

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -GALACTOSIDASES DE SEMENTES DE *Platymiscium pubescens* Micheli¹

Giordani de Oliveira², Valéria Monteze Guimarães², Eduardo Euclides de Lima e Borges³, Lilian da Silva Fialho², Maria Goreti de Almeida e Oliveira² e Sebastião Tavares de Rezende²

RESUMO – Este trabalho objetivou foi determinar a composição bioquímica de sementes de espécies florestais e caracterizar a enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Platymiscium pubescens*. Os maiores teores de lipídios foram determinados em sementes de *Chorisia speciosa*, *Caesalpinia peltophoroides*, *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia velanadae*, enquanto sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, *Schizolobium parahyba* e *Cassia grandis* apresentaram os maiores teores protéicos. A α -galactosidase catalisa a hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose, em sementes de leguminosas, durante a germinação. A maior atividade da α -galactosidase foi detectada em sementes de *Platymiscium pubescens* após 72 h de embebição. Duas formas de α -galactosidases, C1 e C2, foram purificadas de sementes germinadas de *P. pubescens*, usando-se fracionamento com sulfato de amônio e cromatografias de filtração em gel e de afinidade. Essas enzimas apresentaram atividade máxima em pH 5,5 e a 50-55 °C. Os valores de $K_{m\text{ap}}$ das formas C1 e C2, para o substrato p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo, foram de 0,54 mM e 0,78 mM, e para a rafinose, de 4,64 mM e 5,09 mM, respectivamente. Essas enzimas exibiram estabilidade térmica moderada, mantendo 70% da atividade original após 3 h de incubação a 45 °C. A atividade enzimática da C1 e C2 foi totalmente perdida na presença de CuSO_4 e dodecil sulfato de sódio (SDS). Tais enzimas também hidrolisaram melibiose, rafinose e estaquiiose, indicando potencial para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: *Platymiscium pubescens*, α -galactosidase, sementes, germinação e purificação.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF α -GALACTOSIDASES FROM *Platymiscium pubescens* Micheli SEEDS

ABSTRACT – The objective of this work was to determine seed biochemical composition of forest species and to characterize α -galactosidase enzyme of germinated seeds of *Platymiscium pubescens*. The highest lipid levels were found in seeds of *Chorisia speciosa*, *Caesalpinia peltophoroides*, *Tabebuia serratifolia* and *Tabebuia velanadae*, whereas seeds of *Enterolobium contortisiliquum*, *Schizolobium parahyba* and *Cassia grandis* showed the highest protein levels. α -galactosidase catalyzes the hydrolysis of raffinose oligosaccharides in legume seeds during germination. The highest activity of α -galactosidase was found in seeds of *Platymiscium pubescens* after 72 h of soaking in the water. Two forms of α -galactosidases, C1 and C2, were purified from germinated seeds of *P. pubescens*, using partition with ammonium sulfate, and gel filtration and affinity chromatographies. These enzymes presented maximum activity at pH 5.5, 50-55°C. $K_{m\text{ap}}$ values in the C1 and C2 forms for p -nitrophenyl- α -D-galactopyranoside substrate were 0.54 mM and 0.78 mM, and 4.64

¹ Recebido em 13.02.2004 e aceito para publicação em 20.04.2005.

² BIOAGRO/DBB da Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa-MG, Brasil.

³ Departamento Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.

mM and 5.09 mM for raffinose, respectively. These enzymes showed moderate thermal stability, maintaining 70% of the original activity after 3 h incubation at 45°C. The C1 and C2 enzymatic activity was totally lost in the presence of CuSO₄ and sodium dodecyl sulfate (SDS). These enzymes also hydrolyzed melibiose, raffinose and stachyose, indicating a potential for biotechnological applications.

Keywords: *Platymiscium pubescens*, α -galactosidase, seeds, germination, purification.

1. INTRODUÇÃO

Além da importância das espécies florestais para o reflorestamento de áreas degradadas e conservação da biodiversidade (CARNEIRO et al., 1998), o estudo das suas sementes tem merecido destaque em razão das reservas de nutrientes e das enzimas hidrolíticas ativas durante a germinação.

As espécies florestais *Cassia grandis*, *Schizolobium parahyba*, *Tachigali multijuga*, *Tabebuia serratifolia*, *Tabebuia velanadae*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Platymiscium pubescens*, *Chorisia speciosa*, *Caesalpinia peltophoroides*, *Senna macranthera* e *Cedrela fissil* apresentam diversas aplicações. Em razão das características de cada espécie, elas são mais apropriadamente indicadas para a produção de madeira usada na construção civil e na geração de energia, indústria de papel e celulose, extração de componentes químicos, alimentação animal e humana, apicultura, medicina, paisagismo e reflorestamento (CARVALHO, 1994). *Platymiscium pubescens* var. *pubescens* é uma espécie arbórea identificada pelos nomes de tamborildamata, timburí, timburil ou jacarandá-branco. De acordo com Klitgaard (1995), o “habitat” da espécie é o Cerrado, embora Marangon (1999) a identifique como de Floresta Estacional Semidecidual, ocorrendo em altitudes de 300 a 750 m. Predomina na Bahia, Espírito Santo, Distrito Federal e Minas Gerais. A espécie é de vegetação secundária, sendo a sua madeira usada para construção de moirão de cerca, além de ser utilizada como planta ornamental e de reflorestamento (KLITGAARD, 1995).

A enzima α -galactosidase (E.C.3.2.1.22, α -D-galactosídeo galacto-hidrolase) é uma exoglicosidase que hidrolisa ligações α -1,6 de resíduos de galactosil em galacto-oligossacarídeos e galactomananas (FUJIMOTO et al., 2003). Em plantas, essa enzima vem sendo especialmente investigada em sementes durante a germinação (CORCHETE e GUERRA, 1987; BHASKAR et al., 1990; GUIMARÃES et al., 2001), mas também está presente em folhas (SMART e PHARR, 1980), raiz (BOM et al., 1988) e frutos (GAO e SCHAFFER, 1999).

Múltiplas formas de α -galactosidases ocorrem em plantas, apresentando diferenças em suas propriedades bioquímicas e cinéticas e em suas massas moleculares e exibindo especificidades diferentes por substratos naturais e sintéticos (DEY e PRIDHAM, 1972; KIM et al., 2002).

Dois tipos de carboidratos são armazenados no endosperma de leguminosas: oligossacarídeos de rafinose (RO) nos vacúolos e galactomananas nas células de parede (DEY, 1980). Os RO são formados de uma molécula de sacarose cujo resíduo glicosil está ligado com um a nove resíduos de galactose por ligação α -(1,6). Galactomananas são polissacarídeos compostos de uma cadeia principal formada de resíduos de D-manose unidos por ligação β -1,4 e ramificada em variadas extensões com unidades de D-galactose em ligações α -1,6 (REID, 1985).

Durante a germinação e crescimento da plântula, reservas do cotilédone são degradadas e seus produtos, translocados para os pontos de crescimento do embrião e da plântula em desenvolvimento, em que são usados como fonte de carbono e energia para vários processos metabólicos (KANDLER e HOPF, 1980). A maioria das atividades enzimáticas, especialmente a da α -galactosidase, aumenta com a embebição e germinação das sementes (CORCHETE e GUERRA, 1987; KONTOS e SPYROPOULOS, 1996; GUIMARÃES et al., 2001). Além do envolvimento fisiológico na germinação de sementes, as α -galactosidases apresentam potencial para diversas aplicações biotecnológicas, como no branqueamento da polpa na indústria de papel, na mudança de propriedades gélidas de galactomananas (BULPIN et al., 1990) e na hidrólise de oligossacarídeos não-digeríveis presentes em produtos de soja (GUIMARÃES et al., 2001).

Diversas α -galactosidases já foram purificadas e caracterizadas a partir de sementes, durante a germinação, como em *Cassia sericea* (BHASKAR et al., 1990) e *Sesbania marginata* (FALCO et al., 2000), mas a maioria dos estudos de atividade enzimática e da composição

bioquímica das sementes se refere a espécies já utilizadas na alimentação, como soja (GUIMARÃES et al., 2001), lentilha (CORCHETE e GUERRA, 1987), ervilha (DEY e PRIDHAM, 1972) e feijões (DHAR et al., 1994). De acordo com Borges et al. (2002), há uma grande carência de informações fisiológicas e bioquímicas concernentes à composição e germinação das sementes de espécies florestais arbóreas nativas.

O objetivo do presente trabalho foi ampliar o conhecimento sobre a composição bioquímica de algumas sementes de espécies florestais, bem como identificar, entre as estudadas, uma espécie florestal que apresentasse a enzima α -galactosidase com potencial para aplicação biotecnológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes das espécies florestais *Cassia grandis*, *Schizolobium parahyba*, *Tachigali multijuga*, *Tabebuia serratifolia*, *Tabebuia velanadae*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Platymiscium pubescens*, *Chorisia speciosa*, *Caesalpinia peltophoroides*, *Cedrela fissilis* e *Senna macranthera* foram fornecidas pelo Laboratório de Silvicultura do Departamento de Engenharia Florestal da UFV, enquanto as sementes das espécies *Vigna umbellata*, *Pisum sativum* e *Glycine max*, pela EPAMIG/ Viçosa.

Para avaliar a atividade de α -galactosidase durante a germinação, amostras contendo 20 sementes foram colocadas em papel Germitest umedecido e incubadas por 24, 48, 72 e 96 h, a 27 °C. As sementes germinadas foram trituradas em tampão acetato de sódio a 100 mM e pH 5,0 (uma semente para cada 1 mL de tampão). O extrato foi centrifugado a 17.200 x g, por 30 min, a 4 °C, e o sobrenadante, utilizado para a determinação da atividade enzimática e da concentração de proteínas solúveis.

O ensaio-padrão da atividade de α -galactosidase foi realizado usando-se uma mistura de reação contendo 650-750 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, adicionando de 0 a 100 μ L da preparação enzimática e 250 μ L de p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (pNP α Gal), ou outros substratos sintéticos. A reação foi incubada por 15 a 30 min, a 37 °C, e paralisada pela adição de 1 mL de carbonato de sódio a 0,5 M. Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de proteína necessária para produzir 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto. Os efeitos do pH e da temperatura na atividade

das frações enzimáticas foram determinados em pH de 3,0 a 7,5 e em temperaturas variando de 20 a 70 °C. Para a determinação da estabilidade térmica, as frações enzimáticas foram pré-incubadas por vários períodos de tempo, a 45 e 50 °C, e a atividade residual foi determinada pelo ensaio-padrão. Para a determinação das atividades com os substratos rafinose, estaquiase e sacarose, usou-se uma mistura de reação contendo 650 μ L de tampão acetato de sódio a 100 mM, pH 5,0, adicionando 100 μ L de extrato enzimático e 250 μ L de solução de substrato a 20 mM. O açúcar redutor produzido foi quantificado pela reação com 1 mL de 3,5 dinitrossalicilato (MILLER, 1956). Os ensaios com os substratos melibiose, lactose e maltose foram feitos usando-se as mesmas condições de reação anteriormente descritas, e a quantidade de glicose formada foi determinada pelo método da glicose-oxidase (BERGMEYER e BERNT, 1974). As determinações da atividade de α -galactosidase são os valores médios de ensaios em triplicata, nos quais os desvios-padrão foram menores que 10%.

As α -galactosidases de tamboril-da-mata foram purificadas por fracionamento com sulfato de amônio (30-50%), e o precipitado obtido foi ressuspenso e submetido à filtração em gel, em coluna Sephacryl S-200 (80 x 3 cm), equilibrada com tampão acetato de sódio a 25 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, com fluxo de 24 mL.h⁻¹. A fração enzimática proveniente da coluna Sephacryl S-200 foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna (17 x 1 cm) de Concanavalina A Sepharose 4B, equilibrada com tampão acetato de sódio a 100 mM e pH 5,0, contendo MnCl₂, MgCl₂ e CaCl₂ a 1,0 mM e 0,9% de NaCl. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, acrescido de 0,1 M de metil- α -D-manosídeo, com fluxo de 24 mL.h⁻¹.

Experimentos cinéticos foram feitos a 37 °C e pH 5,0. Para a determinação dos valores de $K_{M\text{ap}}$ e $V_{\text{max ap}}$ das α -galactosidases, as concentrações finais de pNP α Gal foram de 0,1; 0,2; 0,4; 0,75; 1,0; 1,5; e 2,0 mM e as concentrações finais de melibiose e rafinose, de 5, 10, 20, 30 e 40 mM. Os valores de $K_{M\text{ap}}$ e $V_{\text{max ap}}$ foram determinados pela curva de Michaelis-Menten, utilizando-se o programa Curve Expert, versão 1.3, para Windows (HYAMS, 1997). Os efeitos de íons, agentes redutores e açúcares na atividade enzimática, foram testados utilizando-se ensaios-padrão, cujas amostras das enzimas foram pré-incubadas com cada um dos compostos testados por 15 min a 40 °C.



A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se curva-padrão construída com albumina sérica bovina (BSA). No processo de purificação das α -galactosidases, a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry, como o descrito em Petterson (1979). O teor protéico nas sementes foi determinado pelo método de Kjeldahl, empregando-se o fator 6,25 para a conversão de nitrogênio em proteína (AOAC, 1975). O teor de lipídeos foi determinado segundo o procedimento descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). O teor de umidade das sementes foi determinado, pesando-se cerca de 5 g de amostras e colocando em estufa a 105 °C até a estabilização do peso. Após esse tempo, as amostras foram novamente pesadas e a matéria seca, determinada por diferença.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de umidade, lipídeos e proteína e a atividade de α -galactosidase em sementes maduras de 10 espécies florestais são mostrados na Tabela 1. A Soja da variedade Doko RC foi utilizada como referencial, uma vez que os parâmetros umidade, lipídeos e proteínas e atividade de α -galactosidase em suas sementes estão bem caracterizados (NIELSEN, 1996).

Dentre as espécies estudadas, as sementes de paina-rosa (*Chorisia speciosa*) apresentaram o maior teor de lipídeos e também alto teor de proteínas. Sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*), ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia velanadae*) exibiram teores de lipídios maiores que de soja (*Glycine max*), entretanto os menores teores protéicos foram

determinados nessas sementes. No entanto, a orelha-de-negro (*Enterolobium contortisiliquum*) apresentou o maior teor de proteínas, inclusive superior ao de soja, considerada uma semente com elevado teor protéico. Elevada atividade de α -galactosidase foi detectada no extrato de sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*), o que levou essa espécie a ser selecionada como fonte produtora da α -galactosidase, para caracterizações bioquímica e cinética.

Uma vez que a germinação das sementes pode induzir o aumento da atividade de enzimas hidrolíticas (KONTOS e SPYROPOULOS, 1996; GUIMARÃES, 2001), a atividade de α -galactosidase foi determinada, durante a germinação, em extratos de sementes da espécie florestal tamboril da mata, bem como em sementes das leguminosas feijão-arroz (*Vigna umbellata*), ervilha (*Pisum sativum*) e soja (*Glycine max*) (Figura 1), utilizadas como controle, por se tratarem de espécies mais amplamente estudadas.

A atividade de α -galactosidase aumentou consideravelmente em sementes de tamboril-da-mata e fedegoso no período de 24 a 72 h após a embebição, em relação às sementes usadas como controle. Resultados similares foram obtidos por Reis et al. (2003), que, trabalhando com sementes da espécie florestal *Pterogine nitens*, observaram aumento da atividade de α -galactosidase durante a germinação. Atividades de α -galactosidase sobre os substratos naturais encontrados nas sementes, rafinose e estaquiose e atividade de invertase sobre o substrato sacarose foram avaliadas nos extratos das sementes, após 72 h de embebição em água (Tabela 2).

Tabela 1 – Teores de umidade, lipídios e proteínas e atividade da α -galactosidase em sementes maduras de soja e de espécies florestais

Table 1 – Contents of moisture, lipids, protein and α -galactosidase activity from mature seeds of soybean and forest species

Espécies Florestais	Umidade (%)	Lipídeos (%)	Proteína (%)	Ativ. Específica (mM.min ⁻¹ mg ⁻¹)
<i>Cassia grandis</i>	9,19 ± 0,14	1,64 ± 0,05	46,18 ± 1,98	0,07
<i>Schizolobium parahyba</i>	8,54 ± 0,10	4,08 ± 0,27	48,63 ± 0,24	0,10
<i>Tachigali multijuga</i>	6,69 ± 0,07	2,38 ± 0,08	36,37 ± 0,22	0,20
<i>Tabebuia serratifolia</i>	12,00 ± 0,54	22,96 ± 0,38	24,25 ± 0,11	0,16
<i>Tabebuia velanadae</i>	9,94 ± 0,35	21,38 ± 0,36	20,98 ± 0,14	0,51
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	4,82 ± 0,06	1,15 ± 0,04	50,30 ± 0,31	0,02
<i>Platymiscium pubescens</i>	13,53 ± 0,57	4,67 ± 0,18	43,90 ± 0,76	0,41
<i>Chorisia speciosa</i>	20,55 ± 0,88	31,12 ± 0,15	44,00 ± 0,15	0,29
<i>Caesalpinia peltophoroides</i>	9,69 ± 0,57	28,92 ± 0,28	25,22 ± 0,41	0,13
<i>Cedrela fissilis</i>	8,84 ± 0,21	16,07 ± 0,24	43,04 ± 0,42	0,44
<i>Glycine max</i>	11,05 ± 0,45	18,80 ± 0,39	41,45 ± 0,24	0,05

Sementes germinadas de tamboril-da-mata apresentaram as maiores atividades das enzimas hidrolíticas invertase e α -galactosidase, inclusive superiores às de soja e ervilha, espécies tidas como grandes produtoras de α -galactosidase. Segundo Dey e Pridham (1972) e Modi et al. (2000), várias leguminosas, como soja e ervilha, acumulam grande quantidade de oligossacarídeos de rafinose (RO) nos estádios finais de desenvolvimento do grão e são degradados por α -galactosidases e invertases no início da germinação, fornecendo a energia inicial para o desenvolvimento do embrião. Uma vez que maior atividade de α -galactosidase foi detectada em sementes de tamboril-da-mata após 72 h de embebição, tal resultado indicou que essa espécie tem grande potencial para produção da α -galactosidase. Assim, a enzima foi purificada e caracterizada a partir dessa fonte vegetal.

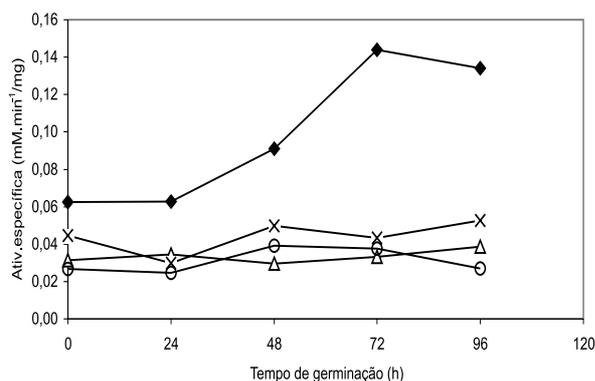


Figura 1 – Perfil da atividade de α -galactosidase, usando-se o substrato rNPaGal, em sementes de *Platymiscium pubescens* (◆), *Vigna umbellata* (Δ), *Glycine max* (X) e *Pisum sativum* (O), durante a germinação.

Figure 1 – Profile of α -galactosidase activity against rNPaGal from seeds of *Platymiscium pubescens* (◆), *Vigna umbellata* (Δ), *Glycine max* (X) and *Pisum sativum* (O) during germination.

No processo de purificação da α -galactosidase, a fração protéica contendo atividade enzimática precipitada com 50% de sulfato de amônio (A50) foi ressuspendida e submetida à cromatografia em coluna Sephacryl S-200, resultando na separação de duas frações (F1 e F2) com atividade de α -galactosidase. A fração F1, por apresentar maior grau de purificação (26,21 vezes) e uma taxa de recuperação de 49%, foi utilizada na seqüência do processo, sendo submetida à cromatografia em coluna de Concanavalina-A (Figura 2). Foram obtidas duas formas enzimáticas (C1 e C2) altamente purificadas, como indicado por suas atividades específicas (Tabela 3).

As α -galactosidases C1 e C2 de *P. pubescens* foram purificadas 14,71 e 98,48 vezes, com rendimentos de 6 e 31%, respectivamente. Similarmente, duas formas de α -galactosidases foram purificadas de sementes de *Cassia sericea* germinadas (BHASKAR et al., 1990).

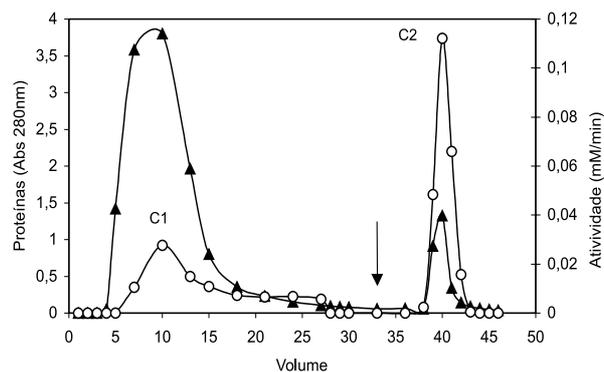


Figura 2 – Perfil de eluição da α -galactosidase de sementes germinadas de *Platymiscium pubescens* em coluna de concanavalina-A Sepharose. Concentração de proteína (▲), atividade enzimática (O) e (↓) eluição com 0,1 M de metil-a-D-manosídeo.

Figure 2 – Elution profile of the α -galactosidase from germinating *Platymiscium pubescens* seeds on a concanavalin-A Sepharose column. Protein concentration (▲), enzyme activity (O) and (↓) elution with 0.1 M methyl-a-D-mannoside.

Tabela 2 – Atividade rafinólítica e de invertase em sementes de leguminosas após 72 h de embebição
Table 2 – Raffinolytic and invertase activities from legume seeds 72 h after imbibition

Espécie	Atividade Enzimática (mM.min ⁻¹ mg ⁻¹)		
	Sacarose	Rafinose	Estaquiase
<i>Platymiscium pubescens</i>	0,143 ± 0,011	0,171 ± 0,014	0,121 ± 0,011
<i>Vigna umbellata</i>	0,072 ± 0,006	0,082 ± 0,007	0,113 ± 0,010
<i>Glycine max</i>	0,102 ± 0,010	0,155 ± 0,013	0,117 ± 0,011
<i>Pisum sativum</i>	0,074 ± 0,006	0,108 ± 0,010	0,076 ± 0,005

Tabela 3 – Sumário das etapas de purificação das α -galactosidases de sementes germinadas de *Platymiscium pubescens*
Table 3 – Summary of the purification steps of the α -galactosidases from germinating *Platymiscium pubescens* seeds

Etapa de Purificação	Proteína Total mg	Atividade Total mM.min ⁻¹	Atividade Específica mM.min ⁻¹ .mg ⁻¹	Fator de Purificação X	Recuperação %
Extrato bruto	2244,00	21,20	0,009	1	100
Sulfato de Amônio (30-50%)	758,00	17,30	0,023	2,43	82
Sephacryl S-200	42,29	10,42	0,246	26,21	49
Con A-Sepharose					
C1	9,40	1,30	0,138	14,71	6
C2	7,00	6,48	0,926	98,48	31

As α -galactosidases C1 e C2 apresentaram pH 5,5 como ótimo para sua atividade (Figura 3A) e atividades máximas a 50 e 55 °C, respectivamente. Uma redução acentuada nessas atividades foi observada entre as temperaturas de 60-70 °C, sendo a 70 °C a atividade enzimática nula (Figura 3B). Os valores ótimos de pH e temperatura encontrados foram próximos daqueles determinados para α -galactosidases de sementes de soja em germinação (CRUZ e SILVA, 1986), de cotilédones de *Vigna unguiculata* (OLIVEIRA-NETO et al., 1998), de amendoim (BRYANT e RAO, 2001) e do fungo *Aspergillus fumigatus* (De REZENDE e FELIX, 1999).

Ambas as formas enzimáticas C1 e C2 foram moderadamente termoestáveis (Figura 4), mantendo aproximadamente 70% de suas atividades originais quando pré-incubadas a 45 °C por 180 min. Entretanto, a 50 °C, com 30 min de pré-incubação, a C1 perdeu completamente a atividade, enquanto a C2 manteve apenas 40% da atividade original, após 180 min de

incubação. A 50 °C, a meia-vida das α -galactosidases C1 e C2 foram de 66 e de 232 min, respectivamente. Puchart et al. (2000), trabalhando com α -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus*, encontraram meia-vida de 3 h a 65 °C, e Guimarães et al. (2001) constituíram, a 30 °C, meia-vida de 254 e de 1.199 min, respectivamente, em duas α -galactosidases de sementes de soja.

Os valores de K_{Map} , tendo-se o pNP α Gal como substrato (Tabela 4), foram comparáveis àqueles determinados para α -galactosidase de sementes de soja em germinação (CRUZ e SILVA, 1986; GUIMARÃES et al., 2001) e para α -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus* (PUCHART et al., 2000). Os valores de K_{Map} para a rafinose (Tabela 4) foram próximos daqueles determinados para α -galactosidase purificada de sementes de soja madura (PORTER et al., 1990), mas menores do que aqueles descritos para a rafinose e as enzimas de *Aspergillus fumigatus* (De REZENDE e FELIX, 1999) e de amendoim (BRYANT e RAO, 2001).

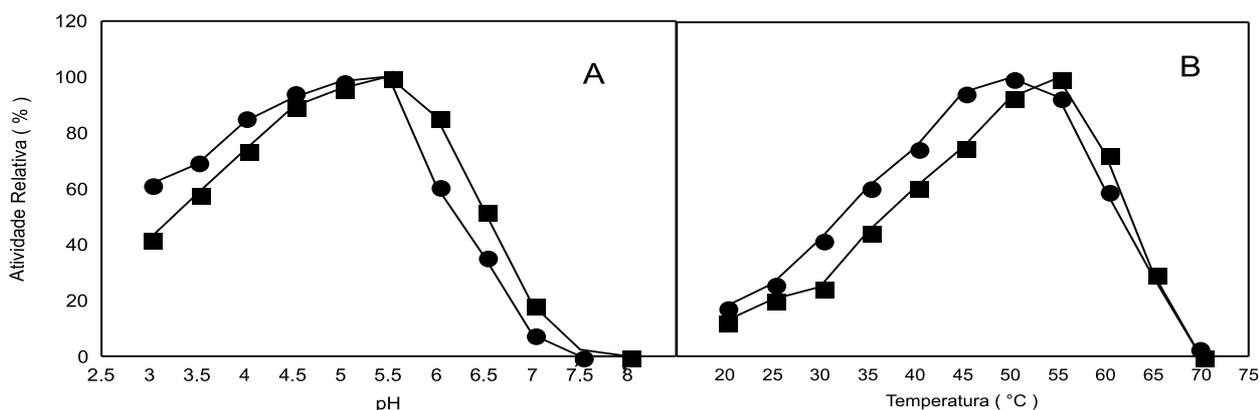


Figura 3 – Efeitos de pH (A) e temperatura (B) na atividade das α -galactosidases (C1, ●; C2, ■) de sementes germinadas de *Platymiscium pubescens*.

Figure 3 – pH (A) and temperature (B) effects on the activity of α -galactosidases (C1, ●; C2, ■) from germinating *Platymiscium pubescens* seeds.

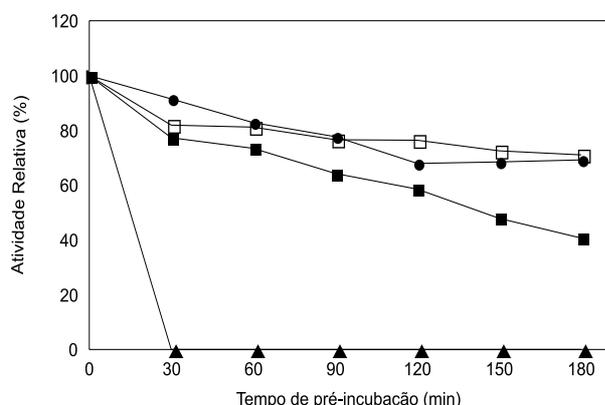


Figura 4 – Efeito da temperatura na estabilidade das α -galactosidases de sementes germinadas de *Platymiscium pubescens*. As preparações enzimáticas foram pré-incubadas a 45 °C, C1 (●), C2 (□) ou 50 °C, C1 (▲), C2 (■) por 3 h e ensaiada a 37 °C.

Figure 4 – Temperature effects on the stability of the α -galactosidase from germinating *Platymiscium pubescens* seeds. Enzyme preparations were pre-incubated at 45 °C, C1 (●), C2 (□) or 50 °C, C1 (▲), C2 (■) for up to 3 h and the assays run at 37 °C.

Tabela 4 – Valores de $K_{M,ap}$ e $V_{max,ap}$ da hidrólise de pNP α Gal, rafinose e melibiose pelas α -galactosidases de sementes germinadas de *Platymiscium pubescens*

Table 4 – $K_{M,app}$ e $V_{max,app}$ values for hydrolysis of pNP α Gal, raffinose and melibiose by α -galactosidases from germinating *Platymiscium pubescens* seeds

	pNP α Gal		Rafinose		Melibiose	
	$K_{M,ap}$ (mM)	$V_{max,ap}$ (mM.min ⁻¹)	$K_{M,ap}$ (mM)	$V_{max,ap}$ (mM.min ⁻¹)	$K_{M,ap}$ (mM)	$V_{max,ap}$ (mM.min ⁻¹)
C1	0,54	0,10	5,03	0,04	-	-
C2	0,78	0,77	5,09	0,24	0,70	0,03

As atividades de C1 e de C2 tiveram diminuição expressiva em presença de SDS e moderada em presença de melibiose e galactose, ressaltando-se que o cobre inibiu fortemente a atividade da C2 e totalmente a da C1 (Tabela 5). De forma semelhante, as atividades das α -galactosidases de *Vicia sativa* e de *Prunus amygdalus* foram diminuídas em presença de cobre (DEY e PRIDHAM, 1972). EDTA e iodoacetamida não influenciaram a atividade de C1 e C2, indicando que não há dependência de íons metálicos e de grupo SH (sulfidrila) livre, essenciais à catálise.

Tanto a C1 quanto a C2 não hidrolisaram substratos sintéticos contendo resíduos de açúcar diferentes de galactose ou contendo galactose na posição β (Tabela 6).

Altas atividades sobre rafinose e estaquiase sugerem que as duas formas de α -galactosidase de tamboril-da-mata podem atuar nas sementes em germinação, hidrolisando os RO. No entanto, a hidrólise da lactose, maltose e sacarose acreditam que essas enzimas não apresentam especificidade absoluta ou que, na preparação, existiam outras proteínas com atividade enzimática.

Tabela 5 – Efeito de íons, açúcares e outros efetores na atividade das α -galactosidases de sementes germinadas de *Platymiscium pubescens*

Table 5 – Effect of ions, sugars and other effectors on α -galactosidases from germinating *Platymiscium pubescens* seeds

Composto*	Atividade Relativa (%)	
	C1	C2
Controle	100	100
D-Galactose	48	54
D-Glicose	100	96
Sacarose	92	96
Rafinose	90	100
Melibiose	72	62
CuSO ₄	0	40
MgCl ₂	94	100
KCl	100	95
NaCl	100	94
CaCl ₂	96	100
SDS	6	0
Beta-Mercaptoetanol	100	100
EDTA	96	100
Iodoacetamida	100	92

* A concentração final dos compostos foi de 2 mM.

Tabela 6 – Hidrólise de vários substratos pelas α -galactosidases de sementes germinadas de *Platymiscium pubescens*

Table 6 – Hydrolysis of several substrates by the α -galactosidases from germinating *Platymiscium pubescens* seeds

Substratos	Concentração (mM)	Atividade Relativa (%)	
		C1	C2
pNP- α Gal	0,5	100	100
Rafinose	10,0	94	100
Estaquiase	10,0	63	56
Melibiose	10,0	59	20
Sacarose	10,0	53	71
Maltose	10,0	53	21
Lactose	10,0	76	6
pNP- α Glc	0,5	0	0
pNP- α Ara	0,5	0	0
pNP- α Xil	0,5	0	0
pNP- α Man	0,5	0	0
pNP- β Gal	0,5	0	0
oNP- β Gal	0,5	0	0

4. CONCLUSÕES

- Sementes das espécies florestais *Chorisia speciosa*, *Caesalpinia peltophoroides*, *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia velanadae* são muito ricas em lipídeos, enquanto sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, *Schizolobium parahyba* e *Cassia grandis* o são em proteínas.

- Atividade específica de α -galactosidase de sementes de *Platymiscium pubescens* aumenta durante a germinação, tendo sido identificadas duas formas da enzima (C1 e C2), com atividade máxima em pH de 5,5 e em 50 e 55 °C, respectivamente.

- As α -galactosidases de sementes germinadas de *P. pubescens* apresentam estabilidade térmica moderada, e a forma C2 exhibe maior estabilidade em comparação com a forma C1.

- As α -galactosidases C1 e C2 de *P. pubescens* hidrolisam os substratos naturais melibiose, rafinose e estaquiose, indicando potencial para aplicações biotecnológicas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG o suporte financeiro para a realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington: 1975. 1094 p.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. Determination of glucose with oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. (Eds), **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim: Verlag Chemic, 1974. p.1205-1215.

BHASKAR, B.; RAMACHANDRA, G.; VIRUPAKSHA, T.K. Alpha galactosidase of germinating seeds of *Cassia sericea* Sw. **Journal of Food Biochemistry**, v.14, p.45-59, 1990.

BOM, I.; WASSENAAR, V.D.; BOOT, J. Hybrid affinity chromatography of α -galactosidase from *Verbascum thapsus* L. **Journal of Chromatography A**, v. 808, p. 133-139, 1998.

BORGES, E.E.L. et al. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (Tamboril da Mata). **Revista Árvore**, v. 26, p. 603-613, 2002.

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

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

CARNEIRO, M.A.C. et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no Sudeste do Brasil. **Cerne**, v. 4, p.129-145, 1998.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ/ Brasília: EMBRAPA SPI, 1994.

CORCHETE, M.P.; GUERRA, H. α and β -galactosidase activities during germination of lentil seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 25, p. 105-109, 1987.

CRUZ, R.; SILVA, A.L. Soybean (*Glycine max*), endogenous alpha-galactosidase and invertase during the germinative process. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 29, p. 435-443, 1986.

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

DEY, P.M. Biochemistry of alfa-galactosidic linkages in the Plant kingdom. **Advanced Carbohydrates Biochemistry**, v. 37, p.273-283, 1980.

DE REZENDE, S.T.; FELIX, C.R. Production and characterization of raffinose-hydrolysing and invertase activities of *Aspergillus fumigatus*. **Folia Microbiologica**, v. 44, p. 191-195, 1999.

- FALCO, A.L.P.; DURRANT, L.R.; FRANCO, T.T. Purification of α -galactosidase from seeds of *Sesbania marginata*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, p. 819-825, 2000.
- FUJIMOTO, Z. et al. Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 20313-20318, 2003.
- GAO, Z.; SCHAFFER, A. A. A novel alkaline α -galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. **Plant Physiology**, v.119, p. 979-987, 1999.
- GUIMARÃES, V.M. et al. Characterization of α -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67-73, 2001.
- HYAMS, D. Curve Expert 1.3: A comprehensive curve fitting system for Windows. Copyring (c). 1997.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos físicos e químicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: 1985. v. 1. p. 533.
- KANDLER, O.; HOPF, H. Metabolism and function of oligosaccharides. In: **Biochemistry of plants**. Carbohydrates. New York: Academic Press, 1980. v.15, p.117-131.
- KIM, W.D. et al. α -Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) cells. **Phytochemistry**, v. 61, p. 621-630, 2002.
- KLITGAARD, B.B. **Systematics of Platymiscium (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergiae): taxonomy, morphology, ontogeny and phylogeny**. 1995. 168 f. Thesis (PhD.) – University of Aarhus, Aarhus, 1995.
- KONTOS, F.; SPYROPOULOS, C.G. Seed coat inhibits the production of α -galactosidase and endo- β -mannanase in the endosperm of developing carob seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 787-793, 1996.
- MARANGON, L.C. **Florística e fitossociologia de área de floresta estacional semidecidual visando dinâmica de espécies florestais arbóreas no município de Viçosa** – MG. 1999. 145 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade de São Carlos, São Carlos, 1999.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1956.
- MODI, A.T., MCDONALD, M.B.; STREETER, J.G. Soluble carbohydrates in soybean seeds during development and imbibition. **Seed Science and Technology**, v. 28, p. 115-127, 2000.
- OLIVEIRA-NETO, O.B. et al. Partial purification and properties of cotyledonary α -galactosidase from three cultivars of *Vigna unguiculata*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 91-96, 1998.
- PETERSON, G.L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, v.100, p. 201-220, 1979.
- PUCHART, V. et al. Purification and characterization of α -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1524, p. 27-37, 2000.
- PORTER, J.E.; HERRMANN, K.M.; LADISH, M.R. Integral Kinetics of α -galactosidase purified from *Glycine max* for simultaneous hydrolysis of stachyose and raffinose. **Biotchnology and Bioengineering**, v. 35, p. 15-22, 1990.
- REID, J.S.G. **Structure and function in legume-seed polysaccharides**, In: BRETT, C.T.; HILLMAN, J.R. (Eds.) *Biochemistry of plant cell walls*. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. p.259-268.
- SMART, E.L.; PHARR, D.M. Characterization of α -galactosidase from cucumber leaves. **Plant Physiology**, v. 66, p. 731-734, 1980.