraç̄oes da soja e do feij̄o, sendo que os valores aparentes para as fraç̄oes de menor peso molecular (enzima II) representaram a terç̄a parte daqueles obtidos para as fraç̄oes de maior peso molecular (enzima I). Estes dados s̄o apresentados no Quadro 6, que resume os resultados obtidos a partir dos estudos das propriedades bioquımicas das α -galactosidases da soja e do feij̄o, e s̄o semelhantes aos relatados para algumas enzimas de sementes (9, 48).

MCCLEARY & MATHESON (48) mostraram a presenç̄a de m̄ltiplas formas moleculares de α -galactosidase (designadas A, B e C) em sementes germinadas de v̄rias leguminosas. Realizaram a separaç̄o das isoenzimas por cromatografia em DEAE-celulose. As formas A e C foram co-

QUADRO 6. Propriedades das α -galactosidases da soja e do feijão.

Parâmetros	Substrato*	α -galactosidase da soja		α -galactosidase do feijão	
		I	II	I	II
pH ótimo	a	5,0	5,0	5,5	6,0
	b	5,0	5,0	5,5	6,0
	c	5,0	5,0	5,5	6,0
Temperatura ótima (°C)	a	45	50	55	55
	b	45	50	55	55
	c	45	50	55	55
pH de estabilidade					
96 horas - 4°C	a	4,0-7,0	4,0-7,0	4,0-7,5	4,0-7,5
20 min - 55°C	a	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-6,0
Temperatura de es- tabilidade (°C)	a	50	50	50	50
Energia de ativa- ção (Kcal/mol)	a	10,32	11,80	7,03	11,58
	b	16,22	15,04	9,14	15,05
	c	14,15	12,38	11,25	18,53
Km (mM)	a	0,857	0,706	0,278	0,714
	b	4,288	3,533	1,004	2,578
	c	74,059	60,664	25,205	64,736
Vmax (μ moles de produ- to/min/mgP)	a	24,691	36,364	5,195	26,316
	b	34,265	50,464	5,742	29,086
	c	58,826	86,637	4,849	24,516
Peso molecular					
Sephadex-G-100		136.000	45.000	140.000	49.000
SDS-poliacrilamida		126.000	44.000	130.000	47.000

* a = PNPG

b = Melibiose

c = Rafinose

muns em todas as sementes analisadas. Por cromatografia em coluna de Sephadex G-200, a enzima C da soja foi posteriormente resolvida em duas outras frações ativas, denominadas I e II. A forma A também estava presente nas sementes que não foram submetidas à germinação e seu nível não aumentou significativamente durante o processo germinativo. Sugeriu-se que as formas A e B, confinadas na parte cotilédone-embrião das sementes, são responsáveis principalmente pela hidrólise dos α -D-galactoligossacárides. A forma C, por outro lado, é uma enzima presente no endosperma, e tem sua atividade aumentada rapidamente na germinação da semente, exceto na soja, que tem um nível muito baixo de galactomanas. A enzima C mostrou-se altamente específica para a hidrólise de galactomanas.

O conhecimento dos efeitos do pH e da temperatura sobre a ação catalítica da enzima são fatores muito importantes, especialmente quando se considera a utilização prática desta enzima. Para a hidrólise dos oligossacárides presentes no extrato de soja, tem sido sugerida a utilização de preparações de α -galactosidase com relativa termoestabilidade e com elevada atividade no pH natural do extrato de soja, ou seja, aproximadamente a pH 6,3 (18, 49, 73).

As α -galactosidases I e II da soja apresentaram um mesmo valor ótimo de pH, situado em 5,0 para os três substratos estudados. Somente quando ensaiadas com melibiose as enzimas produziram um pico relativamente largo, sendo que a enzima II apresentou mais de 78% da atividade máxima a pH 6,0.

A fração I do feijão exibiu uma atividade máxima a pH 5,5 e a fração II a pH 6,0, para os três substratos pesquisados. A atividade enzimica das enzimas do feijão, em função do pH, quando o substrato utilizado foi melibiose, também exibiu uma faixa relativamente larga, de forma semelhante à verificada para as enzimas da soja frente ao mesmo substrato.

Com respeito à temperatura, a hidrólise máxima foi verificada, respectivamente, a 45°C e a 50°C para as frações I e II da soja e a 55°C para ambas as enzimas do feijão, para os três substratos estudados. As duas frações do feijão, quando o PNPG foi o substrato ensaiado, ainda apresentavam cerca de 70% da atividade máxima a 65°C.

A atividade catalítica das enzimas I e II da soja e do feijão se manteve estável na faixa de pH de 4,0 a 7,0 e de 4,0 a 7,5, respectivamente, quando mantidas à temperatura de 40°C. A estabilidade destas enzimas ao calor foi observada entre pH 5,0 e 6,0, comportamento este que se mostrou semelhante para a soja e o feijão. Além disso, a ação catalítica destas enzimas se manteve estável em temperaturas na faixa de 30 a 50°C, com exceção da fração I do feijão, que apresentou uma discreta diminuição de atividade a 50°C. Porém, a 65°C, tanto as enzimas da soja quanto as do feijão, foram praticamente inativadas. A desnaturação térmica das α -galactosidases das amostras ora em estudo seguiu uma cinética de primeira ordem em todas as temperaturas ensaiadas.

No entanto, estudos comparativos destes resultados com os obtidos para a α -galactosidase de outras fontes tornaram-se difíceis, devido às diferentes condições experimentais utilizadas.

AGRAWAL & BAHL (1) demonstraram, em estudos com sementes germinadas de *Phaseolus vulgaris*, que a α -galactosidase apresentava um máximo de atividade a pH 6,5-6,7, com o PNPG como substrato e que esta atividade se manteve estável ao redor do pH ótimo, isto é, na faixa de pH 4,6 a 8,0. Contudo, estes autores não fizeram qualquer menção quanto à existência de múltiplas formas moleculares da enzima, assumindo-se que a forma enzimática por eles estudada tenha sido a fração II.

KON & WAGNER (39), trabalhando com α -galactosidases extraídas de sementes dormentes e germinadas de *Phaseolus vulgaris* e parcial-

mente purificadas, verificaram que ambas as preparações enzimáticas apresentavam valores de pH ótimo semelhantes, situados entre 5,7 e 6,1 com PNPG como substrato e na faixa de pH 4,4 a 5,3 com a melibiose. A temperatura ótima de atividade observada foi ao redor de 55°C, sendo que, acima desta temperatura, a enzima entrou em processo de inativação.

Os estudos das propriedades cinéticas das α -galactosidases purificadas evidenciaram maior afinidade da enzima pelo substrato PNPG, do que para os substratos melibiose e rafinose. Este fato foi constatado pelos menores valores de K_m apresentados, quando da utilização do PNPG como substrato (Quadro 6), comportamento este já verificado para a maioria das α -galactosidases de diferentes fontes (23, 35, 45, 61, 81). A enzima produzida por *Mortierella vinacea* (78) apresentou valores de K_m muito próximos para os substratos sintéticos ONPG e PNPG e para a melibiose.

As α -galactosidases I e II da soja hidrolisaram a rafinose mais rapidamente que a melibiose e que o PNPG. Além disso, os valores de energia de ativação para a rafinose foram menores do que os obtidos para a melibiose. Estes resultados sugerem que a rafinose é um substrato muito útil para as α -galactosidases da soja.

As enzimas I e II do feijão mostraram maior velocidade de hidrólise para a melibiose do que para a rafinose. A energia de ativação para a melibiose também foi menor em relação à rafinose. Neste caso, os resultados revelam que a melibiose é melhor substrato para as α -galactosidases do feijão do que a rafinose.

O PNPG mostrou ser inibidor, em altas concentrações, com ambas as formas enzimáticas (I e II) do feijão. Este comportamento, entretanto, não foi observado nas enzimas da soja com este mesmo substrato. Quando os oligossacáridos contendo galactose em suas estruturas, como a melibiose e a rafinose, foram usados como substrato, não

se observou qualquer efeito inibidor. Efeitos semelhantes têm sido relatados para α -galactosidases de outras fontes (25, 46, 81, 82).

As α -galactosidases provenientes da soja e do feijão foram totalmente inibidas pela ação dos íons metálicos prata e mercúrio. A atividade enzimática, no feijão, não foi afetada pela iodoacetamida e, na soja, este reagente exerceu apenas uma ligeira inibição. O fato destas enzimas não terem sido inibidas pela iodoacetamida, que pertence à classe dos chamados "reagentes sulfidrílicos", evidencia que os grupamentos -SH não são importantes para a atividade catalítica da enzima. Sugere, ainda, a possibilidade de que outros grupamentos, também afetados por metais pesados, porém, não pelos "reagentes sulfidrílicos", como grupos carboxílicos e resíduos de histidina, estejam presentes no sítio ativo da enzima.

Por outro lado, as α -galactosidases de outras fontes, especialmente as de origem microbiana (3, 42, 49, 77) se mostraram dependentes de grupos -SH para a sua atividade catalítica. DEY & PRIDHAM (24, 25) demonstraram, mediante estudos envolvendo fotoxidação, emprego de diferentes concentrações de íons prata e mercúrio, em diversos valores de pH e também com a utilização de reagentes sulfidrílicos, a ausência de grupos -SH e presença de resíduos de histidina no centro catalítico da α -galactosidase de sementes de *Vicia faba*.

A contribuição dos açúcares glicose e frutose, na inibição das α -galactosidases da soja e do feijão foi pequena, mesmo em concentrações de inibidor da ordem de 100mM. A frutose exerceu uma inibição maior, em torno de 20%, sobre as enzimas do feijão. Entretanto, a galactose mostrou-se um inibidor relativamente potente, em ambas as amostras em estudo e suas respectivas frações. É interessante notar que, de modo diferente ao de outras α -galactosidases já pesquisadas, as enzimas de *Bacillus* sp e de *Micrococcus* sp (3) não foram inibidas pela galactose, um produto da reação hidrolítica sobre a melibiose ou rafinose.

6- CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir:

1- As α -galactosidases da soja e do feijão são enzimas com predominância de cargas positivas.

2- A filtração molecular em Sephadex G-100 revelou a existência de duas formas moleculares da enzima, em ambas as amostras estudadas.

3- As duas formas isoenzímicas, analisadas por electroforese em gel de poliacrilamida, mostraram diferentes pesos moleculares. A fração I, nas duas amostras, apresentou peso molecular três vezes maior que a fração II.

4- O critério de purificação adotado promoveu um aumento na atividade específica das enzimas I e II da soja, com fatores de 25,2 e 59,3, respectivamente. No feijão, estes fatores foram de 19,0 e 51,3.

5- As duas formas isoenzímicas da soja e do feijão tiveram ação preferencial sobre o substrato sintético PNPg, apresentando uma relação entre K_m e V_{max} puramente ocasional.

6- Cineticamente, a enzima II da soja e a forma I do feijão se mostraram mais reativas aos substratos estudados.

7- A análise conjunta dos parâmetros velocidade de reação e energia de ativação, para os substratos naturais, revelou a rafino-

se como um substrato muito útil para a soja e a melibiose para o feijão.

8- A atividade máxima das enzimas da soja foi observada em valores de pH e temperatura menores do que os observados para as formas I e II do feijão.

9- Ambas as amostras e suas respectivas frações tiveram comportamento semelhante quanto à estabilidade ao calor e ao pH.

10- As α -galactosidases da soja e do feijão não foram inibidas por reagentes sulfidrídricos mostrando, assim, que suas atividades catalíticas não dependem, necessariamente, da presença de grupos -SH.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRAWAL, K.M.L. & BAHL, O.P. Glycosidases of *Phaseolus vulgaris*. II. Isolation and general properties. J.Biol.Chem., 243 (1): 103-111, 1968.
2. AKIBA, T. & KORIKOSHI, K. Identification and growth characteristics of α -galactosidases - producing microorganisms. Agric.Biol.Chem., 40 (9): 1845-1849, 1976.
3. AKIBA, T. & KORIKOSHI, K. Properties of α -galactosidases of alkalophilic bacteria. Agric.Biol.Chem., 40 (9): 1851-1855, 1976.
4. ANDREWS, P. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J., 96: 595-606, 1965.
5. BAHL, O.P. & AGRAWAL, K.M.L. Glycosidases of *Phaseolus vulgaris*. I - Isolation and characterization of β -N- Acetylglucosaminidase. J.Biol.Chem., 243 (1): 98-102, 1968.
6. BAHL, O.P. & AGRAWAL, K.M.L. Glycosidases of *Aspergillus niger*. I - Purification and characterization of α - and β -galactosidases and β -N- acetyl-glucosaminidase. J.Biol.Chem., 244 (11): 2970-2978, 1969.
7. BAILEY, R.W. α -Galactosidase activity of rumen bacteria. Nature, 195: 79-80, 1962.
8. BAILEY, R.W. The intracellular α -galactosidase of a rumen strain of *Streptococcus bovis*. Biochem. J., 86: 509-514, 1963.

9. BARHAM, D.; DEY, P.M.; GRIFFITHS, D. & PRIDHAM, J.B. Studies on the distribution of α galactosidases in seeds. Phytochem., 10: 1759-1763, 1971.
10. BECKER, R.; OLSON, A.C.; FREDERICK, D.P.; KON, S.; GUMBMANN, M. R. & WAGNER, J.R. Conditions for the autolysis of alpha-galactosides and phytic acid in California small white beans. J. Food Sci., 39: (4) 766-769, 1974.
11. BLANCHARD, P.H. & ALBON, N. The inversion of sucrose: a complication. Arch.Biochem., 29 (3): 220-222, 1950.
12. BURSTEIN, C. & KEPES, A. The α -galactosidase from *Escherichia coli* K12. Biochem.Biophys.Acta, 230: 52-63, 1971.
13. COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. Enzyme nomenclature. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing, 1975, 443p.
14. COURTOIS, J.E.; CARRERE, C. & PETEK, F. L'alfa galactosidase de *Penicillium paxillus*. Bull.Soc.Chim.Biol., 41: 1251-1259, 1959.
15. COURTOIS, J.E. & PETEK, F. α -Galactosidase from Coffee beans. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology, New York, Academic Press, 1966, vol. 8, p.565-571.
16. COURTOIS, J.E.; WICSTROM, A. & LE DIZET, P. Actions des alfa-galactosidases sur divers galactosides du saccharose et du glucose. Bull.Soc.Chim.Biol., 38: 851-861, 1956.
17. CRISTOFARO, E.; MOTTU, F. & WUHRMANN, J.J. Involvement of the Raffinose family of oligosaccharides in flatulence. In: SIPPLE, H.L. & McNUTT, K.W. Sugars in nutrition. New York, Academic Press, 1974, cap. 20, p.313-336.

18. CRUZ, R.; BATISTELA, J.C. & WOSIACKI, G. Microbial α -galactosidase for soymilk processing. J.Food Sci., 46 (4): 1196-1200, 1981.
19. CRUZ, R. & PARK, Y.K. Production of fungal α -galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. J.Food Sci., 47 (6): 1973-1975, 1982.
20. DAVIS, B.J. Disc electrophoresis II - Method and application to human serum proteins. Ann.N.Y.Acad.Sci., 121: 404-427, 1964.
21. DELENTE, J.; JOHNSON, J.H.; KUO, M.J.; O'CONNOR, R.J. & WEEKS, L.E. Production of a new thermostable neutral alpha - galactosidase from a strain of *Bacillus stearothermophilus*. Biotechnol. Bioeng., 16: 1227-1243, 1974.
22. DEY, P.M. Biochemistry of plant galactomannans. In: TIPSON, R. S. & HORTON, D.; Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, New York, Academic Press, 1978, vol. 35, p.356-366.
23. DEY, P.M. & PRIDHAM, J.B. Purification and properties of α -galactosidases from *Vicia faba* seeds. Biochem. J., 113: 49-55, 1969.
24. DEY, P.M & PRIDHAM, J.B. Substrate specificity and Kinetic properties of α -galactosidases from *Vicia faba*. Biochem.J., 115: 47-54, 1969.
25. DEY, P.M. & PRIDHAM, J.B. Biochemistry of α -galactosidases. Advances in Enzymology, 36: 91-130, 1972.
26. EAST, J.W.; NAKAYAMA, T.O.M. & PARKMAN, S.B. Changes in stachyose, raffinose, sucrose and monosaccharides during germination of soybeans. Crop. Sci., 12: 7-9, 1972.

27. FRENCH, D. The raffinose family of oligosaccharides. Advances in carbohydrate chemistry, 9: 149-184, 1954.
28. GATT, S. & BAKER, E.A. Purification and separation of α and β -galactosidases from spinach leaves. Biochem. et Biophys. Acta, 206: 125-135, 1970.
29. GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology, New York, Academic Press, 1955, vol. 1, p.138-146.
30. HESTRIN, S.; FEINGOLD, D.S. & SCHRAMM, M. Hexoside hydrolases. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology, New York, Academic Press, 1955, vol.1, p.249-251.
31. HOGNESS, D.S. & BATTLE, E.H. The α -galactosidase of *Aerobacter aerogenes*: its characteristics and induced syntesis. Federation Proc., 16: 197-198, 1957.
32. HOUGH, L. & JONES, J.K.H. "Enzymic method for determination of D-glucose". In: WHITLER, R.L. & WOLFROM, M.L. Methods in carbohydrate chemistry, New York, Academic Press, 1962, vol. 1, cap. 16, p. 400-401.
33. HSU, S.H.; HADLEY, H.H. & HYMOWITZ, T. Changes in carbohydrate contents of germinating soybean seeds. Crop.Sci., 13: 407-412, 1973.
34. KAJI, A. & ICHIMI, T. Production and properties of α -galactosidases from *Corticium rolfsii*. Appl.Microbiol., 18 (6): 1036-1040, 1969.

35. KAJI, A. & YOSHIARA, O. Purification and properties of α -galactosidase produced by *Corticium rolfsii*. Agric.Biol.Chem., 36 (7): 1335-1342, 1972.
36. KAWAMURA, S.; KASAI, T. & TANUSI, S. Purification and properties of α -galactosidase from *Escherichia coli* subsp. *communior* IAM 1272. Agric.Biol.Chem., 40 (4): 641-648, 1976.
37. KELEMEN, M.V. & WHELAN, W.J. Inhibition of glycosidases and galactosidases by polyols. Arch.Biochem.Biophys., 117: 423-428, 1966.
38. KIM, W.J.; SMIT, C.J.B. & NAKAYAMA, T.O.M. The removal of oligosacchararides from soybeans. Lebensm. Wiss. U. Technol., 6 (6): 201-204, 1973.
39. KON, S. & WAGNER, J.R. Partial separation and characterization of α -galactosidase from *Phaseolus vulgaris*. Lebensm. Wiss U. Technol., 10 (2): 106-108, 1977.
40. KU, S.; WEI, L.S.; STEINBERG, M.P.; NELSON, A.I. & HYMOWITZ, T. Extraction of oligosaccharides during cooking of whole soybeans. J.Food Sci., 41 (2): 361-364, 1976.
41. LEE, Y.C. & WACEK, V. Alpha-galactosidase from *Aspergillus niger*. Arch.Biochem.Biophys., 138: 264-271, 1970.
42. LI, Y.T.; LI, S.C.C. & SHETLAR, M.R. α -Galactosidase from *Diplococcus pneumoniae*. Arch.Biochem.Biophys., 103: 436-442, 1963.
43. LINEWEAVER, H. & BURK, D. Determination of enzyme dissociation constants. J.Am.Chem.Soc., 56: 658-666, 1934.

44. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193 (2): 265-275, 1951.
45. MALHOTRA, O.P. & DEY, P.M. Purification and physical properties of sweet-almond α -galactosidase. Biochem.J., 103: 508-513, 1967.
46. MALHOTRA, O.P. & DEY, P.M. Specificity of sweet-almond α -galactosidase. Biochem.J., 103: 739-743, 1967.
47. MARBACH, J.; MAYER, A.M. & MARON, R. Galactosidases in cultivated and wild peas. Phytochem., 17: 655-657, 1978.
48. McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. α -D-Galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds. Phytochem., 13: 1747-1757, 1974.
49. McGHEE, J.E.; SILMAN, R. & BAGLEY, E.B. Production of α -galactosidase from *Aspergillus awamori*: properties and action on para-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside and galacto-oligosaccharides of soy milk. J.Am.Oil.Chem.Soc., 55 (2): 244-247, 1978.
50. MITAL, B.K.; SHALLENBERGER, R.S. & STEINKRAUS, K.H. α -Galactosidase activity of lactobacilli. Appl. Microbiol., 26 (5): 783-788, 1973.
51. MITAL, B.K. & STEINKRAUS, K.H. Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soy milk. J. Food Sci., 40 (1): 114-118, 1975.
52. MITAL, B.K.; STEINKRAUS, K.H. & NAYLOR, H.B. Growth of lactic acid bacteria in soy milks. J.Food Sci., 39 (5): 1018-1023, 1974.

53. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J.Biol.Chem., 133 (3): 375-381, 1944.
54. OISHI, K. & AIDA, K. Blood-group substance degrading enzymes obtained from *Streptomyces sp.* Part I: Screening tests and culture conditions for best enzyme production. Agric.Biol.Chem., 35 (7): 1101-1108, 1971.
55. OISHI, K. & AIDA, K. Blood-group substance degrading enzymes obtained from *Streptomyces sp.* Part II: Purification and characteristics of α -galactosidase from *Streptomyces* 9917S₂. Agric. Biol.Chem., 36 (4): 578-587, 1972.
56. OMOSAIYE, O.; CHERYAN, M. & MATTHEWS, M.E. Removal of oligosaccharides from soybean water extracts by ultrafiltration. J. Food Sci., 43 (2): 354-360, 1978.
57. ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I: Background and theory. Annal.N.Y.Acad.Sci., 121: 321-349, 1964.
58. PARK, Y.K.; DE SANTI, M.S.S. & PASTORE, G.M. Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. J. Food Sci., 44 (1): 100-103, 1979.
59. PAZUR, J.H.; SHADAKSHARASAWY, M. & MEIDELL, G.E. The metabolism of oligosaccharides in germinating soybeans, *Glycine max.* Arch.Biochem.Biophys, 99: 78-85, 1962.
60. PETEK, F. & DONG, T. Séparation et étude de deux α -galactosidase des graines du café. Enzymologia, 23: 133-137, 1961.

61. PETEK, F.; VILLARROYA, E. & COURTOIS, J.E. Purification et propriétés de l' α -galactosidase des graines germées de *Vicia sativa*. European J.Biochem., 8: 395-402, 1969.
62. RACKIS, J.J.; SESSA, D.J. & STEGGERDA, F.R. Soybean factor relating to gas production by intestinal bacteria. J.Food Sci., 35 (5): 634-639, 1970.
63. RAO, V.S. & VAKIL, U.K. Effects of gamma-irradiation on flatulence-causing oligosaccharides in green gram (*Phaseolus aureus*) J.Food Sci., 48 (6): 1791-1795, 1983.
64. REDDY, N.R. & SALUNKHE, D.K. Changes in oligosaccharides during germination and cooking of black gram and fermentation of black gram/rice blend. Cereal Chem., 57 (5): 356-360, 1980.
65. REYNOLDS, J.H. An immobilized α -galactosidase continuous flow reactor. Biotechnol.Bioeng., 16: 135-147, 1974.
66. ROCKLAND, L.B.; GARDINER, B.L. & PIECZARKA, D. Stimulation of gas production and growth of *Clostridium perfringens* type A (n^o 3424) by legumes. J.Food Sci., 34 (5): 411-417, 1969.
67. SASTRY, P.S. & KATES, M. Hydrolysis of monogalactosyl and digalactosyl diglycerides by specific enzymes in runner bean. Biochemistry, 3 (9): 1280-1287, 1964.
68. SATHE, S.K.; DESHPANDE, S.S.; REDDY, N.R.; GOLL, D.E. & SALUNKHE, D.K. Effects of germination on proteins, raffinose oligosaccharides, and antinutritional factors in the great Northern beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). J.Food Sci., 48 (6): 1796-1800, 1983.

69. SHALLENBERGER, R.S.; HAND, D.B. & STEINKRAUS, K.H. Changes in sucrose, raffinose and stachyose during tempeh fermentation. U. S. Dept. Agric., Agric. Res. Serv., ARS - 74-41, 1966, p.68-71.
70. SHEININ, R. & CROCKER, F.B. The induced concurrent formation of α -galactosidase and β -galactosidase in *Escherichia coli* B. Can. J. Biochem. Physiol., 39: 63-72, 1961.
71. SILVA, H.C. & BRAGA, G.L. Effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) J. Food Sci., 47 (3): 924-925, 1982.
72. SILVA, H.C. & LUH, B.S. Changes in oligosaccharides and starch granules in germinating beans. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 12 (3): 103-107, 1979.
73. SMILEY, K.L.; HENSLEY, D.E. & GASDORF, H.J. α -Galactosidase production and use in a hollow fiber reactor. Appl. Environ. Microbiol., 31: 615-617, 1976.
74. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160 (1): 61-68, 1945.
75. STEGGERDA, F.R.; RICHARDS, E.A. & RACKIS, J.J. Effects of various soybean products on flatulence in the adult man. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121: 1235-1239, 1966.
76. STEINKRAUS, K.H.; LEE, C.Y. & BUCK, P.A. Soybean fermentation by the ontjon mold *Neurospora*. Food Technol., 19: 1301-1302, 1965.
77. SUGIMOTO, H. & VAN BUREN, J.P. Removal of oligosaccharides from soy milk by an enzyme from *Aspergillus saitoi*. J. Food Sci., 35 (5): 655-660, 1970.

78. SUZUKI, H.; LI, S.C. & LI, Y.T. α -Galactosidase from *Mortierella vinacea*. Crystallization and properties. J.Biol.Chem., 245 (4): 781-786, 1970.
79. SUZUKI, H.; OZAWA, Y.; OOTA, H. & YOSHIDA, H. Studies on the decomposition of raffinose by α -galactosidase of mold. I: α -Galactosidase formation and hydrolysis of raffinose by the enzyme preparation. Agric.Biol.Chem., 33 (4): 506-513, 1969.
80. THANANUNKUL, D.; TANAKA, M.; CHICHESTER, C.O. & LEE, T.C. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of α -galactosidase within polyacrylamide gel. J.Food Sci., 41 (1): 173-175, 1976.
81. THOMAS, B. & WEBB, J.A. Multiple forms of α -galactosidase in mature leaves of *Cucurbita pepo*. Phytochem., 16: 203-206, 1977.
82. UENO, Y.; IKAMI, T.; YAMAUCHI, R. & KATO, K. Purification and some properties of α -galactosidase from tubers of *Stachys affinis*. Agric.Biol.Chem., 44 (11): 2623-2629, 1980.
83. WALLENFELS, K.G. & MALHOTRA, O.P. Galactosidases. In: TIPSON, R. S. & HORTON, D. Advances in Carbohydrate Chemistry, 16: 239-298, 1961.
84. WEBB, J.A. & GORHAM, P.R. Translocation of photosynthetically assimilated C¹⁴ in straight-necked squash. Plant Physiol., 39: 663-672.
85. WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem., 244 (16): 4406-4412, 1969.

86. WHITAKER, J.R. Principles of Enzymology for the Food Sciences, New York, Marcel Dekker, INC., 1972, p. 319-349.
87. WORTHINGTON, R.E. & BEUCHAT, L.R. α -Galactosidase activity of fungi on intestinal gas-forming peanut oligosaccharides. J. Agric.Food.Chem., 22 (6): 1063-1066, 1974.
88. ZACCHARIUS, R.M.; ZELL, T.E.; MORRISON, J.H. & WOODLOCK, J.J. Glyco-protein staining following electrophoresis on acrylamide gels. Anal.Biochem., 30: 148-152, 1969.