

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE FÚNGICA. HIDRÓLISE  
DE OLIGOSSACÁRIDES DO EXTRATO DE SOJA

Tese de Doutorado

Rubens Cruz *5/*

Orientador: *No box*

*Young*  
Prof. Dr. Young Kun Park

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de  
Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas  
para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos

1 983  
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENT

A

meus pais,  
esposa e  
filho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Young Kun Park, pela segura e dedicada orientação.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, através de sua Direção e Coordenadoria de Pós-Graduação, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento do presente projeto.

Aos professores, Dr. John Robert Whitaker, Dra. Adelia Rodrigues Amaya e Dr. Walter Esteves, pelos brilhantes cursos ministrados.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Sgarbieri, pela atenção, bons conselhos e cessão de equipamentos e reagentes.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", pelos afastamentos concedidos.

À CAPES-PICD, pelo auxílio financeiro permitindo as viagens semanais.

Aos funcionários dos laboratórios de Bioquímica de Alimentos da F.E.A.A.-UNICAMP e de Fisiologia do I.L.H.P.A.-UNESP, pela grande colaboração.

Aos amigos e colegas, pelo estímulo.

## ÍNDICE

|                                                   | Página |
|---------------------------------------------------|--------|
| ÍNDICE DE TABELAS                                 | vi     |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                 | vi     |
| SUMÁRIO                                           | viii   |
| SUMMARY                                           | ix     |
| I- INTRODUÇÃO                                     | 1      |
| II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA                         | 6      |
| 1- Oligossacárides da soja e flatulência          | 6      |
| 2- $\alpha$ -Galactosidase: fontes e propriedades | 15     |
| III- MATERIAIS E MÉTODOS                          | 25     |
| 1- Materiais                                      | 25     |
| - Microrganismo                                   | 25     |
| - Equipamentos                                    | 25     |
| - Matéria prima e reagentes                       | 26     |
| 2- Métodos                                        | 27     |
| - Preparação do Extrato de Soja                   | 27     |
| - Crescimento do Microrganismo e enzimas          | 28     |
| - Ensaio da atividade da $\alpha$ -galactosidase  | 30     |
| - Atividade de Invertase                          | 31     |
| - Atividade de $\beta$ -galactosidase             | 31     |
| - Purificação da $\alpha$ -galactosidase          | 31     |
| - Caracterização da $\alpha$ -galactosidase       | 33     |
| - Hidrólise de galactoligossacárides puros        | 35     |
| - Hidrólise de galactoligossacárides da soja      | 36     |
| - Cromatografia em camada delgada                 | 36     |

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| IV- RESULTADOS                                        | 37 |
| 1- Crescimento do microrganismo e produção de enzimas | 37 |
| - Meio submerso                                       | 37 |
| - Meio semi-sólido                                    | 38 |
| 2- Purificação da $\alpha$ -galactosidase             | 39 |
| 3- Caracterização da enzima                           | 39 |
| - Efeito da concentração do substrato                 | 39 |
| - Estudos de Inibição                                 | 40 |
| - Influência do pH                                    | 41 |
| - Comportamento em função da temperatura              | 41 |
| - Peso molecular                                      | 41 |
| 4- Aplicação em oligossacárides e Extrato de Soja     | 42 |
| V- DISCUSSÃO                                          | 63 |
| VI- CONCLUSÕES                                        | 71 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                            | 73 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 01 - Produção de Enzimas em meio submerso                                                                | 43 |
| TABELA 02 - Produção de Enzimas em meio semi-sólido                                                             | 44 |
| TABELA 03 - Etapas da Purificação da $\alpha$ -galactosidase                                                    | 45 |
| TABELA 04 - Inibição da $\alpha$ -galactosidase por ions me<br>tálicos, monossacárides e outras substân<br>cias | 46 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 01 - Estrutura dos oligossacárides da soja                                                                           | 47 |
| FIGURA 02 - Preparação do Extrato de Soja e formu<br>lação do meio de cultura.                                              | 48 |
| FIGURA 03 - Crescimento do <i>Aspergillus orizae</i> em<br>extrato aquoso de soja                                           | 49 |
| FIGURA 04 - Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50                                                                             | 50 |
| FIGURA 05 - Filtração em Sephadex G-200                                                                                     | 51 |
| FIGURA 06 - Efeito da concentração do substrato na<br>na hidrólise da melibiose                                             | 52 |
| FIGURA 07 - Efeito da concentração do substrato na<br>hidrólise do <i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-galacto<br>piranosídeo | 53 |
| FIGURA 08 - Inibição da $\alpha$ -galactosidase por monos<br>sacárides.                                                     | 54 |
| FIGURA 09 - Efeito do pH na hidrólise do PNPG.                                                                              | 55 |

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 10 - Efeito do pH na velocidade de hidrólise da melibiose.                                                       | 56 |
| FIGURA 11 - Efeito do pH na velocidade de hidrólise do PNPG                                                             | 57 |
| FIGURA 12 - Efeito da temperatura na atividade da $\alpha$ -galactosidase                                               | 58 |
| FIGURA 13 - Efeito da temperatura na estabilidade da $\alpha$ -galactosidase                                            | 59 |
| FIGURA 14 - Determinação do peso molecular por gel filtração em Sephadex G-200                                          | 60 |
| FIGURA 15 - Cromatografia em Camada Delgada: hidrólise da rafinose e estaquiose pelo preparado enzimático.              | 61 |
| FIGURA 16 - Cromatografia em Camada Delgada: hidrólise de oligossacárides do Extrato de Soja pelo preparado enzimático. | 62 |

## SUMÁRIO

Foi estudada a produção de  $\alpha$ -galactosidase por *Aspergillus oryzae*, tanto em meio submerso como por fermentação semi-sólida. A enzima foi levemente induzida por rafinose e estaquiase, enquanto um extrato de oligossacáridos da soja, fermentado por *S. cerevisiae* (3.7% de açúcares totais), mostrou excepcional capacidade de indução. Simultaneamente, o microrganismo produziu invertase, esta de forma constitutiva.

A  $\alpha$ -galactosidase, parcialmente purificada, mostrou um Km de 2.04 mMol para PNPG e 140 mMol para melibiose. Para os mesmos substratos os valores de Vm foram de 0.36  $\mu$ Mol de PNP e 0.64  $\mu$ Mol de glucose/min./mg de proteína. O peso molecular foi estimado em 200 000 e a enzima foi inibida competitivamente por galactose e frutose e de forma não competitiva por glucose.  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$  e p-cloromercuribenzoato afetaram drasticamente a atividade enzimática, sugerindo a presença de grupo(s) -SH no sítio ativo. A enzima mostrou a atividade máxima em pH 4.0 e mais de 70% da atividade máxima em pH 6.3. Nenhuma perda de atividade foi observada, quando tratada entre 35 a 50°C, por 15 minutos.

O preparado bruto contendo  $\alpha$ -galactosidase e invertase diminuiu substancialmente os teores de rafinose e estaquiase do Extrato de Soja, o que sugere a possibilidade de seu emprego no tratamento de produtos da leguminosa, visando eliminar aqueles galactoligosacáridos, apontados como causadores da flatulência.



## SUMMARY

The production of  $\alpha$ -galactosidase by a strain of *Aspergillus oryzae* was observed either by a submerged culture method or *Koji* method. The enzyme was slightly induced by raffinose and stacchiose, while in a previously fermented oligosaccharydes extract from soybean with 3.7 per cent of total sugar the yield was greatly increased.

The partially purified  $\alpha$ -galactosidase showed a  $K_m$  value of 2.04 and 140 mMole respectively for PNPG and melibiose. The  $V_m$  value was 0.36  $\mu$ Mole of PNP and 0.64 of glucose/min./mg. of protein for the same substrates. The molecular weight was estimated in 200 000 by gel filtration in Sephadex G-200 and the enzyme was competitively inhibited by galactose and fructose and non competitively by glucose.  $Ag^+$ ,  $Hg^+$  and  $p$ -Chloromercuribenzoate remarkably inhibited the enzyme activity suggesting the presence of SH groups in the active site. The optimum pH was 4.0 and more than 70% of the maximum activity was found in pH 6.3. No loss of activity was shown when submitted to heat treatment between 35 - 50° C., for 15 minutes.

Enzymatic filtrate substantially decreased the contents of raffinose and stacchiose from soybean milk suggesting the possibility of its application to eliminate soybean galactooligosaccharydes responsible for flatulence troubles.

## I- INTRODUÇÃO

Segundo a FAO, o rendimento proteico por unidade de superfície de solo tem se mostrado muito maior quando este é cultivado com soja do que com outras fontes convencionais de proteínas como o trigo, o arroz e o milho ou quando usado como suporte para crescimento e manutenção de gado bovino (48).

Proteínas de soja destacam-se consideravelmente entre as de origem vegetal, também no aspecto qualitativo, pois apresentam alto valor nutricional, qualquer que seja a técnica de avaliação empregada: maior valor para a razão aminoácidos essenciais - nitrogênio total ( $E:T = 2,58$ ); *score* químico (69%), maior que os registrados para proteínas de trigo, arroz e milho; teor de lisina disponível mais elevado; valor biológico ( $BV = 58$  a  $69\%$ ) e Taxa de eficiência proteica ( $PER = 0,7$  a  $1,8$ ) maiores que algumas e comparáveis a outras (48).

Há que se considerar ainda que a multiplicidade de formas de preparação e processamento da le-

guminosa tem permitido a obtenção de produtos de propriedades nutritivas mais acentuadas que as acima citadas. Assim, o leite de soja, oficialmente denominado Extrato de Soja pela Resolução 14/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, apresenta valores médios de 2,0 para o PER, 79% para o BV e 91 para a digestibilidade (D) quando ratos são usados nos ensaios (22). Em seres humanos já foram obtidos BV médio de 91% e D = 89 (8).

O valor nutritivo do Extrato de Soja tem se mostrado inferior ao do leite bovino em apenas 10 a 30%, deficiência esta que pode ser sanada por suplementação com metionina, aminoácido limitante das proteínas da soja (42). Tem sido demonstrado, no entanto, que o teor de aminoácidos essenciais fornecidos pelo Extrato de Soja satisfaz as necessidades de crianças de até 1 ano de idade, na mesma extensão que o leite animal, desde que se ajuste o teor de proteínas (33).

As qualidades nutritivas do Extrato de Soja aliadas ao seu baixo custo em relação ao leite animal são fatores que tendem a aumentar o seu consumo. Além disso, o produto vegetal apresenta baixo índice de alergenicidade e é particularmente útil a indivíduos intolerantes à lactose e a galactosêmicos (65). No Brasil, Extrato de Soja em Pó, aromatizado e enriquecido com vitaminas e minerais já vem sendo produzido em escala industrial e, inclusive, empregado em programas de merenda escolar e suplementação de dietas de convalescentes em hospitais.

A incorporação da soja e seus produtos como hábito alimentar vem sofrendo, no entanto, algumas restrições por parte das populações ocidentais, principalmente por causa do gosto e cheiro característicos. Outro problema de grande importância é a flatulência verificada em seguida à sua ingestão.

Flatulência é um problema fisiológico bastante sério. Já foi demonstrado que um pequeno aumento da pressão de gases retais pode produzir inúmeros sintomas de desconforto como dor de cabeça, tontura, diminuição da capacidade de concentração, podendo chegar até a problemas de acomodação de imagem (4). Além disso, flatulência é um fenômeno socialmente inconveniente que tem levado 25% da população norte-americana a não ingerir feijões (84).

Grande número de especialistas em nutrição vem apontando a rafinose e especialmente a estaquiose, respectivamente, tri e tetrassacárides (Fig. 1) como os principais responsáveis por aquela resposta fisiológica à ingestão de soja e seus derivados (16,66,69). O desenvolvimento do indesejável fenômeno pode ser assim resumido: 1- o trato digestivo dos mamíferos não possui atividade de  $\alpha$ -galactosidase, não metabolizando, portanto, aqueles açúcares; 2- passando para o intestino grosso, as ligações  $\alpha$ -(1+6) dos referidos oligossacárides são rompidas pela  $\alpha$ -galactosidase de microrganismos da flora, especialmente do gênero *Clostridium* (70), transformando-se em unidades de galactose e sacarose; 3- estes açúcares são, a

seguir, fermentados anaerobicamente, com grande produção de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ , os principais constituintes do meteorismo intestinal(67).

Inúmeras tentativas de eliminação dos galactoligossacárides dos produtos da soja vem sendo desenvolvidas desde a última década, através de processos físicos, fermentativos e hidrólise enzimática, faltando, no entanto, uma avaliação mais efetiva dos resultados publicados.

Produtos fermentados de soja e consumidos, principalmente, nos países orientais, como o *miso* e o *shoyu* são totalmente isentos de rafinose, estaquiose e outros oligossacárides, apresentando, entretanto, consideráveis teores de galactose, glucose e frutose (30), monossacárides constituintes daqueles açúcares, o que sugere a presença de  $\alpha$ -galactosidase e invertase durante o processamento daqueles produtos. *Aspergillus orizae* e *Aspergillus sojae*, fungos usados milenarmente na preparação do *koji*, uma das etapas na elaboração dos referidos produtos, não tem recebido a devida atenção quanto à capacidade de produzir  $\alpha$ -galactosidase e invertase. Estudos preliminares desenvolvidos nos Laboratórios de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da UNICAMP (19), como suporte para este trabalho, revelaram que tais enzimas são produzidas por *A. orizae*, quando inoculado em meios contendo produtos da soja.

Este trabalho se propõe a estudar as

condições de produção, caracterização e possibilidades de a  
plicação da  $\alpha$ -galactosidase de *A. orizae* no Extrato de Soja,  
visando eliminar os açúcares da família rafinose, causado  
res da flatulência

## II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1- OLIGOSSACÁRIDES DA SOJA E FLATULÊNCIA.

A primeira referência sobre o teor de açúcares solúveis da soja data de 1914 e pertence a GARNER *et alii* (28), ao relatarem o efeito de fatores nutricionais sobre o conteúdo de óleo das sementes. Segundo tais autores, o teor de óleos durante o período reprodutivo é proporcional ao acúmulo de carboidratos durante o pe\_ríodo vegetativo. Estas observações foram confirmadas por CARTER & HOPPER (12), em 1942, os quais ampliaram a generalização, afirmando que:

"a porcentagem de açúcares aumenta paralelamente com o conteúdo do óleo e quando o total de açúcares e óleos varia numa direção, o conteúdo de proteínas varia no outro"

Os teores de carboidratos solúveis da soja têm sido extremamente variáveis de acordo com a variedade, maturidade das sementes e condições de análise. O'KEL

LY & GIEGER (58), em 1937, por exemplo, encontraram valores de 17.93% a 30.18% de açúcares totais em um extrato aquoso, isento de proteínas. Quantidades substanciais de amido e monossacárides como a glucose, frutose e galactose têm sido encontradas em sementes verdes da leguminosa, estando virtualmente ausentes, entretanto, em sementes amadurecidas (27,73). Da mesma forma, traços de arabinose, raminose e ácido glucurônico já foram caracterizados em extratos alcoólicos de soja desengordurada (75).

Os principais açúcares encontrados na soja amadurecida, entretanto, são a sacarose, rafinose e estaquiase, isolados e caracterizados, inicialmente por KASAI & KAWAMURA (39), em 1966, através de técnicas de polarimetria. Anteriormente, apenas a sacarose havia sido isolada da leguminosa por KRAYBILL *et alli* (44), em 1937, o que levou alguns pesquisadores da época a relatarem como sacarose os açúcares totais da soja (75). Traços de verbascose, um pentassacáride homólogo à estaquiase e dotado de uma unidade a mais de galactose, também têm sido encontrados em sementes amadurecidas (39,75).

Em 1967, KAWAMURA *et alli* (42), usando cromatografia em papel, caracterizaram quantitativamente os açúcares solúveis, tanto em grãos de soja integral quanto em cotilédones desengordurados de seis variedades americanas e três japonesas obtendo os seguintes valores médios para sacarose, rafinose e estaquiase:



| Oligossacárides | Variedades |      |           |      |
|-----------------|------------|------|-----------|------|
|                 | americanas |      | japonesas |      |
|                 | (a)        | (b)  | (a)       | (b)  |
| Sacarose        | 4.5%       | 6.2% | 5.7%      | 7.4% |
| Rafinose        | 1.1%       | 1.4% | 1.1%      | 1.4% |
| Estaquiouse     | 3.7%       | 5.2% | 4.1%      | 5.4% |

Fonte: Kawamura, 1967

a) *Soja integral*

b) *Cotilêdones desengor-  
durados*

Resultados próximos aos da tabela acima foram obtidos por DELENTE & LANDEMBURG (21), em 1972, através de Cromatografia Gás Líquido (GLC). Os teores de sacarose, rafinose e estaquiouse foram estimados em 8.2%, 1.1% e 4.7%, respectivamente, relatando ainda traços de melibiose, maninotriose (Fig. 1), além de monossacárides.

A variação do teor de oligossacárides é bastante acentuada de uma variedade para outra, conforme demonstram os trabalhos de HYMOWITZ *et alii* (36), desenvolvidos em 1972. Pesquisando 60 variedades de soja de diferentes origens, encontraram valores de 2.5 a 8.5% para sacarose, 0.1 a 0.9% para rafinose e 1.4 a 4.1% para a estaquiouse. Os autores demonstraram ainda que o teor de estaquiouse está correlacionado ao de proteínas e que o conteúdo de rafinose e sacarose é proporcional ao de lipídeos. Com 6.44% de sacarose, 0.36% de rafinose e 2.1% de estaquiouse, a composição em oligossacárides da variedade Corsoy se manteve dentro dos valores acima, apresentando, entretanto, 1.58% de frutose e traços de glucose, segundo os re-

latos de KU *et alli* (45), de 1976. Ainda através de GLC, CRUZ *et alli* (18), em 1981 estimaram em 6.1%, 1.1% e 4.4% respectivamente, os teores de sacarose, rafinose e estaquiose de sementes integrais da variedade Brag, cultivada no Brasil, detectando ainda alguns traços de monossacárides.

Apesar das afirmações de alguns autores de que as condições ambientais também influenciam o conteúdo dos açúcares totais da soja, estudos específicos de HYMOWITZ *et alli* (37), em 1972b e HYMOWITZ & COLLINS (35), em 1974, demonstraram que os componentes dos açúcares das sementes da soja e outras leguminosas são razoavelmente estáveis em relação a várias condições ambientais. Estas conclusões sugerem a possibilidade de obtenção de cultivares com baixo teor de galactoligossacárides, através da genética agrícola, o que poderia representar a solução mais natural para o problema da flatulência causado pelas leguminosas.

Embora ainda não se relacionassem aos seus oligossacárides, dietas ricas em feijões são apontadas como produtoras de flatuosidade no homem desde 1961 por STEGGERDA (76) o qual verificou que o volume de gases retais provenientes de uma dieta normal é cerca de dez vezes menor quando comparado aquele produzido por uma dieta à base de feijões.

"... há alguma coisa nas leguminosas que pode alterar a fisiologia do trato gastro intestinal, pois a flatulência foi acentuadamente marcada..."

Um homogenato de feijões (*Phaseolus vulgaris*) também aumentou a produção de gases no intestino de cães segundo RICHARDS & STEGGERDA (69), em 1966. Os referidos autores mostraram ainda que o colon é a região do intestino onde os gases são produzidos mais intensamente. Em 1971, os grupos de Kies e Werner, citados por CRISTOFARO *et alli* (16), testaram a farinha texturizada de soja quanto à capacidade de produzir flatulência no homem, administrando aquele produto como única fonte proteica em voluntários. O primeiro grupo chegou à resposta negativa ao servir uma dieta de apenas 25 a 50 gramas por dia. Quando a dieta fornecida ultrapassou as 50 gramas diárias, no entanto, o segundo grupo observou o aparecimento do meteorismo intestinal em 5 dos 6 homens testados.

Foi também STEGGERDA (77), em 1966, o primeiro pesquisador a associar a flatulência desenvolvida pelas dietas à base de leguminosas com os oligossacarídes rafinose e estaquiose, já que até então, se questionava se o fenômeno era causado pela casca, fração lipídica ou proteica. Os estudos daquele autor foram posteriormente confirmados por RACKIS *et alli* (66), em 1967 e 1970 (67) e HICHEY *et alli* (31), em 1972. Alguns resultados aparentemente contrários a estes foram publicados por MURPHY *et alli* (55), neste mesmo ano. As dietas não flatulentas foram adicionadas, separadamente, diferentes frações de feijões, rafinose e estaquiose e, a seguir, servidas a voluntários. Verificaram que frações ricas em carboidratos produziam maior quantidade de gases, mas que rafinose e estaquiose não desenvolviam maior flatuosidade que a dieta controle, após

4 a 7 horas de ingestão. Tais conclusões são explicadas pelo fato daqueles oligossacárides requererem maior tempo para completa decomposição pelas bactérias intestinais, segundo CRISTOFARO *et alli* (16). Tal grupo, em 1974 e CALLOWAY, D.H. (9), em 1975, publicaram amplas revisões sobre o desenvolvimento da flatulência provocada pela rafinose e estaquiose presentes nas leguminosas.

A obtenção de produtos da soja isentos de rafinose e estaquiose vem sendo investigada intensamente nos últimos anos, por pesquisadores de diversas áreas.

Além da genética agrícola acima citada e ainda fora do campo tecnológico, uma possível solução para o problema da flatulência seria o uso da soja em um estágio de maturação em que suas propriedades nutritivas não estejam consideravelmente alteradas. East, citado por NAKAYAMA, T.O.M. (56), em 1981, concluiu que soja na maturidade verde possui mais amido e menos oligossacárides, sendo estes sintetizados a partir daquele nos últimos estágios de maturação. Da mesma forma, durante a germinação aqueles oligossacárides são convertidos em monossacárides através de enzimas endógenas. CALLOWAY *et alli* (11), em 1971, confrontaram os índices de flatulência observados em ratos alimentados com soja germinada, soja não germinada como controle positivo e caseína como controle negativo. Os resultados mostraram que o volume de gás provocado pela soja germinada foi significativamente menor que o controle positivo, e levemente maior que o controle negativo.

A germinação das leguminosas, no entanto, é um processo bidirecional, já que o catabolismo de substâncias acumuladas se processa simultaneamente com a síntese de outras. Assim, moléculas pré-existentes de oligossacárides são hidrolisadas e, a seguir, ressintetizadas durante a germinação (56). EAST *et alli* (27), 1972, procurando separar os dois processos, verificou que a hidrólise daqueles açúcares durante a germinação pode ocorrer em anaerobiose e que esta inibe a síntese dos mesmos. Naquelas condições, após 15 horas de maceração, seguidas de 24 horas de germinação e mais 15 horas de maceração, obteve um produto com apenas 1/3 dos galactooligossacárides iniciais e perda de 6.6% de matéria seca. A ressíntese dos oligossacárides durante a germinação pode também ser inibida pela remoção da casca e embriões no início do processo (56). Adotando tal procedimento, RACKIS, J.J. (64), em 1978, relatou a obtenção de grãos com menor teor de fitatos, maior quantidade de caroteno, riboflavina e vitamina C e, praticamente isentos de rafinose e estaquiase, após 5 dias de germinação.

O emprego de processos físicos como a maceração em água ou tampão (43) e a ultrafiltração tem proporcionado sensíveis decréscimos no conteúdo de oligossacárides de soja e seus produtos. KU *et alli* (45), em 1976, conseguiram remover até 59% destes carboidratos de grãos de soja integral através de extrações aquosas que variaram de 10 a 60 minutos em temperaturas e proporção soja-água também variáveis. Empregando ultrafiltração, OMOSAYE *et alli* (59), em 1978, obtiveram um concentrado com 60%

de proteínas, 35% de lipídeos e apenas 0.6% de oligossacáridos, com propriedades potencialmente adequadas para a formulação de dietas infantis. O emprego de membranas, no entanto, encarece o produto.

Embora o uso de produtos fermentados como o *tempeh*, *miso*, *nato* e *shoyu* remontem a séculos e não tenha sido desenvolvido em função dos fatores de flatulência, alguns autores ultimamente têm estudado a remoção dos galactoligossacárides daqueles produtos (56). *Miso* e *shoyu* contêm apenas monossacáridos e *tofu* mantém de 20 a 30% da estaquiose original (27). Durante a produção do *tempeh* por lactobacilos, SHALLEMBERGER *et alii* (71), em 1966, observaram que a estaquiose aparecia em teores decrescentes no meio enquanto a rafinose permanecia praticamente inalterada, talvez pelo fato da quebra do tetrassacáride ocorrer na mesma velocidade de hidrólise desta. O teor dos galactoligossacárides do Extrato de Soja foi também sensivelmente reduzido através de fermentações com *Lactobacillus fermentii*, *L. cellobiosi* e *L. plantarum*, segundo MITAL & STEINKRAUS (53), em 1975. O rápido consumo da sacarose e a conseqüente diminuição do pH do meio inibiu a completa remoção dos produtos intermediários melibiose e mannotriose.

A remoção dos galactoligossacárides de bebidas da soja vem sendo tentada também por hidrólise enzimática, pela aplicação de  $\alpha$ -galactosidase produzida por fungos e bactérias. SUGIMOTO & VAN BUREN (78), em 1970, trataram o Extrato de Soja com um preparado enzimático co

mercial de *Aspergillus saitoi* contendo  $\alpha$ -galactosidase e invertase, conseguindo completa remoção de estaquiase, rafinose e sacarose, permanecendo, no entanto no meio de reação maninotriose e melibiose, como produtos intermediários MITAL *et alli* (52), em 1973, aplicaram uma preparação de carbohidrases de *Lactobacillus cellobiosis* em várias amostras de Extratos de Soja, produzindo inicialmente melibiose e maninotriose e posteriormente os monossacárides constituintes, numa hidrólise total. Apenas 48% da estaquiase do Extrato de Soja foram hidrolisados pelo micélio imobilizado de *Mortierella vinacea* após tratamento de 12 horas, o que provou, entretanto, o aumento de rafinose no meio, conforme citação de THANANUNKUL *et alli* (81), em 1976. A remoção de oligossacárides de um Extrato de Soja diluído para 1% de matéria seca foi tentada, também sem maior sucesso, através de um processo contínuo com  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus awamori*, imobilizada em Amicon DC-30 por SMILEY *et alli* (74), em 1976. CRUZ *et alli* (18), em 1981, isolaram um cepa de *Cladosporium cladosporioides* produtora de uma  $\alpha$ -galactosidase excepcionalmente termotável e com grande atividade na faixa de pH (6.2 a 6.4) em que o Extrato de Soja é originalmente produzido. Após 6 horas de tratamento enzimático, os autores obtiveram um produto totalmente isento de rafinose e estaquiase e com elevado teor de galactose e sacarose. Entretanto, a falta de estudos relativos à produção de micotoxinas pelo referido microrganismo não recomenda, por ora, o emprego comercial de tal enzima.

A eliminação dos galactoligossacárides

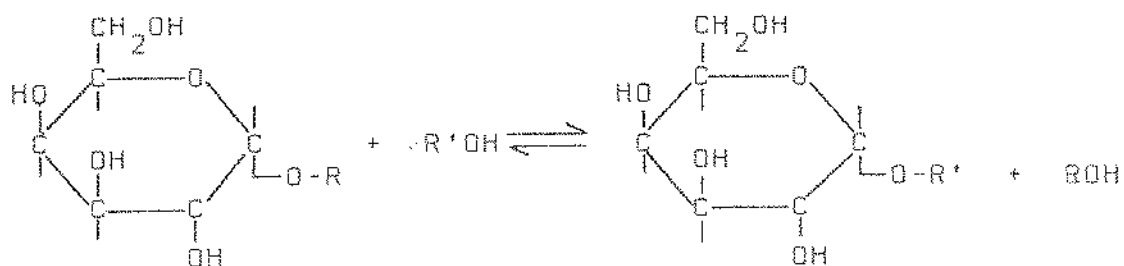
da soja e produtos constitui-se, portanto, num objetivo imediato da Ciência de Alimentos e a aplicação da  $\alpha$ -galactosidase apresenta excelentes perspectivas.

## 2- $\alpha$ -GALACTOSIDASE: SUBSTRATOS, FONTES, PURIFICAÇÃO EFEITO DO pH E TEMPERATURA, CINÉTICA E PESO MOLECULAR.

As primeiras citações sobre a  $\alpha$ -galactosidase ou  $\alpha$ -D-Galactosídeo-Galactohidrolase (EC 3.2.1.22) (13) datam do século passado. Obtida inicialmente de extratos de leveduras selvagens em 1895 por Bua e Lindner, citados por DEY & PRIDHAN (25), em 1972, foi denominada melibiase devido à capacidade de degradar a melibiose e posteriormente chamada  $\alpha$ -galactosidase devido a grande afinidade por açúcares constituídos de resíduos de  $\alpha$ -D-galactose.

A ação da  $\alpha$ -galactosidase sobre o substrato, entretanto, é determinada por dois fatores: primeiro, a estrutura piranoidal do anel e, segundo, as configurações dos H e OH dos carbonos 1, 2, 3 e 4 devem ser similares às da galactose. Desta maneira, a enzima pode atuar sobre compostos que possuam outros glicosídeos que não a galactose, desde que mantenham aquelas propriedades, o que foi demonstrado por DEY & PRIDHAN (24), em 1969, ao obterem a hidrólise de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-fucosídeo e *p*-nitrofenil- $\beta$ -L-arabnosídeo, pela aplicação de  $\alpha$ -galactosidase de *Vicia faba*. Em resumo, a  $\alpha$ -galactosidase catalisa as reações que seguem o modelo da página seguinte, onde a molécula aceptora da hidroxila  $\epsilon$ , normalmente, a água, embora, R e R' possam ser grupos aromáticos ou alifáticos (25).





Assim sendo, galactosídeos como o metil (24,32), *o*-nitrofenil (1,24,47,79), *p*-nitrofenil (18, 24,32,38,46,51,60,79) e o *n*-propil- $\alpha$ -D-Galactopiranosídeo (24,25) vêm sendo intensamente empregados como substratos sintéticos para estudo da atividade da  $\alpha$ -galactosidase, principalmente o *o*-nitrofenil e o *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeos por serem compostos cromogênicos. Oligossacárides dotados de ligações  $\alpha$ -(1+6), como a rafinose, estaquiase, verbascose, epimelibiose, planteose, maninotriose, melibiose e respectivos alcoóis, são também conhecidos substratos da enzima (1,18,24,25,32,38,46,47,60,79). Especificamente em relação a alcoóis produzidos pela redução do grupo aldeídico de alguns oligossacárides como a melibiose e maninotriose, a afinidade da enzima tem sido menor, como demonstrado por BAYLEY, R.W. (5), em 1962.

A enzima é amplamente encontrada na natureza, distribuindo-se entre animais, vegetais e microrganismos. Sementes de *Coffea* sp, *Vicia faba*, *V. sativa*, *Citrullus vulgaris*, *Phaseolus vulgaris*, *Brassica oleracea*, *Pisum sativum* e folhas de *Spinacea oleracea* são reconhecidas fontes de  $\alpha$ -galactosidase, de acordo com as revisões de WALLENFELS & MALHOTRA (83), de 1961 e DEY & PRIDHAN (25), de 1972. Em animais, já foi localizada em *Astacus fluvialis*

lis, *Helix pomatia* e vários insetos, além de plasma, esperma e órgãos de inúmeros mamíferos, segundo as mesmas revisões.

Em relação a microrganismos,  $\alpha$ -galactosidase de natureza constitutiva tem sido encontrada principalmente em bactérias. Em 1962, BAYLEY, R.W. (5) isolou  $\alpha$ -galactosidase de *Streptococcus bovis* em meio de cultura contendo apenas glucose como fonte de carbono. LI *et alli* (47), em 1963, conseguiram hidrolisar melibiose, rafinose e estaquiose com o extrato bruto de *Diplococcus pneumoniae* cultivado em meio contendo apenas aquele monossacáride como fonte de carbono. Resultados semelhantes foram obtidos por MITAL *et alli* (54), em 1974, trabalhando com cinco diferentes linhagens de lactobacilos. AKIBA & HORIKOSHI (1) em 1976, testaram diferentes açúcares como fonte de carbono para crescimento de uma cepa de *Bacillus* sp., observando atividade de  $\alpha$ -galactosidase após 40 horas em todos os meios, independentemente do carbohidrato usado.

Outras bactérias como *Aerobacter aerogenes* e *Escherichia coli* tem produzido a enzima adaptativamente desde que inoculadas em meios de cultura contendo  $\alpha$ -D-galactosídeos como única fonte de carbono, conforme relatos de HOGNES & BATLEY (32), de 1957 e SHEININ & CROCKER (72), de 1961. Da mesma forma, DELENTE *et alli* (20), em 1974, isolaram de amostras de solos cultivados com soja, uma cepa de *Bacillus stearothermophilus*, capaz de produzir  $\alpha$ -galactosidase quando inoculada em melibiose ou rafinose. A mesma habilidade foi mostrada por *Lactobacillus*

*plantarum*, segundo MITAL *et alli* (54), no mesmo ano.

Não têm sido encontrados na literatura especializada relatos sobre a produção de  $\alpha$ -galactosidase de natureza constitutiva por fungos. Estudando a produção da enzima por 8 linhagens de *Penicillium* e 33 de *Aspergillus*, COURTOIS *et alli* (14), em 1959, obtiveram resultados positivos para *Penicillium paxillus*, *P. jantah*, *Aspergillus niger*, *A. rubescens* e *A. terreus*, apenas quando rafinose e/ou estaquiase foram adicionadas no meio de cultura.

Indução da  $\alpha$ -galactosidase pelos mesmos oligossacárides em *Mortierella vinacea* também foi relatada por SUZUKI *et alli* (80), em 1969, ao tentarem remover, por processo enzimático, o excesso de rafinose que impede a completa cristalização da sacarose, na indústria açucareira da beterraba. Os autores demonstraram ainda que o uso da farinha de soja em substituição ao farelo de trigo na preparação do *koji*, pode aumentar, em mais de dez vezes, a produção da enzima pela fermentação semi-sólida. DELENTE *et alli* (20), em 1974, também conseguiram consideráveis porções de  $\alpha$ -galactosidase ao inocular uma linhagem de *Bacillus stearothermophilus* numa suspensão contendo 3% de farinha de soja. Um extrato aquoso de soja, fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* de origem comercial e contendo 2% de açúcares, identificados como melibiose e manotriose, mostrou-se excelente indutor de  $\alpha$ -galactosidase em 16 cepas de diferentes espécies de fungos, segundo CRUZ, R. (17), em 1979.

Apesar da configuração  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), de sua única ligação glicosídica, lactose tem se mostrado potente indutora de  $\alpha$ -galactosidase em *Mortierella vinacea* (80), *Aspergillus oryzae* (60), *A. awamori* (51), *Micrococcus* sp. (57), e *Escherichia coli* (72). A constatação da presença da  $\beta$ -galactosidase em todos estes casos e em outros em que o indutor é um oligossacáride de configuração  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (19, 25, 33) parece reforçar a hipótese de que  $\alpha$  e  $\beta$ -galactosidase são enzimas pertencentes a um mesmo operon.

Apesar das inúmeras citações de ocorrência da  $\alpha$ -galactosidase na natureza, são relativamente escassos os estudos sobre sua purificação. A primeira tentativa de isolamento da enzima coube a PETEK & DONG (61), em 1961, os quais relataram a obtenção de duas frações de  $\alpha$ -galactosidase em grãos de café (*Coffea* sp.), após precipitação do extrato bruto com acetona e adsorção em colunas de alumina. DEY & PRIDHAN (23), em 1969, também encontraram duas formas de  $\alpha$ -galactosidase, com diferentes pesos moleculares, em sementes de *Vicia faba*, após sucessivas insolubilizações por pH e adição de sulfato de protamina e acetona, seguidas por gel filtração em Sephadex G-100 e G-200. No ano seguinte, LEE & WACEK (46), submeteram um preparado comercial de enzimas de *Aspergillus niger* a gel filtração em Sephadex G-200 e Bio-Gel p-200, troca iônica em colunas DEAE-celulose e DEAE-Sephadex A-50, separando a  $\alpha$  da  $\beta$ -galactosidase. Quando as frações contendo atividade de  $\alpha$ -galactosidase foram percoladas em CM-celulose, desdobram-se em três formas ativas, o que foi confirmado posteriormente por focalização isoelétrica.

Técnicas convencionais de isolamento de quaisquer enzimas, como precipitação por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , percolagem em colunas de troca iônica e gel filtração foram também empregadas na purificação de  $\alpha$ -galactosidases de *Vicia sativa* por PETEK *et alli* (62), em 1969, *Mortierella vinacea* por SUZUKI *et alli* (79), em 1970, e *Corticium rolfssii* por KAJI & YOSHIHARA (38), em 1972. A obtenção da  $\alpha$ -galactosidase cristalizada de *Mortierella vinacea* (79) em sobrenadante refrigerado de frações eluídas de uma coluna de Bio-Gel 200, após precipitação com sulfato de amônio recristalizado e finalmente pulverizado, é considerada a forma mais pura de  $\alpha$ -galactosidase já obtida até o momento. Ao contrário, o preparado enzimático de *Aspergillus saitoi* citado por SUGIMOTO & VAN BUREN (78), em 1970 e de *A. awamori* descrito por MCGHEE *et alli* (51), em 1978, foram tratados apenas até a obtenção de um concentrado de  $\alpha$ -galactosidase e invertase para aplicação em Extratos de Soja, o que foi conseguido através de ultrafiltração em células de Amicon e gel filtração em Sephadex G-200.

O efeito do pH sobre a atividade da  $\alpha$ -galactosidase tem variado de acordo com a fonte da enzima e com o substrato empregado. Em alguns casos, mostra apenas um pico, em outros, dois ou até uma ampla faixa de atividade máxima, para o mesmo substrato. De maneira geral, entretanto,  $\alpha$ -galactosidases produzidas por fungos e plantas têm apresentado pH ótimo entre 2.5 e 5.0, enquanto  $\alpha$ -galactosidases de bactérias tem mostrado atividade máxima entre 5.5 e 7.5, de acordo com inúmeros trabalhos citados nas revisões de WALLENFELS & MALHOTRA (83), de 1961 e DEY & PRIDHAN (25), de

A fim de remover os galactoligossacáridos dos produtos da soja tem se procurado enzimas com grande atividade em pH próximo à neutralidade. As preparações enzimáticas obtidas de *Aspergillus saitoi* (78) e *A. awamori* (51) apresentaram pH ótimo de 5.0 para a melibiose e rafinose. A  $\alpha$ -galactosidase de *Mortierella vinacea*, purificada e cristalizada apresentou pH ótimo na faixa de 4.0 a 6.0 para rafinose (79), valor também encontrado para o micélio imobilizado em gel de poliacrilamida, segundo trabalho de THANANUNKUL *et alii* (81), de 1 974. Atuando sobre o PNPG,  $\alpha$ -galactosidase de *Cl. cladosporioides*, produziu um pico com atividade máxima em pH 7.0. Frente a melibiose e rafinose, o pH ótimo encontrado foi 5.0, porém a curva de atividade sensivelmente larga permitiu à enzima apresentar 92% de sua atividade máxima entre pH 6.2 a 6.5, o que é bastante desejável para aplicação no Extrato de Soja (18).

A estrutura proteica da  $\alpha$ -galactosidase também tem sido afetada pela temperatura, em maior ou menor extensão, dependendo da origem e estado de purificação da enzima. A  $\alpha$ -galactosidase do extrato bruto de *Escherichia coli* é extremamente instável em baixas temperaturas, mas pode ser estocada, por mais de 2 meses a 4°C, sem nenhuma perda de atividade, de acordo com Smith, H., citado por DEY & PRIDHAN (25) em 1 972. Enzimas de fungos e bacterias, purificadas ou não, não tem perdido a atividade após serem mantidas por vários meses em refrigeração (18,20,51, 78,79), enquanto  $\alpha$ -galactosidase de *Vicia faba* foi comple-

tamente inativada nas mesmas condições (23). A termoestabilidade das  $\alpha$ -galactosidases das diversas fontes tem sido testada em diferentes condições de tempo e temperatura, tornando difícil uma comparação. A  $\alpha$ -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus*, entretanto, manteve sua atividade inalterada após duas semanas a 40°C (20), enquanto a enzima de *Spinacea oleracea* perdeu 50% de sua atividade após ser mantida por apenas 10 minutos a 43°C (83).

O comportamento em função do pH e a resistência da estrutura proteica ao calor são dois importantes fatores a serem observados na aplicação de uma enzima na indústria de alimentos. CRUZ *et alli* (18), em 1981, resumiram, num mesmo quadro o efeito destes dois fatores sobre a atividade de  $\alpha$ -galactosidases de diversas fontes, já propostas para a remoção de galactoligossacárides de produtos da soja.

$\alpha$ -Galactosidases de diferentes fontes: Comparação da termoestabilidade e atividade em pH 6.3 - 6.5

|                     | pH * | % da ativ.<br>máxima em pH<br>6.3 - 6.5 | Perda de atividade nas<br>respectivas condições<br>de ensaio |               |                 |
|---------------------|------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------|-----------------|
|                     |      |                                         | Ativ. Res.<br>(%)                                            | Temp.<br>(°C) | Tempo<br>(min.) |
| Cl. cladosporioides | 5.0  | 93                                      | 100                                                          | 60            | 120             |
| A. awamori          | 5.0  | 72                                      | 90                                                           | 55            | 15              |
| A. saitoi           | 5.0  | 85                                      | 55                                                           | 60            | 30              |
| M. vinacea          | 4.0  | 30                                      | 58                                                           | 60            | 15              |

Fonte: CRUZ *et alli*, 1981

\*Substrato: melibiose

Investigações sobre a cinética das  $\alpha$ -galactosidases são relativamente limitadas, já que não são muitos os estudos sobre a purificação da enzima. Estudando a afinidade da  $\alpha$ -galactosidase de *Vicia faba* para diversos substratos, DEY & PRIDHAN (24), em 1969, verificaram que os valores de  $K_m$  são inteiramente dependentes do agrupamento glicon, havendo em relação ao grupo aglicon, no entanto, maior afinidade para os aril- $\alpha$ -D-galactosídeos do que para os derivados alquil e oligossacárides. Estas relações foram também observadas para as  $\alpha$ -galactosidases de *Corticium rolfsii* (38) e *Vicia sativa* (62). Ainda quanto à especificidade enzima-substrato, tem sido verificado que os valores de  $V_m$  apresentam variações puramente ocasionais, não guardando nenhuma relação com o  $K_m$ , o que pode ser interpretado como um indício de que o  $K_m$  representa apenas a dissociação do complexo enzima-substrato ( $K_m \approx K_s$ ) (24,25).

"Reagentes sulfidrílicos" como o *p*-Cloromercuribenzoato (PCMB) e a Iodoacetamida tem inibido  $\alpha$ -galactosidases de *Aerobacter aerogenes* (32), *Diplococcus pneumoniae* (47), *A. saitoi* (78), e deixado de inibir ou tras como as de *Mortierella vinacea* (79), *Vicia faba* (23), *Calvatia cyathiformis* (25) e *Corticium rolfsii* (38), indicando que nem todas as  $\alpha$ -galactosidases requerem o grupo -SH para a sua atividade.  $\alpha$ -galactosidase de *Vicia faba* foi inativada por fotooxidação na presença de azul de metileno e inibida competitivamente por ions prata (24), o que nas condições de ensaio sugere a presença de resíduos de histidina no sítio ativo da enzima. Além da  $Ag^+$ , o  $Cu^{2+}$  e principalmente o  $Hg^+$  têm se mostrado poderosos inibidores



da  $\alpha$ -galactosidase de *Vicia sativa* (62), *Mortierella vi*  
*nacea* (79), *A. niger* (46), *A. saitoi* (78), *A. awamori* (51)  
*Corticium rolfsii* (38) e *Vicia faba* (23). Galactose tem exerci  
do inibição do tipo competitivo sobre inúmeras  $\alpha$ -galactosi  
dases (24,51,78,79), da mesma forma que outros glicosídeos  
de estrutura análoga como a L-arabnose (23,79) e a D-Fucose  
(23). Embora a revisão de DEY e PRIDHAN (25) de 1972, enume  
re várias  $\alpha$ -galactosidases cuja atividade não é afetada  
pela glucose, este monossacáride mostrou-se inibidor não  
competitivo das enzimas de *A. awamori* (51), *Mortierella vi*  
*nacea* (79) e *A. saitoi* (78).

As  $\alpha$ -galactosidases cujos pesos molecu  
lares foram mais acentuadamente investigadas são de origem  
vegetal. Encontradas principalmente nas sementes de plan  
tas, de maneira geral, têm se apresentado em duas formas:  
uma com peso molecular variando entre 120 000 a 210 000 e  
a segunda com peso molecular estimado entre 23 000 a  
57 000. Entre aquelas produzidas por microrganismos, apenas  
foram estimados os pesos moleculares da de *A. awamori* (51)  
em 130 000 e *A. saitoi* (78), em 290 000. Gel filtração em  
Sephadex G-200 foi a técnica mais empregada para a obten  
ção dos valores acima, embora o peso molecular da  $\alpha$ -galac  
tosidase de *Vicia Sativa* tenha sido calculado através da  
técnicas de ultracentrifugação (62).

### III- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1- MATERIAIS

##### 1.1- Microrganismo

Foi usada uma linhagem de *Aspergillus oryzae* produtora de  $\alpha$ -amilase comercial e que vem sendo mantida nos laboratórios de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola em tubos inclinados contendo Sabouraud dextrose agar.

##### 1.2- Equipamentos

Todas as pesagens envolvidas no presente trabalho foram executadas em balança analítica ou semi-analítica SAUTER; as operações de centrifugação em centrífuga BECKMAN, modelo J-21B e para as diversas determinações de pH e preparações de tampões foi empregado um pHmetro HORIBA H-5. Um evaporador a vácuo ROTADEST, LD101 foi usado para a obtenção de um concentrado de oligossacarídeos da soja, empregado na formulação de meios de cultu

ra. Estes foram esterilizados em autoclave SOC. FABLE LTDA e as culturas submersas submetidas à aeração em agitador rotatório FERMENTATION DESIGN INC., P.A. 18 103 enquanto a fermentação estacionária em meio semi-sólido desenvolveu-se em estufa bacteriológica FANEN. Também da marca FANEN, foram utilizados estufa retilínea e banho-maria, respectivamente para operações de secagem e desenvolvimento de reações enzimáticas. A atividade enzimática e o teor de proteínas das várias etapas da purificação foram estimados em espectrofotômetro BAUSCH & LOMB, modelo Spectronic - 20. As frações eluídas das colunas de troca iônica ou gel filtração foram coletadas em coletor BUCHLER FRACTOMETTE, modelo Alpha 200 e as respectivas absorbâncias, em 280 nm, foram fornecidas por um espectrofotômetro PERKIN-ELMER, modelo 124-D. As placas para cromatografia em camada delgada (TLC) foram preparadas em equipamento DESAGA, 1 213 753.

### 1.3- Matéria prima e reagentes.

Foi utilizado Extrato de Soja em Pó cedido pela OLVEBRA S/A; peptonas e extrato de leveduras para formulação de meios cultura da DIFCO e Sílica-gel da MERK na preparação de placas para cromatografia em camada delgada (TLC). Glucose, galactose, frutose, sacarose, lactose também da MERK, enquanto rafinose e estaquiose pertenciam à SIGMA, da mesma forma que as proteínas padrão, ovoalbumina e soroalbumina bovina. A atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi estimada, respectivamente pelo emprego de

PNPG e *o*-nitrofenil- $\beta$ D-galactopiranosídeo, também da SIGMA. A glucose liberada pela atividade enzimática foi dosada pela glucose oxidase-cromogênio (God-Pap) da BOH ERINGER e as colunas para cromatografia foram empacotadas com DEAE-Sephadex A-50 e Sephadex G-200 da PHARMACIA FINE CHEMICALS. Todos os demais reagentes utilizados apresentavam pureza analítica.

## 2- MÉTODOS

### 2.1- Preparação de Extratos de Soja

Os extratos de soja usados para verificação da ação enzimática ou como meio de crescimento foram produzidos de modo análogo ao descrito por CRUZ *et al* (18), em 1981. Extrato de Soja em Pó desengordurado foi suspenso em água destilada na proporção 1:10 (peso/volume) e aquecido até fervura por 10 minutos com agitação constante. Após resfriamento da suspensão até temperatura ambiente, as proteínas foram precipitadas isoeletricamente pela adição de HCl, N até ajuste do pH em 4.5. O precipitado foi separado por centrifugação a 3 600 rpm por 5 minutos e o sobrenadante concentrado por evaporação a vácuo a 50°C até 6% de açúcares totais; fermentado por leveduras de panificação durante 24 horas e, a seguir, tratado em colunas (35 x 2.5 cm) de troca iônica AMBERLITE, IR 120 AR e IR 45 - AR para dessalinização. Os açúcares totais foram dosados pelo método de DUBOIS *et al* (26) e caracterizados por TLC. O fluxograma da Fig. 2 ilustra todo o procedimento adotado.

## 2.2- Crescimento do microrganismo e obtenção de enzimas

### 2.2.1- Meios de cultura.

Os meios de cultura empregados para testes de crescimento e produção de enzimas em cultura submersa foram formulados de modo a apresentar 1.5% de proteínas, 2.0% de carboidratos, 0.5% de extrato de leveduras, 0.2% de  $\text{NaNO}_3$ , 0.5% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05% de KCl e pH final 6.0.

O meio semi-sólido foi obtido pelo umêdecimento de farelo de trigo com água destilada e/ou "extrato aquoso" de soja (3.7% de açúcares totais), sempre na proporção 1:1, peso/volume. A porção líquida adicionada ao meio foi constituída por: apenas água destilada; água-"extrato" 9:1; água-"extrato" 5:5 e apenas "extrato", por tanto, quatro meios com diferentes teores de carboidratos. Tanto os meios líquidos como os semi-sólidos foram esterilizados por autoclavagem a 120° C e 1 atmosfera, durante 20 minutos.

### 2.2.2- Preparação do inóculo

Foi preparada uma suspensão de esporos pela adição de 10 ml de água esterilizada em um tubo inclinado da cultura, a qual teve sua superfície levemente friccionada por uma alça de platina, também estéril, a fim de desprendê-los da cultura.

### 2.2.3- Cultura submersa

Após esterilização, frascos Erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml de meio foram inoculados com 1.0 ml da suspensão de esporos e colocados a 250 rpm em agitador rotatório a 30° C, por vários dias. O crescimento dos fungos foi acompanhado diariamente por determinação do peso seco do micélio pelo método da AOAC (3), consumo de carboidratos pelo método de DUBOIS *et alli* (26), variações do pH e medida da atividade enzimática do meio de cultura. O micélio foi separado do meio por centrifugação a 10 000 rpm, por 10 minutos e o sobrenadante foi denominado extrato bruto.

Para obtenção das enzimas intracelulares, a massa micelial foi lavada em água destilada, triturada por fricção com vidro moído em almofariz de porcelana e, a seguir, colocada em suspensão em 100 ml de água deionizada. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, a atividade enzimática encontrada no sobrenadante foi considerada como de origem intracelular.

### 2.2.4- Cultura em meio semi-sólido.

Frascos Erlenmeyer de 500 ml, com 20 g. de meio, foram esterilizados e inoculados pelos procedimentos acima descritos e, a seguir, colocados e mantidos em estufa a 30° C, por 5 dias. Cada frasco recebeu, então, 100 ml de água deionizada, sendo o conteúdo levemente agitado por 1 hora à temperatura ambiente. A mistura foi, a seguir,

filtrada em lã de vidro e o filtrado, analisado quanto à atividade enzimática e empregado para tratamento do Extrato de Soja e hidrólise de galactoligossacárides puros.

### 2.3- Ensaio da atividade da $\alpha$ -galactosidase.

A ação da  $\alpha$ -galactosidase foi ensaiada no substrato sintético PNPG e melibiose. Alíquotas de 0.1 ml de solução de enzima, adequadamente diluída, foram adicionadas em 1.0 ml de PNPG, 2 mM em tampão de MacIlvaine, 0.05M, pH 4.0, preparado segundo BATES, R.G (6), e colocados para reagir a 50° C, por 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3.0 ml de tampão borato 0.1 M, pH 10.7 (6) e o p-nitrofenol liberado (PNP) pela ação enzimática, estimado espectrofotometricamente a 400nm. A absorbância molar do PNP nestas condições foi estimada em  $18\,000\text{ cm}^{-1}.\text{M}^{-1}$  e uma unidade (U) de  $\alpha$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1.0  $\mu\text{M}$  de PNP por minuto, nas condições acima.

Quando melibiose foi usada como substrato, o sistema constituido por 1.0 ml de solução de enzima, 1.0 ml de solução de melibiose 0.06M e 1.0 ml de tampão de McIlvaine 0.05M, pH 4.0 foi colocado em banho-maria a 50° C. Após 40 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 0.25 ml de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , 0.33N e 0.25 ml de  $\text{ZnSO}_4$ , a 5%, sendo o precipitado removido por centrifugação a 2 000 rpm, por 5 minutos. A glucose liberada foi dosada pelo método da glucose-oxidase-cromogênio descrito por HOUGH & JONES (34). Uma unidade (U) de  $\alpha$ -galactosida-

se foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1.0  $\mu$ M de glucose, por minuto nas condições descritas. Para ambos os substratos, a atividade específica foi expressa como unidade de enzima por miligrama de proteína. A concentração de proteínas, nestes casos, foi determinada através do método de LOWRY *et alli* (50), modificado por HARTRE (29), tendo sido usada a soro-albumina bovina como padrão.

#### 2.4- Atividade de invertase.

A atividade de invertase encontrada no extrato bruto e filtrado do meio semi-sólido foi estimada pela incubação de 0.5 ml de solução de enzima, 1.0 de tampão McIlvaine, 0.05M, pH 5.0 e 1.0 ml de solução de sacarose, 0.06M, a 40°C, por 5 minutos. Todos os demais procedimentos foram iguais aos do ensaio de  $\alpha$ -galactosidase sobre a melibiose.

#### 2.5- Atividade de $\beta$ -galactosidase.

A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi ensaiada nas mesmas condições de concentração, pH e temperatura descritas para a ação da  $\alpha$ -galactosidase sobre o PNPG, exceto que o *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo foi utilizado como substrato e a absorbância do *o*-nitrofenol liberado foi verificada em 420 nm.

#### 2.6- Purificação da $\alpha$ -galactosidase



### 2.6.1- Insolubilização por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Em 1 000 ml de extrato bruto foram adicionados 560 g. de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 80% de saturação, sob fraca e constante agitação. Após repouso de 24 horas, o precipitado foi submetido à centrifugação a 16 000 rpm, por 10 minutos e o material sedimentado, redissolvido em água deionizada. Tal solução foi, então, dialisada contra água deionizada por 24 horas e mais 24 horas contra freqüentes trocas de tampão de McIlvaine, 0.05M, pH 6.0 e, em seguida, submetida à cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50. Esta e todas as demais fases da purificação foram desenvolvidas em câmara climática a 49 C.

### 2.6.2 Cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50.

Após rápidas e sucessivas lavagens com soluções de NaOH e HCl 0.1N, como recomendado por PETERSON E.A. (63), 20 g. de DEAE-Sephadex A-50 foram empacotados em coluna de 70 x 35 cm, a qual foi equilibrada com tampão McIlvaine 0.05M, pH 6.0. O fluxo foi regulado em 5 ml/30 minutos, a solução adicionada à coluna e suas proteínas eluídas com concentrações crescentes de NaCl (0.05 a 0.3M) no mesmo tampão. Frações de 5 ml foram coletadas e analisadas quanto à concentração de proteínas e atividade enzimática. As frações dotadas de atividade de  $\alpha$ -galactosidase foram precipitadas com sulfato de amônia- 80% de saturação, redissolvida em água deionizada e, a seguir, dialisadas por 48 horas contra tampão Tris-HCl 0.05M mais 0.1 M de KCl, pH 7.5, trocado de 6 em 6 horas. Tal solução foi

posteriormente cromatografada em Sephadex G-200.

### 2.6.3- Gel filtração em Sephadex G-200.

O Sephadex G-200 foi entumecido por 3 dias, equilibrado com Tampão Tris-HCl 0.05M mais 0.1M de KCl, pH 7.5 (2) e empacotado em coluna de 90 x 3.5 cm. Após ajuste do fluxo para 5 ml/20 min., seu volume de vazão ( $V_0$ ) foi calculado pela percolação de pequena amostra de BLUE DEXTRAM 2 000. Simultaneamente, pequenas amostras de proteínas padrão foram dissolvidas na solução de enzimas e esta, depositada na coluna. As proteínas foram eluídas pelo mesmo tampão e coletadas em frações de 5 ml para posterior análise.

### 2.7- Caracterização da $\alpha$ -galactosidase purificada.

#### 2.7.1- Efeito de metais, monossacárides e outros reagentes

Uma mistura composta de 0.5 ml de solução de PNPG 4mM, 0.5 ml de solução de ions, monossacárides ou outros reagentes em concentração duas vezes superior às expressas na Tabela 04 foi incubada com 0.1 ml de solução de enzima (0.28 U), em condições ótimas de pH e temperatura. Os valores obtidos para o PNP liberado foram comparados aos da enzima não inibida e expressos como porcentagem da atividade residual.

#### 2.7.2- Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática.

O efeito da concentração do substrato na velocidade da reação foi verificado numa faixa de 0.5 a 10 mM de PNPG e 0.05 a 0.25 M de melibiose, em condições ótimas de pH e temperatura. Os dados foram dispostos em gráficos da velocidade de reação x concentração do substrato, de acordo com o método de LINEWEAVER & BURK (49), permitindo, desta maneira, o cálculo da constante de Michaelis ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_m$ ).

O método gráfico foi utilizado também para a caracterização da inibição sofrida pela enzima quando diferentes concentrações do substrato PNPG foram incubados com  $5 \times 10^{-2}$  M de monossacárides.

#### 2.7.3- Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima.

Para a determinação do pH ótimo da  $\alpha$ -galactosidase em ambos os substratos, a atividade enzimática foi estimada após incubação dos sistemas de reação em tampão McIlvaine, 0.05 M na faixa de pH 2.5 a 7.6.

A estabilidade da enzima em função do pH, por outro lado, foi determinada medindo-se a atividade residual sobre o PNPG após incubação a 50°C por 15 minutos ou a 49°C, por 60 horas. Foi utilizado tampão MacIlvaine, 0.05 M para pH 2.5 a 7.6 e borato-NaOH, 0.04 M, para a faixa de 8.0 a 10.7.

#### 2.7.4- Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da $\alpha$ -galactosidase.

A ação da temperatura na velocidade da hidrólise enzimática foi estudada na faixa de 25 a 60° C em pH 4.0, enquanto a termoestabilidade foi observada pela medida da atividade residual da enzima após tratamento em diferentes temperaturas, por 15 minutos.

A velocidade de desnaturação da estrutura proteica foi estudada pelo tratamento de amostras da enzima a 50, 55 e 60° C. Alíquotas de 0.1 ml de cada amostra foram retiradas a cada 2 minutos, resfriadas rapidamente a 4° C e mantidas nesta temperatura para posterior análise da atividade residual. O PNP<sub>G</sub> foi empregado como substrato em todas as avaliações acima citadas.

#### 2.7.5- Peso molecular

O peso molecular da  $\alpha$ -galactosidase foi calculado de acordo com o método de ANDREWS, P. (2). Ovoalbumina e soroalbumina bovina foram utilizadas como padrão enquanto  $\beta$ -galactosidase e invertase presentes na própria solução e de pesos moleculares já conhecidos (60), também serviram como referência. A coluna utilizada e suas condições de operação foram descritas no item 2.6.3.

#### 2.8- Hidrólise enzimática de galactoligossacárides.

Um sistema composto de 1.0 ml de filtrado enzimático bruto contendo 0.26 U de  $\alpha$ -galactosidase e 1.0 ml de solução de rafinose ou estaquiase 0.06M em tampão MacIlvaine, 0.1M, pH 4.0 foi incubado a 50° C. Após 2h.

a reação foi paralisada pela adição do sistema  $\text{Ba(OH)}_2\text{-ZnSO}_4$  e os açúcares imediatamente testados por TLC.

#### 2.9- Hidrólise enzimática dos oligossacárides da soja.

A um volume de 50 ml de Extrato de Soja preparado de acordo com o item 2.1 (Fig. 02) foram adicionados 12 ml de filtrado enzimático contendo 30 U de  $\alpha$ -galactosidase e 50 U de invertase. O sistema, depositado em frascos Erlenmeyer de 250 ml foi incubado a 50° C por 2 horas. De 30 em 30 minutos, amostras de 2 ml foram retiradas, desproteinizadas por tratamento com  $\text{Ba(OH)}_2\text{-ZnSO}_4$  e os açúcares caracterizados por TLC.

#### 2.10- Cromatografia em camada delgada (TLC).

Amostras de 20  $\mu\text{l}$  foram aplicadas em placas de sílica-gel ativadas com 0.1M de  $\text{H}_3\text{BO}_4$ . Após 90 minutos de desenvolvimento num sistema de solvente constituído por acetato de etila, ácido acético e água (3:1:1), os cromatogramas foram revelados por uma mistura de difenilamina-anilina-fosfato, conforme descrito por WALKLEY & TILLMAN (82).

#### IV- RESULTADOS

##### 1-CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS

###### 1.1- Meio submerso

Vários açúcares foram testados como fonte de carbono para crescimento e produção de  $\alpha$ -galactosidase e invertase pelo microrganismo, em meio submerso. Como pode ser verificado na Tabela 01,  $\alpha$ -galactosidase somente foi produzida em meios contendo açúcares dotados de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1+6), preferencialmente de cadeia mais longa. Assim, o tetrassacáride estaquiose mostrou-se por volta de cinco vezes mais eficiente que o trissacáride rafinose (0.27 para 0.05 U/ml) e o dissacáride não mostrou nenhuma capacidade de indução.

A Tabela 01 mostra também que atividade de invertase foi encontrada no meio de cultura, independentemente da fonte de carbono usada. A produção da enzima, no entanto, foi significativamente maior nos açúcares em que se configura a ligação glicosídica  $\beta$ -(1+2), notando-se tam

bém, neste caso, uma relação direta entre produtividade e o peso molecular do açúcar. Desta maneira, estaquiase foi melhor indutor que rafinose e esta melhor que sacarose, ficando em 4.0, 1.36 e 0.69 U/ml, os respectivos valores numéricos. O extrato aquoso de soja, previamente fermentado, (Fig. 2) não se mostrou mais eficiente que estaquiase como indutor de invertase; porém, aumentou substancialmente a produção de  $\alpha$ -galactosidase (de 0.27 para 1.65 U/ml).

A Fig. 03 sumariza as condições de crescimento do *Aspergillus orizae* no extrato aquoso de soja, bem como a produção e liberação das enzimas no meio de cultura. A fase exponencial se iniciou após 24 horas de incubação com a produção, tanto de  $\alpha$ -galactosidase como de invertase, evoluindo quase que paralelamente ao crescimento do micélio. Também neste período foram verificadas as maiores variações do pH do meio e o mais acentuado consumo de açúcares. A manutenção do micélio no meio de cultivo após a fase exponencial foi marcada por uma grande liberação de enzimas no meio, de maneira que no período entre a 72ª e a 168ª hora, atividade da  $\alpha$ -galactosidase aumentou de 0.97 para 4.1 U/ml e a de invertase, de 2.3 para 5.8 U/ml.

#### 1.2- Meio semi-sólido

*Aspergillus orizae* mostrou-se capaz de produzir  $\alpha$ -galactosidase e invertase, também pelo método de *kaji*. A adição do extrato aquoso de soja, com 3.7% de açúcares totais ao farelo de trigo, atuou como poderoso indutor de  $\alpha$ -galactosidase, provocando, no entanto, um decrêscimo

cimo na atividade da invertase. Assim, como pode ser verificado na Tabela 02, a atividade inicial da  $\alpha$ -galactosidase de 0.91 U/ml obtida quando apenas água destilada foi adicionada ao farelo, aumentou para 0.96, 1.73 e 2,58 U/ml, respectivamente, quando 10, 50 e 100% de extrato, substituíram iguais porções de água. Estas novas formulações, pelo contrário, baixaram a atividade inicial da invertase de 6.8 U/ml para 6.4, 5.3 e 4.4 U/ml, respectivamente.

## 2- PURIFICAÇÃO DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE.

A atividade específica inicial do extrato bruto, constituído pelo sobrenadante do meio de crescimento do *A. orisae*, foi estimada em 0.13 U de  $\alpha$ -galactosidase por miligrama de proteína. Conforme sumarizado na Tabela 03, a precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 80% de saturação produziu uma fração com 0.61 U/mg, portanto, 4.7 vezes mais pura e, praticamente sem perda de atividade. A percolagem em coluna DEAE-Sephadex A-50 tornou a enzima 13 vezes mais pura, permitindo uma recuperação de apenas 33.6% da atividade total e, finalmente, a filtração em Sephadex G-200 produziu uma fração com 3.43 U/mg de proteína, correspondendo a uma purificação de 26.4 vezes e rendimento de 27%. A Fig. 04 mostra o cromatograma produzido pela eluição da coluna DEAE-Sephadex A-50 enquanto o da gel filtração é visto na Fig. 05.

## 3- CARACTERIZAÇÃO DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE.

### 3.1- Efeito da concentração do substrato na atividade.



Melibiose e PNPG foram utilizados para o estudo do efeito de diversas concentrações de substrato na velocidade de reação. Como mostram as Fig. 06 e 07, os valores de  $K_m$  para melibiose e PNPG foram calculados respectivamente em 140 mMol e 2.04 mMol e os valores de  $V_m$  em 0.64  $\mu$ Mol de glucose/min./mg. e 0.36  $\mu$ Mol de PNP/min./mg. de proteína.

### 3.2- Estudos da inibição da atividade enzimática

Ions de metais pesados como a  $Ag^+$  e o  $Hg^+$  atuaram como potentes inibidores da  $\alpha$ -galactosidase, enquanto  $CaCl_2$  e  $CoCl_2$  em idênticas concentrações, exerceram apenas um leve efeito inibidor. *p*-Cloromercuribenzoato também provocou significativa inibição, ao contrário de outros reagentes como o EDTA e mercaptoetanol. Entre os monossacárides,  $1 \times 10^{-2}$  Mol de glucose inibiu em 9% a atividade enzimática, enquanto galactose e frutose, nas mesmas concentrações não prejudicaram a atividade máxima da enzima. Tais resultados são sumarizados na Tabela 04.

Quando os mesmos monossacárides foram adicionados ao meio de reação, contendo diferentes concentrações de PNPG, a glucose comportou-se como inibidor não competitivo, enquanto galactose e frutose inibiram competitivamente, provocando alterações do  $K_m$ , respectivamente para 3.3 e 3.6 mMol. A Fig. 08 mostra o efeito inibidor dos referidos açúcares, quando adicionados ao sistema de reação na concentração de  $5 \times 10^{-2}$  Mol.

### 3.3- Influência do pH na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática foi verificado nos dois substratos. Como pode ser verificado nas Fig. 09 e 10, a atividade máxima da enzima ocorreu em pH 4.0, tanto para o PNPG, quanto para a melibiose. A Fig. 11 mostra a estabilidade da enzima em função do pH. Quando o sistema enzima-tampão foi mantido por 60 horas a 4°C, a atividade enzimática mostrou-se inalterada em uma ampla faixa de pH, tanto ácido como alcalino. A estabilidade da estrutura proteica também não foi afetada quando o sistema de reação foi mantido a 50°C, por 15 minutos entre pH 4.0 e 7.0.

### 3.4- Comportamento da enzima em função da temperatura.

A Fig. 12 mostra o efeito da temperatura sobre a atividade da  $\alpha$ -galactosidase. Incubada em seu pH ótimo, em várias temperaturas, tendo como substrato o PNPG, a velocidade máxima de hidrólise foi obtida a 50°C, caindo, bruscamente, entretanto a 55°C. Quando submetida a tratamento térmico, durante 15 minutos, a estrutura proteica da  $\alpha$ -galactosidase resistiu até 50°C, conforme pode ser visto na Fig. 13 - A. A velocidade de desnaturação a 55 e 60°C é mostrada na parte B da mesma figura.

### 3.5- Peso molecular

O peso molecular da  $\alpha$ -galactosidase foi calculado em 200 000 aproximadamente, através do gráfico,

$V/V_0 \times \text{Log.}$  do peso molecular, mostrado na Fig. 14

#### 4- HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE GALACTOLIGOSSACÁRIDES PUROS.

O preparado enzimático contendo  $\alpha$ -galactosidase e invertase hidrolisou completamente a rafinose em 2 horas nas condições experimentais, conforme pode ser visto na TLC da Fig. 15. Da mesma forma, a estaquiase foi substancialmente hidrolisada, deixando, no entanto, vestígios de produtos intermediários

#### 5- HIDRÓLISE DOS OLIGOSSACÁRIDES DA SOJA

Sacarose, rafinose e estaquiase foram bem caracterizadas no Extrato de Soja, antes do tratamento enzimático, conforme mostra a TLC da Fig. 16. Após 2 horas de tratamento enzimático, entretanto, substanciais quantidades de monossacárides foram liberados, constatando-se uma completa remoção de sacarose, enquanto os teores de rafinose e estaquiase aparecem significativamente decrescidos.

TABELA 01

Fonte de carbono e produção de enzimas em meio submerso.

| Fonte de<br>carbono     | $\alpha$ -GALACTOSIDASE<br>(U./ml) |      | INVERTASE<br>(U./ml) |
|-------------------------|------------------------------------|------|----------------------|
|                         | *                                  | **   |                      |
| Glucose                 | -                                  | -    | 0.16                 |
| Maltose                 | -                                  | -    | 0.12                 |
| Amido                   | -                                  | -    | 0.80                 |
| Sacarose                | -                                  | -    | 0.69                 |
| Melibiose               | -                                  | -    | 0.31                 |
| Rafinose                | 0.05                               | 0.04 | 1.36                 |
| Estaquiiose             | 0.27                               | 0.14 | 4.00                 |
| Ext. soja<br>fermentado | 1.65                               | 0.40 | 4.10                 |

Substrato: \* PNPG

\*\* Melibiose

TABELA 02

Produção de  $\alpha$ -galactosidase e invertase em meio semi-sólido após 5 dias de fermentação

| Composição<br>do meio.                   | $\alpha$ -GALACTOSIASE<br>U/ml * | INVERTASE<br>U/ml | TOTAL<br>U/ml |
|------------------------------------------|----------------------------------|-------------------|---------------|
| Farelo - água                            | 0.91                             | 6.8               | 7,71          |
| Farelo - Extrato<br>aquoso de soja 10%** | 0.96                             | 6.4               | 7.36          |
| Farelo - Extrato<br>aquoso de soja 50%   | 1.73                             | 5.3               | 7.03          |
| Farelo - Extrato<br>aquoso de soja 100%  | 2.58                             | 4.4               | 6.98          |

\* Substrato: PNPG

\*\* Proporção de extrato aquoso de soja adicionado ao farelo de trigo para umedecimento.

TABELA 03

Purificação da  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*.

| Etapas                                                   | Volume<br>(ml) | Atividade<br>(U/ml) | Ativ.<br>Total | Proteína<br>(mg/ml) | Ativ. Espec.<br>(U/mg) | Recup.<br>(%) | Purif.<br>vezes |
|----------------------------------------------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|------------------------|---------------|-----------------|
| Extrato bruto                                            | 1000.0         | 1.05                | 1050           | 8.23                | 0.12                   | 100           | 1.0             |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Precip.* | 76.5           | 13.62               | 1040           | 22.08               | 0.61                   | 99            | 4.7             |
| DEAE-Sephadex A-50                                       | 31.0           | 11.4                | 353            | 6.75                | 1.69                   | 33.6          | 13.0            |
| Sephadex - G-200                                         | 10.0           | 28.44               | 284            | 8.28                | 3.43                   | 27.1          | 26.4            |

\* Saturação = 80%

Substrato: PNPG

TABELA 04

Inibição da  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por ions metálicos, monossacárides e outras substâncias.

| INIBIDORES             | Concentração<br>(M)  | Atividade*<br>Residual % |
|------------------------|----------------------|--------------------------|
| Sem inibidor           | -                    | 100                      |
| p-Cloromercuribenzoato | $0.5 \times 10^{-4}$ | 11                       |
| Iodoacetamida          | $1.0 \times 10^{-3}$ | 91                       |
| Mercaptoetanol         | $1.0 \times 10^{-3}$ | 100                      |
| CaCl <sub>2</sub>      | $1.0 \times 10^{-3}$ | 95                       |
| CoCl <sub>2</sub>      | $1.0 \times 10^{-3}$ | 87                       |
| MgCl <sub>2</sub>      | $1.0 \times 10^{-3}$ | 100                      |
| AgCl <sub>2</sub>      | $1.0 \times 10^{-3}$ | 0                        |
| HgCl <sub>2</sub>      | $1.0 \times 10^{-3}$ | 0                        |
| AgNO <sub>3</sub>      | $1.0 \times 10^{-3}$ | 0                        |
| EDTA                   | $1.0 \times 10^{-3}$ | 101                      |
| ZnCl <sub>2</sub>      | $1.0 \times 10^{-3}$ | 100                      |
| Glucose                | $1.0 \times 10^{-2}$ | 91                       |
| Galactose              | $1.0 \times 10^{-2}$ | 100                      |
| Frutose                | $1.0 \times 10^{-2}$ | 100                      |

\* Substrato: PNPG.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENT.

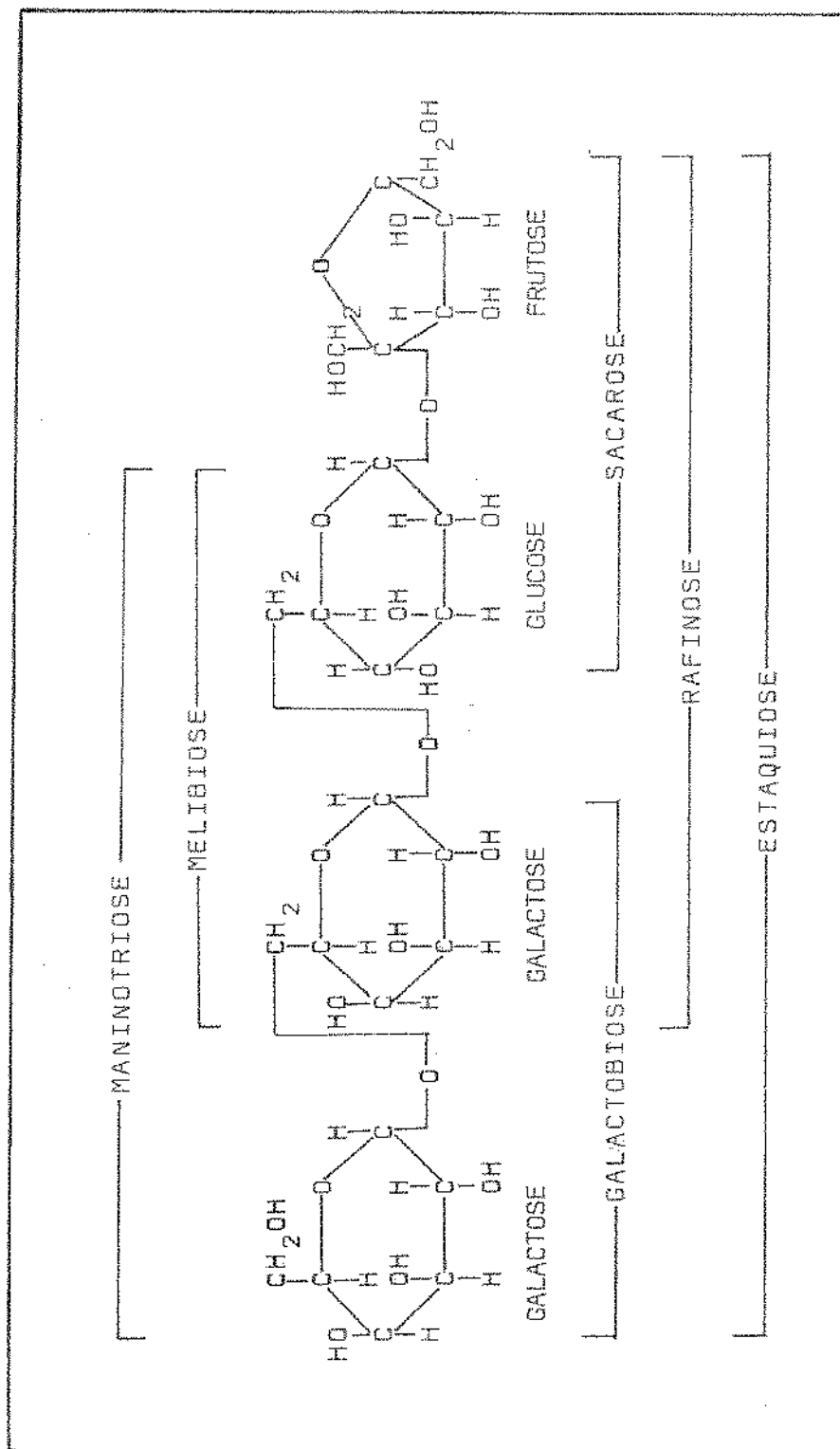


FIGURA 01: Estrutura dos oligossacárides presentes na soja



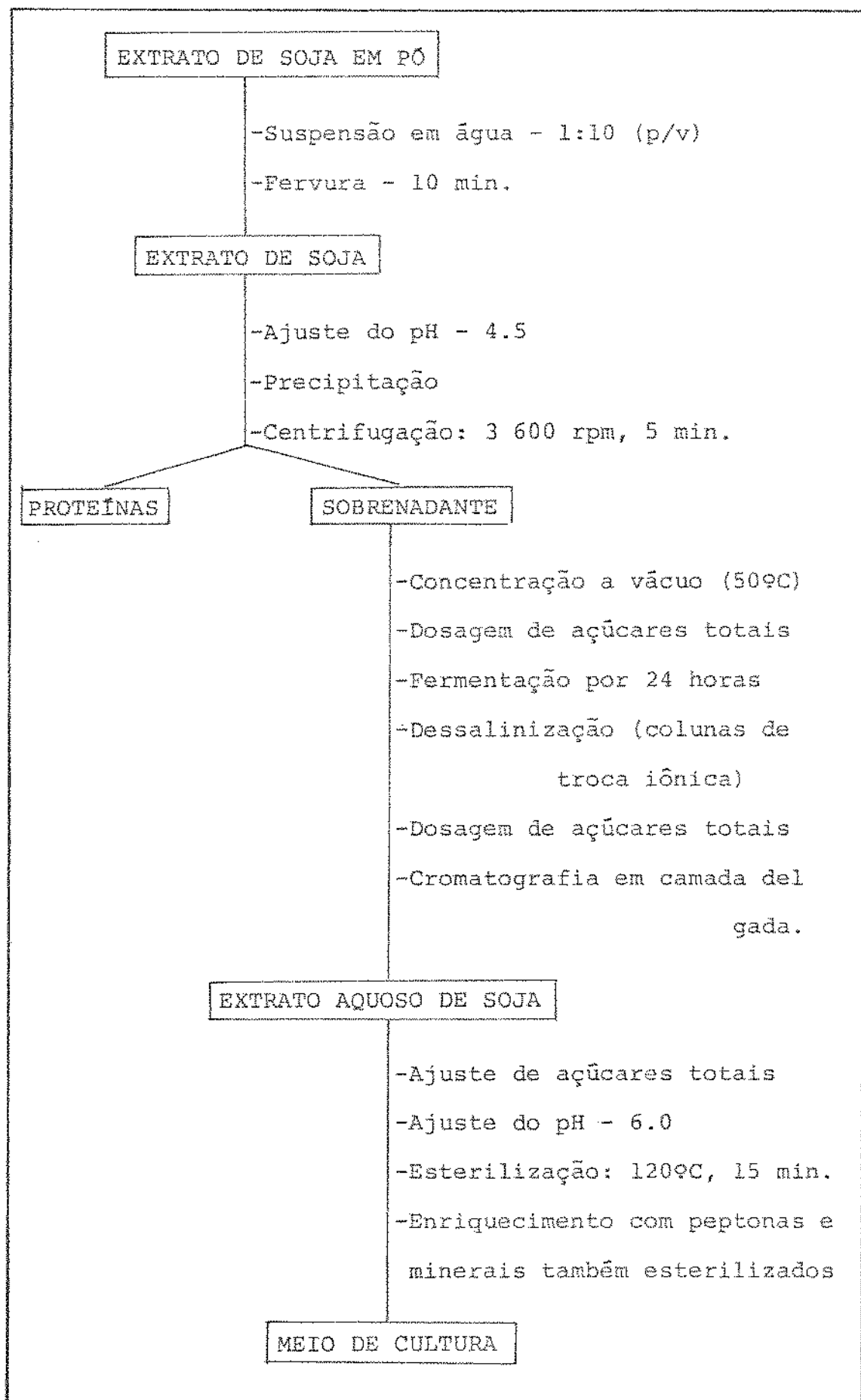


FIGURA 02: Preparação do Extrato de Soja e formulação do meio de cultura.

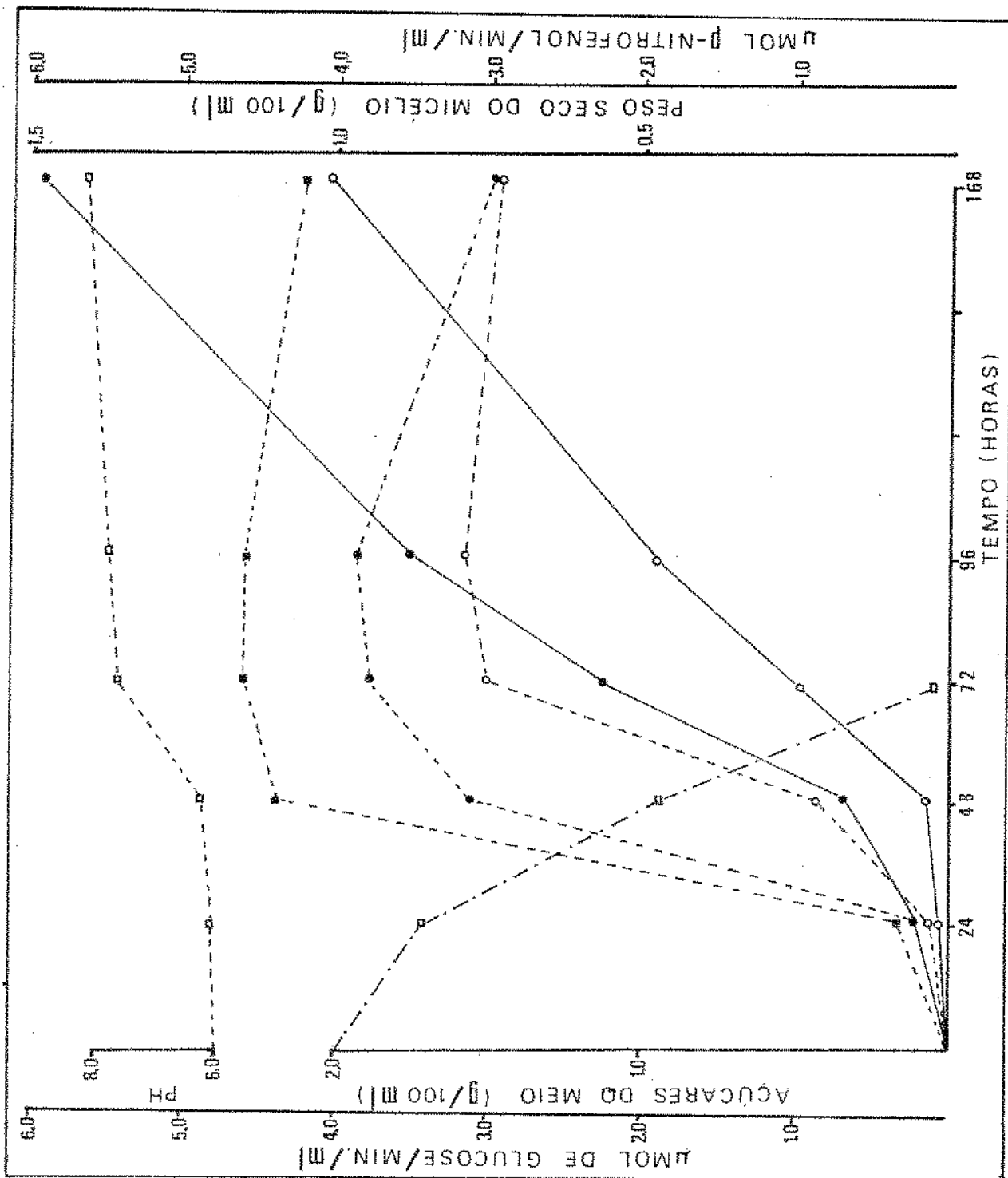


FIGURA 03: Crescimento do *Aspergillus oryzae* em extrato aquoso de soja.

○---○: α-galactosidase intracel.; ●---●: invertase intracel.  
 ○—○: α-galactosidase extracel.; ●—●: invertase extracel.  
 □---□: peso seco do micélio; □---□: pH; ●---●: consumo de açúcar.

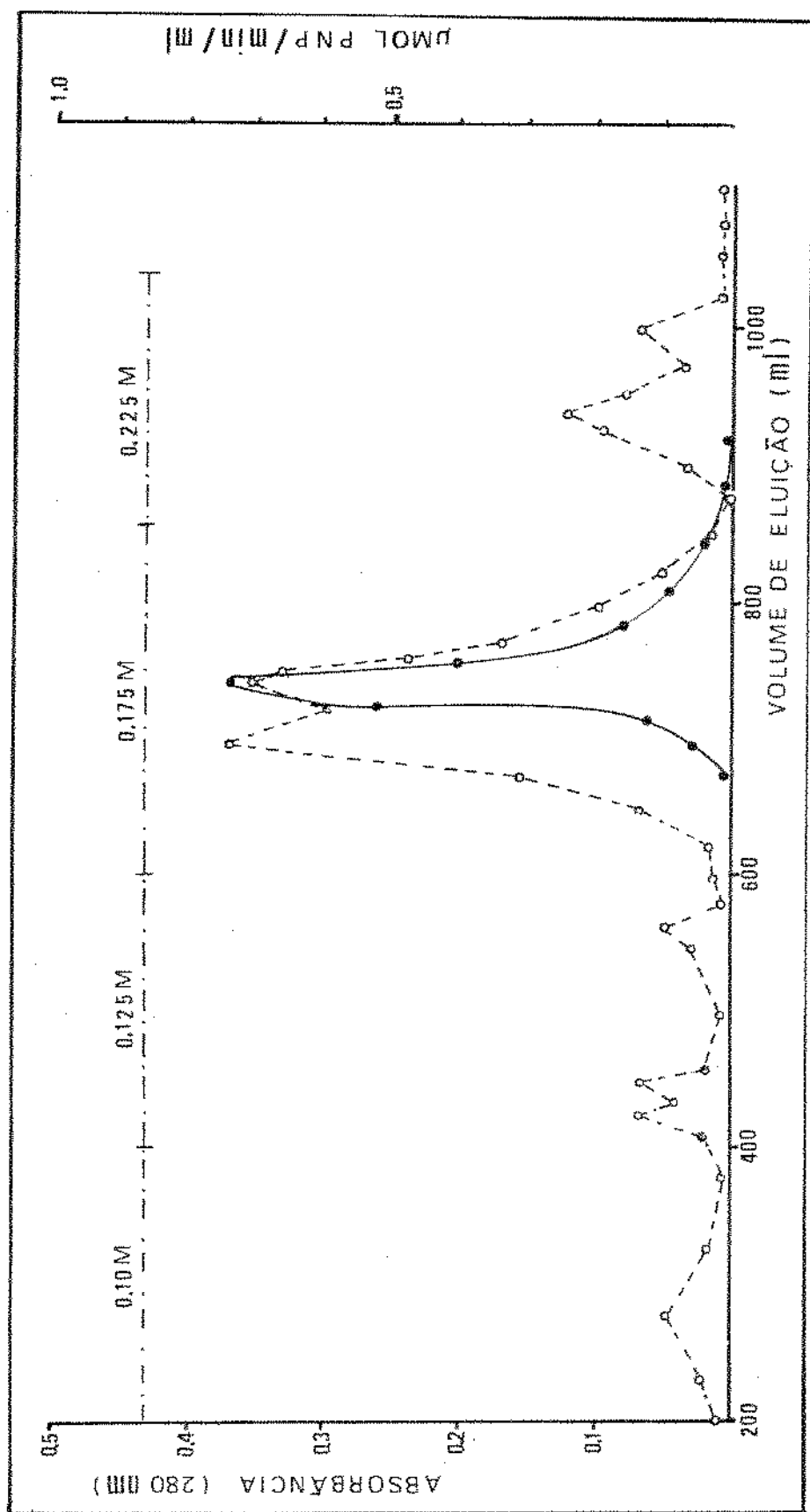


FIGURA 04: Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50, pH 6.0, 0.05 M.

o----o: Absorbância em 280 nm.

●: α-Galactosidase

---: NaCl do Eluente

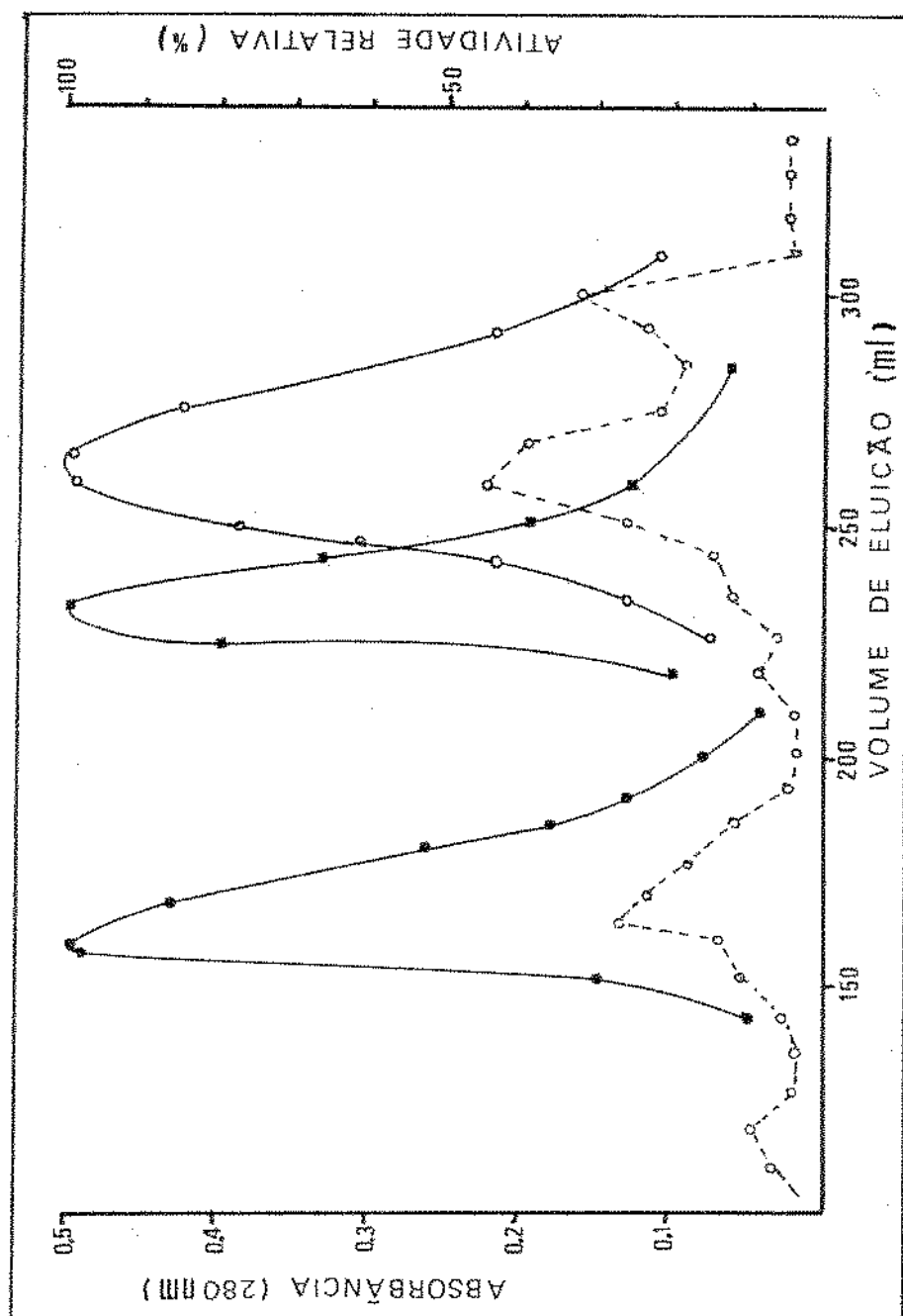


FIGURA 05: Filtração em Sephadex G-200 - Tampão Tris-HCl, 0.05 M,

mais 0.1 M KCl, pH 7.5. o-----o: Absorbância em 280 nm.

●-----●: α-Galactosidase. o-----o: β-Galactosidase.

■-----■: Invertase.

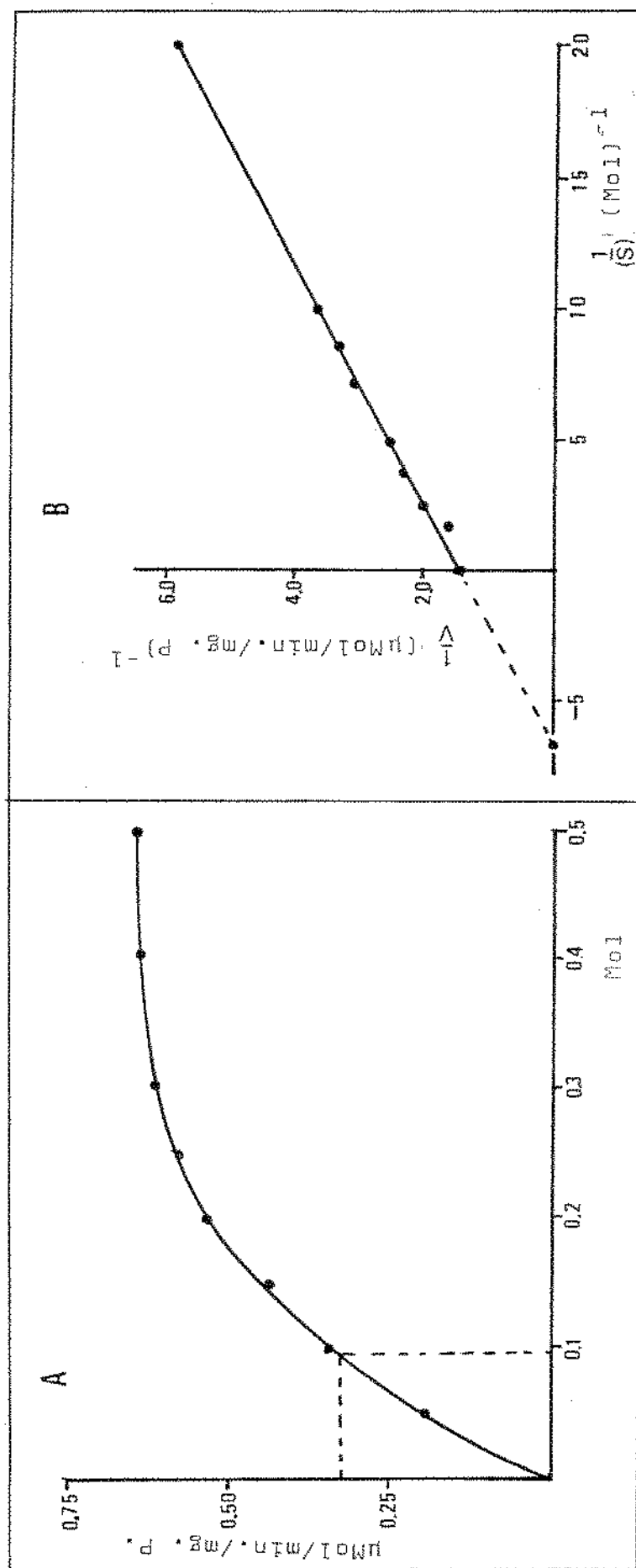


FIGURA 06: Efeito da concentração do substrato na hidrólise da melibiose pela  $\alpha$ -galactosidase purificada.

A: de acordo com Michaelis-Menten. B: de acordo com Lineweaver-Burk.

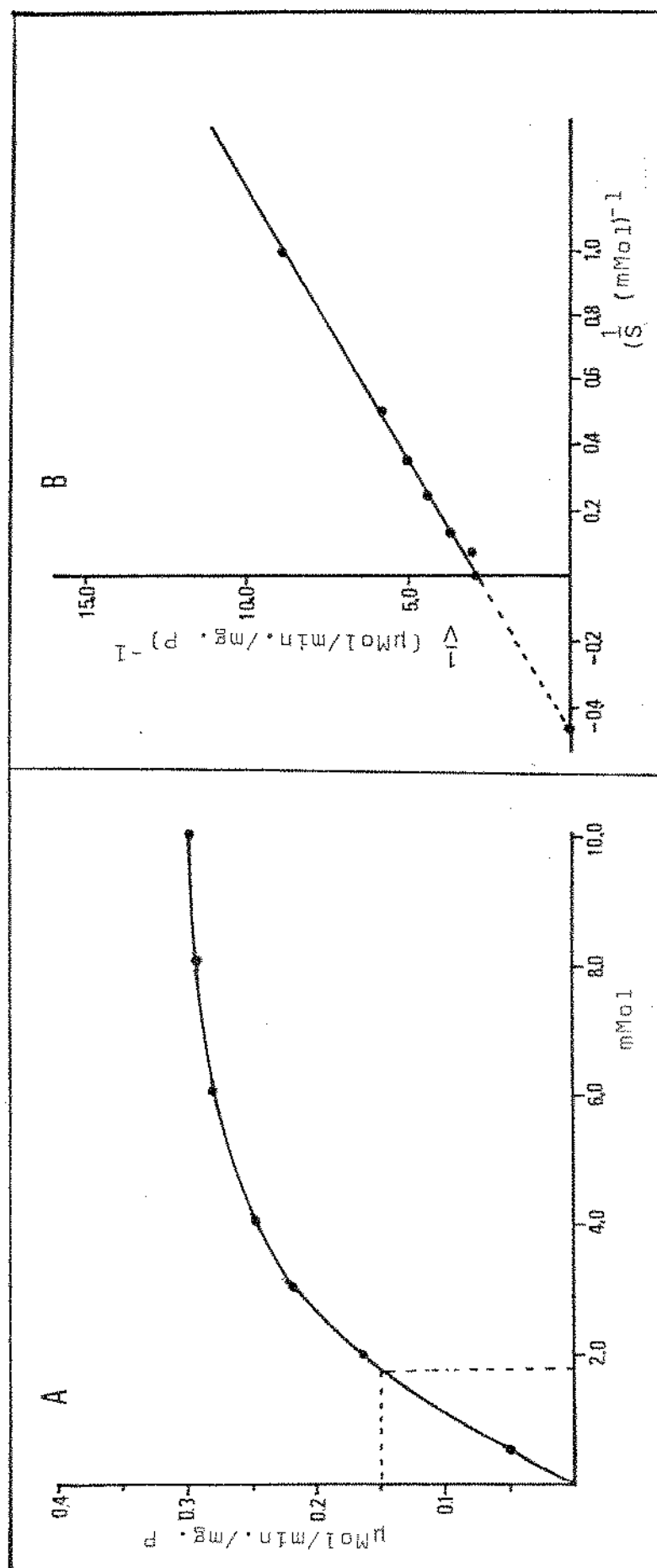


FIGURA 07: Efeito da concentração do substrato na hidrólise do p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-Galactopirano-  
sido pelo  $\alpha$ -galactosidase purificada.

A: de acordo com Michaelis-Menten. B: de acordo com Lineweaver-Burk

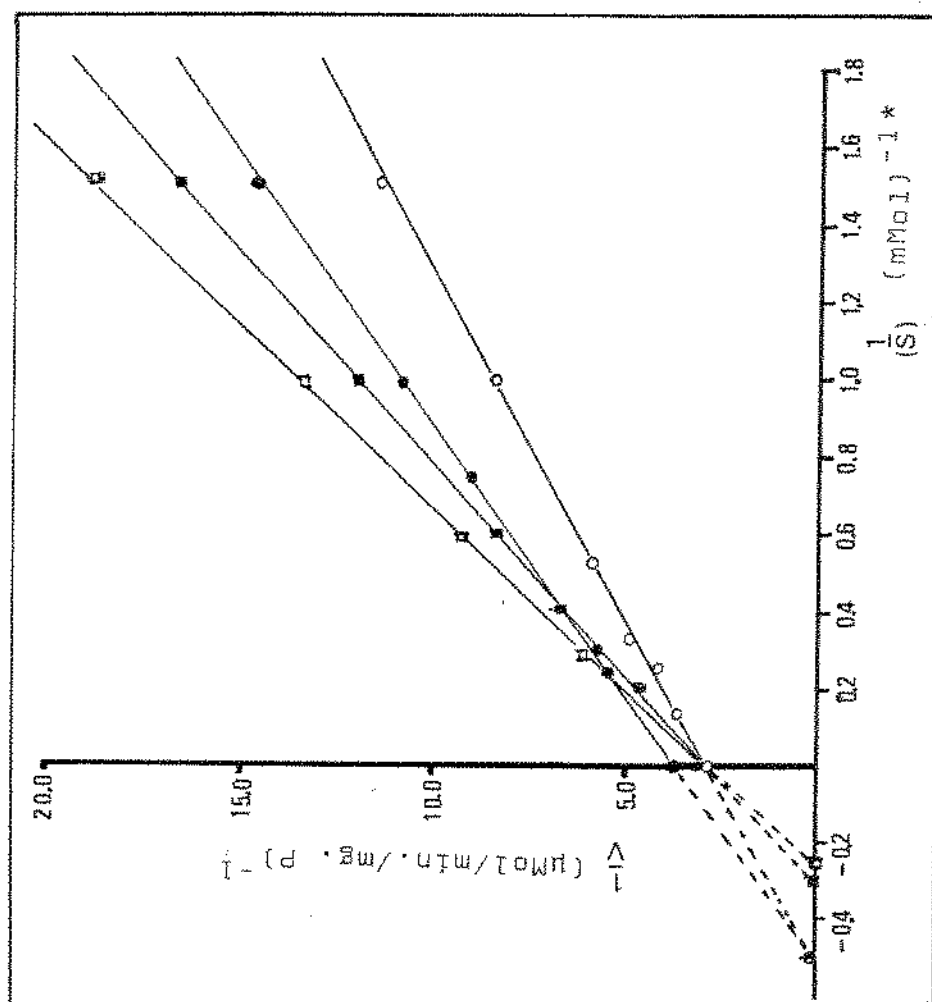


FIGURA 08: Inibição da  $\alpha$ -galactosidase por monossacáridos.

○—○: sem inibidor    ■—■: galactose  
●—●: glucose    □—□: fructose

\* Substrato: PNPG

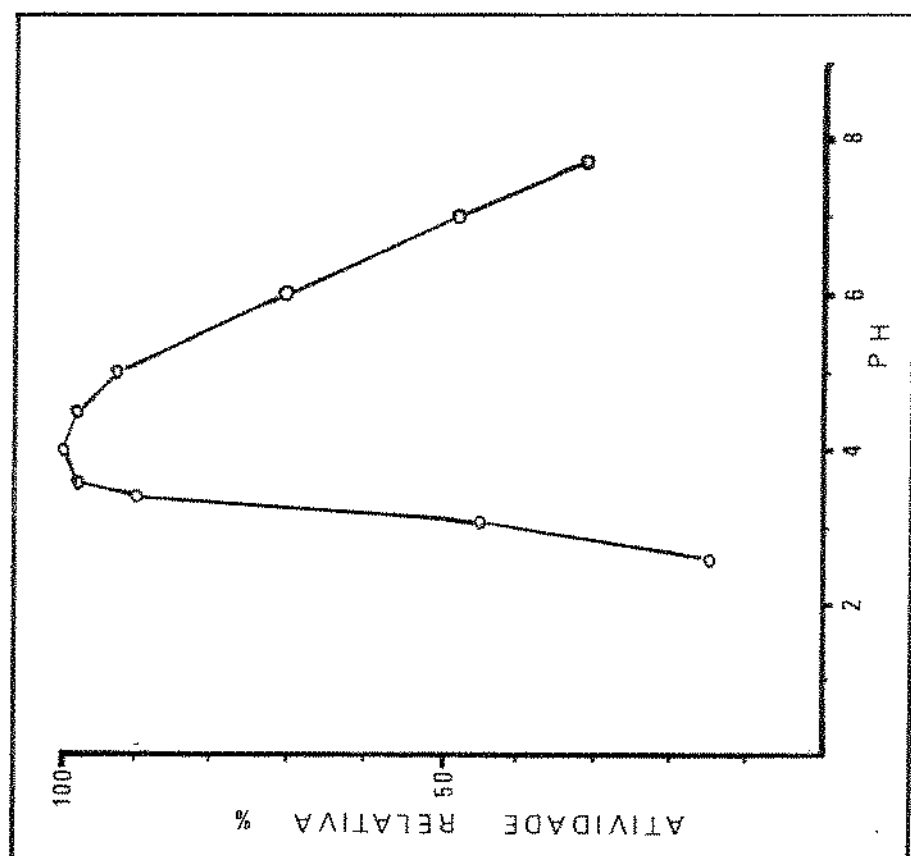


FIGURA 09: Efeito do pH na hidrólise do *p*-Ni-trofenil- $\alpha$ -D-Galactopiranosídeo.



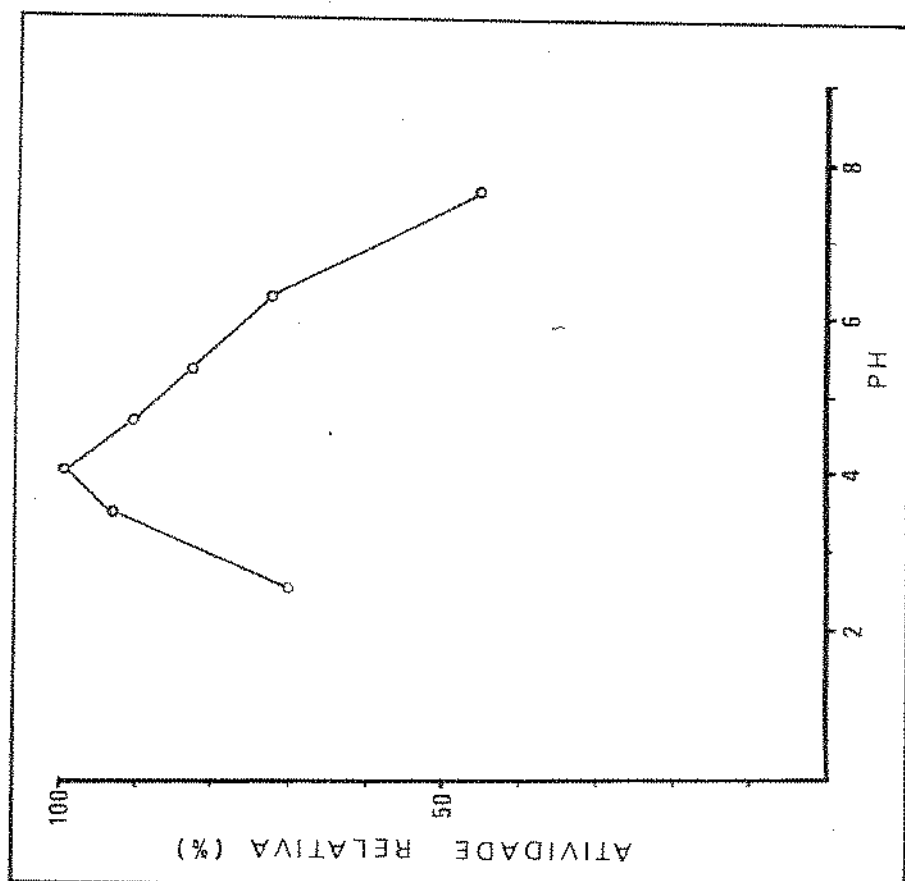


FIGURA 10: Efeito do pH na hidrólise da meli-  
biose pela  $\alpha$ -galactosidase.

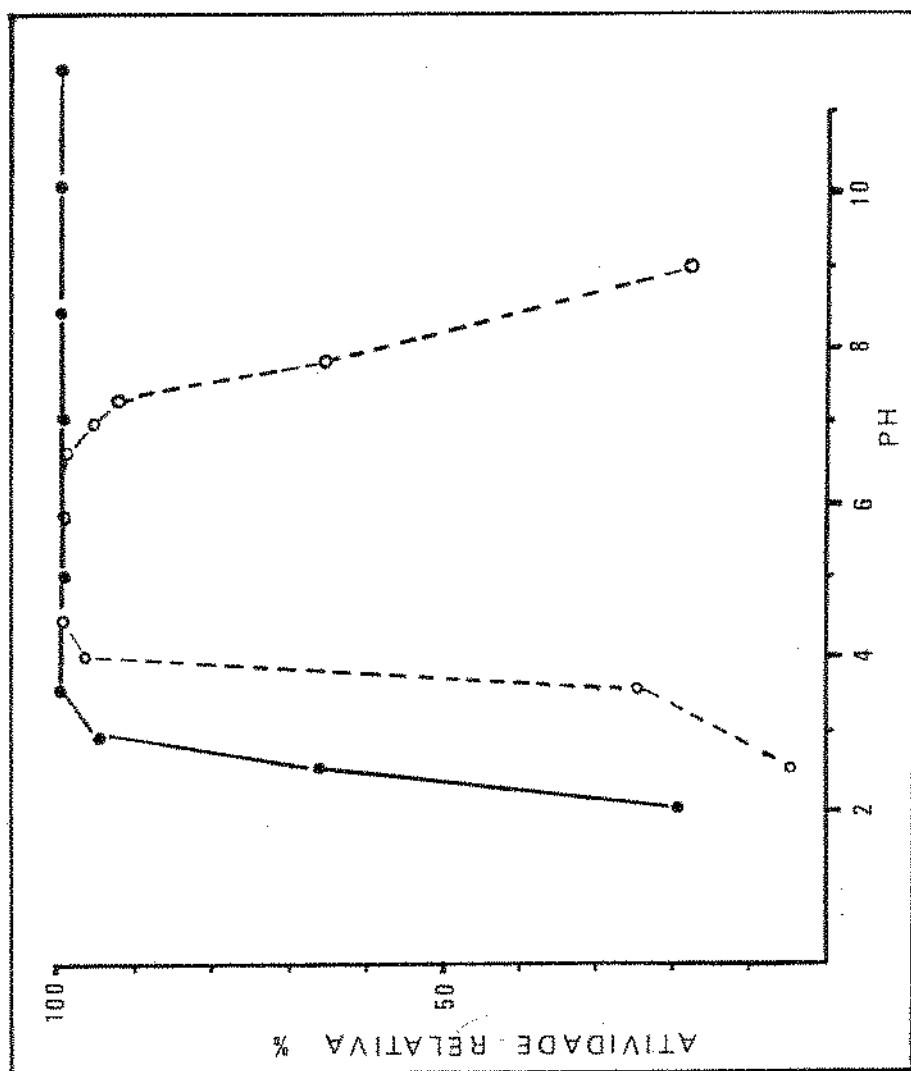


FIGURA 11: Efeito do pH na estabilidade da  $\alpha$ -galactosidase

O---O: tratada a 50° C por 15 minutos

●—●: tratada a 40° C por 60 horas

Substrato: PNPG

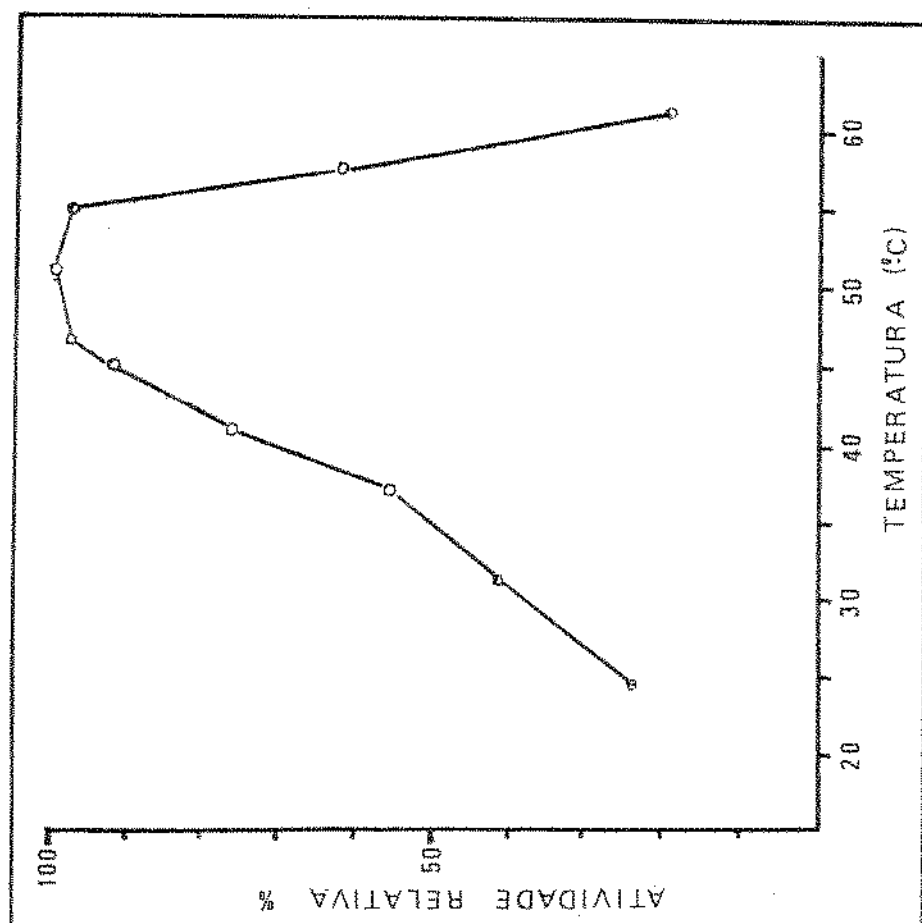


FIGURA 12: Efeito da temperatura na atividade da  $\alpha$ -galactosidase.

Substrato: PNPG.

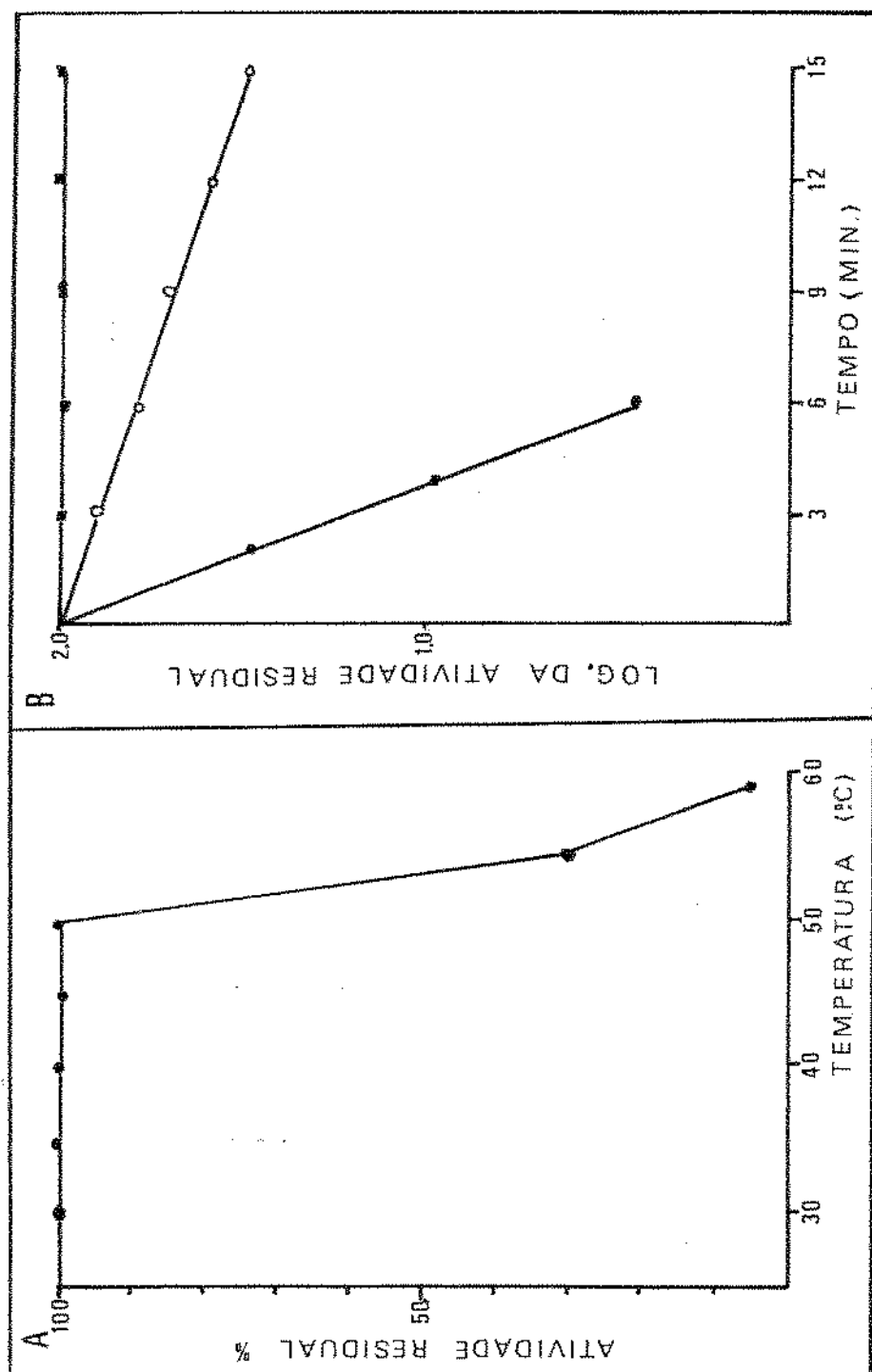


FIGURA 13: Efeito da temperatura na estabilidade da  $\alpha$ -galactosidase.

A: Resistência a várias temperaturas durante 15 minutos

B: Velocidade de desnaturação da estrutura proteica em:

■ : 50°C; ○ : 60°C

Substrato: PNPG.

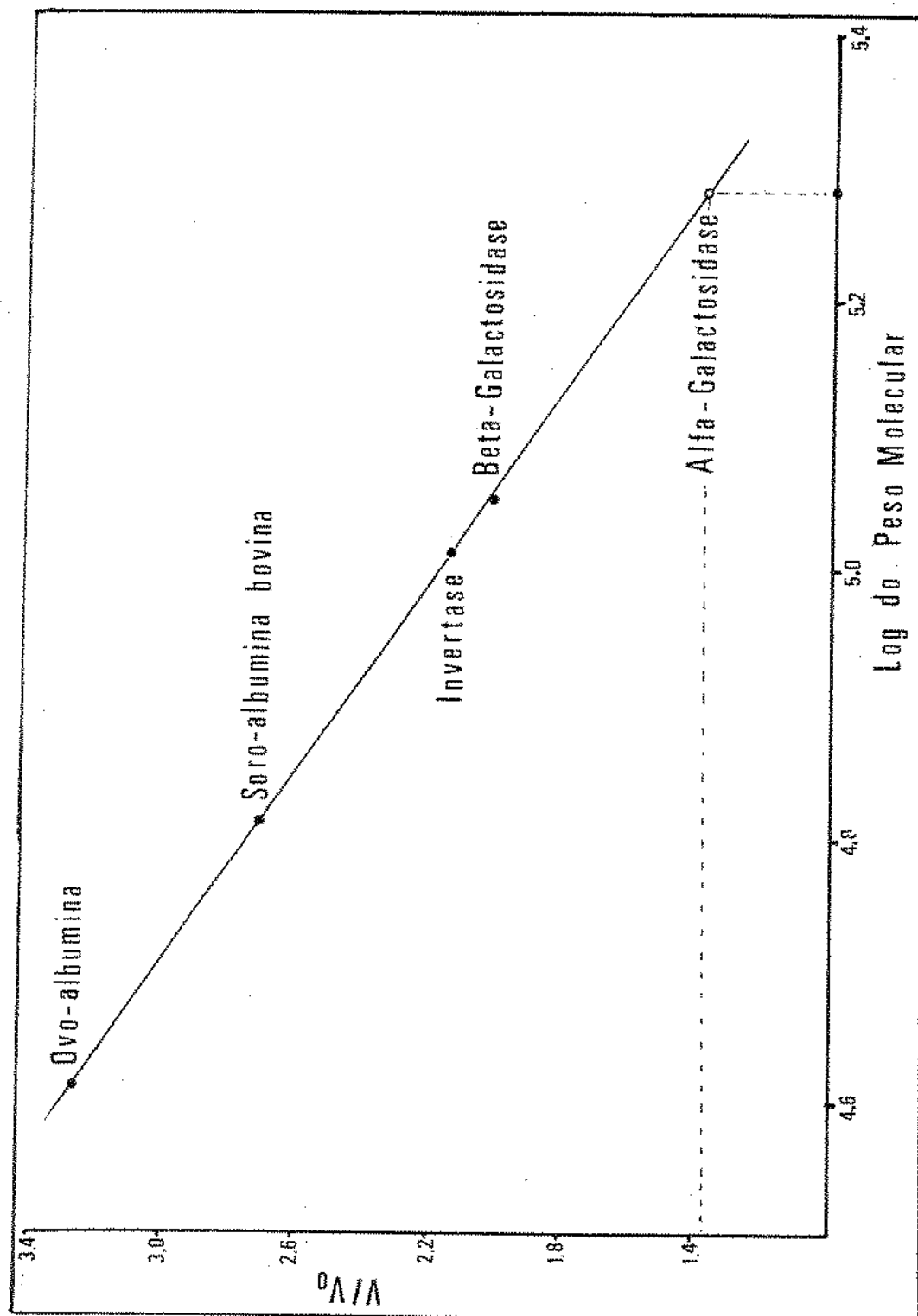


FIGURA 14: Determinação do peso molecular da  $\alpha$ -galactosidase por gel-filtração em Sephadex G-200

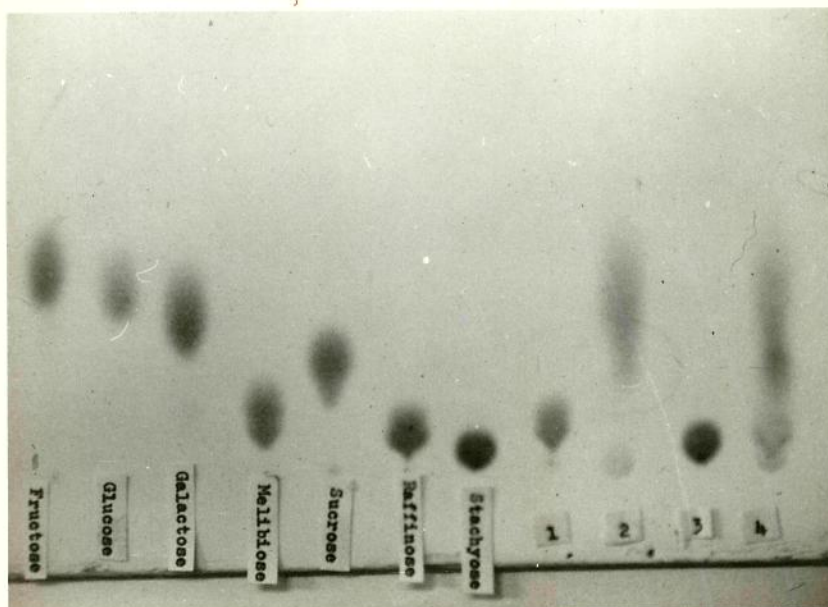


FIGURA 15: TLC - Ação do preparado enzimático sobre soluções de oligossacárides.

- 1- Rafinose: antes do tratamento
- 2- Rafinose: após 2 horas de ação enzimática
- 3- Estaquiouse: antes do tratamento
- 4- Estaquiouse: após 2 horas de ação enzimática.

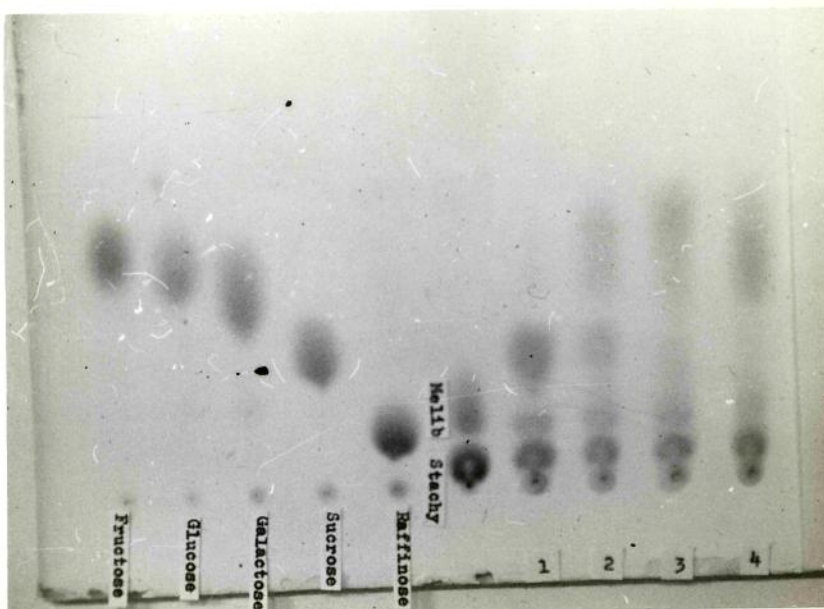


FIGURA 16: TLC - Ação do preparado enzimático sobre oligossacárides do Extrato de Soja.

- 1- Antes do tratamento
- 2- Após 30 minutos
- 3- Após 1 hora
- 4- Após 1 hora e 30 minutos de tratamento.

## V- DISCUSSÃO

*Aspergillus oryzae* mostrou-se capaz de produzir  $\alpha$ -galactosidase de natureza adaptativa, tanto em meio submerso, como por fermentação semi-sólida. Em meio submerso, a indução somente foi verificada quando rafinose ou estaquiase foram usadas como única fonte de carbono. Outros açúcares testados, inclusive lactose e melibiose não mostraram nenhuma capacidade de indução. Isto sugere que a condição para a produção da enzima é a presença no meio de cultura de galactoligossacárides dotados de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1+6) e, preferencialmente, de cadeia mais longa, pois estaquiase foi substancialmente mais efetiva que a rafinose. Os melhores resultados em meio submerso, entretanto, foram obtidos pelo crescimento do microrganismo em um extrato aquoso de soja fermentado por *S. cerevisiae*, as quais removem os resíduos de frutose da estaquiase produzindo, portanto, a maninotriose (18,21). Estas conclusões coincidem com relato anterior de CRUZ *et alli* (18) sobre a produção de  $\alpha$ -galactosidase por outros fungos.

Por outro lado, há evidências de que a



produção de invertase pela linhagem usada seja feita de maneira constitutiva, pois a atividade desta enzima foi encontrada no meio de crescimento, independentemente da fonte de carbono utilizada. Invertases de inúmeros outros fungos já foram citadas como de natureza constitutiva (18,51,80). Como era de se esperar, entretanto, a produção de invertase foi mais acentuada quando açúcares dotados de ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) foram utilizados, obedecendo-se também à ordem de preferência por oligossacárides de cadeia mais longa. Assim, pode-se estabelecer a seguinte ordem de favorecimento de produção: estaquiose > rafinose > sacarose.

Em meio submerso,  $\alpha$ -galactosidase e invertase foram localizadas tanto intra como extracelularmente, em concentrações variáveis dependendo da fase de crescimento do microrganismo. Desta maneira, até o final da fase exponencial, apenas 27% da  $\alpha$ -galactosidase e 44% da invertase foram liberadas no meio de cultura. No período de amadurecimento celular ou fase estacionária, foi verificado grande liberação de enzimas, quando se obteve 58% da  $\alpha$ -galactosidase e 66% da invertase no meio de cultura.

A produção de  $\alpha$ -galactosidase e invertase foi substancialmente maior, quando o microrganismo foi inoculado em meio semi-sólido. Além disso, as enzimas foram facilmente extraídas do *koji* pela adição de água deionizada, fato já descrito, mas também não explicado por SUZUKI *et alli* (80), ao estudarem a produção de  $\alpha$ -galactosidase por *Mortierella vinacea*. Tais autores foram pioneiros no emprego de farinha de soja na preparação do *koji pa*

ra produção de  $\alpha$ -galactosidase.

O emprego do extrato aquoso de soja, previamente fermentado e em diferentes proporções na preparação do meio semi-sólido, permitiu verificar uma interdependência na produção de  $\alpha$ -galactosidase e invertase. O aumento gradativo de volumes de extrato, em substituição a iguais volumes de água, provoca uma queda também gradual na soma das atividades das duas enzimas. Provoca, porém, um aumento linear e considerável na produção de  $\alpha$ -galactosidase e um decréscimo também linear e correspondente na produção de invertase.

As técnicas de fracionamento baseadas em troca iônica mostraram pouca eficácia no isolamento de  $\alpha$ -galactosidase de *A. orizae*. Em coluna catiônica como a CM-celulose, a enzima foi fortemente adsorvida, não sendo eluída posteriormente, com qualquer gradiente de força iônica ou pH, fato já anteriormente observado por PARK *et al* (60), ao estudarem a produção de  $\beta$ -galactosidase pela mesma cepa. Por outro lado,  $\alpha$ -galactosidase, invertase e  $\beta$ -galactosidase exibiram o mesmo comportamento em DEAE-Sephadex A-50, sendo eluídas praticamente no mesmo pico. A completa separação somente se tornou possível com o emprego de gel filtração. Por outro lado, a  $\alpha$ -galactosidase ora pesquisada foi eluída em um único pico, tanto em DEAE-Sephadex A-50 como em Sephadex G-200, o que evidencia uma única forma molecular, ao contrário da enzima produzida por *Mortierella vinacea* (79) e outras de origem vegetal (23, 61).

A presença de atividade de  $\alpha$ -galactosidase e invertase, de pesos moleculares já conhecidos (60) na fração DEAE-Sephadex A-50, posteriormente tratada em coluna de Sephadex G-200, facilitou, aliás, o cálculo do peso molecular da  $\alpha$ -galactosidase, estimado em 200 000, a proximadamente. Este valor é intermediário àquele descrito para  $\alpha$ -galactosidase de *A. sattoi* (78) e *A. awamori* (51), coincidindo com o valor relatado para algumas enzimas de sementes (23).

Os estudos cinéticos da  $\alpha$ -galactosidase assim purificada revelaram maior afinidade da enzima para PNPG ( $K_m = 2.04$  mM) do que para a melibiose ( $K_m = 140$  mM), propriedade exibida por todas as  $\alpha$ -galactosidases já pesquisadas (24,38,51,78), com exceção da enzima produzida por *M. vinacea* (79), cujos valores de  $K_m$  para o substrato sintético e o dissacarídeo são muito próximos. Além disso, não foi encontrada relação de grandeza entre o  $K_m$  e  $V_m$ , o que também coincide com os estudos cinéticos de outras  $\alpha$ -galactosidases (25,38,83). No entanto, comparações dos valores de  $K_m$  e  $V_m$  apresentados pela  $\alpha$ -galactosidase de *A. orizae*, com aqueles relatados para a mesma enzima de outras fontes, tornaram-se inviáveis devido as diferenças de condições experimentais empregadas.

$\alpha$ -Galactosidase de *A. orizae* foi completamente inibida pelos ions prata e mercúrio; sua atividade foi severamente afetada pelo p-cloromercuribenzoato e em menor extensão pela Iodoacetamida, os chamados "reagentes sulfidrílicos", o que evidencia a importância dos gru-

pos -SH na ação catalítica da enzima. Comportamento semelhante tem sido relatado para  $\alpha$ -galactosidases de outras fontes, principalmente de origem microbiana (37,47,78). Esta observação não descarta, entretanto, a possibilidade de que outros agrupamentos, como resíduos de histidina e grupos carboxílicos, também afetados por metais pesados, mas não pelos "reagentes sulfidrílicos", estejam presentes no sítio ativo da enzima. A presença de resíduos de histidina e ausência de grupos -SH no sítio catalítico de  $\alpha$ -galactosidases de algumas sementes de plantas foi demonstrada por DEY & PRIDHAN (25) através de estudos combinados de fotooxidação, empregos de diferentes concentrações de  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Hg}^+$  em várias faixas de pH, além dos próprios "reagentes sulfidrílicos".

Na concentração de  $1 \times 10^{-2}$  M, galactose e frutose não exerceram nenhum efeito inibidor sobre a  $\alpha$ -galactosidase, enquanto glucose diminuiu sua atividade em aproximadamente 10%. Quando a concentração dos monossacárides acima citados foi aumentada para  $5 \times 10^{-2}$ , a enzima foi inibida competitivamente por galactose e frutose e de modo não competitivo por glucose. Tal comportamento em relação à galactose e glucose já foi observado em  $\alpha$ -galactosidase produzida por *A. saitoi* (78), *A. awamori* (51), *M. vinacea* (79) e *V. faba* (23). Frutose, até então, não foi citada como tendo capacidade de inibir a enzima.

Além da inibição pelo produto, também os efeitos do pH e temperatura na ação enzimática são considerados fatores essenciais para o emprego de uma enzima na

indústria de alimentos. Assim sendo,  $\alpha$ -galactosidases com alta atividade no pH natural do Extrato de Soja (6.3 aproximadamente) e com estrutura proteica relativamente termooestável vêm sendo sugeridas para hidrólise de oligossacárides da quele produto (18,51,74,78).

A atividade da  $\alpha$ -galactosidase de *A. orizae* em função do pH produziu um pico relativamente largo de modo que, apesar da atividade máxima ter sido encontrada em pH 4.0, a enzima exibiu mais de 70% dessa atividade máxima em pH 6.0. Sob esse aspecto, a enzima pode ser comparada a  $\alpha$ -galactosidase de *A. saitoi* (78) e de *A. awamori* (51) e oferecer maiores vantagens que a de *M. vinacea* (81), que na quele pH mostra apenas 30% de sua atividade máxima.

A estrutura proteica da  $\alpha$ -galactosidase ora estudada apresentou boa resistência ao calor na faixa de pH entre 4.0 a 7.0, não sofrendo nenhuma perda de atividade em temperaturas compreendidas entre 35 e 50°C, propriedade que também a recomenda para aplicação em produtos da soja. Comparações com a termoestabilidade de outras fontes, entre tanto, não foram viáveis devido às diferentes condições de ensaio empregadas.

O preparado enzimático de *A. orizae* , liberou monossacárides de soluções puras de galactoligossacárides em que se configuram ligações  $\alpha$ -(1+6), mostrando maior atividade sobre a rafinose do que sobre a estaquiase. Esta preferência da  $\alpha$ -galactosidase por oligossacárides de cadeia mais curta já foi demonstrada pela enzima produzida

por *A. saitoi* (78), *A. awamori* (51), *D. pneumoniae* (47) e *C. rolfssii* (38), ao contrário das  $\alpha$ -galactosidases de *M. vinacea* (79), *Cl. cladosporioides* (18), *S. bovis* (5) e vários lactobacilos descritos por MITAL *et alli* (54), que demonstraram maior afinidade pela estaguiose.

O emprego da  $\alpha$ -galactosidase da indústria de alimentos foi pioneiramente sugerida por SUZUKI *et alli* (80), com a finalidade de eliminar o excesso de rafinose que impede a total cristalização da sacarose da beterraba. Para seus propósitos, a contaminação do preparado enzimático com invertase seria inconveniente pois alguma porção do dissacarídeo seria também degradada. Entretanto, para a remoção de galactoligossacárides dos produtos da soja, a presença daquela enzima seria até desejável, segundo SUGIMOTO & VAN BUREN (78), já que a hidrólise completa dos oligossacárides melhoraria as propriedades organolépticas, tornando-os mais doces.

O Extrato de Soja, completamente isento de glucose, frutose e galactose antes da aplicação do preparado enzimático, mostrou crescentes teores destes monossacárides durante o tratamento com o sistema  $\alpha$ -galactosidase-invertase de *A. orizae*. A sacarose foi integralmente removida, enquanto rafinose e estaguiose foram sensivelmente hidrolisadas, deixando, entretanto, vestígios de produtos intermediários. As limitações e dificuldades para determinações quantitativas de açúcares através de TLC, impediram comparações com resultados obtidos pela aplicação do mesmo sistema enzimático de outras fontes.

Um preparado enzimático destinado ao tratamento de Extrato de Soja deve ser isento de proteases as quais poderiam conferir ao produto, efeitos indesejáveis como sabor amargo, coagulação e precipitação de proteínas. O alto peso molecular da  $\alpha$ -galactosidase e invertase de *A. orizae*, entretanto, permitiria fácil separação de proteases através de filtração em gel, técnica de fácil manuseio e baixo custo.

Outra vantagem do preparado enzimático de *A. orizae*, é a fácil produção das enzimas por fermentação estacionária em farelo de trigo umedecido com extrato aquoso de soja, concorrendo para o baixo custo do processo. Além disso, o microrganismo já vem sendo comercialmente usado como fonte de outras enzimas, dispensando, portanto, a necessidade de novos estudos quanto à produção de micotoxinas.

## VI- CONCLUSÕES

1- *Aspergillus orizae* produz  $\alpha$ -galactosidase de forma adaptativa, quando crescido em meio contendo galactoligossacárides em que se configuram ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1+6) como fonte de carbono.

2- Ao mesmo tempo, o microrganismo produz também invertase, sendo esta de natureza constitutiva.

3- A produção de  $\alpha$ -galactosidase é consideravelmente maior em meio semi-sólido e a adição de extrato aquoso de soja ao meio de cultura aumenta significativamente o rendimento do microrganismo.

4- A enzima tem maior afinidade pelo substrato sintético PNPG do que para a melibiose e mostra um relacionamento Km-Vm puramente ocasional

5- A  $\alpha$ -galactosidase é fortemente inibida por metais pesados e "reagentes sulfidrílicos", indicando a presença de grupos -SH no seu sítio catalítico.



6- A produção da enzima em meio de cultura de baixo custo, seu comportamento em relação ao pH e temperatura e o seu alto peso molecular indicam a possibilidade de seu emprego no tratamento de bebidas de soja, visando eliminar os açúcares da família rafinose responsáveis pela flatulência.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AKIBA, T. & HORIKOSHI, K. Identification and growth characteristics of  $\alpha$ -galactosidase-producing microorganisms. *Agr. Biol. Chem.*, 40, 1845-50, 1976.
- 2- ANDREWS, P. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochem. J.*, 96: 595-99, 1965.
- 3- AOAC - *Official Methods of Analysis*. 12<sup>th</sup> ed. Washington, D.C., Association of Official Analytical Chemists, 1975.
- 4- ASKEVOLD, F. Investigation on the influence of diet on the quality and composition of intestinal gas in human. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 8: 87-94, 1965.
- 5- BAILEY, R.W.  $\alpha$ -Galactosidase activity of rumen bacteria. *Nature*, 195: 79, 1962.
- 6- BATES, R.G. *Determination of pH: Theory and Practice*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Wiley, 1964.
- 7- BILLS, R.E & HOWEL, R.W. Biochemical and cytological changes in developing soybean cotyledons. *Crop Science*, 3: 304-308, 1963.
- 8- CAHILL, W.M.; SCHROEDER, L.J.; SMITH, A. H. The digestibility and biological value of soybean proteins in whole soybean and soy flour and soybean milk. *J. Nutr.*, 28: 209-218, 1944.
- 9- CALLOWAY, D.H. Gas-forming property of food legumes. In: *Nutritional improvement of Food Legumes by Breeding* New York, John Wiley and Sons, Inc., 1975 p. 263-270
- 10- CALLOWAY, D.H.; COLASITO, D. J.; MATHEUS, R. D. Gas pro

- duced by human intestinal microflora. *Nature* , 212: 1238-39, 1 966.
- 11- CALLOWAY, D.H.; HICLEY, C.A.; MURPHY, E.L. The reduction of intestinal gas-forming properties of legumes by traditional and experimental food processing methods. *J. Food. Sci.*, 36: 251-254, 1971.
  - 12- CARTTER, J.L. & HOPPER, T.E. Influence of variety, environment and fertility level on the chemical composition of soybean seed. *USDA Tech. Bull.* , 787, 1942.
  - 13- COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. *Enzyme nomenclature*. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing , 1 975. 443 p.
  - 14- COURTOIS J.E.; CARRERE, C; PETEK, F. L'alfa galactosidase de *Penicillium paxillus*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41: 1251- 1 259, 1 959.
  - 15- 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, 1 956.
  - 16- CRISTFARO, E.; MOTTU, F.; WUHRMANN, J.J. Involvement of the Raffinose Family of Oligosaccharydes in flatulence. In: SIPPLE, H.L. & McNUTT, K.W. *Sugars in nutrition*. New York, Academic Press, 1 974, cap. 20 p. 313.
  - 17- CRUZ, R. Produção de  $\alpha$ -galactosidase de origem fúngica e sua aplicação no Extrato de Soja. Londrina, Universidade Estadual de Londrina, PR., 1 979. 76p.
  - 18- CRUZ, R.; BATISTELA, J.C.; WOSIACKI, G. Microbial  $\alpha$ -galactosidase for Soymilk Processing. *J. Food Sci.*, 46 (4) : 1196-1200, 1 981.

- 19- CRUZ, R. & PARK, Y.K. Production of Fungal  $\alpha$ -Galactosidase and Its Application to the Hydrolysis of Galactoligosaccharides in Soybean Milk. *J. Food Sci.*, 47 (6): 1 973 - 75, 1 982.
- 20- 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: 1227-43, 1 974
- 21- DELENTE, J. & LADEMBURG, K. Quantitative determination of the oligosaccharides in defatted soybean by Gas-Liquid Chromatography. *J. Food Sci.*, 37: 372 - 374, 1 972
- 22- DESIKACHAR, H.S.R.; DE, S.S.; SUBRAHAMANNYAN, V. Studies on the nutritive value of soymilk. I- Nutritive value of protein. *Ann. Biochem. Exptl. Med. (Calcuta)* 6, 49-56, 1 946.
- 23- DEY, P.M. & PRIDHAM, J.B. Purification and properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Vicia faba* seeds. *Biochem. J.* 113: 49-55, 1 969a.
- 24- DEY, P.M. & PRIDHAM, J.B. Substrate Specificity and Kinetic Properties of  $\alpha$ -Galactosidase from *Vicia faba* *Biochem. J.*, 115: 47-54, 1 969b
- 25- DEY, P.M. & PRIDHAM, J.B. Biochemistry of  $\alpha$ -Galactosidases. *Advances Enzymology.* 36: 91-129, 1 972.
- 26- DUBOIS, M; GILLES, K.A; HAMILTON, J.K.; RIBER, B.A. ; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350 - 356, 1 956.
- 27- EAST, J.W.; NAKAYAMA, T.O.M.; PARKMAN, S.B. Changes in Stachyose, raffinose, sucrose and monosaccharides

- during germination of soybeans. *Crop Science*, 12: 7-9, 1 972.
- 28- GARNER, W.E.; ALLARD, H.A.; FOUBERT, C.L. Oil contents of seeds as affected by nutrition of the plant. *J. Agric. Reser.*, 3: 227-249, 1 914
- 29- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* ,48: 422-427, 1 972.
- 30- HESSELTINE, C.W. & WANG, H.L. Fermented Soybean Food Products. In: SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. *Soybeans: chemistry and Technology*. Westport, Avi Publishing Co Inc., 1 972, v. 1, cap. 11, p. 389.
- 31- HICKEY, C.A.; MURPHY, E.L.; CALLOWAY, D.H. Intestinal gas production following ingestion of commercial cereals of wheat and milling fractions. *Cereal Chemistry*, 49: 276-283, 1 972
- 32- HOGNESS, D.S. & BATLEY, E.H. The  $\alpha$ -galactosidase of *Aerobacter aerogenes*: its characteristics and induced synthesis. *Federation Proc*, 16: 197-198, 1 957.
- 33- HOLT, L.E. & SNYDERMANN, S.E. The aminoacids requirement of infants. *J. Amer. Med. Assoc.*, 175: 100-103, 1 961
- 34- HOUGH, L. & JONES, J.K.H. "Enzymic method for determination of D-Glucose" In: WHITLER, R.L. & WOLFROM, M.L. *Methods in carbohydrates chemistry*. New York, Academic Press, 1 962, v. 1, cap. 16, p.400.
- 35- HYMOWITZ, T. & COLLINS, F.I. Variability of sugar content in seed of *Glycine max* (L) Merrill and G. soja sieb. and Szcc. *Agronomy Journal* , 66: 239-240, 1 974.
- 36- HYMOWITZ, T.; COLLINS, F.L.; PANCSNER, J.; WALKER, W. M. Relationship between the content of oil, protein and

- sugar in soybeans seed. *Agron. J.* , 64:613-17, 1972a
- 37- HYMOWITZ, T.; COLLINS, F. L.; PANCSNER, J.; WALKER, W.M.  
Stability of sugar content in Soybean strains comm .  
*Soil Science and Plant Analysis*. 3 (5):367-373, 1972b
- 38- KAJI, A & YOSHIARA, O. Purification and properties of  $\alpha$ -galactosidase produced by *Corticium rolfsii*. *Agr. Biol. Chem.*, 36: 1335-1342, 1 972.
- 39- KASAI, T. & KAWAMURA, S. Soybean oligosaccharydes. Isolation by gel filtration and identification by acetylation. *Kagawa Univ. Fac. Tech. Bull.* , 18: 1-8, 1 966
- 40- KAWAMURA, S. Quantitative paper chromatography of sugar of the cotyledon, hull and hypocotyl of selected varieties. *Kagawa Univ. Fac. Tech. Bull.*, 15:147 - 153, 1 966.
- 41- KAWAMURA, S. Review of Public Law 480 Work of soybean carbohydrates. Proc. International Conference on soybean Protein Foods, Peoria III, May, 1 967, ARS 71 - 35, USDA.
- 42- KAWAMURA, S.; TADA, M.; IRIE, N. Effect of autoclaving on sugars of deffated soybean flakes from selected varieties. *Kagawa Univ. Fac. Tech. Bull.*, 15: 147-52 1 967.
- 43- KIM, W.J.; SMITH, C.J.B.; NAKAYAMA, T.O.M. The removal of oligosaccharydes from soybeans. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* , 6:201-204, 1 973.
- 44- KRAYBILL, H.R., SMITH, R.L.; WALTER, E.D. The isolation of sucrose from soybeans. *J. Am. Chem. Soc.*, 59: 2470 71, 1 937
- 45- KU, S.; WEI, L.S.; STEIMBERG, M.P. NELSON, A.I.; HYMOWITZ, T. Extraction of oligosaccharydes during cooking of

- whole soybean. *J. Food Sci.*, 41: 361-64, 1 976.
- 46- LEE, Y.C. & WACEK, V. Alpha-galactosidase from *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.* 138:264 - 271 , 1 970.
- 47- LI, Y.T.; LI, S.C.C.; SHETLAR, M.R. Alpha-galactosidase from *Diplococcus pneumoniae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 103: 436 - 440, 1 963.
- 48- LIENER, I.E. Nutritional value of food protein products  
In: SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. *Soybeans: chemistry and technology*. Westport, Avi Publishing Company Inc v.1, cap. 7, p. 203.
- 49- LINEWEAVER, H. & BURK, D. Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem.*, 56: 658-63, 1 934.
- 50- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-271, 1 951.
- 51- MCGHEE, J.E.; SILMAN, R.; BAGLEY, E.B. Production of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus awamori*: properties and action on p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopinoside and galactooligosaccharydes of soymilk. *J. Am. Chemistry Soc.*, 55, 244-247, 1 978.
- 52- MITAL, B.K.; SHALEMBERGER, R.S.; STEINKRAUS, K.H.  $\alpha$ -Galactosidase activity of lactobacilli. *Appl. Microbiol.*, 26: 783-788, 1 973.
- 53- MITAL, B.K. & STEINKRAUS, K.H. Utilization of oligosaccharydes by lactic acid bacteria during fermentation of soy milk. *J. Food Sci.*, 40: 114-118, 1 975.
- 54- MITAL, B.K.; STEINKRAUS, K.H.; NAYLOR, H.B. Growth of lactic acid bacteria in soy milk. *J. Food Sci.* 39: 1018-23, 1 974.

- 55- MURPHY, E.C.; HORSLEY, H.; BUR, H.K. Fractionation of dry beans extracts wich increase carbon dioxide egestion in human flatus. *J. Agr. Food Chem.*, 20:813-17, 1 972.
- 56- NAKAYAMA, T.O.M. *Unwanted sugars in Processed Foods*. New Orleans, 1 980. Conferência apresentada no 40th Annual Meeting and Food Expo.- New Orleans - EEUU, 5 a 9 junho de 1 980.
- 57- 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: 1101-08, 1 971.
- 58- O'KELLY, J.F. & GIEGER, M. Effect of variety, maturity and soundness on certain soybean seed and oil characteristics. *Mississippi Agr. Expt. Sta. Bull.*, 24: 118-126, 1 937.
- 59- OMOSAYE, O.; CHERYAN, M.E.; MATHEUS, M.E. Removal of oligosaccharides from soybean water extracts by ultrafiltration. *J. Food Sci*, 43: 354-360, 1 978.
- 60- PARK, Y.K.; DE SANTI, M.S.S.; PASTORE, G.M. Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus orizae*. *J. Food Sci*, 44: 100-103, 1 979.
- 61- PETEK, F. & DONG, T. S  paration et étude de deux  $\alpha$ -galactosidase des graines du café. *Enzymologia*, 23: 133-137, 1 961
- 62- PETEK, F.; VILLARROYA, E.; COUTOIS, J.E. Purification et propriétés de l'  $\alpha$ -galactosidase des graines germ  es de *Vicia sativa*. *European J. Biochem.*, 8: 395-402, 1 969.
- 63- PETERSON, E.A. Cellulosic ion exchangers. In: WORK &



WORK ed. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. North Holland Publishing Co. , Amsterdam, 1 970.

- 64- RACKIS, J.J. Biochemical changes in soybeans: matura  
tion, post-harvest storage and processing and germination. In: HUHIN, H.O. & MILNER, M. *Postharvest Biology and technology*. Westport, CT. Food and Nution Press, 1 978, cap. 2, p. 34-76.
- 65- RACKIS; J.J. Biological active components. In: SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. *Soybeans: chemistry and technology*. Westport, Avi Publishing Company, Inc., 1 972 v. 1, cap. 6, p.158.
- 66- RACKIS, J.J.; SESSA, D.J.; HONING, D.H. *Isolation and characterization of flavor and flatulence factors in soybean meal*. Proc. International Conference on Soybean Protein Foods. Peoria Ill, May 1 967. ARS 71 - 35, USDA, p. 100.
- 67- RACKIS, J.J.; SESSA, D.J.; STEGGERDA, F.R. Soybean factor relating to gas production by intestinal bacteria. *J. Food Sci.*, 35: 634-639, 1 970.
- 68- REYNOLDS, J.H. Immobilized  $\alpha$ -galactosidase continuou flow reactor. *Biotechnol. Bioeng .*, 16: 135-147, 1974
- 69- RICHARDS, E.A. & STEGGERDA, F.R. Production and inhibition of gas in various regions in the intestine of the dog. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 122: 573-580 1 966.
- 70- ROCHLAND, L.B. ; GARDINER, B.L.; PIECZARKA, D. Stimulation of gas production and growth of *Clostridium perfringens* Type A (N9 3424) by legumes. *J.Food Sci* 34: 411- 417, 1 969.

- 71- SHALLENBERGER, R.S.; HAND, D.B.; STEINKRAUS, K. H. -  
*Changes in sucrose, raffinose and stachyose during fermentation of tempeh.* Relato apresentado na 89 Conferência de pesquisas em feijões. Bellair, Mich. Agosto, 1 966. ARS 74-41, USDA, p. 68.
- 72- SHEINING, R. & CROKER, F.B. The induced concurrent formation of  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -galactosidase in *Escherichia coli* B. *Can. J. Biochem. Physiol.* 39: 62-66, 1 961
- 73- SILVA, H.S. & LUH, B.S. Changes in oligosaccharides and starch granules in germinating beans. *J. Inst. Technol. Aliment.*, 12(3): 103-106, 1 979
- 74- SMILEY, K.L.; HENSLEY, D.E.; GASDORF, H.J.  $\alpha$ -Galactosidase production and use in a hollow fiber reactor. *Appl. Environ Microbiol.*, 31: 615-617, 1 976.
- 75- SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. Chemical composition of the seed. In: --- *Soybeans: chemistry and technology.* Westport CT, Avi Publishing Company, Inc., 1 972, v. 1, cap. 3, p. 61
- 76- STEGGERDA, F.R. Relation between consumption of dry beans and flatulence in human subjects. In: *Dry beans Res. Conf.* Albany - California, Western Reg. Research Laboratory, 1 961, v. 1, p. 14.
- 77- 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: 1235-39 1 966.
- 78- SUGIMOTO, H. & VAN BUREN, J.P. Removal of oligosaccharides from soy milk by an enzyme from *Aspergillus saitoi*. *J. Food Sci.*, 35: 655-660, 1 970

- 79- SUZUKI, H.; LI, S.C.; LI, Y.T.      Alpha-galactosidase from *Mortierella vinacea*. Crystallization and properties. *J. Biol. Chem.*, 245: 781-786, 1 970.
- 80- SUZUKI, H.; OZAWA, Y.; OOTA, H.; YOSHIDA, H.      Studies on the decomposition of raffinose, by alpha-galactosidase of mold. *Agr. Biol. Chem.*, 33: 501-10, 1 969
- 81- THANANUNKUL, D.; TANAKA, M.; CHICHESTER, C.O.; LEE, T. C.      Degradation of raffinose and stachyose in soy bean milk by  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of  $\alpha$ -galactosidase within polycrylamida gel. *J. Food Sci.*, 41: 173-175, 1 976.
- 82- WALKLEY, J.W. & TILLMAN, J. A simple thin-layer chromatography technique for the separation of mono and oligosaccharides. *Journal of Chromatography*, 132: 172-174, 1 977.
- 83- WALLENFELS, K.G. & MALHOTRA, O.P.      Galactosidases. *Advances in carbohydrates Chemistry*, 16: 239-296 , 1 961.
- 84- WHYTE, E.D.      Consumer use of dry beans, peas and lentils. Relato apresentado na 10ª Conferência de Feijões. Davis-California, USDA-ARS, 74-75., 1 971.