Estudo bioquímico e cinético da enzima α-galactosidase extraída de *Trichoderma virens* e avaliação da sua aplicação no processamento de produtos de soja

GABRIEL MENDONÇA PIAZZI

Orientadora: Dra. Maíra Nicolau de Almeida

São João Del-Rei, MG

2022

Estudo bioquímico e cinético da enzima α-galactosidase extraída de Trichoderma virens e avaliação da sua aplicação no processamento de produtos de soja

GABRIEL MENDONÇA PIAZZI

Orientadora: Dra Maíra Nicolau de Almeida

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

São João Del-Rei, MG

2022

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P584e

Piazzi, Gabriel Mendonça.
Estudo bioquímico e cinético da enzima α galactosidase extraída de Trichoderma virens e avaliação da sua aplicação no processamento de produtos de soja / Gabriel Mendonça Piazzi ; orientadora Maíra Nicolau de Almeida. -- São João del Rei, 2022.
47 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2022.

1. Aplicação de enzima. 2. Caracterização bioquímica. 3. Estudo cinético. 4. Extração de enzima fúngica. 5. Hidrólise de galacto-oligossacarídeos. I. de Almeida, Maíra Nicolau, orient. II. Título.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA

HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 11 / 2022 - PPGMQ (13.31)

Nº do Protocolo: 23122.051527/2022-35

São João del-Rei-MG, 19 de dezembro de 2022.

A dissertação **"Estudo bioquímico e cinético da enzima alfa-galactosidase de *Trichoderma virens* e avaliação da sua aplicação no processamento de produtos de soja"**, elaborada por **Gabriel Mendonça Piazzi** e aprovada por todos os membros da banca examinadora, foi aceita pelo Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, da Universidade Federal de São João del-Rei como requisito parcial à obtenção do título de

MESTRE

(Assinado digitalmente em 20/12/2022 08:44)
LUIZ GUSTAVO DE LIMA GUIMARAES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCNAT (12.12)
Matrícula: 1727278

(Assinado digitalmente em 19/12/2022 17:36)
MAIRA NICOLAU DE ALMEIDA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PPGMQ (13.31)
Matrícula: 2254152

(Assinado digitalmente em 28/12/2022 18:31)
GABRIEL MENDONÇA PIAZZI
DISCENTE
Matrícula: 2019100434

(Assinado digitalmente em 20/12/2022 07:53)
VALÉRIA MONTEZE GUIMARÃES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 418.625.036-72

Para verificar a autenticidade deste documento entre em **https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp** informando seu número: **11**, ano: **2022**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, data de emissão: **19/12/2022** e o código de verificação: **d6243105cc**

Agradecimentos

Agradeço a minha família e amigos por todo apoio e todas contribuições.

Agradeço a minha orientadora Dra Maíra Nicolau de Almeida aos colegas de laboratório por todo auxílio, aprendizado e crescimento obtido neste período da minha vida.

Agradeço aos técnicos por seu auxilio no laboratório, aos professores Marcelo e Luiz por suas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Agradeço ao professor Rafael Alfenas da Universidade Federal de Viçosa, por ter, gentilmente, realizado a identificação do fungo.

Agradeço a Universidade Federal de São João Del Rei e as agências de financiamento CAPES, FAPEMIG e ao PPGMQ por todos recursos e auxílios em prol do sucesso da realização desta pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para meu aprimoramento, meu mais sincero agradecimento.

Resumo

A enzima α-galactosidase é responsável pela hidrólise dos terminais galactose em oligossacarídeos complexos, convertendo-os em açúcares mais simples. Esta função possibilita a utilização desta enzima no tratamento de α-galacto-oligossacarídeos não nutritivos, tornando a enzima reconhecida e empregada no tratamento de produtos a base de soja, que possuem grandes concentrações destes oligossacarídeos. Estes açúcares ao serem ingeridos em grandes quantidades podem causar dores de estômago, diarreia e flatulência. Neste estudo foi realizado a produção e purificação parcial da enzima α-galactosidase de *Trichoderma virens* para caracterização bioquímica e utilização no tratamento de extrato hidrossolúvel de soja. A enzima atua em uma faixa ampla de temperatura e pH mantendo atividade e estabilidade significativas, tendo pH e temperatura ótima de 4,5 e 55ºC, maior estabilidade em temperatura de 45ºC e pHs ácidos. Em presença do íon K^+ sua atividade é elevada em cerca de 20%. A galactose é uma inibidora competitiva da enzima α-galactosidase, já que se trata de um produto da sua reação de hidrolise de oligossacarídeos. A enzima foi aplicada com sucesso na hidrólise de oligossacarídeos de estaquiose e rafinose em melaço e extrato hidrossolúvel de soja.

Abstract

The α-galactosidase enzyme is responsible for the hydrolysis of galactose terminals in complex oligosaccharides, converting them into simpler sugars. This function enables the use of this enzyme in the treatment of non-nutritive α-galacto-oligosaccharides, making the enzyme recognized and used in the treatment of soy-based products, which have high concentrations of these oligosaccharides. These sugars, when ingested in large amounts, can cause stomach pain, diarrhea and flatulence. In this study, the production and partial purification of the α-galactosidase enzyme from *Trichoderma virens* was carried out for biochemical characterization and use in the treatment of water-soluble soybean extract. The enzyme acts in a wide temperature and pH range, maintaining significant activity and stability, with an optimum pH and temperature of 4.5 and 55ºC, greater stability at a temperature of 45ºC and acidic pHs. In the presence of the K+ ion, its activity is increased by about 20%. Galactose is a competitive inhibitor of the α-galactosidase enzyme, as it is a product of its oligosaccharide hydrolysis reaction. The enzyme was successfully applied in the hydrolysis of stachyose and raffinose oligosaccharides in molasses and hydrosoluble soybean extract.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

GOS – galacto-oligossacarídeos.

pNP-Gal – Substrato p-nitrofenil galactopiranosídeo.

BDA – Meio de cultivo Batata dextrose ágar.

DNS – Reagente Ácido Dinitrosalicílico.

SSF – Fermentação em estado sólido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proposta mecanística da catálise do processo de hidrólise de oligossacarídeos ou polissacarídeos realizado pela enzima humana (Figura do próprio autor, baseado em GUCE *et al.*, 2010).
Figura 2:A- Estrutura do oligossacarídeo estaquiose. B- Estrutura do oligossacarídeo rafinose. C- Estrutura do dissacarídeo sacarose. Fonte: Próprio autor.
Figura 3: Curva padrão para conversão de valores em absorbância para atividade enzimática (U/mL) construída com reação com fenolato de sódio.
Figura 4: Produção da enzima α-galactosidase pelo fungo *Trichoderma virens* cultivado em farelo de trigo.
Figura 5: Produção da enzima α-galactosidase pelo fungo 7F cultivado em farelo de trigo.
Figura 6: Perfil cromatográfico em CM-Sepharose. (▄) Concentrações de NaCl; (●) concentração de proteínas (mg/mL); (♦) atividade enzimática (U/mL).
Figura 7: Efeito do pH na atividade da enzima α-galactosidase de *T. virens*.
Figura 8: Efeito da temperatura na atividade da enzima α-galactosidase de *Trichoderma virens.*
Figura 9: Estabilidade térmica a 40ºC em relação ao tempo em horas.
Figura 10: Estabilidade térmica a 45ºC em relação ao tempo em horas.
Figura 11: Estabilidade térmica a 55ºC em relação ao tempo em minutos.
Figura 12: Estabilidade em pH em 1 hora de incubação.
Figura 13: Efeito de íons e reagentes na atividade de α-galactosidase de *Trichoderma virens*.
Figura 14: Efeito cinético do substrato pNP- α-Gal na enzima α-galactosidase de acordo com o gráfico de Michaelis-Mentem.

Figura 15: Efeito cinético do substrato pNP- α-Gal na enzima a-galactosidase de acordo com plotagem em gráfico no modelo de Lineweaver-Burk.
Figura 16: Efeito do inibidor galactose na enzima α-galactosidase, onde representa o ensaio; (●) sem a presença de inibidor; (○) em presença de 1 mmol/L de inibidor; (□) em presença de 2 mmol/L de inibidor; e (■) em presença de 3 mmol/L de inibidor.
Figura 17: Plot de Dixon com as concentrações do inibidor galalactose com suas respectivas inclinações de acordo com o modelo de Lineweaver-Burk.
Figura 18: Relação da concentração de açúcares redutores verificados em diferentes tempos de reação de hidrólise de extrato hidrossolúvel de soja na temperatura de 40 ºC sob agitação constante.
Figura 19: Relação da concentração de açúcares redutores verificados em diferentes tempos de reação de hidrólise de melaço de soja na temperatura de 40 ºC sob agitação constante.
Figura 20-A: Cromatografia de camada delgada contendo análise do extrato de açúcares do extrato hidrossolúvel de soja. Figura 20-B: Cromatografia de camada delgada contendo análise do extrato de açúcares do melaço de soja.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Levantamento de estudos com a enzima α-galactosidase de diversos tipos de organismos.

Tabela 2: Tabela de purificação da enzima α-galactosidase de *Trichoderma. virens*.
Tabela 3: Levantamento bibliográfico de pH e temperaturas ótimas para α-galactosidases em outros organismos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11
1.1 α-Galactosidase 11
1.2 Mecanismo de ação 13
1.3 Aplicações biotecnológicas 14
1.4 O fungo *Trichoderma virens* 17
2. METODOLOGIA 18
2.1 Cultivo dos fungos 18
2.2 Cultivo e produção da enzima em Meio Semi-Solido (SSF) 18
2.3 Ensaio enzimático 19
2.4 Purificação 20
2.5 Caracterização 20
2.5.1 Efeito do pH e temperatura 20
2.5.2 Estabilidade térmica e em pH 20
2.5.3 Efeito de íons e outros reagentes 20
2.6 Estudos Cinéticos 21
2.7 Hidrólise de oligossacarídeos em extrato hidrossolúvel de soja 21
2.8 Hidrólise de oligossacarídeos em melaço de soja 22
2.9 Análise por cromatografia em camada delgada 22
3. RESULTADOS 23
3.1 Produção da enzima 23
3.2 Purificação 25
3.3 Caracterização bioquímica 26
3.3.1 Efeito do pH e temperatura 26
3.3.2 Estabilidade térmica e em pH 29
3.3.3 Efeito de íons e outros reagentes 32
3.4 Caracterização cinética 34
3.4.1 Efeito de Inibição 36
3.5 Hidrólise de oligossacarídeos em leite e melaço de soja 37
3.6 Análise por cromatografia em camada delgada 39
4. CONCLUSÃO 41
REFERÊNCIAS 42

1. INTRODUÇÃO

O tratamento de produtos a base de soja, como o leite de soja, para remoção dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose é realizado industrialmente por métodos químicos, pela hidrólise ácida, este processo possui um melhor custo em relação ao uso de biocatalizadores, porém são gerados compostos potencialmente prejudiciais ao organismo humano. Com este estudo busca-se a utilização de enzimas para o tratamento destes oligossacarídeos, já que devido a especificidade de uma reação enzimática os compostos prejudiciais, que normalmente são produzidos em escala industrial, não seriam produzidos neste método, gerando um produto de maior qualidade (POLAINA; MACCABE, 2007; ZHANG, JIAN *et al.*, 2019).

1.1 α-Galactosidase

A enzima α-galactosidase (EC 3.2.1.22) é uma enzima responsável pela catálise da hidrólise da ligação α-1,6–galactose em oligossacarídeos ou polissacarídeos complexos e simples. Possuindo várias aplicações nos campos da biotecnologia, medicinal e de alimentos (POLAINA; MACCABE, 2007). A α-galactosidase é encontrada em diversos seres vivos, como fungos, bactérias e também sendo observada em mamíferos como seres humanos (Tabela 1).

Tabela 1: Levantamento de fontes de estudos com a enzima α-galactosidase de diversos tipos de organismos.

Espécie	***Reino***	***Referência***
Annona squamosa	Plantae	(RANGANATHA *et al.*, 2021)
Schizolobium parahyba	Plantae	(SILVA, 2007)
Platymiscium pubescens	Plantae	(OLIVEIRA *et al.*, 2005)
Cannabis sativa	Plantae	(ZHANG, WEIWEI *et al.*, 2018)
Tachigali multijuga	Plantae	(FIALHO *et al.*, 2008)
Vigna mungo	Plantae	(MUTRA *et al.*, 2018)
Trichoderma hamatum	Fungi	(THORNTON, 2005)
Irpex lacteus	Fungi	(GUO *et al.*, 2016; JANG *et al.*, 2019)
Pleurotus citrinopileatus	Fungi	(HU *et al.*, 2016)
Aspergillus fumigatus	Fungi	(DE REZENDE *et al.*, 2005)
Aspergillus terréus	Fungi	(FERREIRA *et al.*, 2011)
Aspergillus niger	Fungi	(ADEMARK *et al.*, 2001)
Aspergillus oryzae	Fungi	(KATROLIA *et al.*, 2019)
Aspergillus phoenicis	Fungi	(KURAKAKE; OKUMURA; MORIMOTO, 2015)
Papiliotrema flavescens	Fungi	(STRATILOVÁ *et al.*, 2018)
Hericium erinaceus	Fungi	(YE *et al.*, 2018a)
Lentinula edodes	Fungi	(XU *et al.*, 2019)
Debaryomyces hansenii	Fungi	(VIANA, *et al.*, 2006)
Agaricus bisporus	Fungi	(HU *et al.*, 2017)
Talaromyces leycettanus	Fungi	(WANG *et al.*, 2016)
Penicillium subrubescens	Fungi	(LINARES *et al.*, 2020)
Penicillium purpurogenum	Fungi	(SHIBUYA *et al.*, 1998)
Penicillium griseoroseum	Fungi	(FALKOSKI *et al.*, 2009)
Penicillium oxalicum	Fungi	(KURAKAKE *et al.*, 2011)
Candida guilliermondii	Fungi	(HASHIMOTO *et al.*, 1995)
Saccharomyces pastorianus	Fungi	(DHILLON; KAUR, 2016)
Saccharomyces uvarum	Fungi	(DHILLON; KAUR, 2016)
Thielavia terrestres	Fungi	(LIU, YU *et al.*, 2018)
Tremella aurantialba	Fungi	(GENG *et al.*, 2020)
Lichtheimia ramosa	Fungi	(XIE *et al.*, 2020)
Trametes versicolor	Fungi	(LIU, QIN *et al.*, 2020)
Trichoderma reesei	Fungi	(GOLUBEV *et al.*, 2004)
Trichoderma evansii	Fungi	(CHAUHAN; SIDDIQI; SHARMA, 2014)
Acinetobacter sp.	Monera	(SIRISHA *et al.*, 2015)
Bacillus coagulans	Monera	(ZHAO *et al.*, 2018)
Bacillus stearothermophilus	Monera	(TALBOT; SYGUSCH, 1990)
Lactobacillus acidophilus	Monera	(FREDSLUND *et al.*, 2011)
Bacteroides ovatus	Monera	(REDDY *et al.*, 2016)
Bacteroides thetaiotaomicron	Monera	(SHIN *et al.*, 2020)
Dictyoglomus thermophilum	Monera	(SCHRÖDER *et al.*, 2017)
Meiothermus ruber	Monera	(SCHRÖDER *et al.*, 2017)
Thermus brockianus	Monera	(FRIDJONSSON *et al.*, 1999)
Thermus thermophilus	Monera	(FRIDJONSSON; MATTES, 2001)
Thermotoga marítima	Monera	(COMFORT *et al.*, 2007)
Yersinia pestis	Monera	(CAO *et al.*, 2008)
Homo sapiens	Animalia	(FRANCINI-PESENTI *et al.*, 2020)

A α-galactosidase pertence ao grupo das glicosil hidrolases (GH), enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas. As GHs são classificadas de acordo com a comparação de suas sequências de aminoácidos e possuem mais de 2500 enzimas integrantes desta família (POLAINA; MACCABE, 2007). As α-galactosidases são membros das subfamílias GH 4 (SANNIKOVA *et al.*, 2018), 27 (YE *et al.*, 2018b), 31 (NAUMOFF, 2004), 36 (XIE *et al.*, 2020),57 (LI; ZHU; LI, 2012), 97 (KIKUCHI *et al.*, 2017) e 110 (LIU, QIYONG P. *et al.*, 2007).

1.2 Mecanismo de ação

A enzima pode atuar por dois mecanismos diferentes o de hidrólise, onde há clivagem de oligossacarídeos em monossacarídeos simples, e o de transferência (atividade de transgalactosidase), onde ocorre a síntese de novos oligossacarídeos. Neste estudo será avaliado o mecanismo de hidrólise, no qual o oligossacarídeo se liga a resíduos de aminoácidos de aspartato (Asp) presentes no sitio ativo, assim ocorre a catálise ácida da hidrólise do oligossacarídeo, ocorrendo a liberação de galactose e outro açúcar, dependendo do substrato (Figura 1).

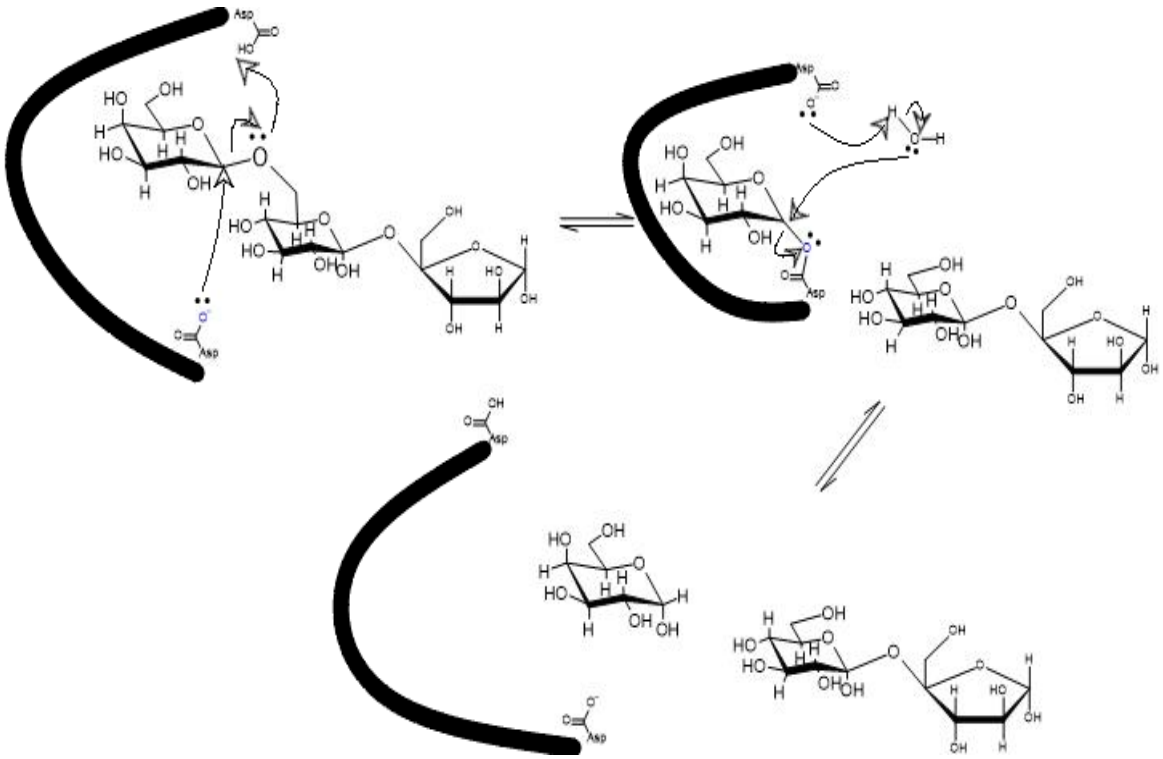

Figura 1: Proposta mecanística da catálise do processo de hidrólise de oligossacarídeos ou polissacarídeos realizado pela enzima humana (Figura do próprio autor, baseado em GUCE *et al.*, 2010).

Na α-galactosidase humana, o resíduo Asp-170 tem função de nucleófilo, que interage com carbono anomérico da ligação glicosídica do açúcar, ocasionando a quebra da ligação entre carbono anomérico e o átomo de oxigênio (O), a parte liberada captura um hidrogênio do resíduo Asp-231, que possui função ácida. Assim é formado um dissacarídeo. Na sequência, o resíduo Asp-231 desprotonado, captura o hidrogênio (H) de uma molécula de água. A molécula de água desprotonada ($^{-}$OH) interage com o carbono ligado ao resíduo Asp-170, promovendo a quebra de sua ligação com Asp-170. Liberando assim um monossacarídeo de galactose e retornando o sítio ativo da enzima a seu estado inicial, pronta para reiniciar este processo com outra molécula de oligossacarídeo (Figura 1) (GUCE *et al.*, 2010).

1.3 Aplicações biotecnológicas

As enzimas α-galactosidases podem ser aplicadas em processos na indústria de alimentos. Em alimentos à base de soja o tratamento com α-galactosidase melhora o valor nutricional. Sendo utilizadas na redução ou eliminação de galacto-oligossacarídeos de rafinose, que compõem a maioria dos açúcares encontrados nestes alimentos, os quais não possuem valor nutricional (BAYRAKTAR; ÖNAL, 2019; BHATIA *et al.*, 2019; DEY; PRIDHAM, 1972). Também encontrados em outras plantas como feijão, repolho, couve de bruxelas, brócolis, aspargo, caroço de algodão e grãos integrais (ZHANG, JIAN *et al.*, 2019).

Estes açúcares precisam ser removidos, já que não são digeridos no intestino humano e de outros animais monogástricos como porcos e aves, porém há presença de bactérias intestinais que são capazes de consumi-los em seu processo de crescimento. Foi estabelecida uma dose diária mínima de 5 g de rafinose para um crescimento adequado destas bactérias, porém na quantidade de 15 g por dia consiste em um excesso e pode causar diarreia e flatulência (BAYRAKTAR; ÖNAL, 2019; BENNO *et al.*, 1987; ZHANG, JIAN *et al.*, 2019).

Produtos a base de soja possuem uma alta concentração de oligossacarídeos não nutritivos, são eles principalmente rafinose e estáquiose (Figura 2.A e 2.B). Na hidrólise da estaquiose ocorre a quebra da ligação entre uma galactose e uma rafinose, por sua vez, na hidrólise da rafinose a ligação entre uma sacarose (Figura 2.C) e uma galactose se rompe. A sacarose é hidrolisada pela enzima invertase (β-frutofuranosidase), por tanto, sua utilização com efeito sinérgico juntamente com a enzima α-galactosidase causa uma melhoria do processo de hidrólise dos oligossacarídeos estaquiose e rafinose (HU *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2010). A invertase pode também atuar diretamente na rafinose, decompondo o

oligossacarídeo em melibiose e frutose, sendo a melibiose um dissacarídeos formado por galactose e glicose também será hidrolisado pela enzima α-galactosidase (ZHANG, JIAN *et al.*, 2019).

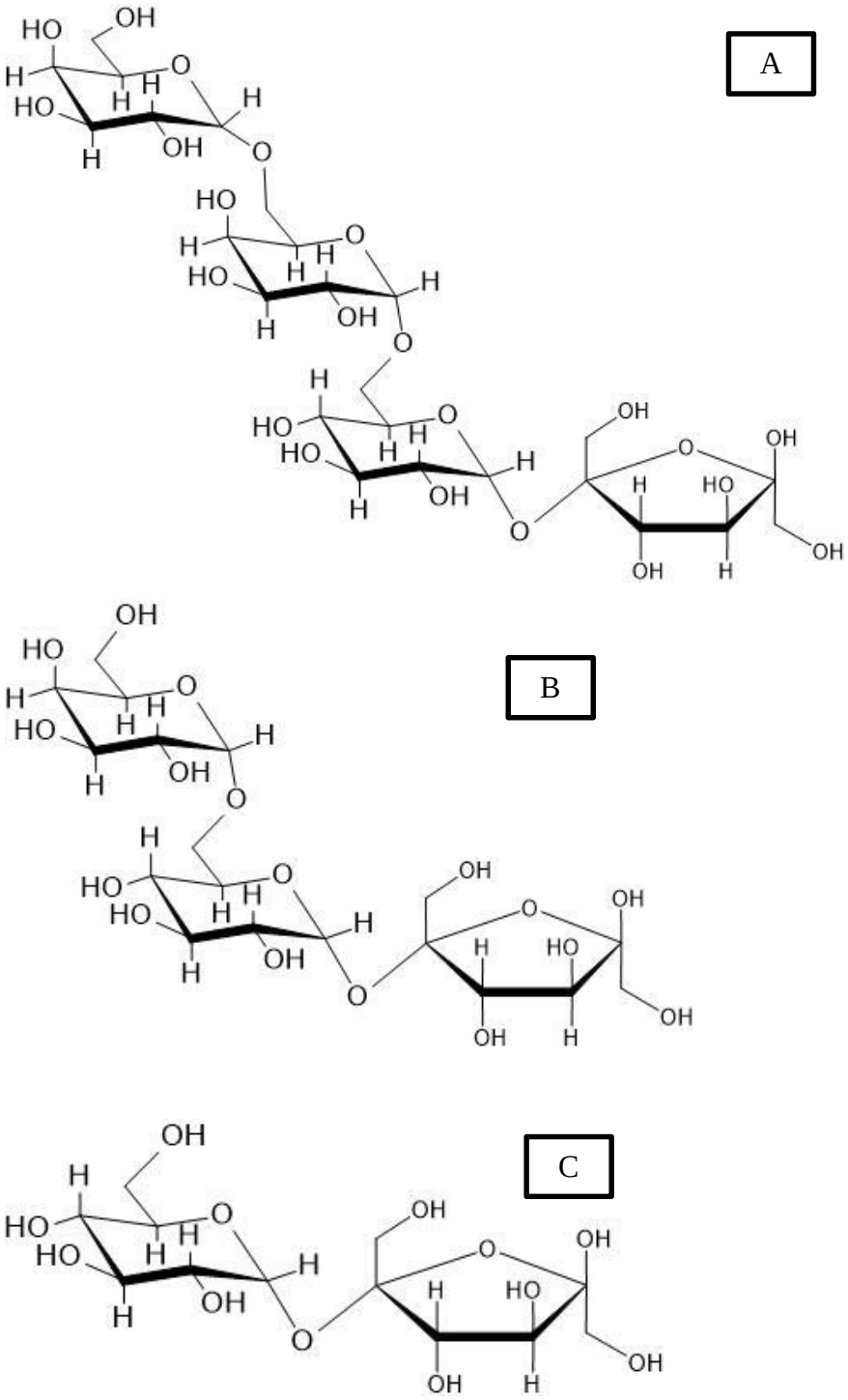

Figura 2:A- Estrutura do oligossacarídeo estaquiose. B- Estrutura do oligossacarídeo rafinose. C- Estrutura do dissacarídeo sacarose. Fonte: Próprio autor.

Na área da saúde a α-galactosidase é utilizada em diversos estudos no tratamento da doença de Fabry, uma doença hereditária transmitida pelo cromossomo X que causa deficiência desta enzima (VAN DER VEEN *et al.*, 2019). A α- galactosidase humana é uma exoglicosidase lisossômica responsável pela hidrólise do terminal α-galactosil de vários glicoconjugados (CALHOUN *et al.*, 1985). A deficiência de α-galactosidase causa excesso de glicolipídios nos vasos sanguíneos, causando sintomas como dor neuropática, córnea verticilata (lesão na córnea) e angioqueratoma. A longo prazo pode causar cardiomiopatia hipertrófica, distúrbios do ritmo cardíaco, insuficiência renal progressiva e acidente vascular cerebral. Em casos considerados não clássicos, geralmente podem ocorrer manifestações de formas menos severas e se limitar a um único órgão. Em pacientes do sexo masculino este comportamento pode ser explicado pela presença de atividade enzimática residual e baixas taxas do substrato desacetilado globotriaosilesfingosina (lysoGb3). Devido a diferenças nos organismos masculinos e femininos a doença e os sintomas apresentados geralmente são mais brandos em pacientes do sexo feminino. A terapia de reposição destas enzimas é um tratamento eficaz da doença (ARENDS *et al.*, 2017; KATROLIA *et al.*, 2014).

Na indústria de polpa e papel as enzimas α-galactosidases podem ser usadas como adjuvantes para o branqueamento. Inicialmente o branqueamento de papeis era realizado apenas quimicamente com agente a base de cloro. Porém, com a utilização deste método ocorre a formação de cloretos orgânicos, como cloro-benzenos e diclorometano, compostos potencialmente cancerígenos e mutagênicos fortes. Há formas de se eliminar estes cloretos, utilizando-se o método com oxigênio e cozimento prolongado, peróxido de hidrogênio e tratamento com ozônio. Porém, este método exige um grande custo financeiro, então, o uso de biocatalisadores surgiu como uma alternativa com menor custo. As principais enzimas utilizadas são as xilanases e as lacases (DHILLON; KAUR, 2016). As α-galactosidases podem ser aplicadas em conjunto com lacases, xilanases e manases no processo de biobranqueamento enzimático. O biobranqueamento com α-galactosidases propicia aumento da eficiência do processo devido à remoção dos grupos galactosídicos das moléculas de lignoceluloses. Uma análise da eficiência de uma combinação de três enzimas (α-galactosidase e as manases da bactéria *Pseudomonas fluorescens* e xilanases do fungo *Neocallimastix patriciarum*) no branqueamento de polpas obteve resultados indicando um aumento da eficiência do processo em relação a utilização separada destas enzimas (CLARKE *et al.*, 2000).

As enzimas celulases são amplamente estudadas e utilizadas na produção de biocombustíveis derivados de biomassa lignocelulosica, um recurso natural e muito

abundante neste planeta, porém há alguns obstáculos relativos ao custo e a efetividade do processo via conversão enzimática, mais especificamente o alto custo da produção de enzimas celulases e sua baixa especificidade para alguns substratos lignocelulosicos. Desta forma, tem se intensificado o número de estudos para identificação de novas e mais efetivas celulases. A celulase tem como função hidrolisar substratos lignocelulosicos em açúcares fermentáveis como glicose, neste processo há a possibilidade de se utilizar outras enzimas para aprimorá-lo por meio de ação sinérgica, ou seja, alguns substratos que a celulase possui baixa especificidade outra enzima poderia hidrolisar (BRAHMACHARI; DEMAIN; ADRIO, 2017).

O melaço de soja pode ser utilizado na produção de etanol, este melaço possui cerca de 28 % de sacarose, um dissacarídeo fermentável. Mas há também aproximadamente 19 % de estaquiose e 10 % de rafinose, oligossacarídeos não fermentáveis por muitos microrganismos devido a presença das ligações α-1-6. A enzima α-galactosidase é capaz de hidrolisar esta ligação nestes oligossacarídeos, portanto possui potencial de ser utilizada para aprimorar o processo de produção de etanol a partir de melaço de soja (SIQUEIRA *et al.*, 2008).

1.4 O fungo Trichoderma virens

O fungo *Trichoderma virens* é um hifomiceto filamentoso haploide, comumente utilizado no combate de patógenos de plantas, processo conhecido como micoparasitismo. Devido a esse perfil de crescimento, existe a perspectiva de utilização do fungo *T. virens* no campo da produção de pesticidas, como uma alternativa aos sintéticos (SCHMOLL *et al.*, 2016). Possui atividade antibiótica e em plantas pode induzir mecanismos de resistência a patógenos, além de estimular seu crescimento. O fungo possui características de organismos simbiontes e patogênicos. Também possui a capacidade de degradar compostos perigosos, incluindo pesticidas, polifenóis e hidrocarbonetos poliaromáticos, além de sequestrar metais potencialmente tóxicos (NOGUEIRA-LOPEZ *et al.*, 2018). Neste organismo há estudos sobre outras enzimas como a celulase (ZENG *et al.*, 2016), quitinase (BAEK; HOWELL; KENERLEY, 1999), endoquitinase (ALIAS *et al.*, 2009) e quinase (MUKHERJEE *et al.*, 2003).

Espécies do gênero *Trichoderma* são encontradas comumente em solos, e colonizam raízes de plantas, estimulando seu crescimento, por esta razão são frequentemente utilizadas, além de serem positivamente efetivas sobre o peso da planta, rendimento de colheitas e controle de doenças em plantas (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009). Em fungos como

T. reseei (GOLUBEV *et al.*, 2004; ZEILINGER *et al.*, 1993), *T. hamatum* (THORNTON, 2005) e *T. evansii* (CHAUHAN; SIDDIQI; SHARMA, 2014) foram estudas a produção de enzimas α-galactosidases.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo dos fungos

Os fungos *T. virens* e 7F foram repicados de fontes do próprio laboratório para cultura em meio sólido BDA, originalmente isolado de solo de buraco de tatu na Serra de São José em São João Del Rei, após a coleta estes e os demais fungos, após um processo de isolamento, foram armazenados e mantidos em ambiente refrigerado. O meio de cultura foi preparado utilizando uma solução de batata (100 g de batata com 900 mL de água) e outra solução de nutrientes de 250 mL (20 mg/mL de glicose; 15 mg/mL de Ágar; 6 mg/mL de extrato de levedura), as soluções foram misturadas e fervidas sob agitação constante. O material foi esterilizado em autoclave a 121 ºC por 20 minutos. Os fungos *T. virens* e o isolado 7F foram repicados em tubos de ensaio e então mantidos em câmara BOD a 28 ºC por 4 dias.

2.2 Cultivo e produção da enzima em Meio Semi-Solido (SSF)

O meio semi-sólido consiste em farelo de trigo, utilizado como fonte de carbono, e uma solução de nutrientes. Foram utilizados 111,5 g de farelo de trigo e 240 mL de solução de nutrientes (3,5 g de KH_2PO_4; 1 g de K_2HPO_4; 0,05 g de $MgSO_4.7H_2O$; 0,5 g de $(NH_4)_2SO_4$; 0,3 g de extrato de levedura; dissolvidos em 500 mL de água destilada). O meio sólido umedecido (2,4 mL de solução nutritiva por grama de farelo de trigo seco) foi adicionado em Erlenmeyers de 250 mL (17 g do meio de cultivo por Erlenmeyer) e então esterilizado em autoclave a 121 ºC por 20 minutos. A massa seca final do meio sólido umedecido foi de 67,82 %. Os fungos *T. virens* e o isolado 7F foram adicionados em seguida, por meio de uma suspensão contendo esporos. A incubação dos fungos ocorreu em câmara BOD, por tempos de 2 a 10 dias para *T. virens* e 4 a 20 dias para o fungo 7F. A determinação da umidade do meio de cultura após autoclavagem foi realizada após secagem de 2 g do material estéril em estufa a 105 ºC por 12 horas. O procedimento foi realizado em triplicata.

A enzima foi extraída utilizando 50 mL de tampão acetato pH 5,0 (50 mM) sob agitação constante e temperatura ambiente, durante 1 hora em três repetições. Então

realizou-se filtração em algodão para remoção dos materiais sólidos e centrifugação (com descarte do material precipitado) a 900 G por 10 minutos.

2.3 Ensaio enzimático

A reação de hidrólise ocorreu em tampão acetato de sódio (50 mmol/L; pH 5,5; 225 µL) com a enzima diluída de 5 a 20 vezes (40 µL) e em presença do substrato sintético p-nitrofenil α-D-galactopiranosideo (pNP-α-D-Gal) (2 mmol/L; 85 µL) com concentração final de 0,5 mmol/L. Os tubos foram incubados em banho maria a 40 ºC por 15 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 350 µL de solução de carbonato de sódio 0,5 mol/L. A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade da enzima foi considerada a quantidade necessária para liberação de 1 µmol de produto por minuto nas condições descritas. A conversão de absorbância em atividade enzimática foi realizada através de uma curva padrão construída através da reação com fenolato de sódio (Figura 3).

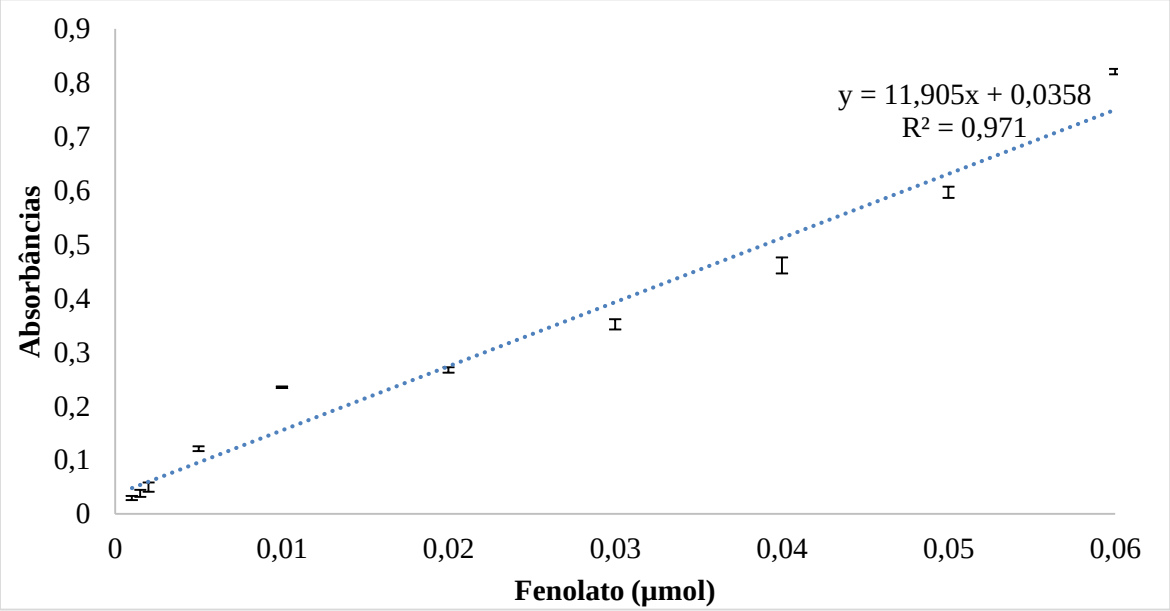

Figura 3: Curva padrão para conversão de valores em absorbância para atividade enzimática (U/mL) construída com reação com fenolato de sódio.

A quantificação de proteína foi realizada de acordo com o método colorimétrico Pierse BCA (TermoFisher scientific). O reagente ácido bicinconínico (BCA) foi adicionado na quantidade de 480 µL, então adicionou-se 20 µL de extrato enzimático diluído em tubos de ensaio em triplicatas. Após a purificação houve necessidade de ajuste das quantidades de

BCA e extrato enzimático. Os tubos foram incubados em banho maria a 37 ºC por 30 minutos. A absorvância foi lida em 562 nm.

2.4 Purificação

A cromatografia de troca iônica foi realizada em uma coluna de volume 20 mL preenchida com a resina CM Sepharose, uma resina de caráter aniônico. A coluna foi preparada previamente lavando-a com tampão acetato de sódio (50 mmol/L, pH 5). Foram aplicados 20 mL de extrato enzimático, seguido respectivamente de: 3 volumes (60 mL) de tampão acetato de sódio (50 mM pH 5), 1 volume (20 mL) de NaCl dissolvido em tampão acetato de sódio (50 mmol/L, pH 5) em diferentes concentrações do sal; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,5 mol/L. Após a corrida cromatográfica foram recolhidos 46 frações em tubos de ensaio com volume de 5 mL. A cromatografia foi realizada sob pressão atmosférica em um fluxo de 4,3 mL/min.

2.5 Caracterização

2.5.1 Efeito do pH e temperatura

O ensaio do pH ótimo foi realizado de acordo com o ensaio padrão substituindo o tampão acetado de sódio (50 mmol/L, pH 5,0) pelos tampões de McIlvaine em valores alternados de pH (3,0 - 8,0). A temperatura ótima foi avaliada pelo ensaio de atividade padrão em diferentes temperaturas na faixa de 30 ºC a 80 ºC.

2.5.2 Estabilidade térmica e em pH

Para medir a estabilidade a enzima foi pré-incubada por 1 hora em diferentes pH de 3,0 a 8,0 em tampões McIlvaine na temperatura ambiente, sendo sua atividade residual determinada pelo ensaio padrão usando o pH ótimo.

Na avaliação da termoestabilidade a enzima foi pré-incubada a 40 ºC, 45 ºC, 55 ºC e 65 ºC em pH 4,5 em frasco com tampa. Alíquotas foram retidas em intervalos selecionados e a atividade residual foi determinada pelo ensaio padrão na temperatura ótima.

2.5.3 Efeito de íons e outros reagentes

O ensaio padrão foi realizado adicionando-se íons e outras substâncias. Foram avaliados em ensaios individuais os efeitos de etanol, azida, uréia, $(NH_4)_2SO_4$, glicerol, ácido acético, $NaNO_3$, $MgSO_4$, $CuSO_4$, KCl, NaCl, $ZnSO_4$, $CaCl_2$, SDS, galactose, glicose, ácido

glucônico, furfural, frutose, ácido galacturônico, arabinose, xilitol, DTT e celobiose. As soluções foram preparadas na concentração inicial de 50 mmol/L, com concentração final no ensaio de 7,1 mmol/L.

2.6 Estudos Cinéticos

Para determinação da constante de Michaelis (K_M) e da velocidade máxima (V_{MAX}) foi realizado o ensaio padrão de atividade variando-se a concentração do substrato pNP-α-Gal. Foram avaliadas as concentrações de 0,085; 0,130; 0,430; 1,100; 1,700; 2,800; 4,300; 7,100; 11,400 mmol/L. Os dados obtidos foram analisados de acordo com os modelos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk.

A inibição da enzima por galactose foi avaliada utilizando as concentrações de 1, 2 e 3 mmol/L deste açúcar. Foi realizado o ensaio padrão de atividade alterando as concentrações de substrato pNP-α-Gal para 0,085; 0,1300; 0,4300; 1,100; 1,700; 2,800 mmol/L. Os resultados foram analisados de acordo com os modelos de Lineweaver-Burk e do Plot de Dixon para o cálculo da constante de inibição (Ki) (DIXON, 1953).

2.7 Hidrólise de oligossacarídeos em extrato hidrossolúvel de soja

O extrato hidrossolúvel de soja foi preparado utilizando 50 g de sementes de soja, previamente fervidas em água por 10 minutos, em seguida foram trituradas em liquidificador em presença 400 mL de água a 80ºC. O produto foi filtrado em algodão, aquecido até entrar em ebulição e armazenado sob condição de congelamento.

O ensaio foi realizado em Erlenmeyer de 250 mL sob agitação constante de 115 rpm na temperatura de 40 ºC. Foram misturados 10 mL de extrato hidrossolúvel de soja, 13 mL do extrato enzimático contendo 10 U de enzimas por grama de soja e 50 µL de antibiótico Pentabiótico Veterinário (Zoetis) (1 %), o qual é composto por: benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina, benzilpenicilina potássica, dihidroestreptomicina base (sulfato) e estreptomicina base (sulfato). O controle negativo ocorreu nas condições do ensaio, porém sem a presença de extrato enzimático, cujo mesmo foi substituído por tampão acetato de sódio pH 4,5 (50 mmol/L), o mesmo tampão utilizado na extração da enzima. O ensaio ocorreu por um tempo total de 8 horas, sendo retiradas alíquotas de 1,5 mL do meio reativo nos tempos: 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8 h.

As alíquotas foram analisadas por meio do teste com ácido dinitrosalicílico (DNS), um teste colorimétrico que avalia as quantidades de açúcares redutores nas amostras. O teste

foi realizado em tubos de ensaio com 500 µL de amostra diluída em água e 500 µL do reagente DNS, em seguida levados a banho-maria em água fervente por 5 minutos e após a redução da temperatura dos tubos o ensaio a absorbância foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm.

2.8 Hidrólise de oligossacarídeos em melaço de soja

O melaço de soja foi gentilmente cedido pela empresa CJ Selecta. O ensaio ocorreu em Erlenmeyer de 250 mL no Shaker sob agitação constante de 115 rpm na temperatura de 40 ºC. Foram misturados 2 g de melaço de soja, 26 mL de extrato enzimático (10 U de enzima por grama de soja) e 50 µL de antibiótico Pentabiótico Veterinário (Zoetis) (1 %). O controle negativo ocorreu nas condições do ensaio, porém sem a presença de extrato enzimático, cujo mesmo foi substituído por tampão acetato de sódio pH 4,5 (50 mmol/L). O ensaio ocorreu por um tempo total de 8 horas, sendo retiradas alíquotas de 2 mL do meio reativo nos tempos: 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8 h.

As alíquotas foram analisadas por meio do teste de DNS e analisado em espectrofotômetro a 540 nm.

2.9 Análise por cromatografia em camada delgada

Alíquotas da hidrólise de melaço e de extrato hidrossolúvel de soja (1, 4 e 8 h) foram analisadas por cromatografia de camada delgada. Inicialmente foi realizada a extração dos açúcares contidos nas amostras coletadas em etanol (80 %), em tubos de ensaio. Foram misturados 0,250 mL das alíquotas e 0,300 mL de etanol (80 %). A mistura foi agitada e os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente.

Foram aplicados 30 µL de extrato de açúcares e de uma solução padrão contendo os açúcares: rafinose, estaquiose e sacarose (1 mg/mL de cada açúcar) em cromatoplacas cobertas de sílica Aluminium Backed TLC (Silicycle®) 20 x 20 cm de 200 µm.

A fase móvel foi uma solução de iso-propanol, ácido acético e água destilada na respectiva proporção (1:1:0,1). A cuba cromatográfica foi previamente preparada com a fase móvel para saturação do meio com seus vapores. Logo após iniciou-se a corrida cromatográfica pelo tempo de aproximadamente 2 h.

A corrida foi interrompida através da secagem do eluente e consequente parada do processo de eluição. Logo após, a placa foi borrifada com revelador (1 % Naftol, 10 % ácido

fosfórico em etanol) e incubada em estufa a 140 ºC por 10 minutos. Com a revelação e visualização da placa foi calculado fator de retenção.

3. RESULTADOS

3.1 Produção da enzima

Os fungos *T. virens* e 7F quando cultivados em SSF com farelo de trigo apresentaram crescimentos e foram capazes de secretar a enzima α-galactosidase. Amostras foram extraídas em diferentes tempos de cultivo em triplicatas e foi observado que o melhor tempo para extração foi de 4 dias, quando foi detectado 1,45 U/mL ($^{+}_{-}$ 7,408 x 10^{-3} U/mL) para o *T. virens* e 1,35 U/mL ($^{+}_{-}$ 4,277 x 10^{-3} U/mL) para o fungo 7F. Foram avaliados o crescimento dos fungos relacionando os tempos de cultivo com a atividade obtida (Figuras 4 e 5).

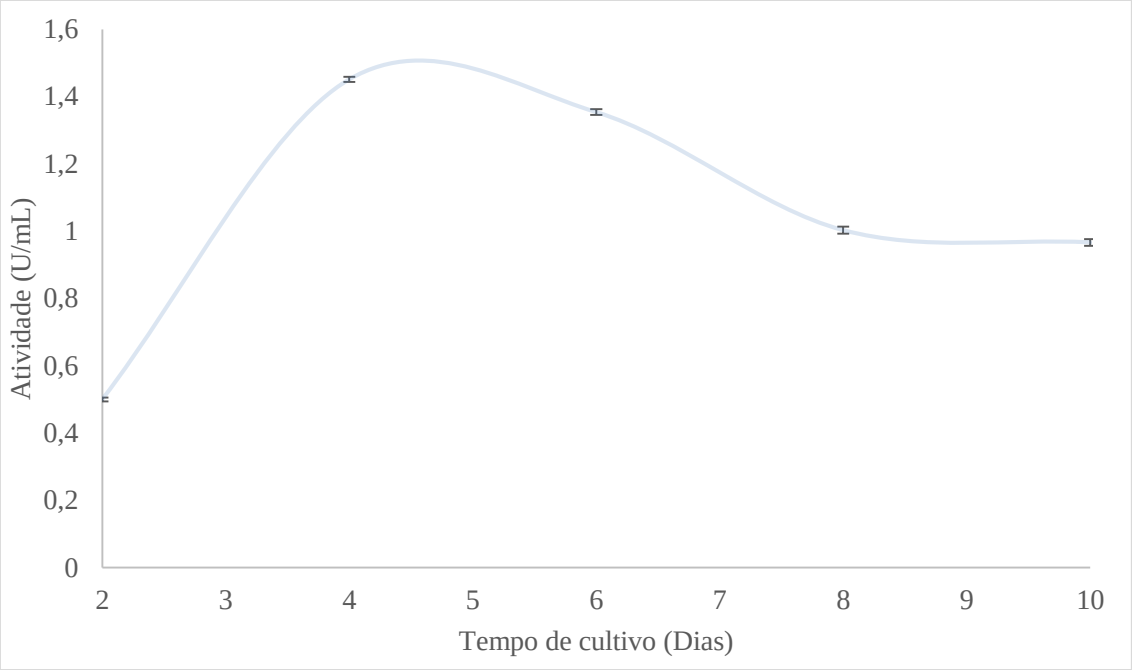

Figura 4: Cultivo da enzima α-galactosidase pelo fungo *Trichoderma virens* cultivado em farelo de trigo

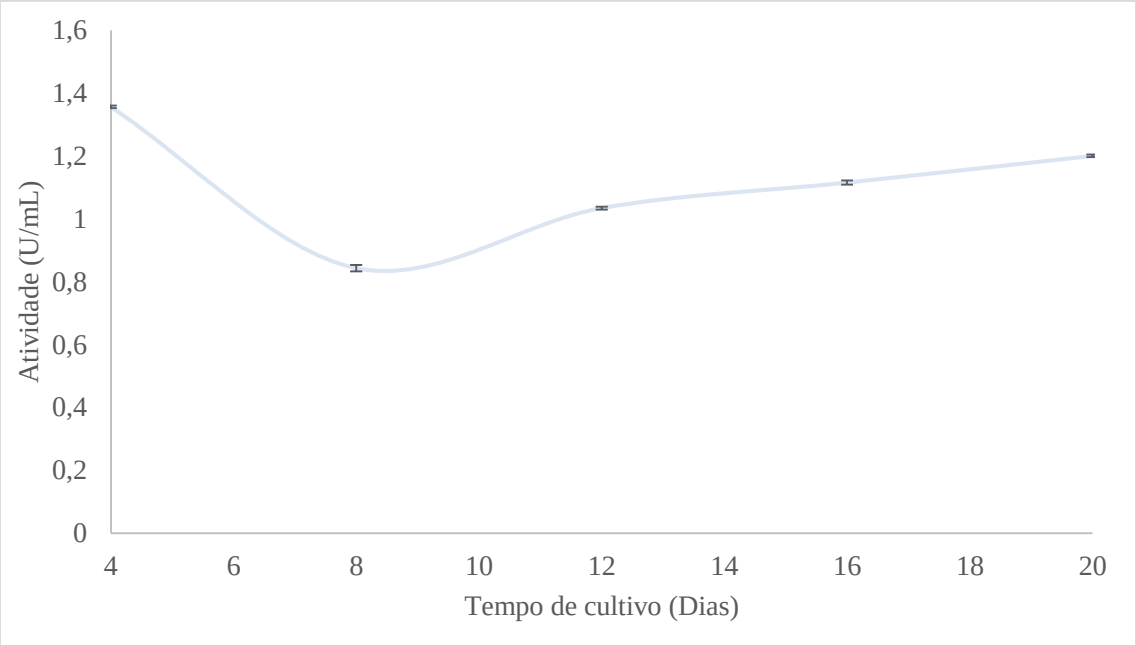

Figura 5: Cultivo da enzima α-galactosidase pelo fungo 7F cultivado em farelo de trigo.

Com o cultivo dos fungos e extração da enzima α-galactosidase em diferentes tempos de cultivo ocorreu a avaliação de sua atividade enzimática, com isso constatou-se em ambos fungos possuem sua enzima com maior atividade com 4 dias de cultivo, sendo que a maior atividade foi obtida pelo fungo *T. virens*.

Este resultado foi diferente do encontrado para outros fungos, como para α-galactosidase de *Aspergillus terreus* e *Aspergillus vesicolor* onde a máxima produção da enzima foi obtida após 14 dias, e de *Monascus rubber* em 18 dias, cujas atividades foram, respectivamente, 6,81; 3,41 e 0,20 U/mL. Porém, as enzimas obtiveram maior atividade quando comparadas com as deste estudo, onde após 4 dias *A. terreus* obteve atividade de 3,29 U/mL, enquanto *A. versicolor* e *M. rubber* com atividade inferior a deste estudo de, respectivamente, 1,03 e 0,01 U/mL. Os fungos foram cultivados em farelo de trigo como fonte de carbono em meio líquido (REIS *et al.*, 2010).

Por se tratarem de diferentes espécies de fungos, adaptados a diferentes condições ambientais as enzimas α-galactosidases podem apresentar diferenças em suas propriedades e características fundamentais, outro fator seria a diferença entre os meios de cultivo, mesmo que ambos estudos utilizem a mesma fonte de carbono, as fermentações SSF e em meio líquido possuem suas diferenças na eficiência da extração de enzimas.

3.2 Purificação

O extrato enzimático do fungo *T. virens* selecionado devido à melhor produção da enzima α-galactosidase foi parcialmente purificado por cromatografia utilizando a resina CM-Sepharose (Figura 6). Foram observados dois indicadores com atividade de α-galactosidase (♦), nomeados α-Gal I e α-Gal II. A resina é um trocador aniônico, portanto α-Gal I possui carga predominante negativa, já que não ficou aderida a resina, sendo eluída com tampão. α-Gal II possui carga predominante positiva já que se aderiu a resina, portanto foi eluída em solução salina tamponada, havendo uma troca entre os íons Na^+ e a enzima.

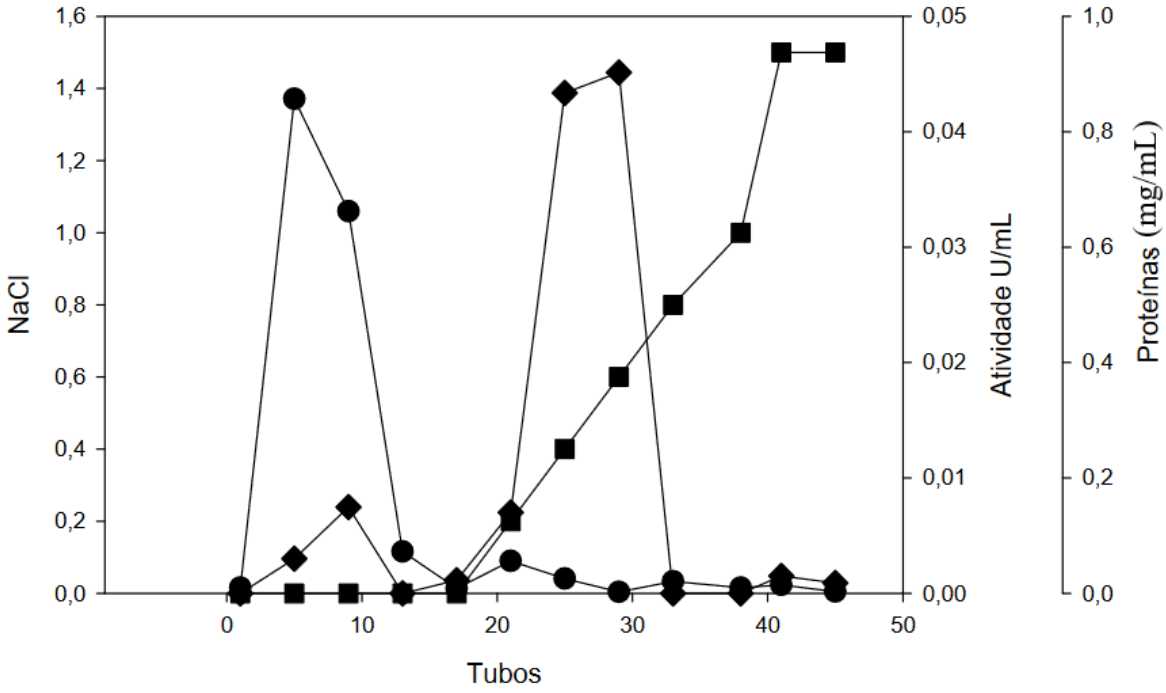

Figura 6: Perfil cromatográfico em CM-Sepharose. (▄) Concentrações de NaCl; (●) concentração de proteínas (mg/mL); (♦) atividade enzimática (U/mL).

Em α-Gal I notou-se uma baixa atividade e um baixo grau de purificação (fator de purificação 0,032), já α-Gal II apresentou além de uma alta atividade uma excelente taxa de pureza, tendo fator de purificação de 52 com rendimento de 22 % (Tabela 2). Portanto, α-Gal II foi selecionada como objeto principal deste estudo.

Tabela 2: Tabela de purificação da enzima α-galactosidase de *Trichoderma virens*.

Etapas	*Total de proteínas (mg/mL)*	*Atividade total (U/mL)*	*Atividade Específica (U/mg)*	*Fator de purificação*	*Rendimento (%)*
Extrato bruto	4,783	0,739	0,154	1,000	100,000
α-Gal I	1,126	0,006	0,005	0,032	0,755
α-Gal II	0,020243	0,164	8,083	52,331	22,147

Na purificação da α-galactosidase de *Platymiscium pubescens* em cromatografia de afinidade com A-Sepharose foi obtido um fator de 98 vezes ao extrato original (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Já com a enzima de *Trametes versicolor* em sua etapa final de purificação foi obtivo um fator de 322 vezes por FPLC em Superdex (LIU, QIN *et al.*, 2020). Nos estudos com a enzima de *Annona squamosa*, obteve-se um fator de 56 vezes utilizando S-200 Sephacryl em cromatografia de filtração em gel (RANGANATHA *et al.*, 2021). Os estudos citados foram realizados com mais de uma etapa de purificação, já neste estudo foi realizado apenas uma etapa de purificação com um alto fator de purificação.

3.3 Caracterização bioquímica

3.3.1 Efeito do pH e temperatura

Após os ensaios constatou-se que o pH em que há maior atividade foi de 4,5. Porém, mantém 80 % de sua atividade em pH 5, sendo possível a utilização da enzima nesta faixa. A partir do pH ótimo ocorre um decaimento considerável da atividade, havendo apenas 20% de sua atividade em pH 6,5; 10% em pH 7,0 e, a partir deste ponto, perda total da atividade (Figura 7).

Comparando os pH ótimos da enzima há uma prevalência de pH ácidos desde 3,0 da planta *Cannabis sativa L.* até o valor de 7,0 da bactéria *Acinetobacter sp* (Ag-I e Ag-II), sendo o valor encontrado neste estudo de 4,5 para *T. virens* (Figura 5). Nota-se um pH ótimo igual ao do fungo *Pleurotus citrinopileatus* (HU *et al.*, 2016). No fungo *Trichoderma reesei* nota-se um pH ótimo semelhante de 4,0 (ZEILINGER *et al.*, 1993), mesmo valor de pH obtido para o fungo *Aspergillus oryzae* (KATROLIA *et al.*, 2019) (Tabela 3).

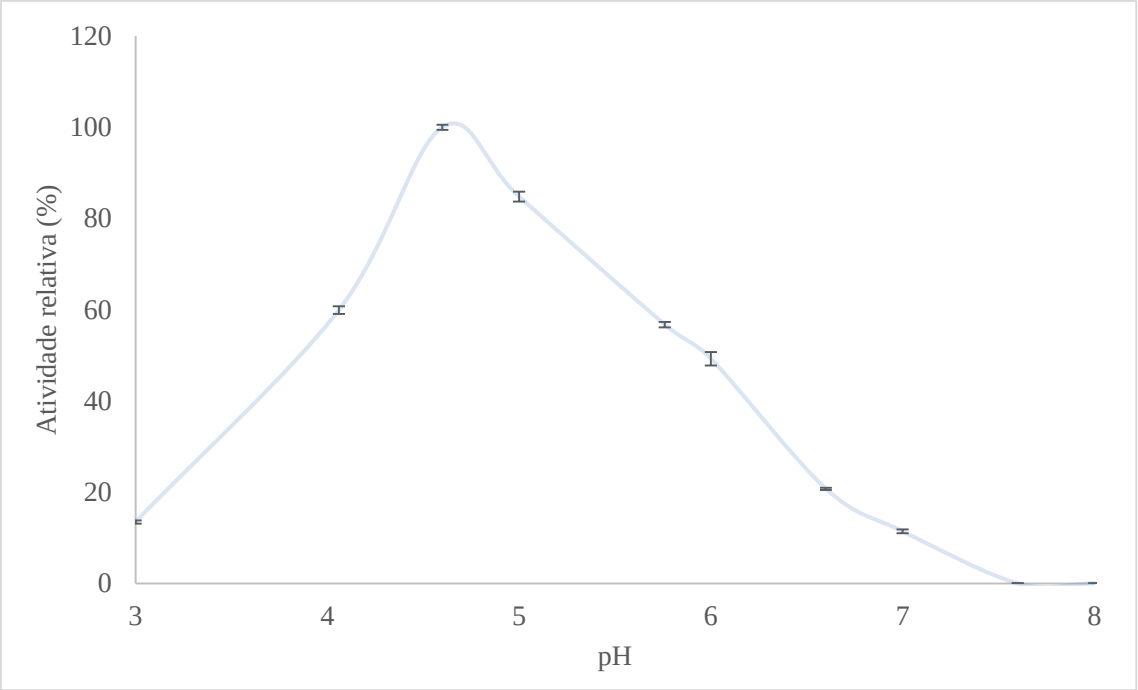

Figura 7: Efeito da variação do pH na atividade da enzima α-galactosidase de *T. virens*.

A temperatura ótima foi de 55ºC, contudo, a enzima mantém atividade acima de 80 % em temperaturas entre 45 ºC e 55 ºC, indicando uma flexibilidade para atuar nesta faixa de temperatura. Porém, em temperaturas acima de 65 ºC, ocorre perda significativa da atividade (Figura 8).

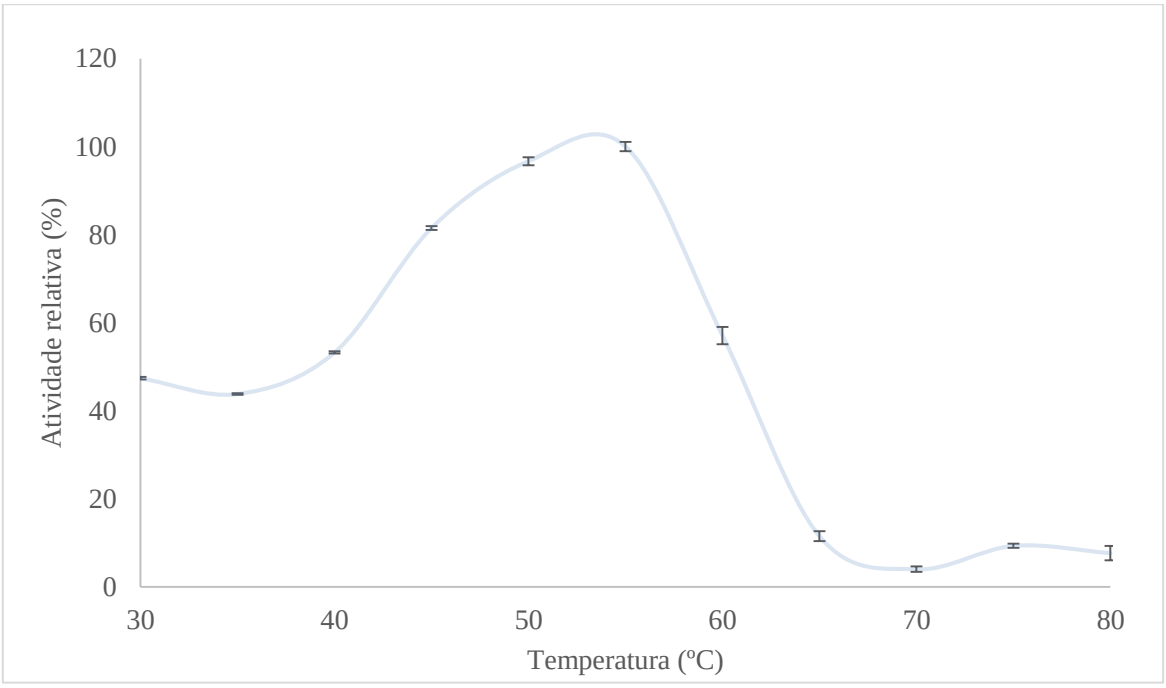

Figura 8: Efeito da temperatura na atividade da enzima α-galactosidase de *T. virens.*

Em relação a temperatura ótima observa-se um valor relativamente alto, como a enzimas da bactéria *Dictyoglomus thermophilum* e do fungo *Irpex lacteus*, com temperatura ótima de 80 ºC, indicando serem muito termoestáveis. E até temperaturas mais baixas como na bactéria *Acinetobacter sp* (Ag-II) de 40 ºC. Neste estudo obteve-se uma temperatura relativamente intermediária de 55 ºC para o fungo *T. virens* (Tabela 3).

Tabela 3: Levantamento bibliográfico de pH e temperaturas ótimas para α-galactosidases em outros organismos.

Organismo	*pH ótimo*	*Temperatura ótima (ºC)*	*Referência*
Acinetobacter sp Ag-I	7,0	50	(SIRISHA *et al.*, 2015)
Acinetobacter sp Ag-II	7,0	40	(SIRISHA *et al.*, 2015)
Cannabis sativa L.	3,0	50	(ZHANG, WEIWEI *et al.*, 2018)
Irpex lacteus	5,0	80	(GUO *et al.*, 2016)
	4,8	70	(JANG *et al.*, 2019)
Bacillus coagulans	6,0	55	(ZHAO *et al.*, 2018)
Lentinula edodes	5,0	60	(XU *et al.*, 2019)
Pleurotus citrinopileatus	4,4	50	(HU *et al.*, 2016)
Papiliotrema flavescens	4,8	60	(STRATILOVÁ *et al.*, 2018)
Dictyoglomus thermophilum	6,5	80	(SCHRÖDER *et al.*, 2017)
Meiothermus ruber	6,5	65	(SCHRÖDER *et al.*, 2017)
Penicillium subrubescens	4,0	45	(LINARES *et al.*, 2020)
Penicillium oxalicum	3,0	60	(KURAKAKE *et al.*, 2011)
Aspergillus oryzae	4,0	50	(KATROLIA *et al.*, 2019)
Aspergillus phoenicis	5,0	60	(KURAKAKE; OKUMURA; MORIMOTO, 2015)
Trichoderma reesei	4,0	60	(ZEILINGER *et al.*, 1993)
Trichoderma virens	4,5	55	Este estudo

3.3.2 Estabilidade térmica e em pH

A enzima α-galactosidase de *T. virens* possui grande estabilidade na temperatura de 40 ºC, observando-se atividade relativa de 60 % em 2 horas de pré-incubação, além de manter sua estabilidade e sem grandes variações em sua atividade por até 8 horas, onde sua atividade decresce para cerca de 50 % (Figura 9).

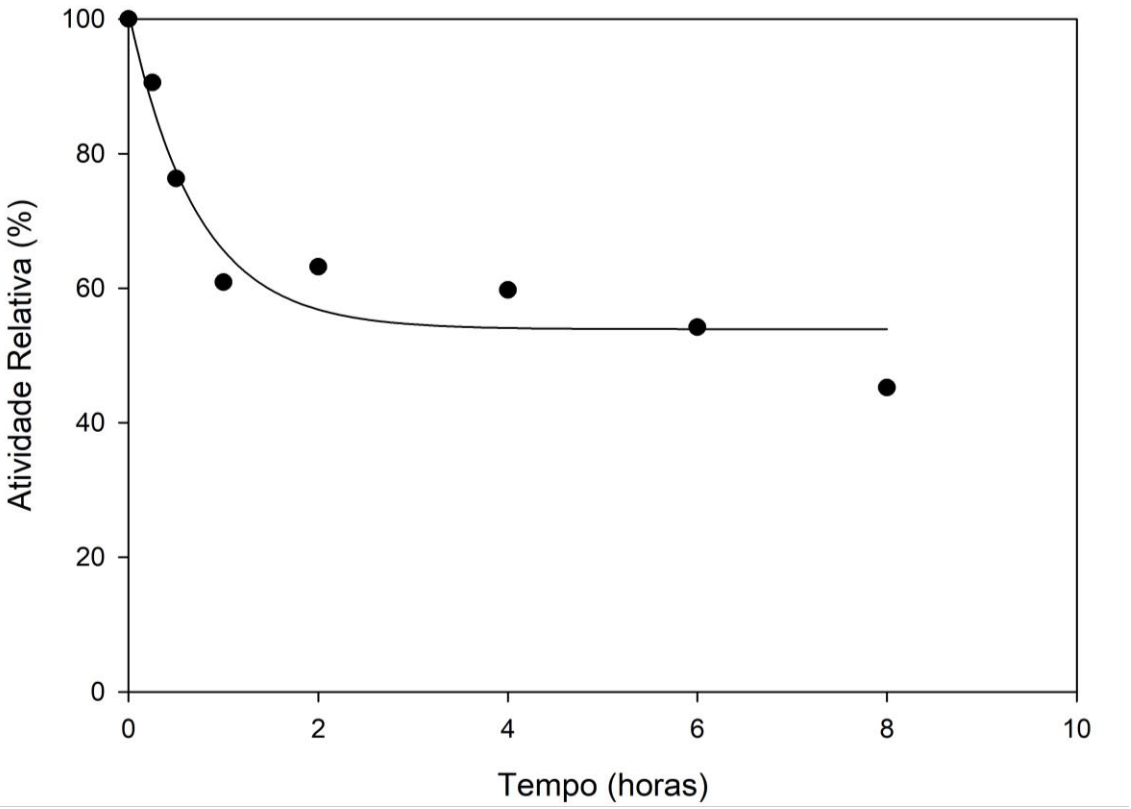

Figura 9: Estabilidade térmica da enzima α-galactosidase de *Trichoderma virens* a 40ºC. Todos desvios padrões obtidos foram inferiores a 6,5 %.

Com a aplicação de análises matemáticas obteve-se um tempo de meia vida de 6,7 horas, valor este calculado com base na equação 1:

$$y = \frac{1}{a + bx}$$

(Equação 1)

A exposição de enzimas a temperaturas mais elevadas em relação ao seu ambiente celular natural, por períodos prolongados, pode causar sua desnaturação. Nos ensaios de estabilidade térmica houve baixa termoestabilidade na temperatura ótima de 55 ºC (Figura 11), porém uma maior estabilidade em 45 ºC (Figura 10).

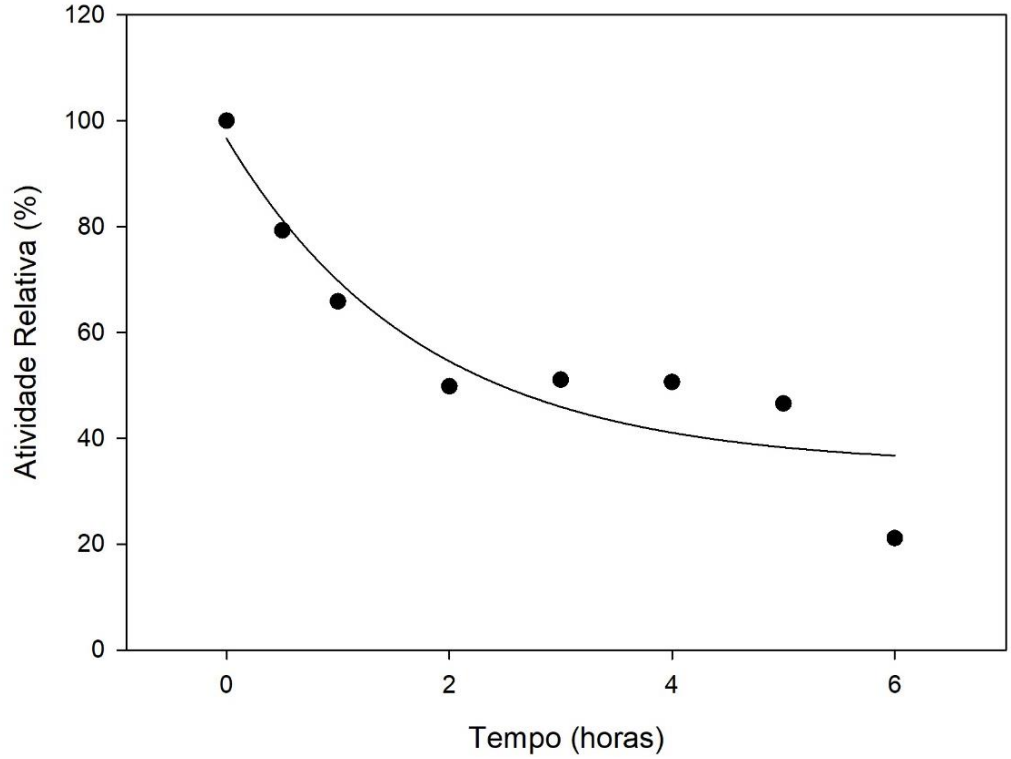

Figura 10: Estabilidade térmica da enzima α-galactosidase de *Trichoderma virens* a 45ºC. Todos desvios padrões obtidos foram inferiores a 6,5 %.

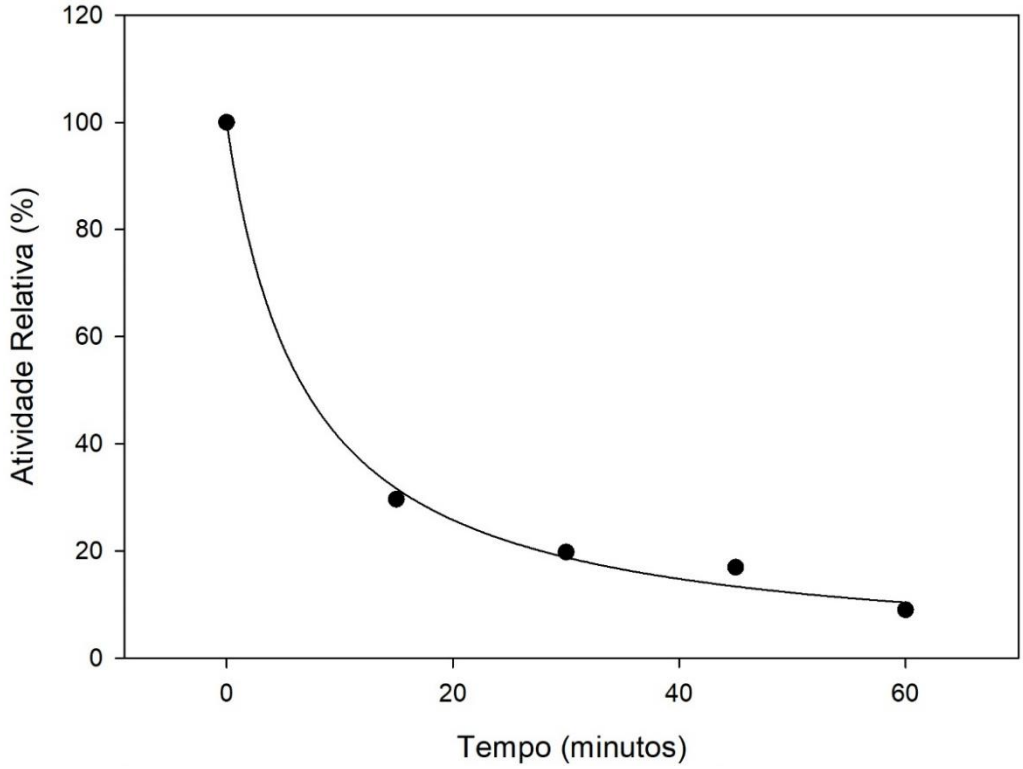

Figura 11: Estabilidade térmica da enzima α-galactosidase de *Trichoderma virens* a 55ºC. Todos desvios padrões obtidos foram inferiores a 6,5 %.

Após análises matemáticas estimou-se o tempo de meia vida da enzima na temperatura de 45 ºC, 2,45 horas, ou seja, o tempo para perder 50% de sua atividade. Este valor foi estimado segundo a equação 2:

$$y = yo + a.e^{-bx}$$

(Equação 2)

A 55 ºC a enzima teve um tempo de meia vida de 7 minutos, calculado pela equação 3:

$$y = \frac{a}{1 + bx}$$

(Equação 3)

Tendo em vista os resultados mostrados nos gráficos de termoestabilidade (Figuras 9, 10 e 11) pode-se observar uma maior estabilidade na temperatura de 40ºC, da qual houve atividade acima de 50% em 6 horas de incubação.

Em enzimas α-galactosidades de outros organismos notam-se características muito variadas. No caso da enzima de *Cannabis sativa*, que é uma espécie vegetal, observa-se uma maior estabilidade até temperaturas de 30 ºC em 1 hora de incubação, mantendo 80 % de sua atividade (ZHANG, WEIWEI *et al.*, 2018). Já neste estudo observa-se em temperatura de 45 ºC mesma atividade de 80 % em 30 minutos de incubação.

Nos ensaios de estabilidade em diferentes pH após 1 hora de incubação em temperatura ambiente (20 ºC – 25 ºC) houve queda significativa da sua atividade em todos pH testados, porém pode-se notar maior estabilidade nos pH de 4,5 a 5,5; sendo que em pH acima de 7 havia perda total da atividade. (Figura 12).

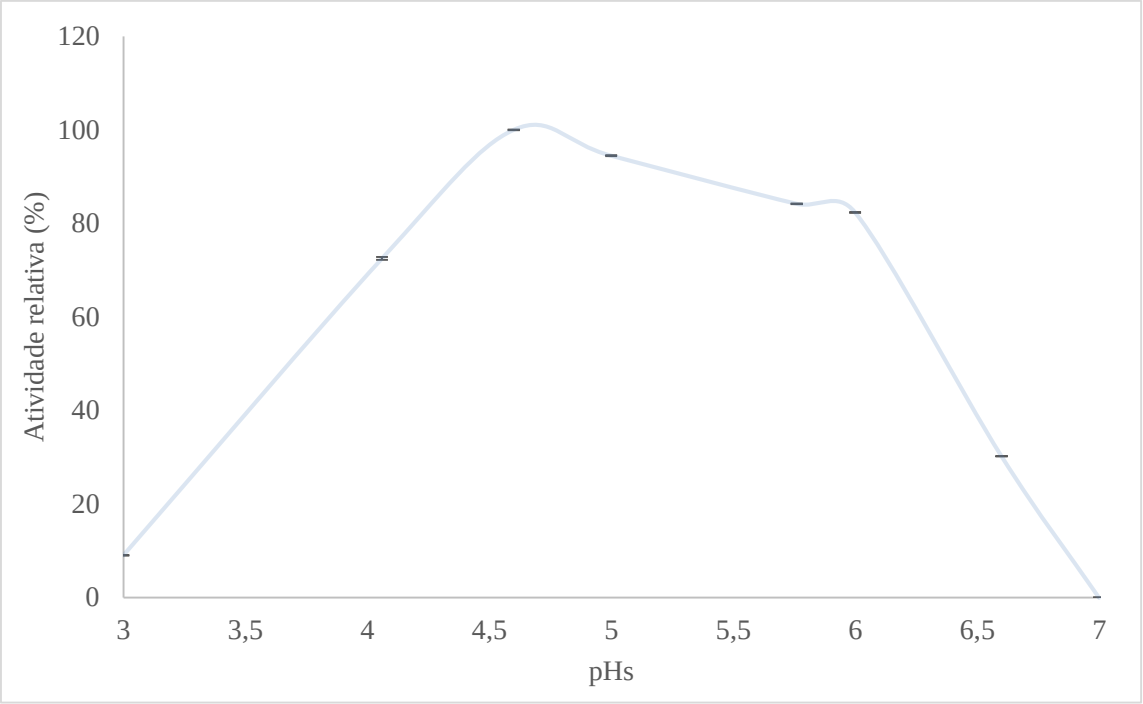

Figura 12: Estabilidade da enzima α-galactosidase de *T. virens* em pH após 1 hora de pré-incubação.

A α-galactosidase do fungo *T. virens* se mostrou mais estável em meios de meios ácidos, apresentando maior estabilidade em solução de pH 4,5; e mantendo uma alta estabilidade de cerca de 80% até pH 6. A enzima α-galactosidase de *Annona squamosa* mostrou uma característica semelhante, sendo sua maior estabilidade em meio ácido com pH igual a 5,0 (RANGANATHA *et al.*, 2021). A enzima do fungo *Trametes versicolor* mostrou maior estabilidade em meio ácido de pH 3,0 (LIU, QIN *et al.*, 2020).

3.3.3 Efeito de íons e outros reagentes

A enzima α-galactosidase apresentou aumento da atividade de 23% em presença de KCl (Figura 13). Em presença de glicose não houve perda significativa de atividade. Com a adição de $NaNO_3$ nota-se uma perda sutil de 10% de atividade, já na adição de etanol e $MgSO_4$, houve uma perda levemente significativa de 30% de sua atividade. Contudo, uma perda de 60% da atividade é observada em ensaios com adição de azida, NaCl, $CaCl_2$, ácido glucônico e frutose. Os regentes galactose, glicerol e ácido acético causaram inibição da atividade enzimática, com uma perda quase total (Figura 13). A galactose é um produto da hidrólise catalisada por α-Gal II, por tanto, um inibidor natural desta enzima.

O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente aniônico e um desnaturante conhecido de proteínas, portanto causou uma grande perda de 60 % da atividade de α-galactosidase. Por esta razão, o glicerol um sulfactante não iônico, também um desnaturante de proteínas, causou perda quase total da atividade enzimática. A ureia, outro desnaturante comum de proteínas, causou perda total da atividade (DE ALMEIDA *et al.*, 2013). Ambas substâncias causam o rompimento de ligações de hidrogênio e alteram a agregação hidrofóbica lateral das cadeias de aminoácidos apolares, desestabilizando o núcleo globular das proteínas (NELSON; COX, 2019). O $(NH_4)_2SO_4$ é um agente precipitante de proteínas, portanto, pode em alguns casos, causar a desnaturação pela formação de agregados proteicos instáveis com a associação de superfície hidrofóbicas.

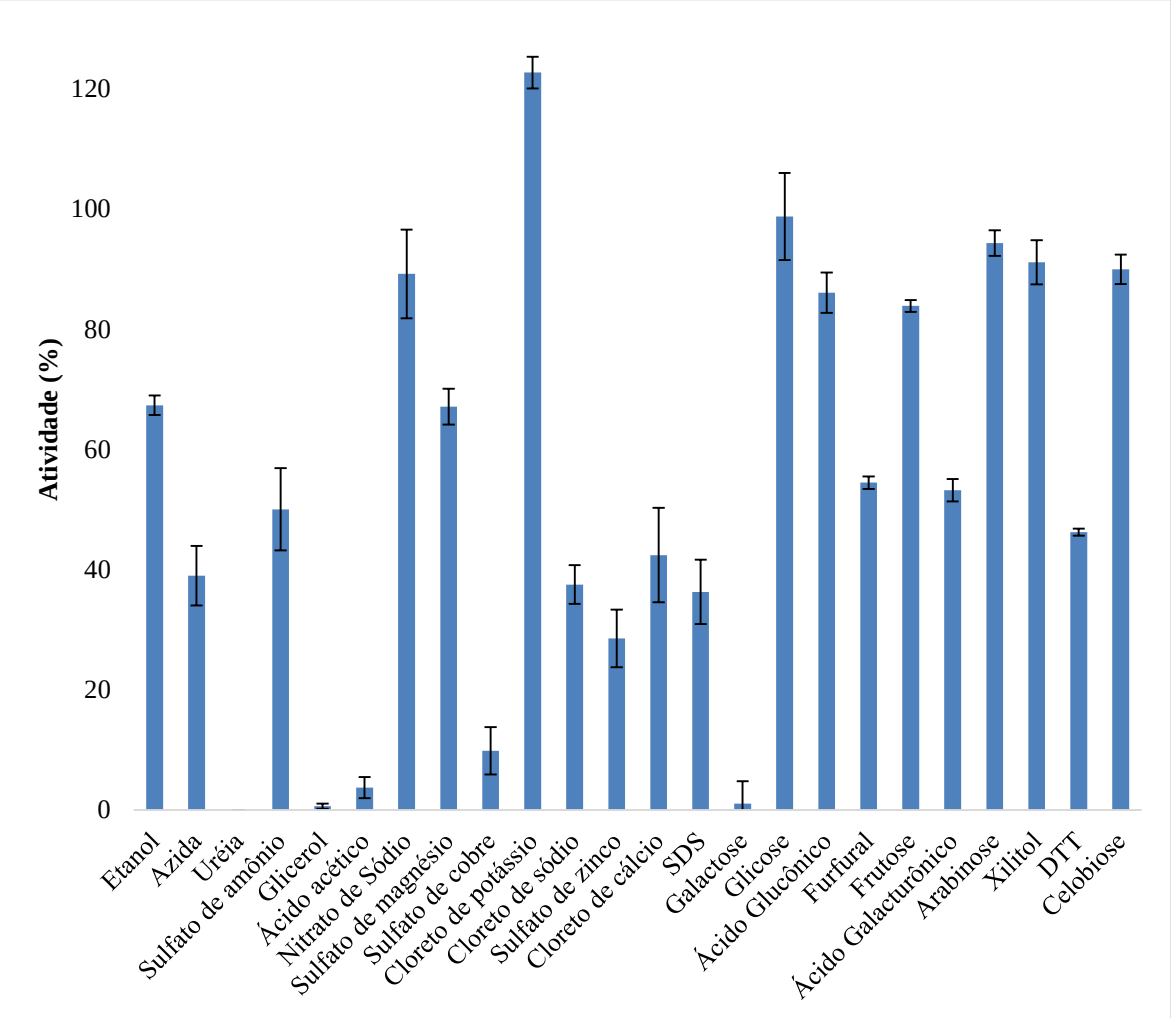

Figura 13: Efeito de íons e reagentes na atividade de α-galactosidase de *T. virens*.

Em algumas α-galactosidases de diferentes organismos, alguns íons têm efeitos semelhantes aos observados neste estudo, mas também apresentam alguns efeitos

divergentes. Como no caso do íon Cu^{2+}, em enzimas do fungo *Irpex lacteus* (GUO *et al.*, 2016), onde sua atividade manteve-se próxima a 75%, porém emno fungo *Aspergillus terreus* (FERREIRA *et al.*, 2011) o mesmo íon causa a perda total de sua atividade enzimática. Em presença deste íon, a enzima α-galactosidase de *T. virens* reteve apenas cerca de 10% de sua atividade neste estudo.

O íon K^{+}, neste estudo, causa um aumento de 23% da atividade de α-Gal II, em comparação têm-se a enzima dos fungos *Aspergillus terreus* (FERREIRA *et al.*, 2011) e *Irpex lacteus* (GUO *et al.*, 2016), onde a atividade não foi alterada.

Neste estudo a presença do íon Zn^{2+} causou perda significativa, mantendo apenas cerca de 30 % da mesma, este efeito é comum em enzimas glicosil hidrolases e são geralmente associado a interações com grupos sulfidrilas, carboxilas, amino, imidazol ou histidina no sítio ativo. Este cátion causa a oxidação destes grupos e leva a alterações conformacionais na enzima (DE ALMEIDA *et al.*, 2013).

O furfural é um resíduo do pré-tratamento ácido de biomassa lignocelulósica, considerando que a α-galactosidase de *T. virens* retém cerca de 55 % de sua atividade representa uma forte evidência de que esta enzima pode ser utilizada, juntamente com a enzima celulase, no processo de produção de bioetanol a partir de melaço de soja para hidrolisar os oligossacarídeos de rafinose e estaquiose presentes no mesmo, possivelmente melhorando a eficiência da produção (DE ALMEIDA *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2008).

3.4 Caracterização cinética

Na análise do efeito da concentração de substrato na atividade enzimática, a enzima α-galactosidase apresentou curva hiperbólica seguindo o modelo clássico de Michaelis-Menten (Figura 14). Utilizando o modelo de Lineweaver-Burk calculou-se o K_M e a V_{MAX} de α-galactosidase, que foram, respectivamente, 0,4065 mmol/L e 0,6938 $mmol.mL^{-1}.min^{-1}$ (Figura 15).

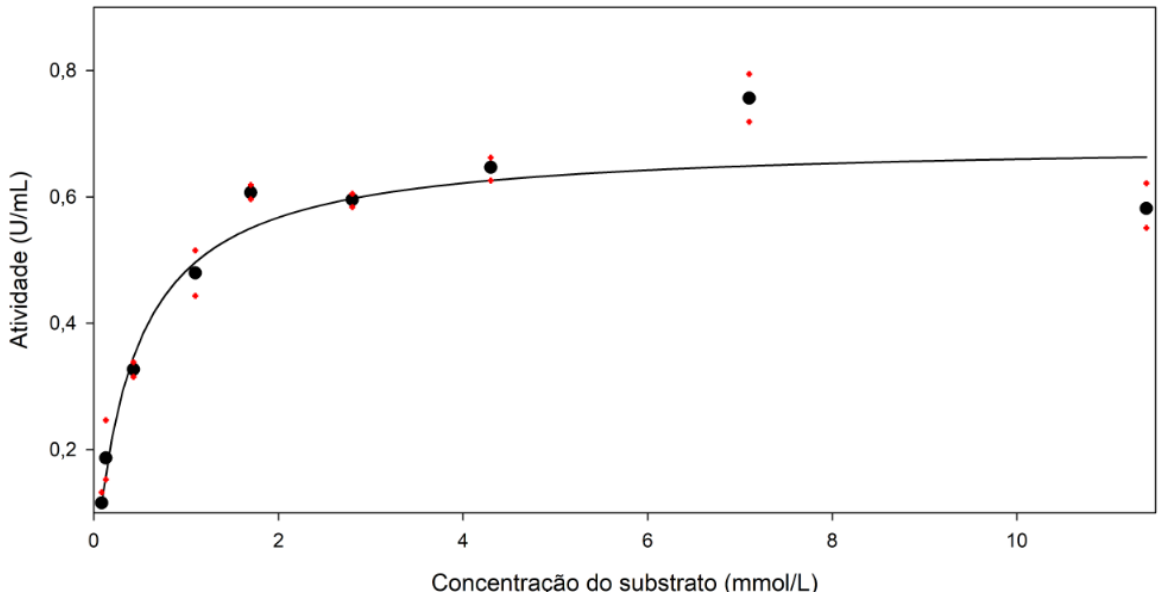

Figura 14: Curva de Michaelis-Menten da enzima α-galactosidase utilizando pNp-α-Gal como substrato. Todos desvios padrões obtidos foram inferiores a 0,04 mmol/L.

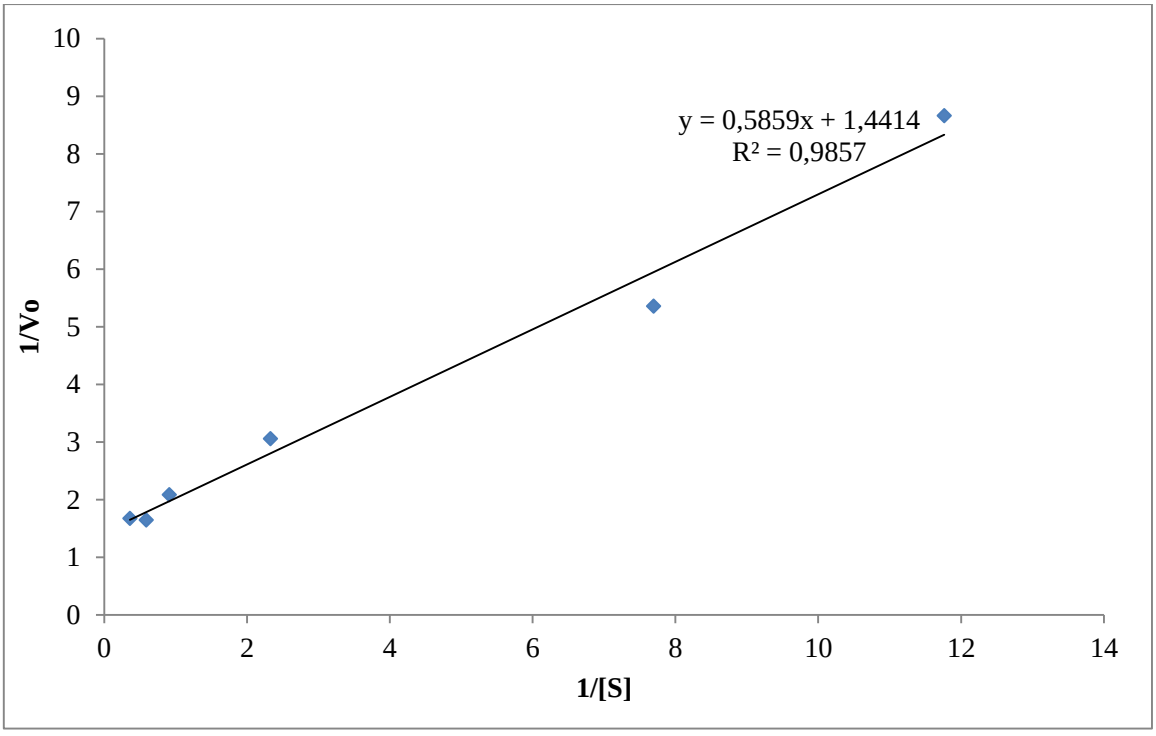

Figura 15: Efeito cinético do substrato pNP- α-Gal na enzima a-galactosidase de acordo com plotagem em gráfico no modelo de Lineweaver-Burk.

Como se pode observar o K_M de α-galactose foi semelhante ao encontrado em *Acinobacter sp* com valor de 0,68 mmol/L (SIRISHA *et al.*, 2015), mas inferior aos encontrados nos demais organismos, como *Irpex lacteus* que apresenta K_M de 1,2 mmol/L (JANG *et al.*, 2019), *Lentinula edodes* com 1,1 mmol/L (XU *et al.*, 2019), *Vigna mungo* com

valor de 0,99 mmol/L (MUTRA *et al.*, 2018) e *Bacillus coagulans* com K_M de 1,1 mmol/L (ZHAO *et al.*, 2018). O valor de K_M inferior aos apresentados em outros estudo indica uma maior afinidade da enzima α-galactosidase de *T. virens* com substratos semelhantes ao pNP-Gal em relação as enzimas apresentadas nos estudos citados.

3.4.1 Efeito de Inibição

Foi observado que o monossacarídeo galactose causa uma inibição competitiva da enzima α-galactosidase (Figura 16). Desta forma o substrato e o inibidor competem pelo espaço no sítio ativo, uma vez que a galactose se liga ao sítio ativo o substrato não consegue interagir imediatamente, porém é uma inibição reversível, caso o inibidor seja retirado do sítio ativo o substrato ainda pode se ligar ao mesmo. Como é observado para esta forma de inibição, houve aumento no K_M, com valores de 3,51 a 15,37 mmol/L, enquanto que o V_{MAX} se manteve constante em aproximadamente 1,22 $mmol.mL^{-1}.min^{-1}$.

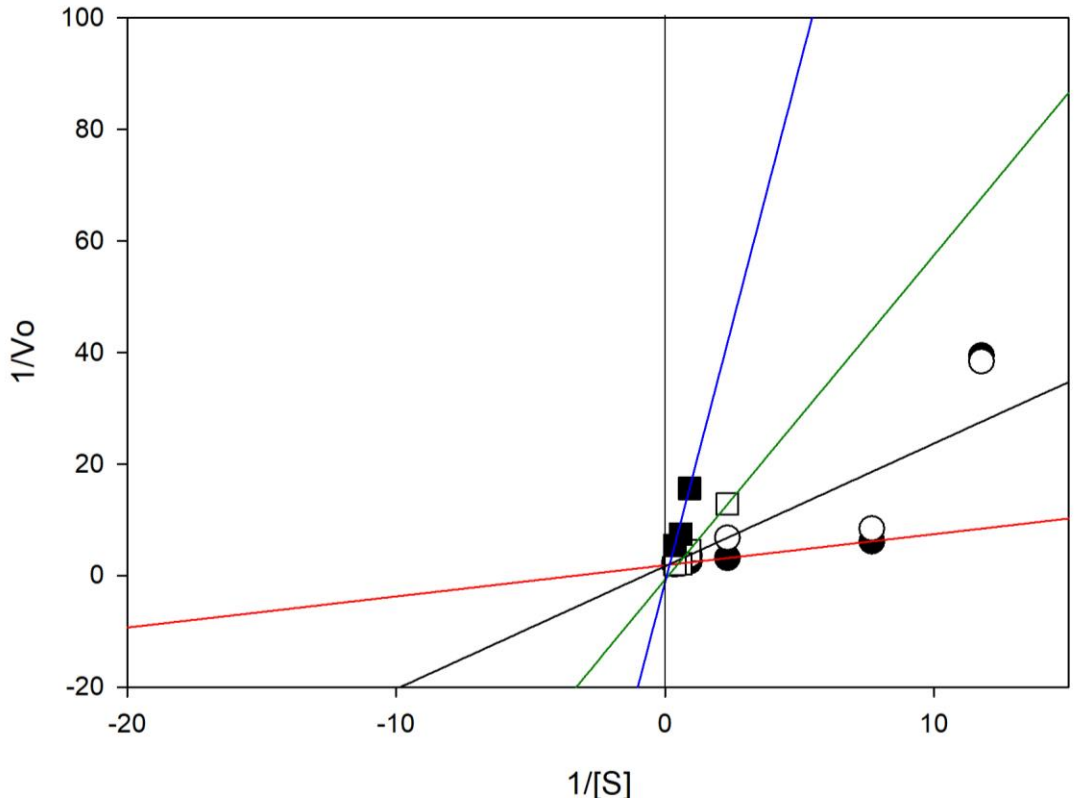

Figura 16: Efeito do inibidor galactose na enzima α-galactosidase, onde representa o ensaio; (●) sem a presença de inibidor; (○) em presença de 1 mmol/L de inibidor; (□) em presença de 2 mmol/L de inibidor; e (■) em presença de 3 mmol/L de inibidor.

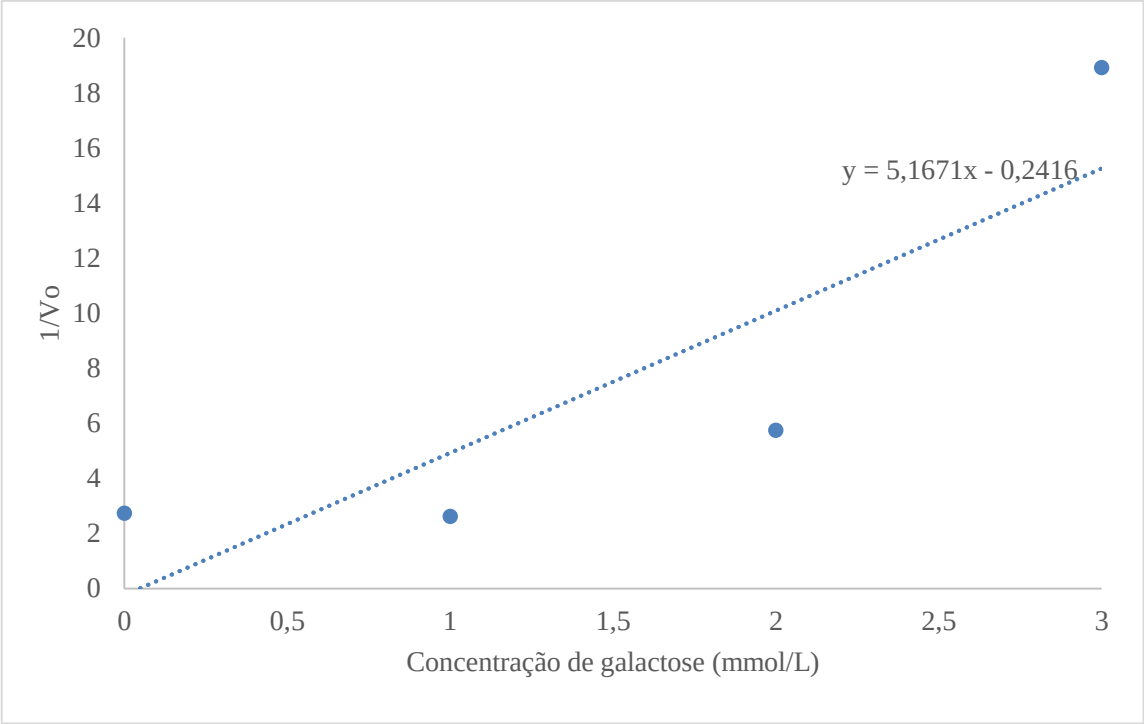

Figura 17: Plot de Dixon com as concentrações do inibidor galalactose com suas respectivas inclinações de acordo com o modelo de Lineweaver-Burk.

Utilizando o plot de Dixon (Figura 17) foi possível calcular a constante de inibição do reagente galactose (k_i), seu valor foi de 0,2416 mmol/L. Um valor inferior se comparado com enzimas α-galactosidases de outros organismos em presença do inibidor galactose, como do fungos *D. hansenii* (2,7 mmol/L) (VIANA *et al.*, 2006) e *I. lacteus* (8,0 mmol/L) (JANG *et al.*, 2019), da bactéria *B. megaterium* (12,5 mmol/L) (HUANG *et al.*, 2018). Indicando que a enzima de *T. virens* necessita de uma concentração menor de galactose para causar inibição da enzima, portanto sendo mais afetada pelo efeito inibitório causado pela galactose em relação a outras enzimas.

3.5 Hidrólise de oligossacarídeos em leite e melaço de soja

A enzima α-galactosidase foi avaliada de acordo com sua eficiência na hidrólise de dois produtos a base de soja utilizando o método com teste com reagente de DNS. A análise revelou um aumento da concentração de açúcares redutores ao longo da reação de hidrólise do extrato hidrossolúvel de soja. Nota-se um grande aumento acentuado até em 6 horas de ensaio, após este marco ocorre um pequeno aumento da concentração até 8 horas (Figura 18).

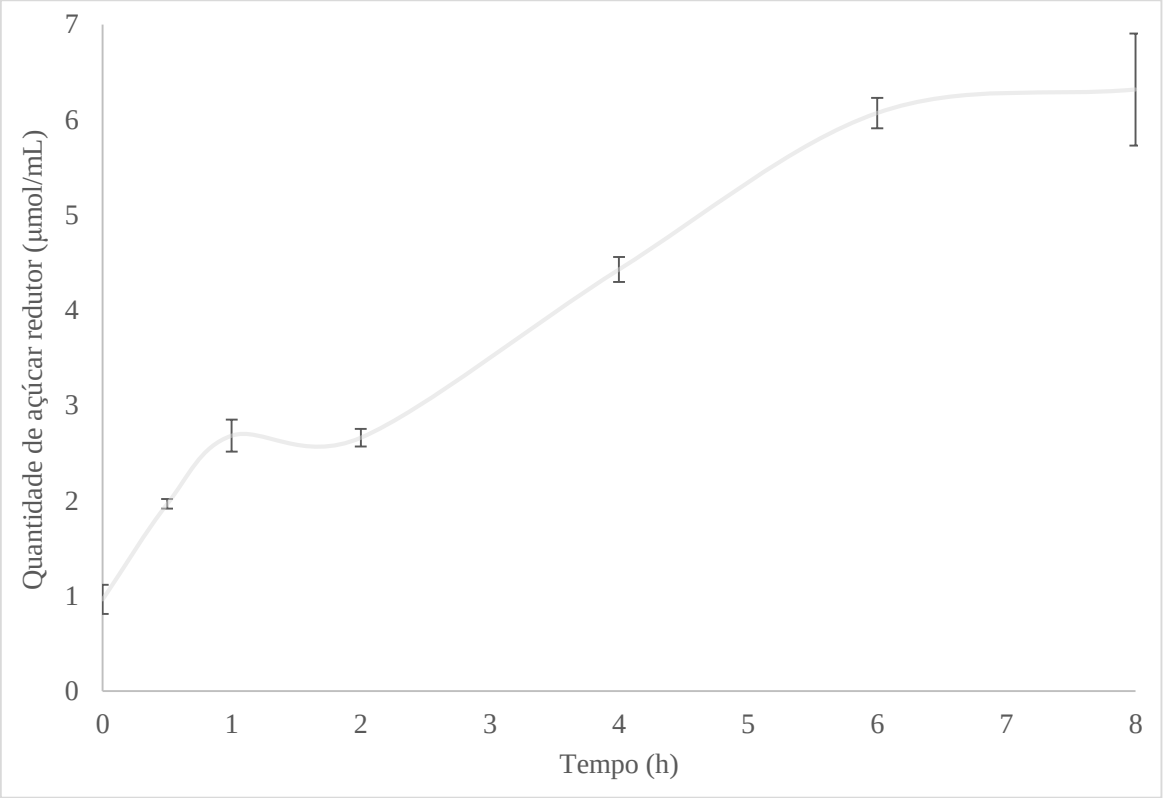

Figura 18: Hidrólise de extrato hidrossolúvel de soja utilizando a enzima α-galactosidase de *Trichoderma.* virens a 40ºC

A análise com teste de DNS revelou um aumento da concentração de açúcares redutores ao longo da reação de hidrólise do melaço de soja. Seguindo um padrão semelhante ao observado na hidrólise do extrato hidrossolúvel de soja (Figura 18), também nota-se uma variação menor entre os tempos de 6 h e 8 h (Figura 19).

Uma possível explicação deste fato seria uma possível instabilidade da enzima após 6 h de ensaio a 40 ºC, porém com base no teste de termoestabilidade realizado na temperatura de 40 ºC, nota-se que esta explicação não se aplica ao caso, já que a enzima mantém cerca de 50 % de sua atividade em até 8 horas de ensaio (Figura 9).

A hidrólise dos oligossacarídeos de estaquiose e rafinose causa um aumento da concentração de galactose no meio reativo, sendo a galactose uma inibidora competitiva da enzima α-galactosidase, pode ocasionar a diminuição da eficiência da enzima, justificando esta redução da taxa de hidrólise entre os tempos 6 h e 8 h.

Em ambos ensaios foram mantidos uma mesma proporção de quantidade de enzimas e de soja, sendo ela 10,5 U de enzima por grama substrato.

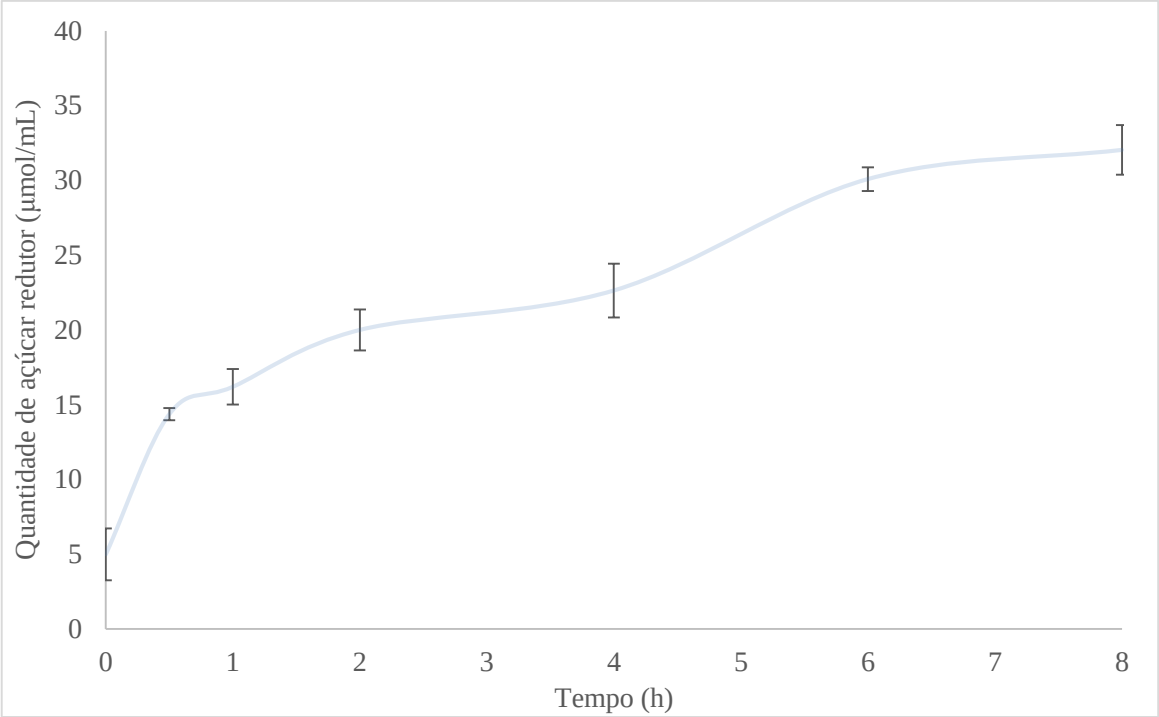

Figura 19: Hidrólise de melaço de soja utilizando a enzima α-galactosidase de *Trichoderma.* virens a 40ºC.

3.6 Análise por cromatografia em camada delgada

Os produtos da hidrólise de extrato hidrossúvel e de melaço de soja foram avaliados em cromatografia de camada delgada para visualização da liberação dos produtos ao longo do tempo. Nesta cromatografia ocorre eluição da fase móvel pela placa, sendo ela menos polar que a sílica que reveste a placa. Com isso os compostos mais polares se ligam a sílica (fase estacionária) mais facilmente, enquanto que os menos polares são mais arrastados pela fase móvel, pois se ligam mais a ela. Outro fator importante é o tamanho das moléculas em questão, quanto maior a molécula, menos a mesma é arrastada pela fase móvel, fato que se torna muito visível durante a cromatografia (Figura 20), a estaquiose (1) a maior molécula é retida antes das demais e depois a rafinose (2) e a sacarose (3).

É possível observar que ocorre a hidrólise de estaquiose e rafinose no extrato hidrossolúvel de soja, uma vez que ocorre uma diminuição da coloração das respectivas bandas após 8 h de hidrólise (Figura 20. A). Após 4 horas de hidrólise pode-se notar na placa cromatográfica que o ponto correspondente a rafinose possui maior intensidade que os demais, indicando uma maior taxa de hidrólise de estaquiose até este tempo, e consequente maior produção de rafinose. No tempo seguinte de 8 horas nota-se o clareamento deste sinal, indicando que nas 4 horas restantes a rafinose foi hidrolisada, na reação a enzima α-

galactosidase converte a rafinose em galactose e sacarose. Análises de outros produtos da hidrólise de produtos à base de soja, catalisados por enzimas α-galactosidase, aplicados em cromatografia TLC mostram o mesmo efeito (HAN *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2010; YE *et al.*, 2018).

Outro fator interessante de se ressaltar é que no ponto que marca 8 horas de ensaio de hidrólise do extrato hidrossolúvel de soja (Figura 20. A; T8h), houve uma baixa intensidade da cor de todos sinais. A estaquiose e rafinose são consumidos diretamente pela hidrólise catalisada pela α-galactosidase, porém a sacarose é um dissacarídeo formado por glicose e frutose não sendo possível a hidrólise pela enzima em questão. Este fator pode ser explicado pela possível presença da enzima invertase (β-frutofuranosidase) no extrato enzimático, a qual é responsável pela reação catalítica de conversão da sacarose em glicose e frutose. Outro indício da presença desta enzima é a falta de variação da intensidade do ponto correspondente a sacarose (3) durante todo ensaio.

O mesmo efeito não é aparente no ensaio de hidrólise do melaço de soja (Figura 20.B), podendo indicar presença de algum inibidor da invertase dentre os resíduos contidos no melaço de soja.

Na placa da hidrólise do melaço de soja, observa-se uma retenção maior das amostras em relação ao padrão, isso ocorre pois a amostra de melaço de soja utilizada contém diversos resíduos dos processos industriais aos quais foi submetida. Estes resíduos representaram um obstáculo aos açúcares analisados durante a corrida cromatográfica, tornando o resultado desta cromatografia menos notável que o obtido com extrato hidrossolúvel de soja. Contudo, no tempo de ensaio de 4 horas também pode-se notar um aumento na concentração de rafinose um indício de que houve hidrólise da estaquiose (Figura 20.B; T4h).

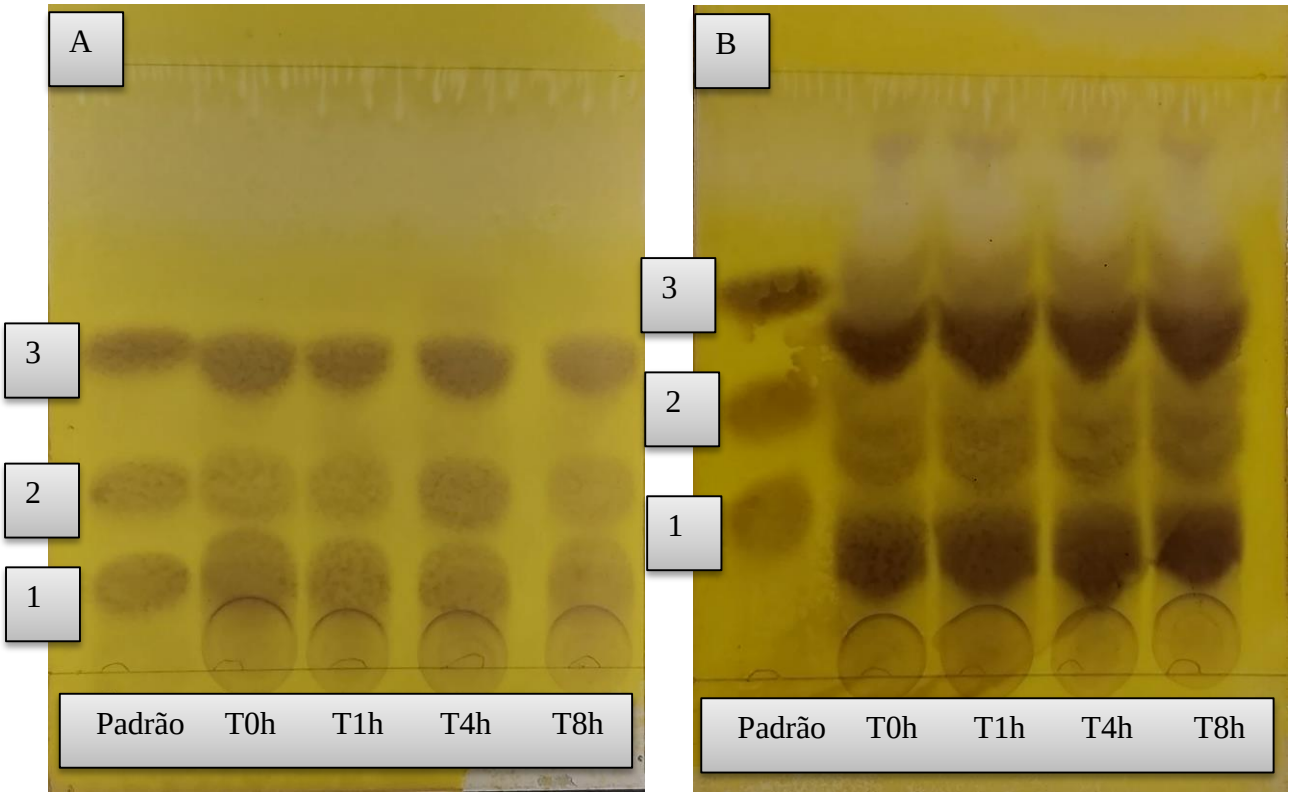

Figura 20-A: Placa cromatográfica contendo análise do extrato de açúcares do extrato hidrossolúvel de soja. Figura 20-B: Placa cromatográfica contendo análise do extrato de açúcares do melaço de soja. Onde 1. Representa a estaquiose, 2. Representa rafinose e 3. Representa sacarose.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho a enzima α-galactosidase extraída do fungo *T. virens* foi produzida, purificada parcialmente e caracterizada. Apresentou valor de pH ótimo de 4,5 e temperatura ótima de 55 ºC. Verificou-se uma estabilidade significativa da enzima em certas condições como no pH ótimo da enzima, em temperaturas de 40 ºC e 45 ºC e em presença do cátion K^+, onde houve aumento de sua atividade enzimática, e outros íons e reagentes que não causaram alterações significativas em sua atividade.

Com o estudo dos parâmetros cinéticos K_M e V_{MAX}, a enzima α-galactosidase mostra grande especificidade para substratos semelhantes ao pNP-Gal. No análise da inibição da enzima pela galactose, nota-se um padrão condizente com a inibição competitiva, onde a variação do K_M é notável.

Os testes de aplicações em hidrólise de extrato hidrossolúvel e melaço de soja mostram resultados favoráveis a sua possível utilização, após processos e estudos para

otimização dos procedimentos e das condições de reação, tanto na melhoria do valor nutricional do extrato hidrossolúvel de soja na indústria alimentícia, quanto em sua aplicação no processo de produção de bioetanol derivado do melaço de soja na indústria de biocombustíveis. Contudo, de acordo com os resultados obtidos, a aplicação da enzima deve ser preferencialmente na indústria alimentícia em extrato hidrossolúvel de soja, já que nas análises realizadas neste estudo apresentaram melhores e mais claros indícios de sua eficiência.

Para melhoria do processo é aconselhável a purificação total da enzima, além da expressão dos genes responsáveis pela biossíntese da enzima em outros fungos para uma produção mais segura, e possivelmente a expressão para superprodução da enzima. Outra possível fonte de aprimoramento seria a imobilização da enzima, assim a mesma poderá ser reutilizada, tornando o processo financeiramente mais viável.

REFERÊNCIAS

ADEMARK, Pia *et al.* Multiple α-galactosidases from *Aspergillus niger*: Purification, characterization and substrate specificities. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, n. 6–7, p. 441–448, 2001.

ALIAS, Nadiawati *et al.* Expression and characterization of *Trichoderma virens* UKM-1 endochitinase in Escherichia coli. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 4, p. 561–572, 2009.

ARENDS, Maarten *et al.* Characterization of classical and nonclassical fabry disease: A multicenter study. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 28, n. 5, p. 1631–1641, 2017.

BAEK, Jong Min; HOWELL, Charles R.; KENERLEY, Charles M. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of Rhizoctonia solani. *Current Genetics*, v. 35, n. 1, p. 41–50, 1999.

BAYRAKTAR, Hasan; ÖNAL, Seçil. Cross-linked α-galactosidase aggregates: optimization, characterization and application in the hydrolysis of raffinose-type oligosaccharides in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 99, n. 10, p. 4748–4760, 2019.

BENNO, Yoshimi *et al.* Effects of Raffinose Intake on Human Fecal Microflora. *Bifidobacteria and Microflora*, v. 6, n. 2, p. 59–63, 1987.

BHATIA, Sonu *et al.* Microbial production and biotechnological applications of α-galactosidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019.

BRAHMACHARI, Goutam; DEMAIN, Arnold L.; ADRIO, Jose L. *Biotechnology of microbial enzymes*. [S.l: s.n.], 2017.

CALHOUN, D. H. *et al.* Fabry disease: Isolation of a cDNA clone encoding human α-galactosidase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 82, n. 21, p. 7364–7368, 1985.

CAO, Yanan *et al.* Cloning and functional expression of an α-galactosidase from *Yersinia pestis* biovar Microtus str. 91001. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 72, n. 8, p. 2203–2205, 2008.

CHAUHAN, Aishwarya; SIDDIQI, Nikhat Jamal; SHARMA, Bechan. A Novel Promising Strain of *Trichoderma evansii* (WF-3) for Extracellular ? -Galactosidase Production by Utilizing Different Carbon Sources under Optimized Culture Conditions. *Hindawi*, v. 2014, 2014.

CLARKE, J. H. *et al.* A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and α-galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 6, p. 661–667, 2000.

COMFORT, Donald A. *et al.* Biochemical analysis of *Thermotoga maritima* GH36 α-galactosidase (TmGalA) confirms the mechanistic commonality of clan GH-D glycoside hydrolases. *Biochemistry*, v. 46, n. 11, p. 3319–3330, 2007.

CONTRERAS-CORNEJO, Hexon Angel *et al. Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 149, n. 3, p. 1579–1592, 2009.

DE ALMEIDA, Maíra N. *et al.* Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. *Bioresource Technology*, v. 143, p. 413–422, 2013.

DE REZENDE, Sebastião Tavares *et al.* Purification and characterization of an α-galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. 2, p. 195–202, 2005.

DEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. BIOCHEMISTRY OF a-GALACTOSIDASES. v. 36, n. 2, p. 91–130, 1972.

DHILLON, Gurpreet Singh; KAUR, Surinder. *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2016.

DIXON, M. The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Instrument Engineers' Handbook: Process Measurement and Analysis, Fourth Edition*, v. 55, n. 1, p. 170–171,

1953.

FALKOSKI, Daniel Luciano *et al.* Covalent immobilization of α-galactosidase from *Penicillium griseoroseum* and its application in oligosaccharides hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 158, n. 3, p. 540–551, 2009.

FERREIRA, Joana Gasperazzo *et al.* Purification and characterization of *Aspergillus terreus* α-galactosidases and their use for hydrolysis of soymilk oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 164, n. 7, p. 1111–1125, 2011.

FIALHO, Lílian da Silva *et al.* Characterization and biotechnological application of an acid α-galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds. *Phytochemistry*, v. 69, n. 14, p. 2579–2585, 2008.

FRANCINI-PESENTI, Francesco *et al.* Could nutritional therapy take us further in our approaches to Fabry disease? *Nutrition*, v. 72, 2020.

FREDSLUND, Folmer *et al.* Crystal structure of α-galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* NCFM: Insight into tetramer formation and substrate binding. *Journal of Molecular Biology*, v. 412, n. 3, p. 466–480, 2011.

FRIDJONSSON, Olafur *et al.* Cloning of the gene encoding a novel thermostable α-galactosidase from *Thermus brockianus* ITI360. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 9, p. 3955–3963, 1999.

FRIDJONSSON, Olafur; MATTES, Ralf. Production of Recombinant α-Galactosidases in *Thermus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 9, p. 4192–4198, 2001.

GENG, Xueran *et al.* Good hydrolysis activity on raffinose family oligosaccharides by a novel α-galactosidase from *Tremella aurantialba*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 150, p. 1249–1257, 2020.

GOLUBEV, A. M. *et al.* Crystal structure of α-galactosidase from *Trichoderma reesei* and its complex with galactose: Implications for catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, v. 339, n. 2, p. 413–422, 2004.

GUCE, Abigail I. *et al.* Catalytic mechanism of human α-galactosidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 6, p. 3625–3632, 2010.

GUO, Yajie *et al.* Purification of thermostable α-galactosidase from *Irpex lacteus* and its use for hydrolysis of oligosaccharides. *Journal of Basic Microbiology*, v. 56, n. 5, p. 448–458, 2016.

HAN, Zheng Gang *et al.* Gene dosage and coexpression with endoplasmic reticulum secretion-associated factors improved the secretory expression of α-galactosidase. *Protein*

Expression and Purification, v. 153, p. 83–91, 2019.

HASHIMOTO, Hiroyuki *et al.* Transgalactosylation Catalyzed by α-Galactosidase from *Candida Guilliermondii* H-404. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 59, n. 4, p. 619–623, 1995.

HU, Yujing *et al.* A protease-resistant α-galactosidase from *Pleurotus citrinopileatus* with broad substrate specificity and good hydrolytic activity on raffinose family oligosaccharides. *Process Biochemistry*, v. 51, n. 4, p. 491–499, 2016.

HU, Yujing *et al.* Isolation of a protease-resistant and pH-stable α-galactosidase displaying hydrolytic efficacy toward raffinose family oligosaccharides from the button mushroom *Agaricus bisporus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 104, p. 576–583, 2017.

HUANG, Yan *et al.* Characterization of a novel GH36 α-galactosidase from *Bacillus megaterium* and its application in degradation of raffinose family oligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 98–104, 2018.

JANG, Jin Myong *et al.* Characterization of a high performance α-galactosidase from *Irpex lacteus* and its usage in removal of raffinose family oligosaccharides from soymilk. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 131, p. 1138–1146, 2019.

KATROLIA, Priti *et al.* Biotechnological potential of microbial α-galactosidases. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 34, n. 4, p. 307–317, 2014.

KATROLIA, Priti *et al.* Enhanced elimination of non-digestible oligosaccharides from soy milk by immobilized α-galactosidase: A comparative analysis. *Journal of Food Biochemistry*, v. 43, n. 11, p. 1–7, 2019.

KIKUCHI, Asako *et al.* A novel glycoside hydrolase family 97 enzyme: Bifunctional β-L-arabinopyranosidase/α-galactosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Biochimie*, v. 142, p. 41–50, 2017.

KURAKAKE, Masahiro *et al.* Enzymatic properties and transglycosylation of α-galactosidase from *Penicillium oxalicum* so. *Food Chemistry*, v. 126, n. 1, p. 177–182, 2011.

KURAKAKE, Masahiro; OKUMURA, Takumi; MORIMOTO, Youichirou. Synthesis of galactosyl glycerol from guar gum by transglycosylation of α-galactosidase from *Aspergillus sp*. MK14. *Food Chemistry*, v. 172, p. 150–154, 2015.

LI, Suhong; ZHU, Minpeng; LI, Tuoping. Classification, substrate specificity and application of α-galactosidases. *Advanced Materials Research*, v. 343–344, p. 1222–1228, 2012.

LINARES, Nancy Coconi *et al.* Recombinant production and characterization of six novel

GH27 and GH36 α-galactosidases from *Penicillium subrubescens* and their synergism with a commercial mannanase during the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 295, p. 122258, 2020.

LIU, Qin *et al.* Fermentation production, purification and characterization of a fungal α-galactosidase from *Trametes versicolor* and its synergistic degradation of guar gum with mannanase. *Food Science and Technology Research*, v. 26, n. 2, p. 265–280, 2020.

LIU, Qiyong P. *et al.* Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells. *Nature Biotechnology*, v. 25, n. 4, p. 454–464, 2007.

LIU, Yu *et al.* High-level expression of a novel protease-resistant α-galactosidase from *Thielavia terrestris*. *Process Biochemistry*, v. 71, p. 82–91, 2018.

MUKHERJEE, Prasun K. *et al.* TmkA, a mitogen-activated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark. *Eukaryotic Cell*, v. 2, n. 3, p. 446–455, 2003.

MUTRA, Ramadevi *et al.* Low molecular weight α-galactosidase from black gram (*Vigna mungo*): Purification and insights towards biochemical and biophysical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 119, p. 770–778, 2018.

NAUMOFF, D G. The alpha-galactosidase superfamily: sequence based classification of alpha-galactosidases and related glycosidases. *Computational Structural and Functional Proteomics*, p. 315–318, 2004.

NOGUEIRA-LOPEZ, Guillermo *et al.* The apoplastic secretome of *Trichoderma virens* during interaction with maize roots shows an inhibition of plant defence and scavenging oxidative stress secreted proteins. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. April, p. 1–23, 2018.

OLIVEIRA, Giordani *et al.* Purificação e caracterização de α-galactosidases de *Platymiscium pubescens* Micheli seeds. *Revista Árvore*, v. 29, n. 4, p. 535–543, 2005.

POLAINA, Julio; MACCABE, Andrew P. *Industrial Enzymes*. [S.l.]: Springer, 2007.

RANGANATHA, Kavyashree Sakharayapatna *et al.* Purification, biochemical and biophysical characterization of an acidic α-galactosidase from the seeds of *Annona squamosa* (custard apple). *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 175, p. 558–571, 2021.

REDDY, Sumitha K. *et al.* A β-mannan utilization locus in *Bacteroides ovatus* involves a GH36 α-galactosidase active on galactomannans. *FEBS Letters*, v. 590, p. 2106–2118, 2016.

REIS, Angélica Pataro *et al.* Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soy molasses by α-galactosidases, invertase from *Aspergillus terreus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 3, p. 719–729, 2010.

SANNIKOVA, Natalia *et al.* Both Chemical and Non-Chemical Steps Limit the Catalytic Efficiency of Family 4 Glycoside Hydrolases. *Biochemistry*, v. 57, n. 24, p. 3378–3386, 2018.

SCHMOLL, Monika *et al.* The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three Trichoderma Species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 80, n. 1, p. 205–327, 2016.

SCHRÖDER, Carola *et al.* Characterization of two novel heat-active α-galactosidases from *Thermophilic bacteria*. *Extremophiles*, v. 21, n. 1, p. 85–94, 2017.

SHIBUYA, Hajime *et al.* Cloning and high-level expression of α-galactosidase cDNA from *Penicillium purpurogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 11, p. 4489–4494, 1998.

SHIN, Yu Jeong *et al.* Characterization of novel α-galactosidase in glycohydrolase family 97 from *Bacteroides thetaiotaomicron* and its immobilization for industrial application. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 152, p. 727–734, 2020.

SILVA, GIL AMARO DA. *Purificação parcial e caracterização de uma alfa- galactosidase de sementes de guapuruvu (Schizolobium parahyba)*. *UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/1997/1/Dissert_GilAmaroSilva.pdf>. , 2007

SIQUEIRA, Paula F. *et al.* Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 17, p. 8156–8163, 2008.

SIRISHA, E *et al.* Purification and characterisation of intracellular alpha-galactosidases from *Acinetobacter sp*. *3 Biotech*, v. 5, n. 6, p. 925–932, 2015.

STRATILOVÁ, Barbora *et al.* Characterization of a long-chain α-galactosidase from *Papiliotrema flavescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 2, p. 1–14, 2018.

TALBOT, G.; SYGUSCH, J. Purification and characterization of thermostable β-mannanase and α-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 11, p. 3505–3510, 1990.

THORNTON, Christopher R. Use of monoclonal antibodies to quantify the dynamics of α-galactosidase and endo-1,4-β-glucanase production by *Trichoderma hamatum* during saprotrophic growth and sporulation in peat. *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 5, p. 737–749, 2005.

VAN DER VEEN, S. J. *et al.* Antibodies against recombinant alpha-galactosidase A in Fabry disease: Subclass analysis and impact on response to treatment. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 126, n. 2, p. 162–168, 2019.

VIANA, Pollyanna A. *et al.* Extracellular α-galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 6, p. 2385–2391, 2006.

WANG, Caihong *et al.* Biochemical characterization of a novel thermophilic α-galactosidase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 with significant transglycosylation activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 121, n. 1, p. 7–12, 2016.

XIE, Jianhua *et al.* A thermophilic fungal GH36 α-galactosidase from *Lichtheimia ramosa* and its synergistic hydrolysis of locust bean gum. *Carbohydrate Research*, v. 491, n. January, p. 107911, 2020.

XU, Lijing *et al.* A protease-resistant α-galactosidase characterized by relatively acid pH tolerance from the Shitake Mushroom *Lentinula edodes*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 128, p. 324–330, 2019.

YE, Feng *et al.* Purification and characterization of a novel protease-resistant GH27 α-galactosidase from *Hericium erinaceus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 2165–2174, 2018a.

YE, Feng *et al. Purification and characterization of a novel protease-resistant GH27 α-galactosidase from Hericium erinaceus*. [S.l.]: Elsevier B.V, 2018b. v. 120.

ZEILINGER, Susanne *et al.* Conditions of Formation, Purification, and Characterization of an α-Galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 1, p. 58–62, 1993.

ZENG, Rong *et al.* A novel cellulase produced by a newly isolated *Trichoderma virens*. *Bioengineering*, v. 3, n. 2, p. 1–9, 2016.

ZHANG, Jian *et al.* Present status on removal of raffinose family oligosaccharides - a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 37, n. 3, p. 141–154, 2019.

ZHANG, Weiwei *et al.* Characterization of an acidic α-galactosidase from hemp (*Cannabis sativa L.*) seeds and its application in removal of raffinose family oligosaccharides (RFOs). *Acta Biochimica Polonica*, v. 65, n. 3, p. 383–389, 2018.

ZHAO, Ruili *et al.* A novel α-galactosidase from the thermophilic probiotic *Bacillus coagulans* with remarkable protease-resistance and high hydrolytic activity. *PLoS ONE*, v. 13, n. 5, p. 1–16, 2018.