

CARACTERIZAÇÃO DE ALFAGALACTOSIDASE E SUA RELAÇÃO COM A GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpinioideae)¹

Eduardo Euclides de Lima e Borges², Sebastião Tavares de Rezende³, Rita de Cassia Gonçalves Borges²e Sonia Cristina Juliano Gualtieri Andrade Perez⁴

RESUMO – Sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpinioideae) – sibipiruna – foram colocadas para embebição por 144 h, sendo retiradas amostras para análise de proteína, quantificações da atividade de alfavgalactosidase e de açúcares presentes na micrópila. A germinação iniciou-se com 96 h de embebição, sem que fossem detectadas modificações na parede celular da micrópila. Nesta, observou-se maior proporção de arabinose, que mostrou tendência de aumento com o decorrer da embebição. A atividade específica da alfavgalactosidase foi detectada em sementes secas, tanto no eixo embrionário quanto nos cotilédones, aumentando no primeiro a partir de 24 h de embebição. O aumento da atividade nos cotilédones foi mais lento, sendo mais acentuado a partir de 120 h de embebição. O teor de proteína decresceu continuamente no eixo embrionário a partir de 24 horas de embebição, enquanto se manteve estável nos cotilédones. A atividade da alfavgalactosidase foi máxima nas temperaturas de 55 e 50 °C para o eixo embrionário e para os cotilédones, respectivamente. O pH que mais estimulou a atividade da enzima foi na faixa de 5,5 a 6,0 para o eixo embrionário e na de 4,5 a 5,0 para os cotilédones. As alfavgalactosidase do eixo embrionário e dos cotilédones foram inibidas por SDS, CuSO₄, galactose e melibiose. Não houve efeito estimulante sobre a atividade da alfavgalactosidase do eixo embrionário por nenhum dos efetores, enquanto o mercaptoetanol estimulou a atividade da enzima dos cotilédones. Os K_M para o substrato p-NPGal para a alfavgalactosidase do eixo embrionário e dos cotilédones foram de 1,74 e 2,64 mM, respectivamente.

Palavras-chave: Alfavgalactosidase, sementes e *Caesalpinia peltophoroides*.

ALPHAGALACTOSIDASE CHARACTERIZATION AND ITS RELATIONSHIP WITH SEED GERMINATION OF *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpinioideae)

ABSTRACT – *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpinioideae) seeds were soaked in water for 144 hours. Samples were taken for protein analysis, quantification of alfavgalactosidase activity and micropyle sugar composition. Germination began after 96 hours of imbibition, with no modifications in the micropyle cellular wall. The content of arabinose was higher in the micropyle region, with a tendency to increase during imbibition. Activity of alfavgalactosidase was detected in dry seeds in the embryonic axis, as well as in the cotyledons, having increased 24 hours after imbibition. The increase of the activity in the cotyledons was observed only after 120 hours of imbibition. The protein content decreased continuously in the embryonic axis after 24 hours of imbibition, however it kept stable in cotyledons. The activity of the alfavgalactosidase

¹ Recebido em 1º.07.2004 e aceito para publicação em 20.04.2005.

² Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa-MG.

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Celular da Universidade Federal de Viçosa.

⁴ Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

was raised by the temperature, being maximum at 55°C for embryonic axis and at 50°C for cotyledons. Enzyme activity was favored by pH ranging from 5.5 to 6.0 for the embryonic axis and 4.5 to 5.0 for cotyledons. The effectors SDS, CuSO₄, galactose and melibiose inhibited enzyme activity of embryonic axis and cotyledons. Mercaptoethanol showed little stimulating effect on *alfagalactosidase* in cotyledons. The K_M of the embryonic axis and the cotyledons were 1.74 and 2.64, respectively.

Keywords: *Alfagalactosidase*, seeds *Caesalpinia peltophoroides*.

1. INTRODUÇÃO

As alfagalactosidases, segundo Lahuta et al. (2000), promovem a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,6 presentes nos oligossacarídeos da rafinose e de polissacarídeos da parede celular. Os oligossacarídeos, de acordo com Jiménez et al. (1985), são fontes primárias de energia e substrato para a síntese de outros compostos, durante a germinação das sementes. A sua ação resulta no aumento da relação manose/galactose em sementes em desenvolvimento pela remoção de resíduos de galactose presentes no galactomanano (EDWARDS et al., 1992). Segundo Lahuta et al. (2000), sementes maduras possuem diferentes formas de alfagalactosidase (isoenzima), tanto na atividade quanto na massa molecular. Desse modo, as formas da enzima podem estar relacionadas ao estágio fisiológico da semente, atuando na hidrólise enzimática de hemicelulose, como galactoglicomananos (ZEILINGER et al., 1993). Para Oliveira (2002), as sementes de *Platymiscium pubescens* possuem duas formas moleculares de alfagalactosidase, cujas atividades aumentaram substancialmente no período de 24 a 72 horas de embebição. Guimarães et al. (2001) observaram que o teor de rafinose decresceu durante a germinação de *Glycine max*, enquanto a atividade de alfagalactosidase e o teor de frutose aumentaram. Além da atividade de degradação dos oligossacarídeos da rafinose, a alfagalactosidase também participa na germinação, tendo sua presença detectada por Feurtado et al. (2001) no embrião e nas regiões lateral e micropilar do endosperma de sementes de *Lycopersicon esculentum*.

Não há informações na literatura técnica a respeito do comportamento fisiológico ou bioquímico das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* durante a germinação. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação das alterações que ocorrem na parede celular da micrópila e na atividade da alfagalactosidase, com sua caracterização bioquímica durante a embebição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Sementes de *Caesalpinia peltophoroides* foram classificadas no intervalo de peso entre 0,20 e 0,30 g e colocadas para embeber sobre duas folhas de papel Gemitest umedecidas com água, colocadas em caixa plástica tipo gerbox, em temperatura de 25 °C, no escuro, pelo período de 144 h. Diariamente foram retiradas amostras, quando as sementes foram dissecadas em tegumento, excluía a região da micrópila, região central dos cotilédones, eixo embrionário e parte do tegumento correspondente à micrópila. Utilizou-se o mesmo critério para sementes germinadas e não-germinadas na retirada do tegumento. Foram removidos os fragmentos de cotilédones presos ao eixo embrionário. Foram determinados os teores de proteína e a atividade da enzima alfagalactosidase no eixo embrionário, região da micrópila e cotilédones.

A extração e quantificação da atividade da enzima foram feitas segundo metodologia descrita por Viana (2002). Para tanto, tomaram-se 100 mg de embriões e cotilédones secos em liofilizador e macerados em gral de porcelana com 1,0 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e centrifugadas a 24.000 x g por 30 min, a 4 °C. O sobrenadante foi usado para quantificação da atividade da enzima e para determinação do teor de proteína.

Foi utilizado o substrato para-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p -NPGal) como substrato na avaliação da atividade da alfagalactosidase. A mistura de reação constou de 750 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250 μ L de solução 2 mM de p -NPGal e 10 μ L do extrato enzimático. Os tubos contendo a solução foram mantidos em banho-maria a 37 °C, por

15 min, sendo interrompida a reação pela adição de 1,0 mL de solução de 0,5 M de Na_2CO_3 . Os valores de absorbância medidos no comprimento de onda de 410 nm foram transformados em μmoles de p -nitrofenolato (p -NP), utilizando uma curva-padrão construída com 0-0,20 μmoles de p -NP. A unidade de enzima foi definida como a quantidade de proteína necessária para produzir 1 mol de p -NP por minuto nas condições do ensaio.

Para a determinação do pH ótimo da enzima foram conduzidas reações em solução-tampão com pHs variando de 4,0 a 8,0, utilizando-se tampões (citrato/fosfato) McIlvaine (MCILVAINE, 1921), mantendo as mesmas condições de ensaio descritas anteriormente.

Os ensaios de temperatura foram feitos em 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C, utilizando-se tampão McIlvaine com pH 5,0.

A termoestabilidade foi testada pela pré-incubação da mistura enzima + tampão por vários tempos na temperatura de 50 °C, no pH 5,0. Após a pré-incubação, o substrato foi adicionado e o ensaio, conduzido como já descrito.

Os efeitos de íons, agentes redutores e açúcar foram avaliados usando-se 200 μL de soluções, 10 mM de MgCl_2 , CaCl_2 , KCl , CuSO_4 , NaCl , sódio dodecil sulfato (SDS), β -mercaptoetanol, melibiose, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e iodoacetamida. A mistura contendo tampão, enzima e efector foi pré-incubada por 15 min a 40 °C e, em seguida, foram acrescentados 250 μL de solução de 2 mM de p -NPGal, sendo conduzido o restante do ensaio da mesma maneira já descrita. O ensaio-controle utiliza apenas o substrato p -NPGal, sem a adição de nenhum efector.

Os ensaios para determinação de K_m e V_{max} foram realizados com utilização de diferentes concentrações de p -NPGal. As concentrações usadas foram 0,1; 0,125; 0,143; 0,2; 0,4; 0,6; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; e 8,0 mM. Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram calculados por meio da curva de velocidade, em função da concentração de substrato, curva de Michaelis-Menten (LINEWEAVER e BURKE, 1934). Foi utilizado o programa Curve Expert, versão 1.3, para Windows (HYAMS, 1997).

A extração de proteínas solúveis foi realizada pelo método descrito por Alfenas et al. (1991), a qual consistiu em moer os embriões em tampão fosfato de sódio, 0,05 M e pH 7,0.

A quantificação foi feita conforme descrito por Bradford (1976).

As quantificações dos açúcares da parede celular do tegumento, região da micrópila e da camada de galactomanano foram feitas pela digestão com ácido trifluoroacético 2 M. Em seguida, a solução foi neutralizada com hidróxido de amônia e preparado o alditol acetato para quantificação em cromatógrafo a gás, conforme metodologia descrita por Englyst e Cummings (1984), sendo injetados em cromatógrafo a gás, conforme descrito por Borges et al. (2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação das sementes iniciou no quarto dia de embebição. A partir daí aumentou, aproximadamente, 50 pontos percentuais (Figura 1).

A composição de monossacarídeos da região micropilar durante a embebição encontra-se na Figura 2. Arabinose predominou na composição da parede, com pequeno aumento durante a embebição, enquanto os demais açúcares mostraram-se sem variação durante a embebição. Dessa forma, pode-se inferir que a germinação da semente de *Caesalpinia peltophoroides* não envolve a degradação ou alteração na estrutura física da parede da micrópila relacionada a monossacarídeos. Essa percepção fica mais clara quando se observam, na Figura 3, os dados da atividade específica da alfa-galactosidase. A enzima está ativa antes mesmo da embebição e aumenta sua atividade com a embebição mais no eixo embrionário do que nos cotilédones. Nestes, o aumento é mais acentuado no sexto dia, o que demonstra a sua participação no metabolismo da semente, provavelmente na mobilização da rafinose. Segundo Dey e Pridham (1972) e Modi (2000), essa reserva é acumulada durante a formação da semente e degradada durante a germinação. Oliveira (2002) observou nas sementes de *Platymiscium pubescens* e *Senna macranthera* que, diferentemente da atividade específica de alfa-galactosidase detectada no presente trabalho, as daquelas decresceram em 96 h de embebição.

Os teores de proteína no eixo embrionário diminuíram mais do que aqueles observados nos cotilédones em 144 h de embebição (Figura 4). Trabalho realizado com *Cedrela fissilis* por Pontes et al. (2002) indicou aumento significativo no teor de proteína nos cotilédones, enquanto permaneceu estável no eixo embrionário, durante a embebição.

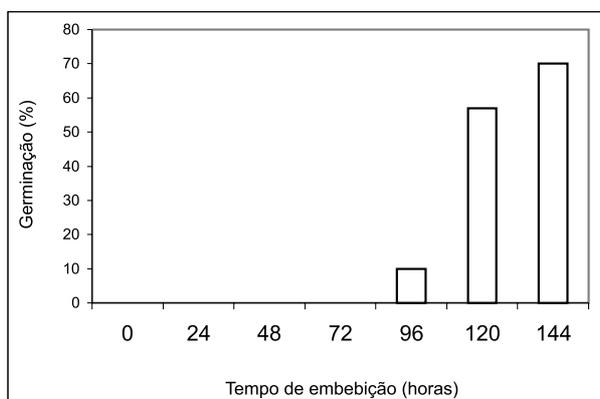


Figura 1 – Porcentagem de germinação de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

Figure 1 – Germination percentage of *Caesalpinia peltophoroides* seeds.

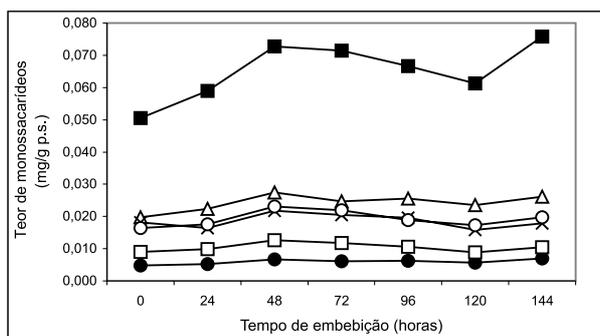


Figura 2 – Composição de monossacarídeos da micrópila durante a embebição de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Ramnose: ●, arabinose: ■, xilose: Δ, manose: X, galactose: □, glicose: ○ (valores de erro-padrão da média menores do que 0,01).

Figure 2 – Micropyle monosaccharides composition of *Caesalpinia peltophoroides* seeds during imbibition. Ramnose: ●, arabinose: ■, xylose: Δ, mannose: x, galactose: □, glucose: ○ (mean standard error less than 0.01).

A temperatura de 55 °C estimulou a atividade da alfa-galactosidase ao máximo, vindo a decair em seguida (Figura 5). Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Oliveira (2002) em sementes de *Platymiscium pubescens*, muito embora aqueles foram medidos em extratos de sementes. A atividade da enzima de origem cotiledonar apresentou a atividade máxima na temperatura de 50 °C. Os resultados aqui observados estão próximos àqueles obtidos por Bryant e Rao (2001) em sementes de *Arachis hypogaea*.

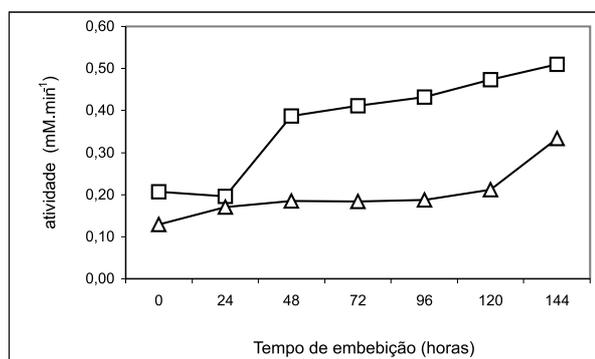


Figura 3 – Atividade específica das alfa-galactosidasas do eixo embrionário e dos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* durante a embebição.

Eixo embrionário: □ e cotilédones: Δ.

Figure 3 – Embryo axis and cotyledon specific activity of alpha-galactosidase of *Caesalpinia peltophoroides* seeds during imbibition. Embryo axis: □, cotyledons: Δ.

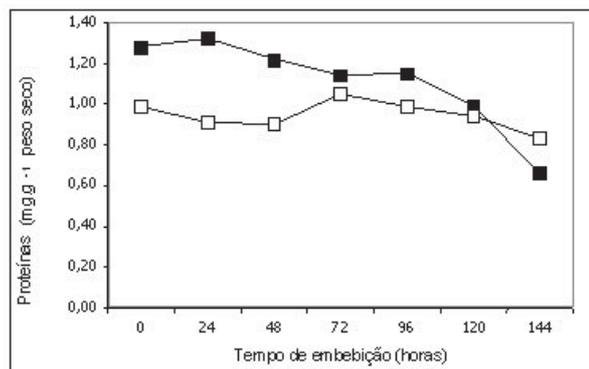


Figura 4 – Teores de proteína em embrião e cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* durante a embebição. Eixo embrionário: ■, cotilédones: □.

Figure 4 – Embryo and cotyledon protein content of *Caesalpinia peltophoroides* seeds during imbibition. Embryo axis: ■, cotyledons: □.

Os dados mostrados na Figura 6 indicam que a faixa de pH entre 5,5 e 6,0 resultou na maior atividade da enzima alfa-galactosidase no eixo embrionário, decrescendo em seguida. No entanto, a faixa de pH entre 4,0 e 5,0 foi a mais adequada para a enzima proveniente dos cotilédones. Oliveira (2002) concluiu, para sementes de *Platymiscium pubescens*, que o pH 5,5 foi o mais adequado, enquanto Guimarães et al. (2001) obtiveram pH ótimo na faixa de 5,0 a 5,5 em

alfagalactosidase de sementes de soja. Dey (1981) purificou alfa-galactosidase de sementes de *Castanea sativa*, obtendo um pico de atividade em pH 4,5 para uma fração e em pH 6,0, em outra fração.

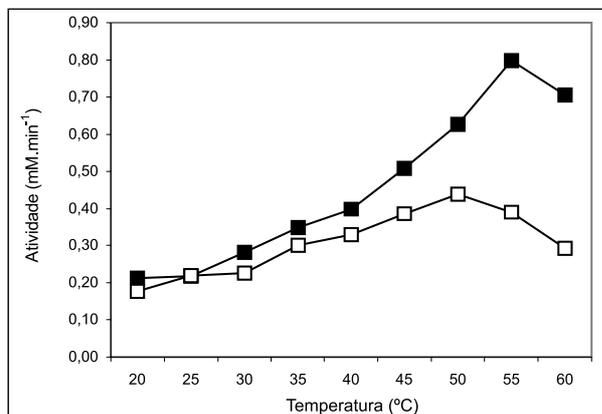


Figura 5 – Efeito da temperatura nas atividades das alfa-galactosidas do eixo embrionário e dos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Eixo embrionário: ■ e cotilédones: □.

Figure 5 – Effect of temperature on activity of alpha-galactosidase on embryo axis and cotyledons of *Caesalpinia peltophoroides* seeds. Embryo axis: ■ and cotyledons: □.

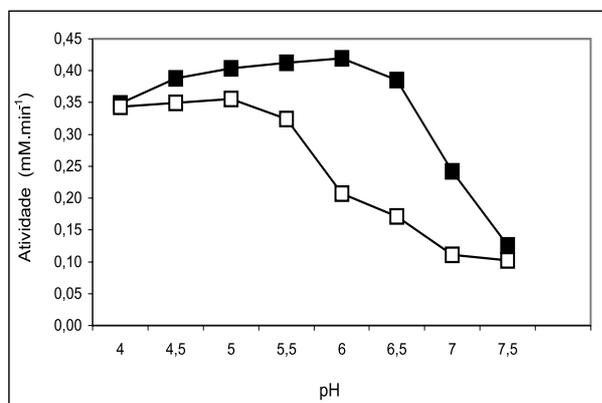


Figura 6 – Efeito do pH na atividade das alfa-galactosidas do eixo embrionário e dos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Eixo embrionário: ■ e cotilédones: □.

Figure 6 – Effect of pH on alpha-galactosidase activity of embryo axis and cotyledons of *Caesalpinia peltophoroides* seeds. Embryo axis: ■ and cotyledons: □.

A atividade da alfa-galactosidase não foi estimulada em eixo embrionário de *C. peltophoroides* por nenhum dos efetores, enquanto nos cotilédones o estímulo da atividade foi proporcionado por mercaptoetanol. Em ambas as enzimas houve inibição por SDS, CuSO₄, galactose e melibiose (Figuras 7 e 8). As duas frações protéicas separadas por Oliveira (2002) em sementes de *Platymiscium pubescens* também foram inibidas pelos mesmos efetores que a *C. peltophoroides*.

Guimarães et al. (2001) demonstraram que a galactose é um forte inibidor competitivo da alfa-galactosidase. Segundo Oliveira (2002), por não haver redução de atividade dessa enzima em presença de EDTA e iodoacetamida, isso indica que provavelmente não há dependência de íons metálicos para a atividade catalítica no grupo SH livre na molécula dessa enzima, que não é essencial à catálise.

Os valores de meia-vida da alfa-galactosidase do eixo embrionário e cotilédones encontram-se nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Não foi possível atingir a metade da atividade inicial nas enzimas provenientes do eixo embrionário, mesmo após 60 h de pré-incubação a 50 °C. No entanto, os valores encontrados naquelas enzimas dos cotilédones foram menores que a metade, nesse mesmo tempo. A enzima de *C. peltophoroides* mostrou-se mais resistente a 50 °C do que a de *P. pubescens*, conforme verificado por Oliveira (2002). Duffaud et al. (1997) determinaram a meia-vida dessa enzima em *Thermomyces lanuginosus* como sendo de 3 h, a 65 °C.

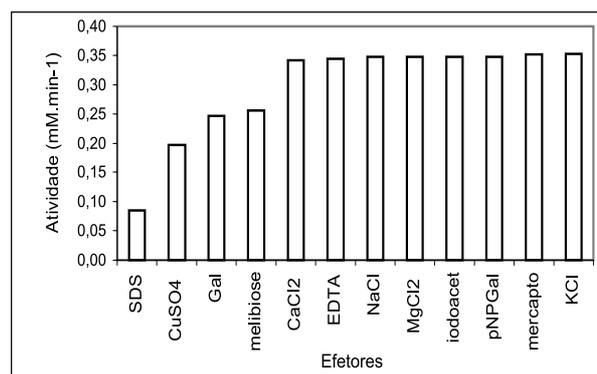


Figura 7 – Efeito de íons e agentes redutores na atividade da alfa-galactosidase do eixo embrionário de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

Figure 7 – Effect of ions and reducing agents on alpha-galactosidase activity of embryo axis of *Caesalpinia peltophoroides* seeds.

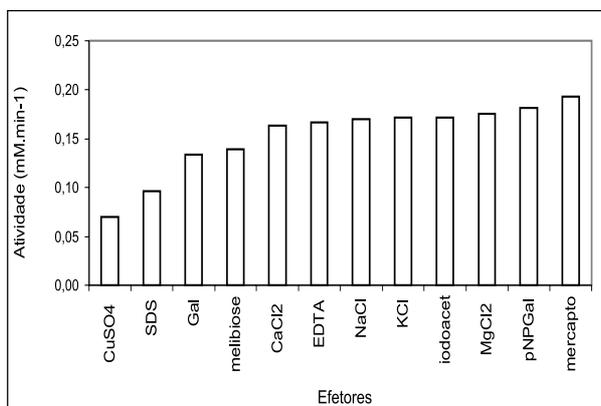
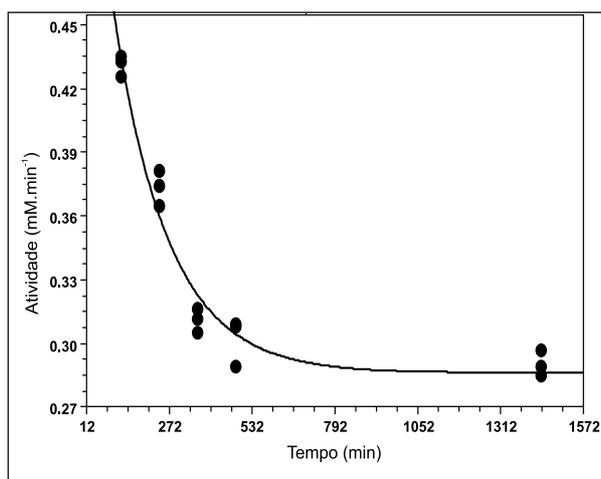


Figura 8 – Efeito de íons e agentes redutores na atividade da alfa-galactosidase nos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

Figure 8 – Effect of ions and reducing agents on alpha-galactosidase activity of cotyledons of *Caesalpinia peltophoroides* seeds.

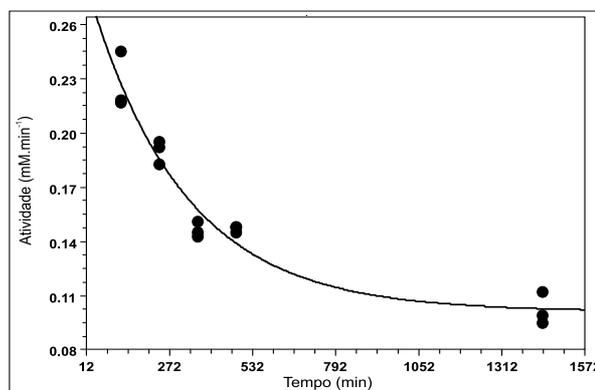


$$Y = 0,29465347(-0,97450109 e^{0,00581X}), R = 0,98$$

Figura 9 – Meia-vida de alfa-galactosidase do eixo embrionário de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* na temperatura de 50 °C.

Figure 9 – Half-life of alpha-galactosidase of embryo axis of *Caesalpinia peltophoroides* seeds at 50 °C.

Concentrações do substrato r-NPGal *versus* a velocidade de sua hidrólise pelas alfa-galactosidasas de embrião encontram-se nas Figuras 11e 12 e de cotilédones, nas Figuras 13 e 14. Os K_M da alfa-galactosidase do embrião e dos cotilédones



$$Y = -0,18694285 (-0,55838106 e^{0,003489X}), R = 0,96$$

Figura 10 – Meia-vida da alfa-galactosidase de cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* na temperatura de 50 °C.

Figure 10 – Half-life of alpha-galactosidase activity of cotyledons of *Caesalpinia Peltophoroides* seeds at 50 °C.

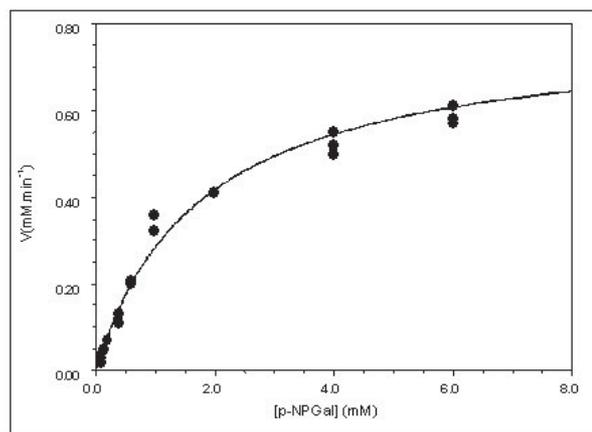


Figura 11 – Gráfico de Michaelis-Menten da hidrólise de p-NPGal pela alfa-galactosidase em eixo embrionário de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Os valores de K_M e V_{max} aparentes obtidos foram de 1,74 mM e 0,78 mM.min⁻¹, respectivamente.

Figure 11 – Michaelis-Menten graphic of p-NPGal hydrolysis by alpha-galactosidase of embryo axis of *Caesalpinia peltophoroides* seeds. Apparent values of K_M and V_{max} were 1.74 mM and 0.78 mM.min⁻¹, respectively.

mostraram-se diferentes na afinidade pelo substrato r-NPGal, indicando ser provavelmente enzimas distintas. Reis (2003) obteve valores de 0,99 mM em sementes de *Pterogine nitens*, bem distintos dos encontrados em *C. peltophoroides*.

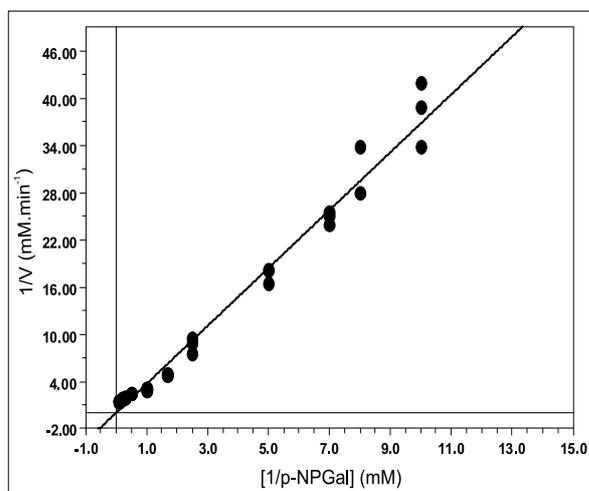


Figura 12 – Gráfico da duplo recíproco da alfagalactosidase em eixo embrionário de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

Figure 12 – Double reciprocal of alphagalactosidase of embryo axis of *Caesalpinia peltophoroides* seeds.

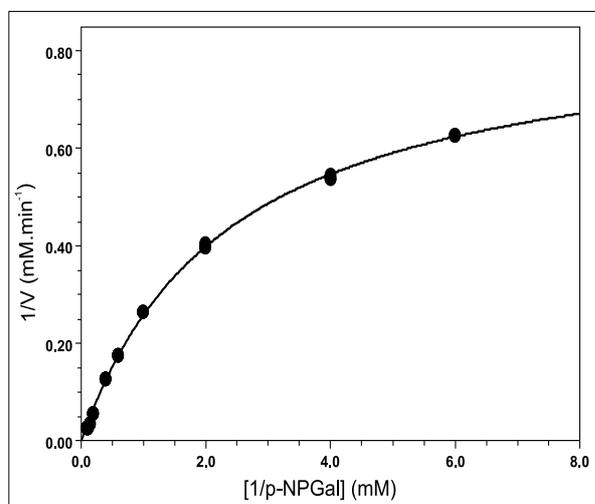


Figura 13 – Gráfico de Michaelis-Menten da hidrólise de p-NPGal pela alfagalactosidase em cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*. Os valores de K_M e V_{max} aparentes obtidos foram de 2,64 mM e 0,91 mM.min⁻¹, respectivamente.

Figure 13 – Michaelis-Menten graphic of p-NPGal hydrolysis by alphagalactosidase of cotyledons of *Caesalpinia peltophoroides* seeds. Apparent values of K_M and V_{max} were 2.64 mM and 0.91 mM.min⁻¹, respectively.

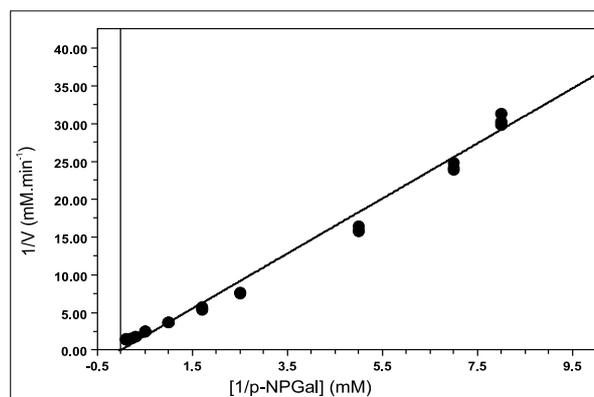


Figura 14 – Gráfico de duplo recíproco da alfagalactosidase em cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

Figure 14 – Double reciprocal of alphagalactosidase of cotyledons of *Caesalpinia Peltophoroides* seeds.

4. CONCLUSÕES

Em face dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- A arabinose é o principal componente da parede celular da micrópila.
- Que a atividade da alfagalactosidase foi detectada em sementes secadas no eixo embrionário e nos cotilédones.
- Que o teor de proteína decresceu no eixo embrionário durante a embebição.
- Que a atividade da alfagalactosidase do eixo embrionário foi máxima na temperatura de 55 °C.
- Que a atividade da alfagalactosidase nos cotilédones foi máxima na temperatura de 50 °C.
- Que a atividade da alfagalactosidase foi máxima na faixa de pH de 5,5 a 6,0, no eixo embrionário.
- Que a atividade da alfagalactosidase foi máxima na faixa de pH de 4,5 a 5,0, nos cotilédones.
- Que as atividades da alfagalactosidase do eixo embrionário e dos cotilédones foram inibidas por SDS, CuSO₄, galactosidase e melibiose.
- Que as enzimas do eixo embrionário e dos cotilédones são diferentes na afinidade pelo r-NPGal.
- Que a estabilidade térmica foi diferente entre as enzimas provenientes do eixo embrionário e dos cotilédones na temperatura de 50 °C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991. 242p.

BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; BUCKRIDGE, M.S. Alterações nas composições de carboidratos e de ácidos graxos em sementes de jacarandá-bahia osmocondicionadas. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v.12, n.1, p.10-16, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRYAN, R.J.; RAO, D.R. Purification and characterization of alpha-galactosidase from peanuts. **Journal Food Biochemistry**, v.25, p.139-156, 2001.

DEY, P.M. α -galactosidase from sweet chestnut seeds. **Phytochemistry**, v.20, p.1493-1496, 1981.

DEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. Biochemistry of α -galactosidases. **Advances of Enzimology**, v.36, p.91-130, 1972.

DUFFALD, G.D. et al. Purification and characterization of extremely thermostable β -mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium thermogota neaplitan 5068. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.167-177, 1997.

EDWARDS, M. et al. Control of mannose galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. **Planta**, v.8, p.67-74, 1992.

ENGLYST, E.N.; CUMMINGS, J.H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, v.19, p.937-942, 1984.

FEURTADO, J.A.; BANIK, M.; BEWLEY, J.D. The cloning and characterization of alpha-galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) seed. **Journal Experimental of Botany**, v.52, n.359, p.1239-1249, 2001.

GUIMARÃES, V.M. et al. Characterization of α -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligossacarídeos. **Phytochemistry**, v.58, p.67-73, 2001.

HYAMS, D. **Curve expert 1.3: a comprehensive curve fitting system for Windows**. Copyright[©]. 1997.

JIMÉNEZ, M.J.M. et al. Estudios bioquímicos y nutricionales de la semilla germinada de soya. **Archives Latinoamericano de Nutrición**, v.35, n.3, p.480-490, 1985.

LAHUTA, L. et al. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. **Electronic Journal Polish Agriculture University**, v.3, p.1-10, 2000.

LEIZINGER, S. et al. Conditions of formation, purification and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei*. RUT C-30. **Applied Environmental of Microbiology**, v.59, p.1347-1353, 1993.

LINEWEAVER, H.; BURKE, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of American Chemistry of Society**, v.56, p.658-666, 1934.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparisons. **Journal Biology Chemistry**, v.49, p.185-186, 1921.

MODI, A.T.; McDONALD, M.B.; STREETER, J.G. Soluble carbohydrates in soybean seeds during development and imbibition. **Seed Science & Technology**, v.28, p.115-127, 2000.

OLIVEIRA, G. **Purificação parcial e caracterização bioquímica-cinética de alfa-galactosidase de sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*)**. 2002. 63f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

R. **Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.4, p.525-533, 2005

PONTES, C.A. et al. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v.26, n.5, p.593-601, 2002.

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

VIANA, S.F. **Caracterização de α -galactosidase de soja para hidrólise de oligossacarídeos de rafinose**. 2002. 65f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

ZEILINGER, S. et al. Conditions of formation, purification and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. **Applied Environmental of Microbiology**, v.59, p.1347-1353, 1993.