

ATIVIDADE BAPA-ÁSICA EM SEMENTES DE *Vigna sinensis* (L.) Savi

cv. SERIDÓ

Norma Maria Barros Benevides

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de
MESTRE EM BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

1979

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados, na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição do material contido nessa dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

Norma Maria Barros Benevides

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

Iracema Lima Ainoz
Orientadora da Dissertação

Data

José Xavier Filho, DSc

Data

Renato de Azevedo Moreira, DSc

Data

A meu marido
a meu filho
a meus pais

AGRADECIMENTOS

À Profa. Iracema Lima Ainouz, pela valiosa e permanente orientação em todas as etapas deste trabalho, que foi decisivo para minha formação científica.

Aos Professores José Xavier Filho e Renato de Azevedo Moreira, pelas importantes sugestões e discussões apresentadas durante a realização desta dissertação.

A todos os professores e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela cooperação e incentivo.

Finalmente, agradeço, de modo especial, ao meu marido, ao meu filho e a meus pais que, direta ou indiretamente, muito contribuíram para a execução do presente trabalho.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de Pós-graduação concedida ao autor.

Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de convênio com o Curso de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta dissertação foi preparada.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

ÍNDICE GERAL

Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	x
Abreviaturas	xi
Sumário	xii
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	9
A. MATERIAIS	9
B. MÉTODOS	10
1. Preparação da farinha	10
2. Preparação dos extratos	10
3. Determinação de proteína	10
4. Preparação dos substratos	11
4.1. BAPA	11
4.2. LPA	11
5. Determinação das condições a serem usadas nos ensaios de atividade enzimática	11
5.1. Atividade BAPA-ásica	12
5.1.1. Concentrações do substrato e do extrato	12
5.1.2. pH	12
5.1.3. Tempo e temperatura	13
5.2. Atividade LPA-ásica	13
5.2.1. Concentrações do substrato e do extrato	13
6. Unidade de atividade	13
7. Efeito do pH sobre a estabilidade das <u>ativida</u> des BAPA-ásica e LPA-ásica presentes nos ex- tratos	14
8. Fracionamento com sulfato de amônio	14

9. Fração 25/50	15
9.1. Estabilidade térmica	15
9.2. Estabilidade ao pH	15
9.3. Filtração em gel de dextrana - Sephadex G-100	16
9.4. Cromatografia em DEAE-celulose	17
9.5. Recromatografia em DEAE-celulose	17
9.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida ..	18
 III. RESULTADOS.....	 19
1. Condições de ensaio	19
2. Efeito do pH sobre a estabilidade do extrato .	24
3. Fracionamento com sulfato de amônio	31
4. Fração 25/50	36
4.1. Termoestabilidade	36
4.2. Estabilidade ao pH	39
4.3. Filtração em gel	41
4.4. Cromatografia em DEAE-celulose	41
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida ...	48
 IV. DISCUSSÃO	 52
 V. CONCLUSÕES	 55
 VI. BIBLIOGRAFIA	 57
 VII. COMUNICAÇÃO A CONGRESSO	 61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade BAPA-ásica	20
2. Efeito da concentração da enzima sobre a atividade BAPA-ásica	21
3. Efeito do pH sobre a atividade BAPA-ásica	22
4. Efeito da temperatura sobre a atividade BAPA-ásica	23
5. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade LPA-ásica	25
6. Efeito da concentração da enzima sobre a atividade LPA-ásica	26
7. Efeito do pH sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica em extrato preparado em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6	29
8. Efeito do pH sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica em extrato preparado em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6, com 2-mercaptoetanol 2 mM	30
9. Atividade BAPA-ásica nas frações obtidas por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio	32
10. Atividade LPA-ásica nas frações obtidas por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio	34

Figura	Página
11. Esquema de obtenção da fração 25/50	37
12. Termoestabilidade da atividade BAPA-ásica presente na fração 25/50	38
13. Cromatografia em Sephadex G-100 da fração 25/50	42
14. Cromatografia em DEAE-celulose da fração 25/50.	45
15. Recromatografia em DEAE-celulose das frações com atividade BAPA-ásica obtidas na cromatografia anterior	49
16. Segunda recromatografia em DEAE-celulose das frações com atividade BAPA-ásica, obtidas na cromatografia anterior	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela		Página
I.	Atividade BAPA-ásica em diferentes cultivares de <i>Vigna sinensis</i> (L.) Savi	27
II.	Atividade LPA-ásica em diferentes cultivares de <i>Vigna sinensis</i> (L.) Savi	28
III.	Atividade BAPA-ásica nas frações obtidas por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio	33
IV.	Atividade LPA-ásica nas frações obtidas por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio	35
V.	Efeito da diálise contra diferentes tampões sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica presentes na fração 25/50	40
VI.	Atividade BAPA-ásica das frações obtidas por Sephadex G-100	43
VII.	Atividade LPA-ásica das frações obtidas por Sephadex G-100	44
VIII.	Purificação da fração com atividade BAPA-ásica.	46
IX.	Purificação da fração com atividade LPA-ásica .	47

ABREVIATURAS

- ANA: α -naftil-acetato
- APNE: acetil-DL-fenilalanina-naftilester
- BAEE: α -N-benzoil-arginina-etilester
- BAPA: α -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
- CM: carboximetil-celulose
- DEAE: dietilaminoetil-celulose
- LNA: L-leucil-naftilamida
- LPA: L-leucina-p-nitroanilida

SUMÁRIO

Sementes quiescentes de feijão de corda *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô foram usadas para estudo da atividade de BAPA-ásica.

Extratos preparados com tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M, pH 7,6, foram empregados no estabelecimento das condições de ensaio de atividade enzimática e precipitação com sulfato de amônio.

As condições de ensaio estabelecidas foram as seguintes: para um volume de reação de 3,0 ml foram usados 2,5 ml de BAPA 5×10^{-4} M em tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M, pH 7,6 e 0,5 ml de extrato convenientemente diluído; tempo de reação: 15 minutos; temperatura do ensaio: 40°C. Para parar a reação foi usado 1,0 ml de ácido acético 30% (p/v) perfazendo um volume total de 4,0 ml.

A fração protéica precipitada com sulfato de amônio no intervalo de 25 a 50% de saturação encerra a quase totalidade da atividade BAPA-ásica presente no extrato inicial. Quando a fração 25/50 foi submetida a filtração em gel de dextrana, Sephadex G-100 em pH 7,6, a temperatura ambiente, apresentou quatro picos, um dos quais com peso molecular de 58.000 daltons responsável pelas atividades BAPA-ásica e LPA-ásica.

A fração 25/50 manteve a atividade BAPA-ásica quando aquecida por 30 minutos a 30, 40 e 50°C. Houve um decréscimo de 6 e 11%, quando do aquecimento por 40 minutos a 40 e 50°C, respectivamente.

O efeito do pH sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica foi estudado tanto no extrato inicial como na fração 25/50. Foi encontrada uma maior estabilidade

quando as variações de pH foram feitas lentamente, por diálise do que quando os extratos tiveram o pH ajustado por adição de HCl ou NaOH.

As frações obtidas por cromatografia em DEAE-celulose da fração 25/50 foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e foi possível a identificação de um componente responsável pela atividade BAPA-ásica.

Verificou-se que a atividade LPA-ásica é cerca de cinco vezes a atividade BAPA-ásica, tanto nos cotilédones como nos eixos embrionários.

I. INTRODUÇÃO

O estudo de enzimas capazes de hidrolisar proteínas de plantas superiores tem despertado o interesse de bioquímicos e fisiologistas vegetais, cujos objetivos estão voltados para o esclarecimento das etapas iniciais do processo germinativo. Revisões sobre o assunto foram feitas recentemente por Dechary (14), Ryan (31), Millerd (23) e Ashton (1).

Enzimas proteolíticas têm sido estudadas em sementes germinantes onde suas atividades têm sido associadas ao crescimento e desenvolvimento da planta. Algumas enzimas foram purificadas ou parcialmente purificadas, e estudos de suas especificidades por diferentes substratos e algumas outras propriedades começam a proporcionar uma melhor visão da variação e complexidade das mesmas e de seus papéis fisiológicos (31).

Os corpos protéicos, as proteínas de reserva e as enzimas proteolíticas são considerados os principais componentes envolvidos na mobilização de proteínas da semente durante a germinação. As proteínas de reserva, encontradas nos corpos protéicos, são hidrolisadas durante a germinação, entretanto não é um fato geralmente conhecido se os produtos são aminoácidos ou peptídios. Sendo peptídios, outras peptidases seriam necessárias para hidrólise dos mesmos a aminoácidos (1).

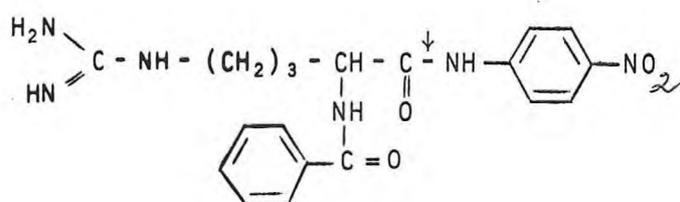
Uma das sérias limitações ao progresso das investigações sobre a mobilização das proteínas de reserva em sementes tem sido a ausência de métodos de ensaio adequados à determinação das atividades enzimáticas. A maioria dos métodos envolve a remoção das proteínas não hidrolisadas por precipitação com ácido tricloroacético, seguida pela medida de um

acrêscimo de absorção em 280 nm, acrêscimo em grupos amini-
cos pela ninhidrina, ou acrêscimo em tirosina pelo método de
Lowry (1).

A despeito da tendência de acreditar que o uso de
substratos endógenos fornece uma indicação mais precisa das
capacidades hidrolíticas das enzimas vegetais, a maior parte
das informações existentes resulta do emprego de substratos
de outras origens. Isto é fácil de se entender, tendo em vis-
ta a insolubilidade das proteínas de reserva nos tampões comu-
mente usados e as relativamente baixas atividades observadas
com métodos autolíticos (7).

O uso de substratos sintéticos deve ser estimulado
sempre que possível, não somente porque os métodos de ensaio
envolvidos são mais específicos do que aqueles, empregando
proteínas, como também por serem rápidos e precisos (7).

O substrato sintético BAPA, usado pela primeira vez
por Erlanger (16)



tem sido utilizado no estudo de enzimas hidrolíticas presen-
tes em vegetais por um grande número de pesquisadores.

Burger (7) purificou 150 vezes uma enzima, capaz de
hidrolisar o BAPA, presente em cevada germinada por 3,5 dias
e determinou algumas de suas propriedades. A purificação foi
feita usando fracionamento com sulfato de amônio, cromatogra-
fia em DEAE-celulose e filtração em gel de Sephadex G-100. A
BAPA-ase purificada não foi inibida por reagentes efetivos

contra enzimas do tipo sulfidrílico, não apresentou atividade contra gelatina e a medida que ela foi sendo purificada foi decrescendo a atividade contra hemoglobina, inicialmente presente.

Burger e colaboradores (8) estudaram as proteases de cevada germinante por cromatografia em CM-celulose e tampão acetato pH 5,5 de 0,005 a 0,5 M, seguida de filtração em gel de Sephadex G-100, usando os substratos BAPA, BAEE, hemoglobina e gelatina. Eles conseguiram separar algumas das proteases em 5 frações, contendo as seguintes enzimas: 1) BAPA-ase, BAEE-ase ácida e proteinase ácida I; 2) proteinase ácida IIa; 3) proteinase ácida IIb; 4) BAEE-ase neutra, proteinase neutra I e 5) proteinase neutra II.

Posteriormente, Burger e colaboradores (9) conseguiram a purificação parcial das enzimas peptídeo hidrolase A e peptídeo hidrolase B a partir de cevada germinada por 6 dias. A primeira apresentava atividade contra BAPA e BAEE e era ácida e a segunda apresentava atividade contra BAEE e era neutra. Eles determinaram os efeitos de pH, temperatura, ions metálicos sobre as atividades enzimáticas, a constante cinética para a atividade BAEE-ásica e testaram a atividade contra um grande número de peptídios e proteínas. Devido a preferência das enzimas por substratos peptídicos, eles concluíram que essas enzimas não são as responsáveis pela hidrólise das proteínas de reserva do endosperma de cevada durante o desenvolvimento da planta.

A peptídeo hidrolase A de cevada foi parcialmente purificada e caracterizada por Moeller e colaboradores (24), que encontraram que a mesma era capaz de hidrolisar outros substratos, tais como ANA e LNA, além do BAPA e do BAEE. Por eletroforese em gel de poliacrilamida eles foram capazes de remover completamente as atividades LNA-ásica e ANA-ásica, aumentando a atividade específica de 2,5 a 15 vezes. As ativida

des BAPA-ásica e BAEE-ásica foram encontradas na mesma faixa do gel e confirmaram a prévia evidência de que ambas as atividades estavam associadas com a mesma enzima.

Ory e Henningsen (27), estudando corpos protéicos isolados de sementes de cevada não germinada verificaram a ausência da atividade BAPA-ásica nos mesmos.

Sopanen e Mikola (33) estudaram o isolamento e propriedades de uma peptidase capaz de hidrolisar leucil-glicil-glicina e leucil-tirosina e verificaram que a mesma também não é capaz de hidrolisar o BAPA.

Prentice e colaboradores (28), utilizando métodos desenvolvidos previamente no estudo de peptídio-hidrolases de cevada, estudaram as peptídio-hidrolases de trigo germinado. Eles mostraram na fração ácida do extrato a presença de duas peptídio-hidrolases: uma, semelhante à peptídio-hidrolase A de cevada, sensível a baixos valores de pH, hidrolisando os substratos BAPA e BAEE e a outra, resistente a baixos valores de pH e desnaturação térmica, capaz de usar BAEE como substrato.

Kruger (20) conseguiu a purificação de uma BAPA-ase, presente em trigo maltado, em alto estado de pureza, usando fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em DEAE-celulose e eletroforese preparativa em gel de poliacrilamida. A enzima purificada não apresentou atividade BAEE-ásica após eletroforese, muito embora ela se apresentasse nas etapas anteriores de purificação. Foram determinados: ponto isoelétrico, peso molecular, pH ótimo, estabilidade térmica e efeitos de ions metálicos na inativação da enzima. A enzima por ele isolada apresenta uma baixa capacidade de hidrolisar azocaseína, hemoglobina e gelatina.

Uma enzima capaz de hidrolisar o BAPA foi pela primeira vez estudada em sementes de amendoim por Irving e Fontaine (19), que a denominaram de "arachain". Foi feito um es-

tudo detalhado da atividade na farinha de sementes, nos cotilédones, nos eixos embrionários e em sementes germinadas até 96 horas.

Usando os substratos BAPA e BAEE, Cameron e Mazelis (11) purificaram a "arachain" 325 vezes a partir de amendoim não germinado. A fração mais purificada apresentou, por eletroforese em gel de poliacrilamida, uma banda principal acompanhada de uma a três bandas menores e não apresentou atividade de contra caseína, albumina sérica bovina e L-leucil-L-tirosina. A enzima purificada foi capaz de hidrolisar um grande número de peptídios e parece ter muitas propriedades em comum com a peptídio-hidrolase A de cevada germinada.

A degradação de proteínas e a atividade proteolítica em cotilédones de ervilhas germinadas de um a dez dias foi estudada por Beevers (5), usando como substratos caseína, BAPA e LPA.

Beevers e Splittstoesser (6), estudando o metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos em ervilha germinante, verificaram que a atividade LPA-ásica é 5 vezes maior do que a atividade BAPA-ásica nos extratos de cotilédones. A atividade peptidásica é mais alta nos eixos do que nos cotilédones, quando expressa em termos de proteína, mas não na base de peso fresco.

Nakano e Asahi (25) realizaram experiências relacionadas com as atividades de hidrolases ligadas à membrana em cotilédones de ervilha germinante. Os resultados encontrados indicaram que o acréscimo na atividade BAPA-ásica e fosfatásica acida parece ser devido à síntese de novo das proteínas enzimáticas. No caso das proteinases, entretanto, eles inferiram que o acréscimo é um resultado da ativação de uma forma inativa das enzimas. Os mesmos autores (26) usaram o BAPA como substrato no estudo de membranas encerrando proteases, a partir de cotilédones de sementes de ervilhas germinantes.

Duas peptídio-hidrolases (BAPA-ase I e BAPA-ase II) presentes em sementes de ervilha foram purificadas e caracterizadas por Caldwell e Sparrow (10), usando BAPA como substrato. As enzimas apresentaram peso molecular de 65.000 daltons e puderam ser separadas por cromatografia de troca iônica, mas se mostraram idênticas nas propriedades testadas. O comportamento dessas enzimas com relação aos inibidores comuns para atividades peptidásicas e proteásicas sugerem que elas são peptidases do tipo serina. Os autores sugerem que as BAPA-ases são específicas para pequenos peptídios contendo aminoácidos básicos e clivam no terminal carboxílico do resíduo básico. Eles concluem que a função das BAPA-ases no metabolismo das plantas é ainda obscuro e que avanços no campo requerem um conhecimento mais completo da especificidade do substrato e talvez conhecimento da especificidade das proteinases de sementes.

Harris e Chrispeels (18), ao estudarem a regulação do metabolismo das proteínas de reserva em cotilédones germinantes de "mung bean" [*Vigna radiata* (L.) Wilezek, anteriormente denominado *Phaseolus aureus* Roxb] determinando o conteúdo de corpos protéicos isolados e a capacidade de autodigestão dos mesmos, verificaram que as enzimas poderiam estar envolvidas com a degradação das proteínas de reserva nos corpos protéicos e no citoplasma. Com isso eles mostraram que os corpos protéicos continham toda ou quase toda a atividade caseinolítica e que o citoplasma continha toda a atividade do tipo tripsina, usando BAPA como substrato.

Baumgartner e Chrispeels (3) analisando extratos de cotilédones de "mung bean" germinantes, a fim de verificar a presença de inibidores de endopeptidases, mostraram que a BAPA-ase é uma enzima marcadora de citosol, não estando associada aos corpos protéicos. Posteriormente, os mesmos autores (4) purificaram e caracterizaram a "vicilin" peptídio-hidrolase, enzima capaz de hidrolisar *in vitro* a principal proteína

de reserva de cotilédones germinantes de "mung bean". Eles verificaram que a peptídio-hidrolase purificada não foi capaz de hidrolisar o BAPA.

Em *Vigna unguiculata* L. a atividade BAPA-ásica foi encontrada na fração albumínica de extratos de cotilédones (29) (30). Os autores são a favor da hipótese de que as atividades BAPA-ásica e caseinolítica estão associadas a enzimas diferentes, uma vez que as BAPA-ases albumínicas são insensíveis aos inibidores de tripsina.

Atividade BAPA-ásica foi também detectada em farinha de castanhas de cajú (*Anacardium occidentale* L.) (36) e em corpos protéicos de *Lablab purpureus* L. (22).

Além dos estudos feitos com sementes, a atividade BAPA-ásica foi observada em raízes de soja (*Glycine max* Merrill), ervilha (*Pisum sativum* L.), milho (*Zea mays* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (17). Foi feita uma purificação de 45 vezes da BAPA-ase de raízes de soja por Graf e Hoagland (17) e a enzima não apresentou atividade contra caseína, "azocoll" e p-nitroanilidas de L-lisina, L-cistina, succinil L-fenilalanina e glutaril L-fenilalanina. Porém mostrou uma baixa atividade contra glicina-p-nitroanilida e L-leucina-p-nitroanilida, talvez em virtude da presença de impurezas residuais na preparação ou uma larga especificidade da enzima, como sugerem os autores.

Pelos trabalhos realizados, pode-se concluir que a atividade BAPA-ásica detectada em diferentes materiais vegetais estudados difere da atividade caseinolítica, parecendo estar envolvida com a hidrólise de peptídios, não havendo sido até hoje esclarecida a função das mesmas no processo germinativo.

Vários autores são unânimes em admitir que somente, após um maior conhecimento sobre as proteínas de reserva das

sementes e uma melhor caracterização das enzimas envolvidas no metabolismo das mesmas, poderemos atingir uma melhor compreensão do processo germinativo como um todo. Isto obviamente não é fácil, mas somente quando as enzimas forem melhor entendidas individualmente é que as transformações de proteínas a peptídios e aminoácidos poderão ser apropriadamente avaliadas (7).

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da atividade BAPA-ásica presente em sementes quiescentes de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv seridão, admitindo-se que enzimas capazes de hidrolisar o substrato empregado desempenham papel importante na utilização das proteínas de reserva presentes na semente. Ao mesmo tempo foi feito o estudo da atividade LPA-ásica, uma vez que inicialmente ela se apresentou associada às mesmas frações que encerravam atividade BAPA-ásica.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II-A. MATERIAIS

Na realização do presente trabalho foram usadas sementes de diversos cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi provenientes da Fazenda Experimental do Vale do Curu, Pentecostes, Ceará, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Acetil-DL-fenilalanina- β -naftilester (Lot. AZ-2105) Schwarz/Mann, Orangeburg, N.Y., EUA.

Acrilamida e N,N'-metilenobisacrilamida, produtos de Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Y., EUA.

Albumina sérica bovina (fração V 96-99%, Lot. 126C-0199) de Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Dietilaminoetil-celulose (0,84meq/ml), produto de Nutritional Biochemicals Corporation, EUA.

α -N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (Lot. 91C-2460) e L-Leucina-p-nitroanilida (Lot. 9125), substratos cromogênicos obtidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Sephadex G-100 (Lot. To-5967; particle size: 40-120 μ) e Blue Dextran 2000, adquiridos de Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

II-B. MÉTODOS

1. Preparação da farinha

Para preparação da farinha foram usadas sementes quiescentes dos diversos cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Sa vi, após remoção das películas. As sementes ou cotilédones foram triturados em moinho Wiley adaptado com uma tela de 40 malhas por polegada linear (40 mesh) e a farinha mantida em refrigerador (5°C).

2. Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados usando-se farinha de cotilédones ou de sementes quiescentes deixadas em contacto por duas horas com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6 (13) a temperatura ambiente (26°C) na proporção 1:5 ou 1:10 (farinha:meio de extração). O homogenato foi filtrado através de tecido de nylon e centrifugado durante 30 minutos, 7.200 x g a 4°C (Centrífuga Internacional, mod. HR-1-International Equipment Co., Boston). O resíduo da centrifugação foi desprezado e o sobrenadante (pH 7), chamado extrato bruto, foi usado para determinação de proteína, para ensaios de atividade enzimática e para fracionamento com sulfato de amônio.

Os eixos, quando empregados na preparação de extratos, foram triturados em almofariz em presença do mesmo tampão, usando-se a proporção 1:20 (eixo: meio de extração). As demais condições foram as mesmas descritas para os extratos preparados com farinha.

3. Determinação de proteína

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método do microbiureto (2) usando-se albumina sérica bovi-

na como padrão. A determinação da concentração de proteína nos efluentes das colunas cromatográficas foi feita pela medida de absorvância em 280 nm, em espectrofotômetro Beckman DU.

4. Preparação dos substratos

Foram usados os substratos sintéticos α -N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida.HCl (BAPA) e L-Leucina-p-nitroanilida (LPA) (16) (5).

4.1. BAPA

As soluções de BAPA (5×10^{-4} M) foram preparadas dissolvendo-se inicialmente 21,74 mg de BAPA em 1,0 ml de dimetilsulfóxido e completando-se o volume para 100 ml com tampão. A solução era mantida a temperatura ambiente, no máximo por 48 horas.

4.2. LPA

As soluções-estoque de LPA (5×10^{-4} M) foram preparadas conforme já descrito por Uchoa (34) em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0. As soluções de concentrações menores eram feitas a partir da solução-estoque que era mantida no congelador (-20°C).

5. Determinação das condições a serem usadas nos ensaios de atividade enzimática

As condições de ensaio de atividade BAPA-ásica e LPA-ásica foram estabelecidas no extrato bruto de cotilédones de sementes quiescentes de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô.

5.1. Atividade BAPA-ásica

5.1.1. Concentrações do substrato e do extrato

Inicialmente, foram estabelecidas as concentrações do substrato e do extrato a serem empregados nos ensaios. O meio de reação encerrava 5,0 ml de BAPA nas concentrações que variavam de 1×10^{-4} M a 5×10^{-4} M em tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M pH 7,6 e 1,0 ml do extrato bruto (1:10) diluído 2 vezes. A mistura foi incubada por 15 minutos, a 40°C , sendo a reação parada com 1,0 ml de ácido acético 30% (p/v). Após 15 minutos de repouso, a hidrólise enzimática foi medida pela absorvância em 410 nm do produto corado formado (espectrofotômetro SPEKOL).

A fim de corrigir a atividade autodigestiva do extrato foram sempre usadas amostras-controle, nas quais o extrato e o substrato foram incubados separadamente e o substrato adicionado ao extrato após adição do ácido acético.

5.1.2. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade BAPA-ásica foi estudado, usando-se o substrato na concentração de 5×10^{-4} M preparado com tampão Universal (13) nos valores de pH que variaram de 5 a 10. Os ensaios foram feitos incubando-se 2,5 ml do substrato com 0,5 ml do extrato (1:10), diluído 2,5 vezes, por 15 minutos a 40°C . A avaliação da atividade foi feita pela absorvância em 410 nm, após 15 minutos da adição de 1,0 ml de ácido acético 30%.

5.1.3. Efeito da temperatura e do tempo de reação

A temperatura e o tempo de reação foram determinados fazendo-se ensaios de atividade BAPA-ásica nas temperaturas de 30, 40 e 50°C nos intervalos de tempo de 15 e 30 minutos, incubando-se 2,5 ml da solução de BAPA 5×10^{-4} M em tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 e 0,5 ml de extrato (1:5) diluído 5 vezes.

5.2. Atividade LPA-ásica

5.2.1. Concentrações do substrato e do extrato

As concentrações de substrato e extrato usadas no estudo de atividade LPA-ásica em sementes de feijão, embora estabelecidas anteriormente (34), foram determinadas usando-se 2,5 ml de LPA (1×10^{-4} M a 5×10^{-4} M) em tampão fosfato 0,02 M pH 7,0 e 0,5 ml de extrato (1:5) diluído 25 vezes. O tempo de reação, a 40°C, foi de 15 minutos. Ácido acético 30% p/v (1,0 ml) foi usado para parar a reação e a atividade determinada pela absorbância em 410 nm, após 15 minutos de repouso.

6. Unidade de atividade

Para os cálculos de atividade BAPA-ásica e LPA-ásica foi usado o coeficiente de extinção molar usado por Erlanger (16)

$$\epsilon_{410} = 8800 \text{ (l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}\text{)}$$

A atividade específica foi expressa em $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ calculada pela fórmula:

$$\frac{A_{410 \text{ nm}} \times \text{volume do ensaio} \times \text{fator de diluição}}{8,8 \times 15 \times \text{mg proteína}}$$

7. Efeito do pH sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica presentes no extrato

O efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas hidrolizantes de substratos BAPA ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$) e LPA ($3 \times 10^{-4} \text{ M}$) foi determinado segundo Sopenen e Mikola (33) com extrato (1:5, p/v) preparado em tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 com e sem 2-mercaptoetanol 2 mM.

Alíquotas de 20 ml do extrato bruto (pH 7,0) foram ajustadas com NaOH ou HCl para valores de pH 4 a 11, em seguida foram incubadas durante 60 minutos a temperatura ambiente (26°C) e reajustadas ao valor do pH inicial com NaOH ou HCl. Após levar as alíquotas a um volume de 25 ml os precipitados formados foram removidos por centrifugação a $7.200 \times g$, durante 20 minutos a 4°C . Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para determinação das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica. Os ensaios de atividade foram feitos nas condições citadas anteriormente, isto é, 15 minutos a 40°C , sendo os extratos diluídos 4 vezes para ensaios de atividade BAPA-ásica e 25 vezes para ensaios de atividade LPA-ásica.

8. Fracionamento com sulfato de amônio

O extrato bruto de sementes quiescentes foi submetido a fracionamento com sulfato de amônio sólido nos intervalos de 0 a 25, 25 a 50, 50 a 75, e 75 a 100% de saturação a temperatura ambiente (28°C). O extrato era deixado em contato com o sal por ca. de 4 horas. O precipitado formado foi removido por centrifugação ($7.200 \times g$, 30 minutos, 4°C), redissolvido no tampão de extração e dialisado contra o mesmo tampão, após prévia diálise contra água, a 4°C . Quando o conteú-

do do saco de diálise apresentava algum precipitado, este era removido por centrifugação e desprezado. As frações assim obtidas denominadas de F 0/25, F 25/50, F 50/75 e F 75/100 foram usadas para determinação de proteína e das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica.

9. Fração 25/50

A fração 25/50 foi preparada por precipitação do extrato bruto de farinha de sementes com sulfato de amônio.

9.1. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da atividade BAPA-ásica presente na fração 25/50 foi determinada usando-se a fração liofilizada dissolvida em tampão fosfato 0,02 M pH 7,6. Alíquotas de 5,0 ml encerrando 10 mg/ml foram aquecidas em banho-maria a 30, 40 e 50°C até 40 minutos. Em intervalos de 10 minutos foram retiradas alíquotas de 1,0 ml, diluídas 2,5 vezes com o mesmo tampão e usadas para determinação de atividade BAPA-ásica nas condições anteriormente descritas (2,5 ml de BAPA 5×10^{-4} M pH 7,6, 0,5 ml da fração diluída, incubados por 15 minutos, a 40°C).

9.2. Efeito do pH sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica

O efeito do pH sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica presentes na fração 25/50 foi determinado usando-se 450 mg da fração liofilizada dissolvidas em 45 ml de tampão fosfato de Na e K 0,02 M, pH 7,6. Alíquotas de 10 ml encerrando 100 mg de fração foram dialisadas por 48 horas a 4°C, contra 1200 ml (4 x 300 ml) dos seguintes tampões: acetato 25 mM, pH 5,0; citrato de sódio e fosfato 25 mM, pH

5,0; fosfato de sódio e potássio 20 mM, pH 7,6 e borato de sódio 25 mM, pH 9,7. Os precipitados foram removidos por centrifugação (3000 x g, 20 minutos, 28°C) e ressuspensos em tampão fosfato 20 mM, pH 7,6. Os sobrenadantes obtidos, após determinação de pH, foram dialisados contra 600 ml (2 x 300 ml) de tampão fosfato 20 mM, pH 7,6, a 4°C, por 24 horas. As atividades BAPA-ásica e LPA-ásica foram determinadas na amostra não dialisada e nos sobrenadantes e precipitados resultantes das diálises.

9.3. Filtração em gel de dextrana - Sephadex-G-100

Sephadex G-100 (ca. de 15 g) foi deixada em água por 3 dias com agitação ocasional e usada, depois de desprezadas as partículas finas, para preparação de uma coluna (K 25/45 Pharmacia) medindo 2,5 x 40 cm.

A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,6, a temperatura ambiente (26°C) e o fluxo ajustado para 40 ml/hora. Azul de dextrana (20 mg) foi dissolvido no mesmo tampão (2 ml) contendo sacarose 10% e aplicado na coluna para determinar o seu volume de exclusão (V_o).

A fração 25/50 dissolvida no mesmo tampão de equilíbrio, encerrando 10% de sacarose, foi aplicada na coluna e os efluentes recolhidos em frações de 4,0 ml. Nas frações coletadas foram feitas determinações de proteína, pela absorbância em 280 nm, e determinações das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica, empregando-se as condições de ensaio já descritas.

Para os cálculos dos pesos moleculares foi usada a fórmula de Determann e Michel (15):

$$\log M = 5,941 - 0,847 (V_e / V_o)$$

V_e = volume de eluição

V_o = volume de exclusão

9.4. Cromatografia em DEAE-celulose

Dietilaminoetil-celulose, lavada previamente com água a fim de retirar as partículas finas, foi usada para preparação de uma coluna medindo 2 x 35 cm. Após lavagens sucessivas com NaOH 0,1N, água, HCl 0,1N e água a coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M, pH 7,6. A fração 25/50 liofilizada foi dissolvida e dialisada contra o tampão de equilíbrio por 14 horas, a 4°C. O precipitado formado por diálise foi removido por centrifugação (2.500 x g, 10 min) e o sobrenadante aplicado a coluna. A amostra foi eluída inicialmente com o mesmo tampão de equilíbrio seguido de um gradiente linear de NaCl (0 a 1,0 M, 200 ml) no mesmo tampão a temperatura ambiente (26°C). O fluxo foi mantido em 40 ml/hora com o auxílio de uma bomba peristáltica e frações de 4,0 ml foram recolhidas por um coletor automático de frações (Beckmann, mod 132) acoplado a um registrador (LKB 8.300 UVICORD II). A absorvância dos efluentes foi determinada em 280 nm. A fim de localizar as atividades BAPA-ásica e LPA-ásica nas frações obtidas por cromatografia, foi usado um ensaio rápido de atividade (7) que consistiu em incubar a 40°C, por 15 minutos, uma gota do efluente com duas gotas do substrato. As frações que apresentaram coloração amarela característica da reação foram usadas para recromatografias em DEAE-celulose.

9.5. Recromatografias em DEAE-celulose

Os efluentes da cromatografia anterior (tubos 48 a 54, DEAE I) que apresentaram atividade BAPA-ásica foram reunidos e dialisados contra tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,6 e usados para recromatografia (DEAE II). Uma outra recromatografia (DEAE III) foi feita usando-se os efluentes da primeira recromatografia (tubos 32 a 38, DEAE II). As condições empregadas nas recromatografias foram as mesmas descritas no

item anterior com exceção das dimensões da coluna (1,5 x 18 cm).

9.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo o método de Clarke (12). Foram usados tubos de vidro de 7 x 75 mm, uma amperagem de 2 mA/tubo mantendo-se a voltagem constante. TRIS-glicina-HCl pH 8,1, foi usado como tampão de corrida. As amostras foram sempre aplicadas encerrando sacarose numa concentração final de 10%.

A localização das frações obtidas por eletroforese foi feita pela reação com negro de amido a 1%, em ácido acético a 7%.

A fim de identificar as frações com atividade BAPA-ásica, os tubos de gel foram cortados em duas secções no sentido longitudinal. Uma das secções era corada com negro de amido nas condições já descritas, a outra era cortada em fatias, que correspondiam as bandas coradas, e incubadas com BAPA 5×10^{-4} M a 40°C, durante 15 minutos (20). O aparecimento da coloração amarela indicava a presença da atividade BAPA-ásica.

Foi também usada a reação com APNE, deixando-se o gel em contacto com o reagente durante uma hora a temperatura ambiente. O descoramento foi feito com ácido acético a 2% durante 30 minutos (35).

III. RESULTADOS

1. Condições de ensaio

No estabelecimento das condições a serem usadas nos ensaios de atividade BAPA-ásica em sementes de feijão foram empregados somente cotilédones desprovidos de películas e eixos.

A figura 1 apresenta os resultados obtidos quando do emprego de concentrações crescentes de substrato que variaram de 1×10^{-4} M a 5×10^{-4} M e quantidades fixas de extrato de cotilédones encerrando atividade BAPA-ásica. Verifica-se que, para extratos preparados na proporção 1:10 (peso de cotilédones: meio de extração) e diluídos 2 vezes, a concentração final de BAPA $4,16 \times 10^{-4}$ M no volume de reação é suficiente para saturar a enzima.

Uma vez determinada a concentração de substrato foram feitos ensaios mantendo-se constante a concentração do substrato e variando-se a concentração da enzima presente no extrato. Como mostra a figura 2 a atividade BAPA-ásica aumenta linearmente em função de quantidades crescentes da enzima.

As variações de atividade BAPA-ásica em função do pH (figura 3) foram determinadas no intervalo de 5 a 10, verificando-se uma atividade máxima entre 7 e 9. O pH escolhido para os ensaios foi de 7,6 como usado anteriormente por Beevers (5) no estudo de atividade BAPA-ásica de ervilha.

A temperatura de 40°C e o tempo de reação de 15 minutos foram escolhidos para os ensaios de atividade BAPA-ásica, tendo em vista os dados da figura 4 e as condições já sugeridas por Erlanger (16) e Beevers (5).

Ficaram estabelecidas as seguintes condições de en-

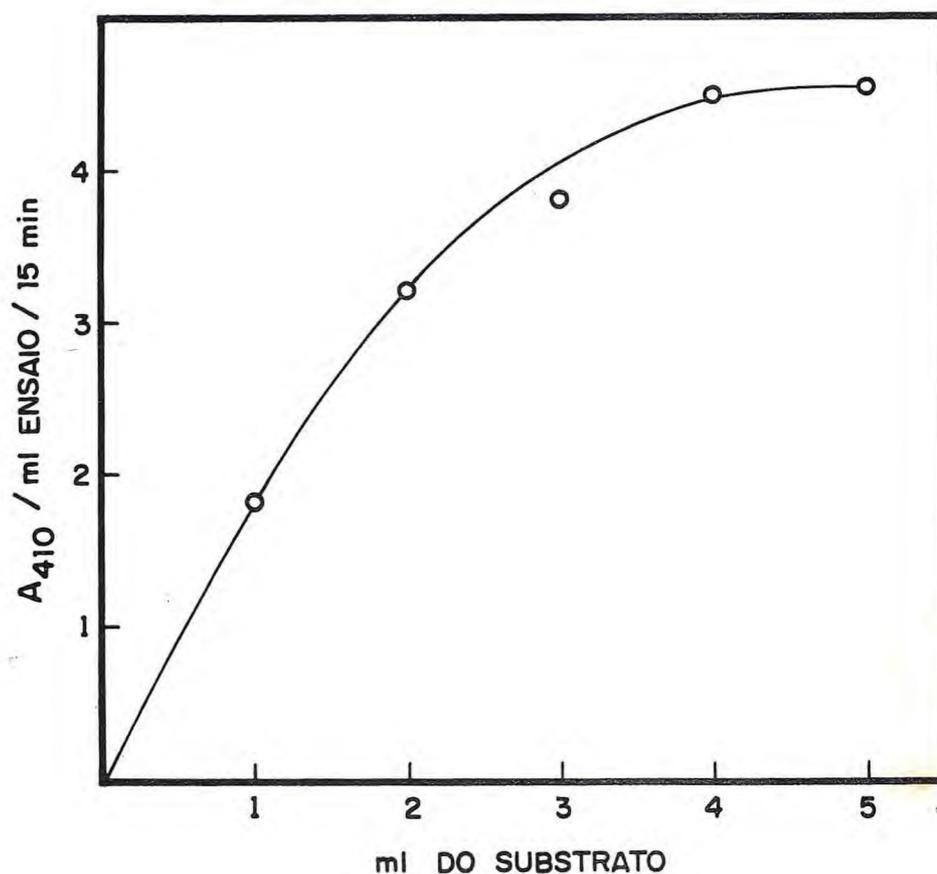


Fig. 1. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade BAPA-ásica presente em extrato de cotilédones de sementes quiescentes de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô. Extrato preparado em tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 na proporção 1:10 e diluído 2 x com o mesmo tampão. Substrato: BAPA 5×10^{-4} M. Volume de reação: 6 ml.

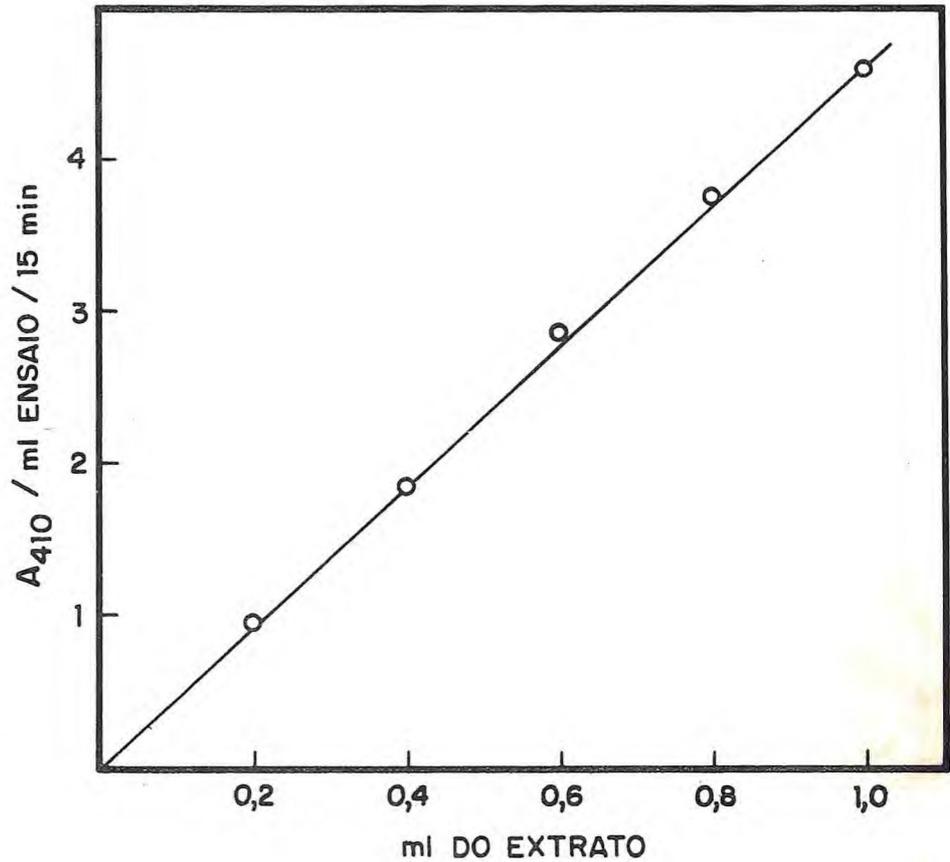


Fig. 2. Efeito da concentração da enzima sobre a atividade BAPA-ásica presente em extrato de cotilédones de sementes quiescentes de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô. Extrato preparado em tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 na proporção 1:10 e diluído 2 x com o mesmo tampão. Substrato: BAPA $4,16 \times 10^{-4}$ M no volume final de reação de 6 ml.

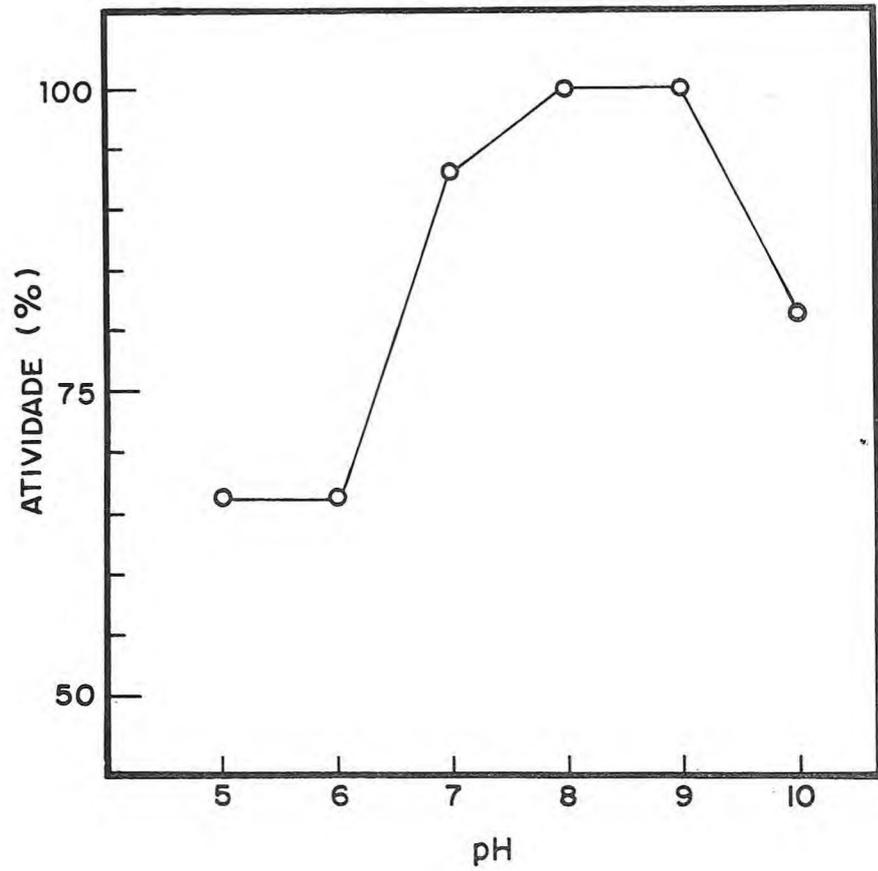


Fig. 3. Efeito do pH sobre a atividade BAPA-ásica presente em extrato de cotilédones de sementes quiescentes de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô. Volume de reação: 3 ml. Atividades calculadas com relação a atividade máxima.

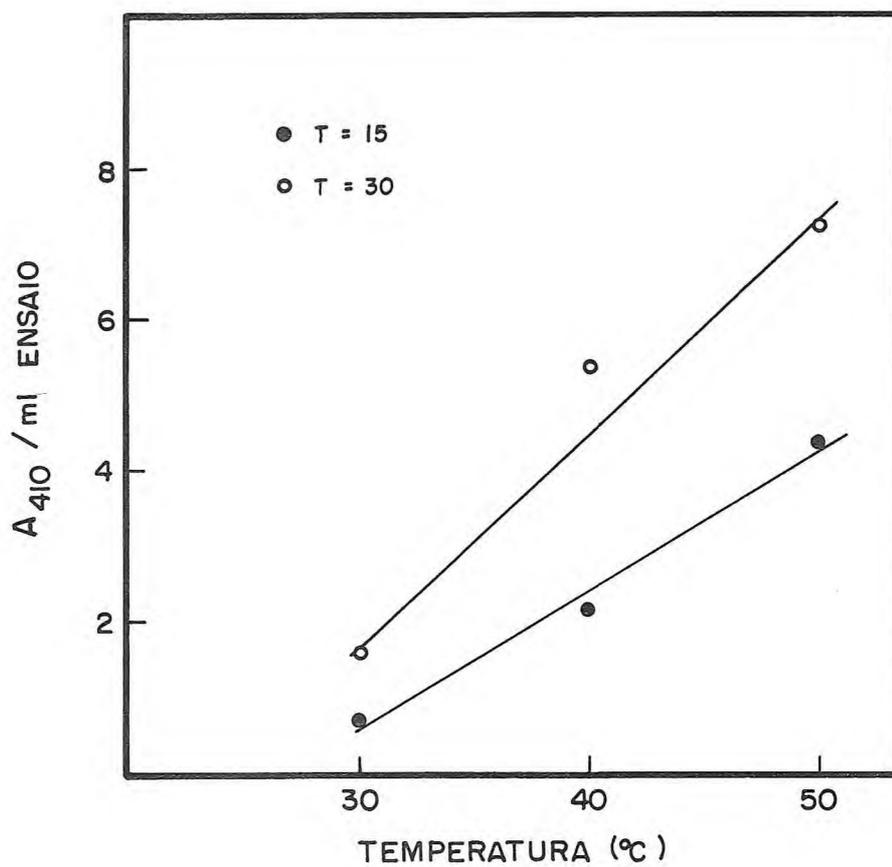


Fig. 4. Efeito da temperatura sobre a atividade BAPA-ásica presente em extrato de cotilédones de sementes quiescentes de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô. Volume de reação: 3 ml.

saio: tempo de reação, 15 minutos; temperatura, 40°C; pH, 7,6; 2,5 ml de BAPA 5×10^{-4} M e 0,5 ml do extrato convenientemente diluído, perfazendo um volume de reação de 3 ml; 1 ml de ácido acético 30% (p/v) a fim de parar a reação. O extrato foi diluído 5 ou 2 vezes, dependendo da proporção farinha: meio de extração, 1:5 ou 1:10, respectivamente.

O efeito da concentração do substrato e do extrato sobre a atividade LPA-ásica presente no extrato de farinha de cotilédones de sementes quiescentes, apresentado nas figuras 5 e 6, podem ser comparados com aqueles já determinados neste laboratório (34).

Uma vez estabelecidas as condições de ensaio com cotilédones de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô, foram feitas determinações de atividade BAPA-ásica e LPA-ásica nos extratos de cotilédones de diferentes cultivares que, conforme pode ser visto nas tabelas I e II, se mostraram respectivamente iguais.

A seguir foram feitas determinações nos extratos de eixos de *Vigna sinensis* (L.) Savi, cv. seridô. Verificou-se que a atividade LPA-ásica é cerca de 5 vezes maior que a atividade BAPA-ásica, tanto nos eixos como nos cotilédones. O mesmo foi verificado por Beevers (6) para cotilédones de ervilha.

2. Efeito do pH sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica presente nos extratos

O efeito do pH sobre as atividades BAPA-ásica e LPA-ásica presentes nos extratos (pH 7,0) preparados com farinha de sementes e tampão fosfato 0,02 M pH 7,6, em presença e ausência de 2-mercaptoetanol, foi determinado segundo Sopanen e Mikola (33).

As figuras 7 e 8 mostram os resultados obtidos quan

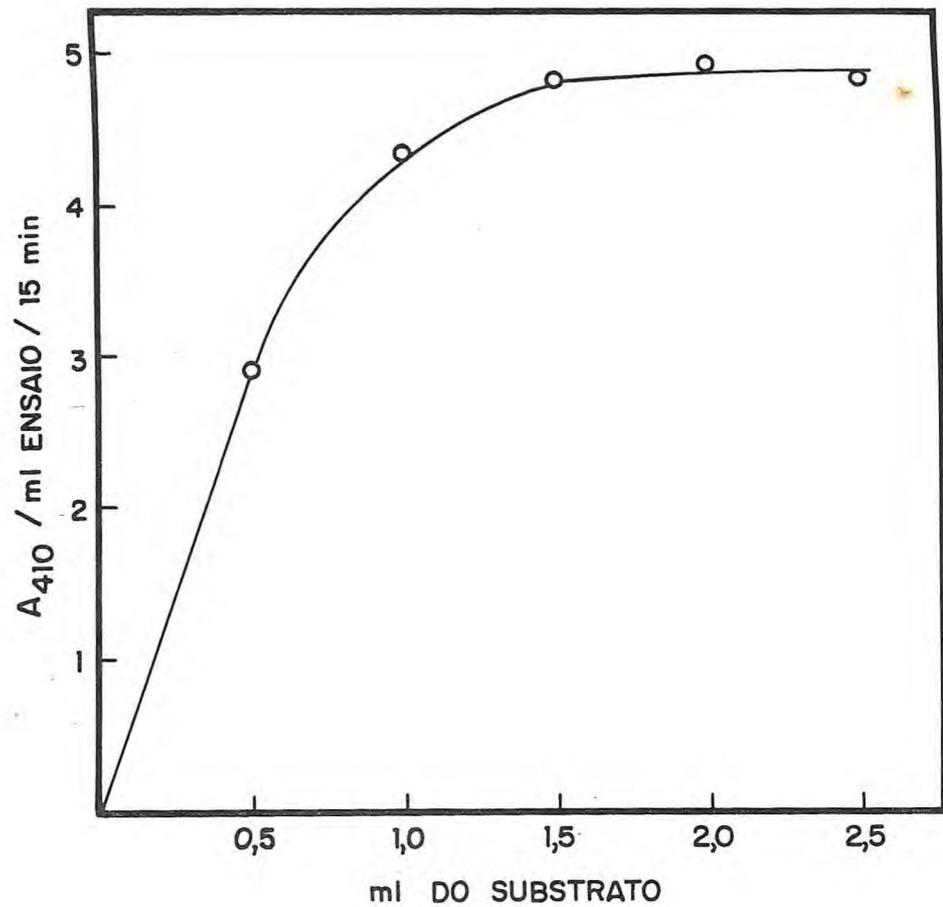


Fig. 5. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade LPA-ásica presente em extrato de cotilédones de sementes quiescentes de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô. Extrato preparado em tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 na proporção 1:5 e diluído 25 x no mesmo tampão. Substrato: LPA 3×10^{-4} M. Volume de reação: 3 ml.

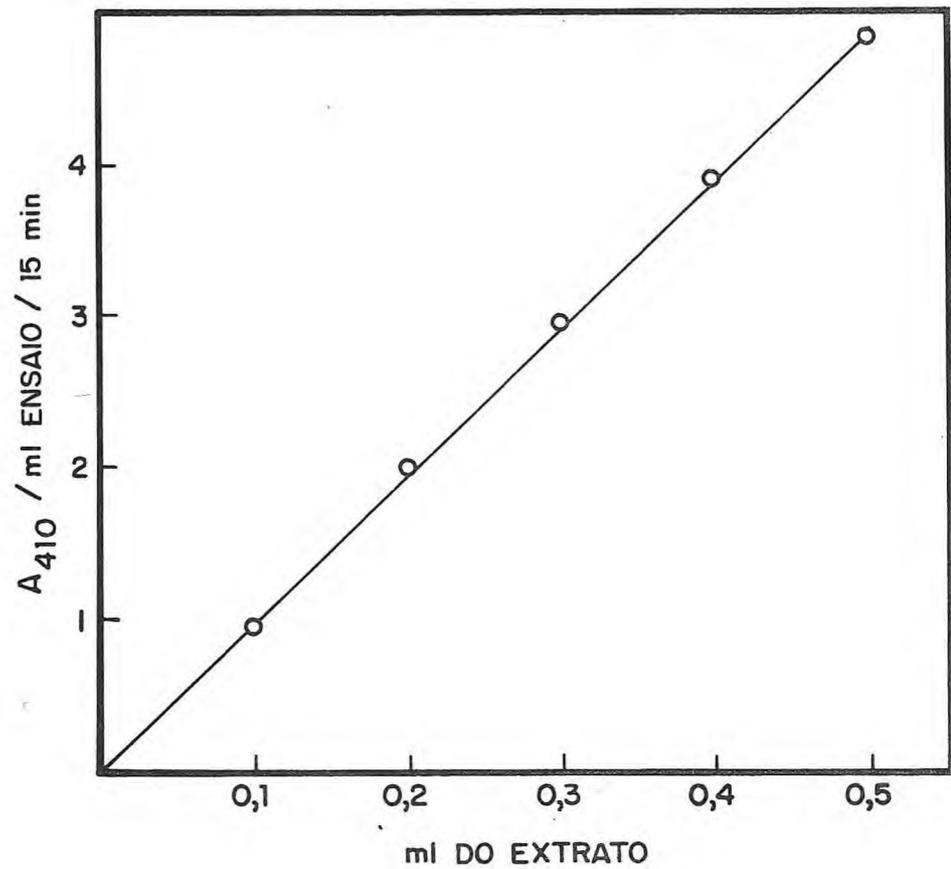


Fig. 6. Efeito da concentração da enzima sobre a atividade LPA-ásica presente em extrato de cotilédones de sementes quiescentes de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô. Extrato preparado em tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 na proporção 1:5 e diluído 25x no mesmo tampão. Substrato: LPA 3×10^{-4} M. Volume de reação: 3 ml.

TABELA I - Atividade BAPA-ásica em diferentes cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi.

CULTIVAR	PESO mg . cot ⁻¹	PROTEÍNA mg . cot ⁻¹	ATIVIDADE	
			μmoles . min ⁻¹ . cot ⁻¹	μmoles . min ⁻¹ . mgProt ⁻¹
Seridô	98,7	13,1	0,0472	0,0036
Quebra cadeira	86,0	10,8	0,0378	0,0035
CE - 24	64,2	8,7	0,0356	0,0041
CE - 236	77,7	9,1	0,0300	0,0033
CE - 222	82,0	12,1	0,0411	0,0034
CE - 216	82,7	12,7	0,0419	0,0033

TABELA II - Atividade LPA-ásica em diferentes cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi.

CULTIVAR	PESO mg . cot ⁻¹	PROTEÍNA mg . cot ⁻¹	ATIVIDADE	
			μmoles . min ⁻¹ . cot ⁻¹	μmoles . min ⁻¹ . mgProt ⁻¹
Serfido	98,7	12,9	0,2580	0,0200
Quebra cadeira	86,0	13,4	0,2693	0,0201
CE - 24	64,2	8,3	0,1793	0,0216
CE - 236	77,7	11,1	0,2153	0,0194
CE - 222	82,0	11,3	0,2113	0,0187
CE - 216	82,7	12,5	0,2250	0,0180

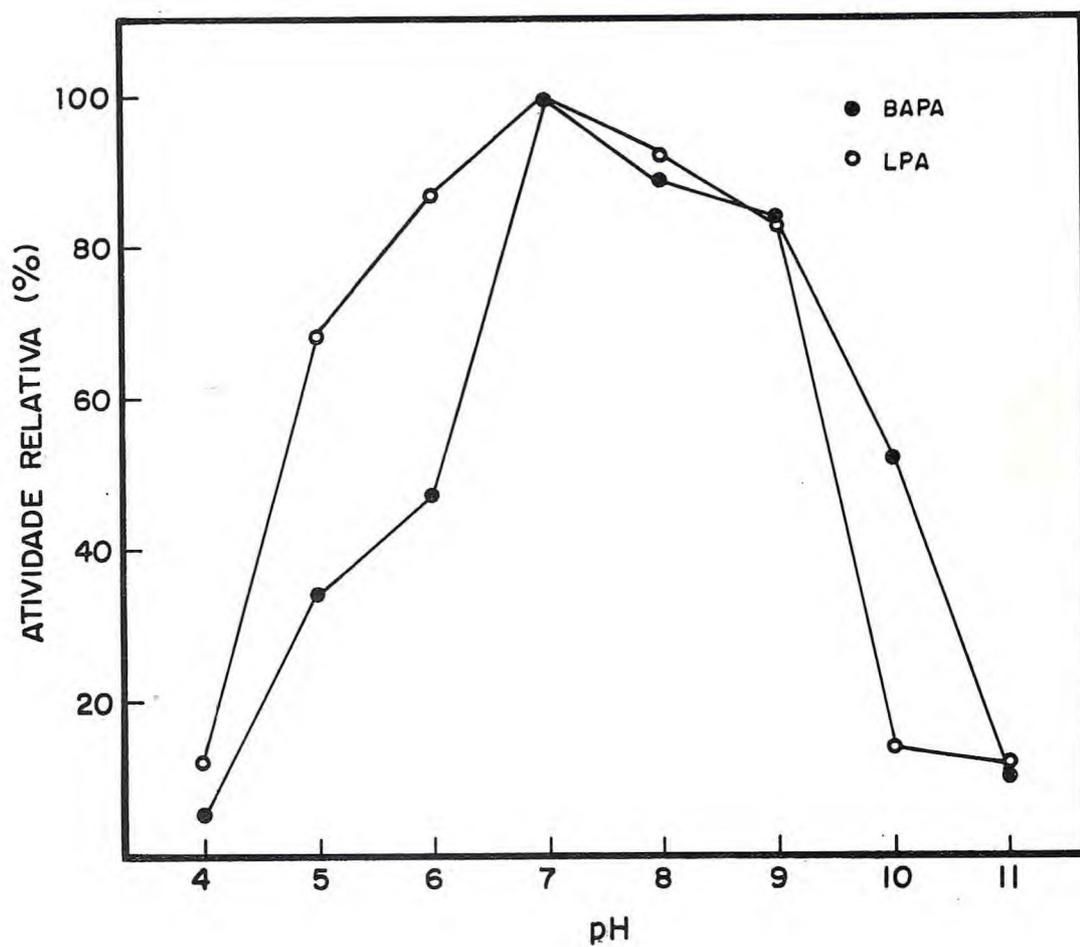


Fig. 7. Efeito do pH sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica em extrato de sementes quiescentes de feijão de corda *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô, preparado em tampão fosfato 0,02 M pH 7,6.

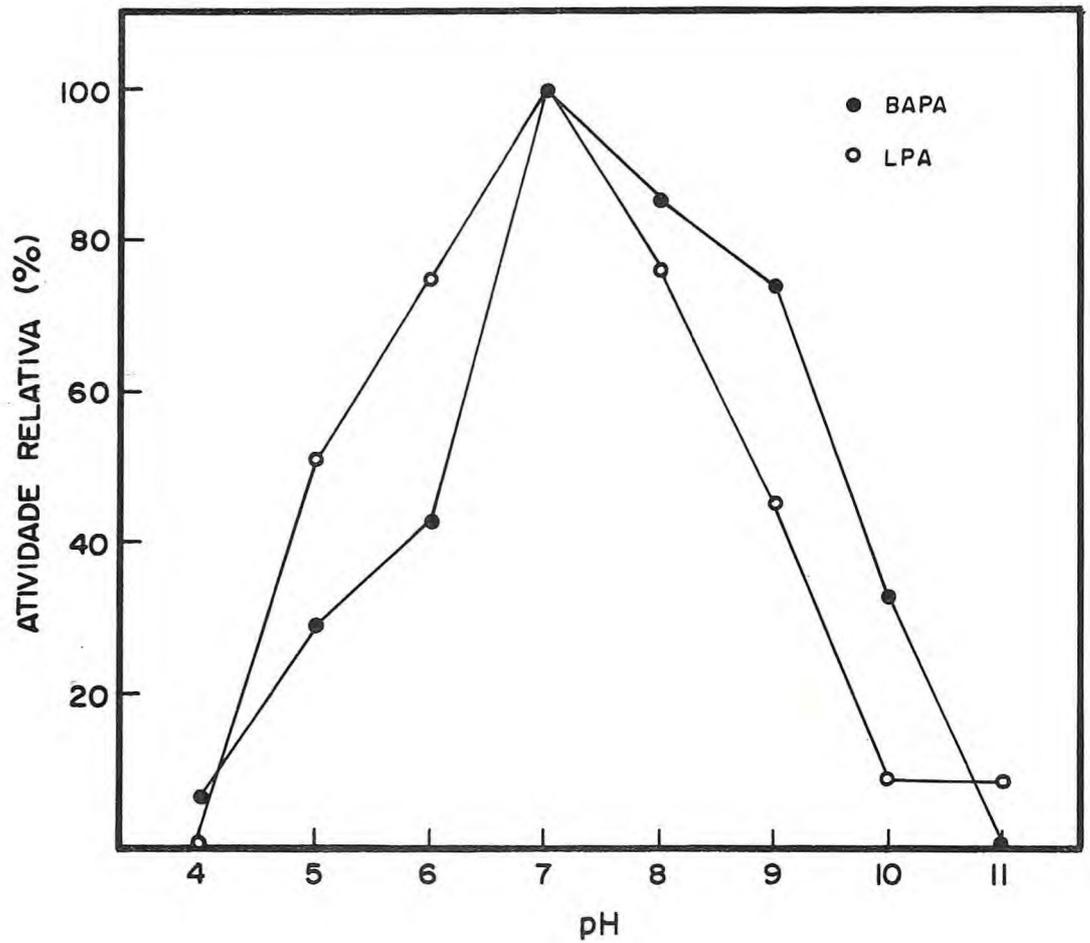


Fig. 8. Efeito do pH sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica em extrato de sementes quiescentes de feijão de corda *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô, preparado em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6 com 2-mercaptoetanol 2 mM.

do o pH do extrato foi levado aos valores desejados pela adição de NaOH ou HCl e preincubados a temperatura ambiente (28°C) por 60 minutos. Verifica-se na figura 7 que o extrato preparado sem 2-mercaptoetanol quando incubado em pH 7, 8 e 9 mantém de 100 a 84% das atividades iniciais. Há um decréscimo acentuado das atividades quando as incubações são feitas em valores de pH acima de 9 e abaixo de 7.

Em presença de 2-mercaptoetanol houve uma perda mais acentuada das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica quando as incubações foram feitas em pH alcalino, como mostra a figura 8. A atividade LPA-ásica ficou reduzida a 10% da atividade inicial em pH 10 e 11 e não apresentou atividade a pH 4. A atividade BAPA-ásica ficou reduzida a 5% da atividade inicial em pH 4 e não apresentou atividade a pH 11.

3. Fracionamento com sulfato de amônio

Para fracionamento com sulfato de amônio o extrato foi preparado com farinha de sementes de feijão e tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6, na proporção 1:5 (farinha: meio de extração).

O extrato de sementes de feijão foi usado para fracionamento por precipitação com sulfato de amônio sólido nos intervalos de saturação de 0 a 25, 25 a 50, 50 a 75 e 75 a 100%, como etapa inicial de purificação da fração protéica, encerrando atividade BAPA-ásica e LPA-ásica.

Os resultados apresentados na figura 9 e tabela III mostram que a fração que precipita no intervalo de 25 a 50% de saturação com sulfato de amônio representa cerca de 14% da proteína total extraída e 97% da atividade BAPA-ásica total presente no extrato inicial. A atividade específica encontrada na fração 25/50 corresponde a uma purificação de 7 vezes.

A figura 10 e a tabela IV referem-se à atividade

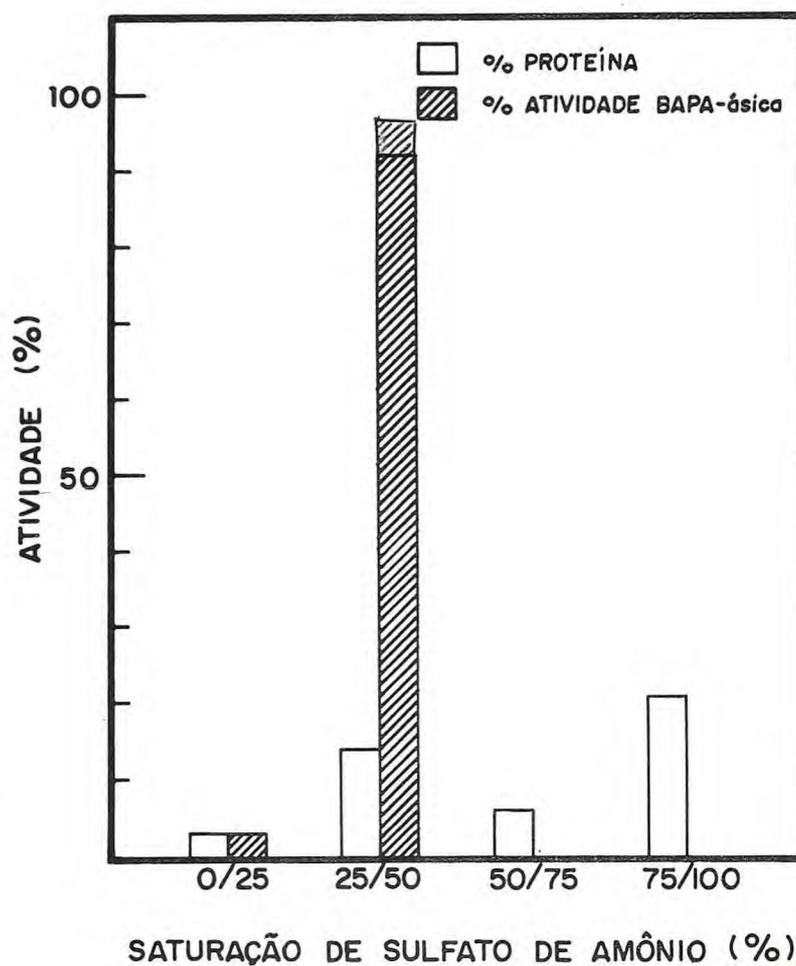


Fig. 9. Atividade BAPA-ásica nas frações obtidas por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio.

TABELA III - Atividade BAPA-ásica nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	PROTEÍNA		ATIVIDADE			
		TOTAL (mg)	%	TOTAL ¹	ESPECÍFICA ²	RECUPERAÇÃO (%)	PURIFICAÇÃO x
Extrato	70	2995,6	100	5,236	0,0017	100	-
0/25	6,8	84	2,8	0,158	0,0019	3	-
25/50	7,5	416	13,8	5,080	0,0122	97	7
50/75	7	180,3	6	0,266	0,0015	-	-
75/100	29,5	631,2	21	-	-	-	-

Os dados referem-se a 70 ml do extrato bruto preparado com tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 usando-se a proporção 1:5 (farinha de feijão : meio de extração).

1 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1}$

2 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$

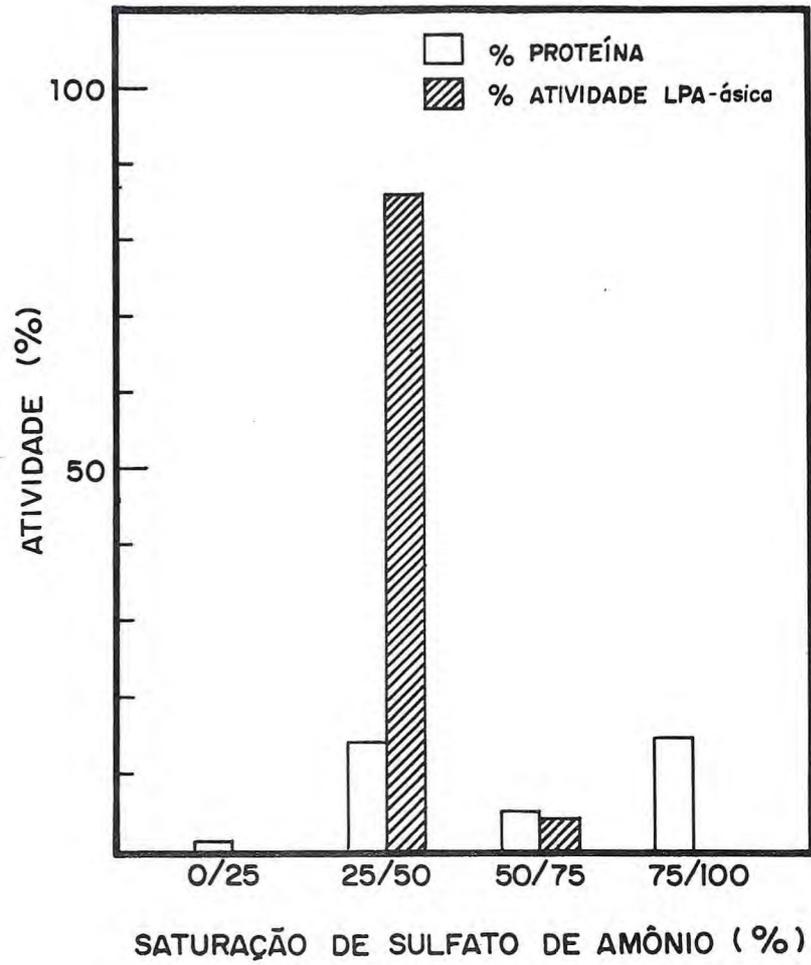


Fig. 10. Atividade LPA-ásica nas frações obtidas por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio.

TABELA IV - Atividade LPA-ásica nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	PROTEÍNA		ATIVIDADE			
		TOTAL (mg)	%	TOTAL ¹	ESPECÍFICA ²	RECUPERAÇÃO (%)	PURIFICAÇÃO x
Extrato	60	1045	100	15,5454	0,0144	100	-
0/25	4	6,3	0,6	0,0242	-	-	-
25/50	6	142,6	13,6	13,4091	0,0939	86,2	6,0
50/75	6	47,5	4,5	0,6455	0,0136	4,1	-
75/100	18	150,5	14,4	0,0053	-	-	-

Os dados referem-se a 60 ml do extrato bruto preparado com tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 usando-se a proporção 1:5 (farinha de feijão : meio de extração).

1 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1}$

2 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

LPA-ásica determinada nas frações obtidas por precipitação do extrato de sementes de feijão com sulfato de amônio sólido. A fração 25/50 encerra cerca de 86% da atividade LPA-ásica presente no extrato inicial e pela determinação da atividade específica há uma purificação de 6 vezes.

Comparando-se os dados das Tabelas III e IV no que diz respeito a proteína total verifica-se que a tabela III apresenta um melhor rendimento do que a tabela IV. Porém com relação a fração 25/50 o rendimento se mantém sempre em torno de 14% da proteína total extraída.

4. Fração 25/50

A fração 25/50 por encerrar a maior percentagem das atividades enzimáticas em estudo foi preparada conforme esquema da figura 11 e usada nos estudos posteriores.

4.1. Termoestabilidade

Quando a fração 25/50 foi incubada a 30°C por 10, 20, 30 e 40 minutos e depois usada para determinação da atividade BAPA-ásica, verificou-se que houve diminuição da atividade enzimática de 6% em 40 minutos. O mesmo foi observado quando a fração 25/50 foi pré-incubada a 40°C por 10, 20, 30 e 40 minutos. Houve um decréscimo de atividade um pouco maior, em torno de 11%, quando a fração 25/50 foi submetida ao aquecimento prévio a 50°C por 30 e 40 minutos. Porém, quando os tempos foram de 10 e 20 minutos o comportamento foi o mesmo apresentado quando do aquecimento a 30 e 40°C. A figura 12 mostra que a atividade BAPA-ásica presente na fração 25/50 apresenta boa estabilidade nas condições empregadas.

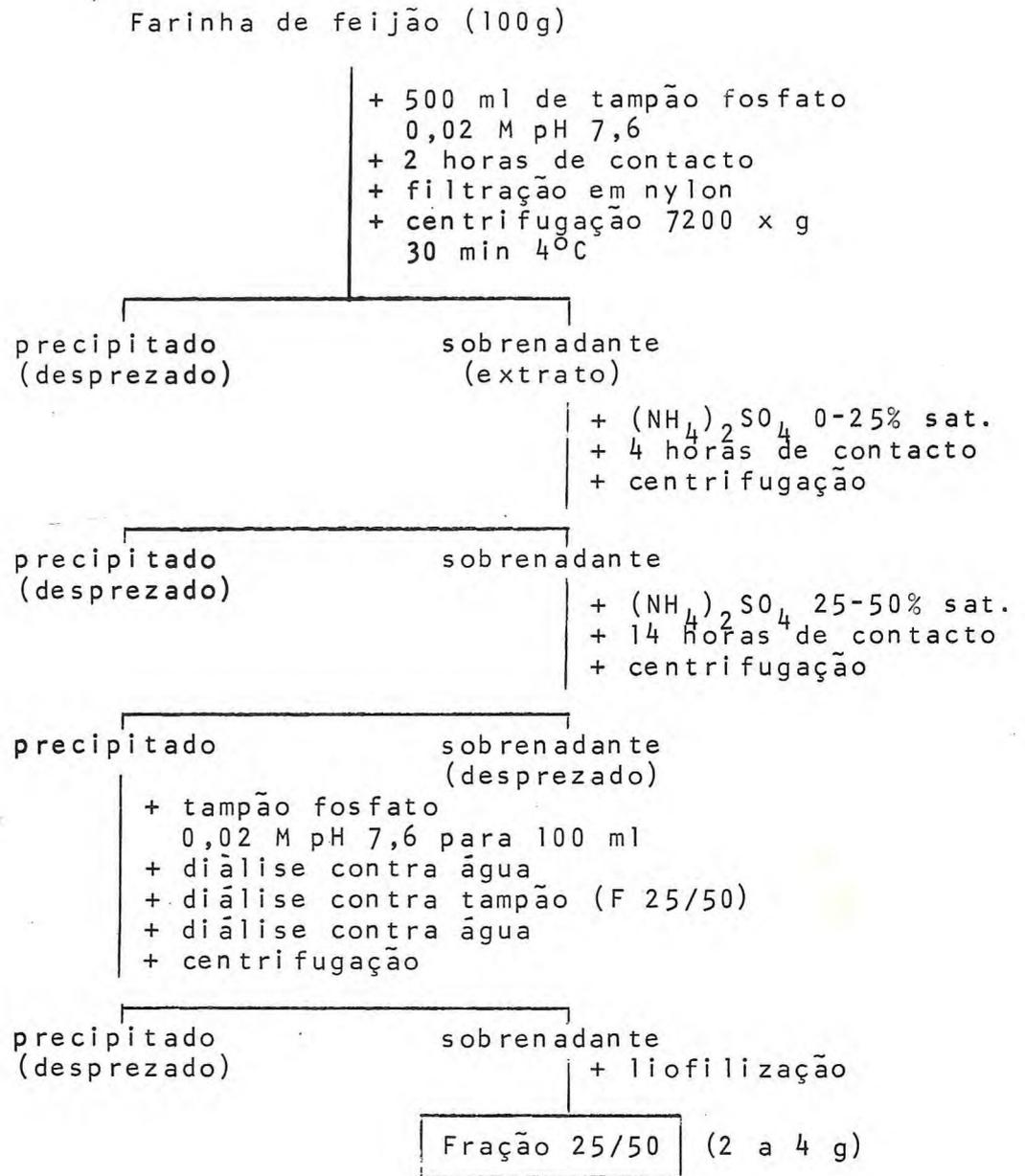


Figura 11. Esquema de obtenção da fração 25/50.

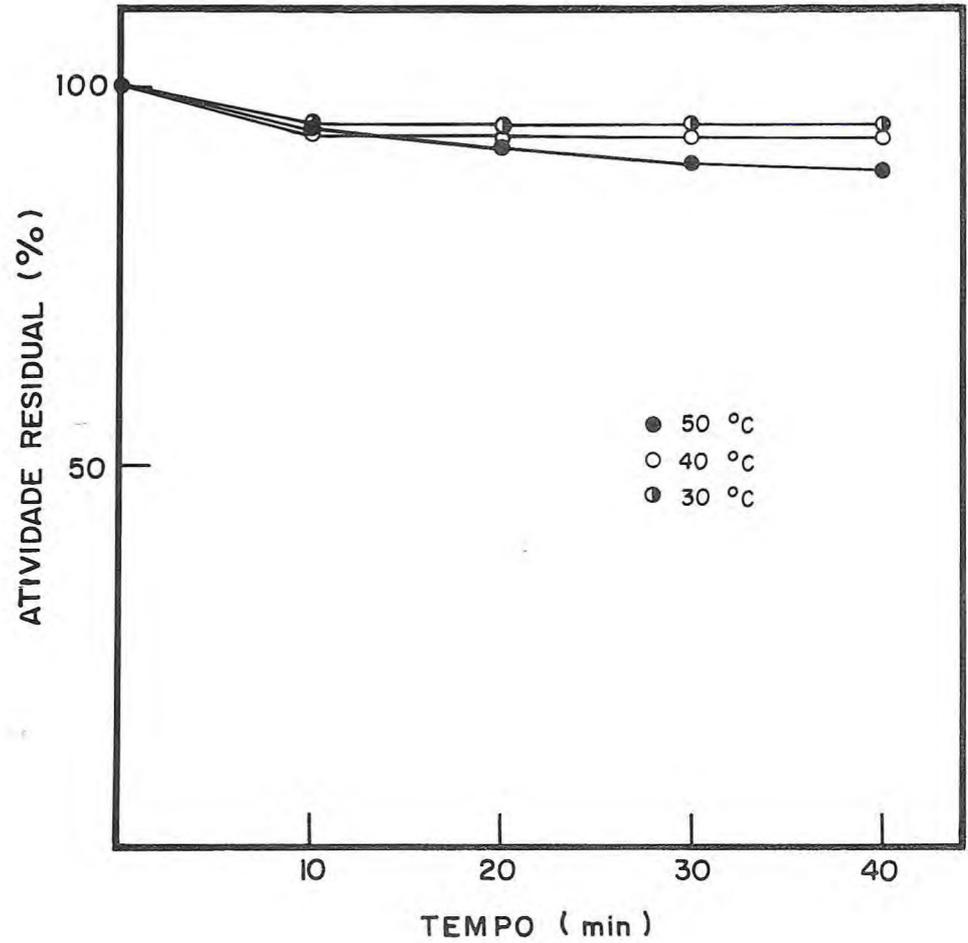


Fig. 12. Termoestabilidade da atividade BAPA-ásica presente na fração 25/50 liofilizada, obtida por precipitação com sulfato de amônio do extrato bruto de sementes quiescentes, no intervalo de 25/50 de saturação.

4.2. Estabilidade ao pH

A tabela V mostra que a fração 25/50, dialisada por 72 horas contra tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M, pH 7,6, perde cerca de 65% e 30% das atividades LPA-ásica e BAPA-ásica, respectivamente.

Tampão borato de sódio 0,025 M, pH 9,7, quando usado na diálise, resultou no desaparecimento da atividade LPA-ásica e na perda de 50% da atividade BAPA-ásica inicial.

Após diálise em pH 5,0, contra os tampões acetato de sódio 0,025 M e citrato de sódio-fosfato 0,025 M, a atividade LPA-ásica foi praticamente destruída e a atividade BAPA-ásica manteve-se em torno de 60% da atividade inicial.

Os precipitados, resultantes das diálises, não mostraram atividade BAPA-ásica e somente o precipitado obtido com diálise contra tampão acetato de sódio apresentou cerca de 15% da atividade LPA-ásica.

Foram também determinadas as quantidades de proteína nos sobrenadantes e nos precipitados das diálises usados nos ensaios de atividade enzimática.

Os sobrenadantes obtidos com os tampões acetato de sódio e citrato de sódio-fosfato pH 5,0 apresentaram menor quantidade de proteína do que os precipitados. O inverso ocorreu com os tampões fosfato de sódio e potássio pH 7,6 e borato de sódio pH 9,7 que apresentaram maior quantidade de proteína nos sobrenadantes.

As percentagens de proteínas recuperadas, após diálise, foram de 75, 100, 69 e 93%, respectivamente para os tampões acetato, citrato-fosfato, fosfato e borato.

TABELA V - Efeito da diálise contra diferentes tampões sobre a estabilidade das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica presentes na fração 25/50

TAMPÃO	pH	PROTEÍNA*		ATIVIDADE SOB.*	
		SOB.	PPT.	BAPA	LPA
Acetato 0,025 M	5,0	26,2	49,0	65,6	3,8
Citrato-fosfato 0,025 M	5,0	32,0	69,7	61,7	5,6
Fosfato 0,020 M	7,6	57,0	11,8	71,5	33,2
Borato 0,025 M	9,7	76,5	16,1	50,0	1,2

* Percentagem em relação a atividade total e o teor total de proteína na fração 25/50 não dialisada.

4.3. Filtração em gel

A figura 13 nos mostra que a fração 25/50 apresenta quatro componentes quando submetida a filtração em gel de Sephadex G-100, com tampão fosfato de sódio pH 7,6. Um componente A, de peso molecular mais alto encerrando atividades contra caseína e hemoglobina (21). O componente B, apresentando um peso molecular em torno de 58.000 daltons capaz de hidrolisar BAPA e LPA. Os componentes C e D de pesos moleculares mais baixos não apresentaram atividade contra os substratos utilizados.

Por filtração em gel obteve-se uma boa recuperação da atividade BAPA-ásica (88%) e uma purificação em torno de 19 vezes com relação a atividade inicial do extrato, como pode ser observado na tabela VI.

A tabela VII refere-se a atividade LPA-ásica da fração 25/50 após filtração em gel de Sephadex G-100. Observa-se uma recuperação de 41% e uma purificação de 7,5 vezes.

4.4. Cromatografia em DEAE-celulose

A principal etapa de purificação e separação das duas peptidases foi a de cromatografia em DEAE-celulose da fração 25/50 obtida por precipitação com sulfato de amônio.

Nos resultados apresentados na figura 14 (DEAE-1), verifica-se que as frações ativas, adsorvidas na coluna, foram eluídas a uma concentração de 0,12 a 0,24 M de NaCl. Todas as frações eluídas foram analisadas para atividades BAPA-ásica e LPA-ásica. O produto final da primeira cromatografia mostrou atividade BAPA-ásica elevada, apresentando um rendimento de 95% e uma purificação de 24 vezes, como pode ser visto na tabela VIII. A atividade LPA-ásica foi quase toda destruída (tabela IX).

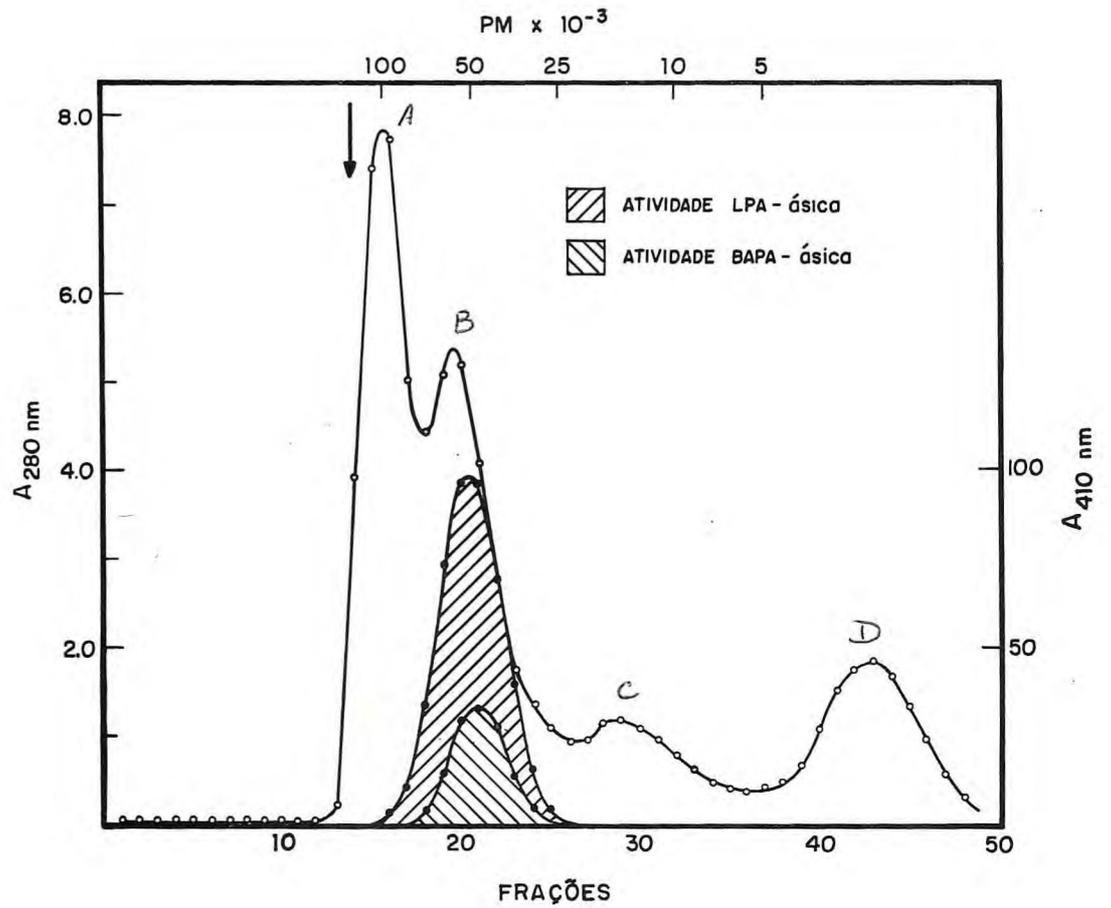


Fig. 13. Cromatografia em SEPHADEX-G-100 da fração 25/50 sem liofilização. Coluna 2,5 x 40 cm; tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6 com NaCl 0,1 M. Fluxo: 30 ml/hora; volume das frações: 5 ml/tubo.

TABELA VI - Atividade BAPA-ásica das frações obtidas por SEPHADEX-G-100.

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ATIVIDADE			
			TOTAL ¹	ESPECÍFICA ²	RECUPERAÇÃO (%)	PURIFICAÇÃO x
Extrato	74	2719	5,1515	0,0019	100	-
25/50	10	387	4,5454	0,0117	88	6,2
Tubos 18-24	35	123	4,5757	0,0371	88,7	19,6
Tubo 22	5	14	1,015	0,0725	-	38,3

1 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1}$

2 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protefna}^{-1}$

TABELA VII - Atividade LPA-ásica das frações obtidas por SEPHADEX-G-100

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ATIVIDADE			
			TOTAL ¹	ESPECÍFICA ²	RECUPERAÇÃO (%)	PURIFICAÇÃO x
Extrato	74	2719	38,1212	0,0140	100	-
25/50	10	387	23,0303	0,0594	60,4	4,2
Tubos 17-24	40	148	15,6060	0,1053	40,9	7,5
Tubo 22	5	14	2,5757	0,1839	-	13,1

1 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1}$

2 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protefna}^{-1}$

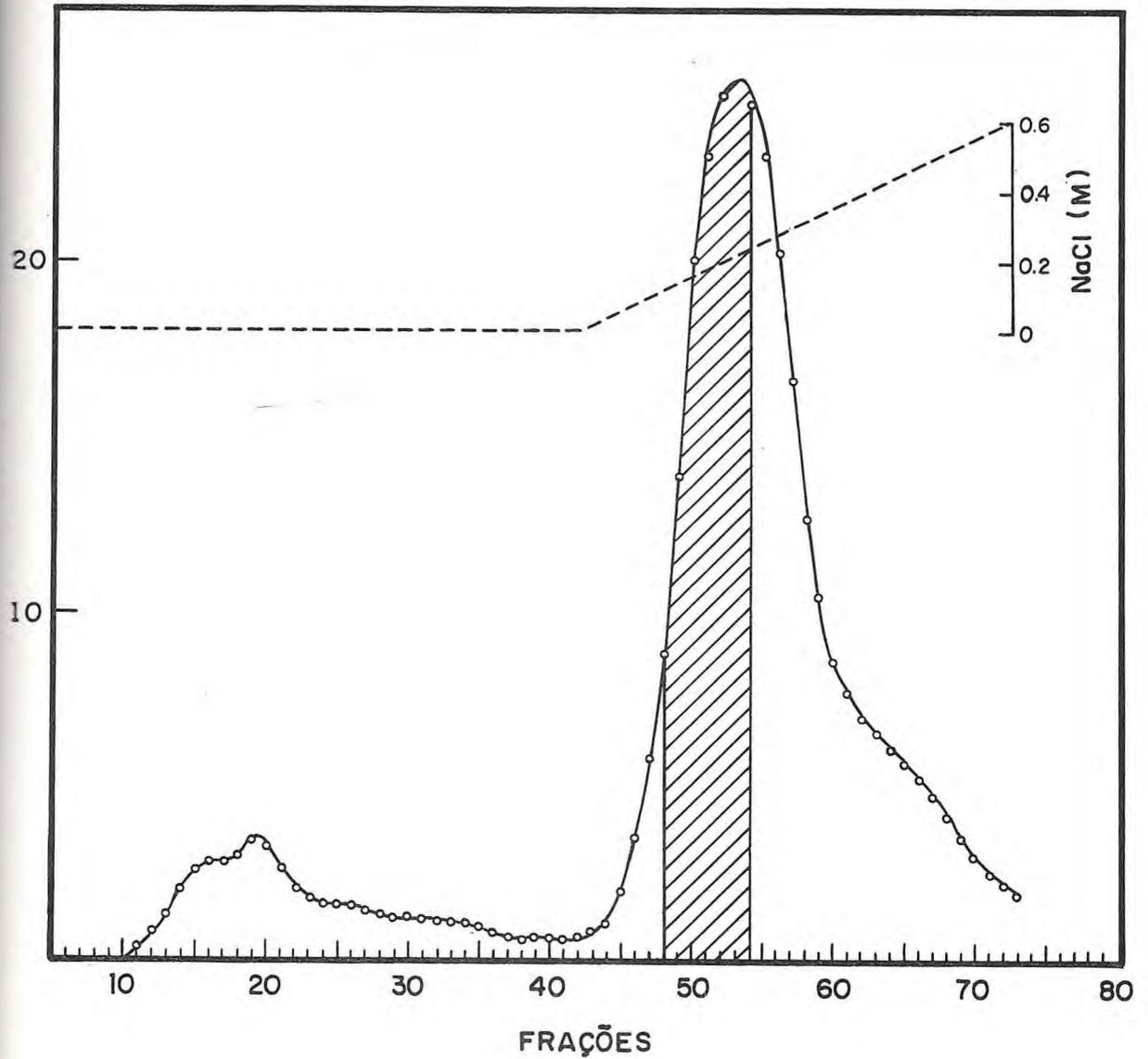


Fig. 14. Cromatografia em DEAE-celulose da fração 25/50 liofilizada. Coluna 35 x 2,5 cm; tampão de partida: fosfato 0,02 M, pH 7,6 seguido por gradiente linear de 0 - 1 M de NaCl. Fluxo: 40 ml/hora; volume das frações: 4 ml/tubo.

TABELA VIII - Purificação da fração com atividade BAPA-ásica presente em sementes de feijão.

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ATIVIDADE			
			TOTAL ¹	ESPECÍFICA ²	RECUPERAÇÃO (%)	PURIFICAÇÃO x
Extrato	380	22367	27,6363	0,0012	-	-
25/50	6,5	237	1,9318	0,0083	100	6,9
DEAE I	28	62	1,8333	0,0295	95	24,3
DEAE II	28	21	1,0454	0,0507	54,1	41,9
DEAE III	12	8,3	0,8121	0,0969	42	80
Tubo 36	4	2,8	0,5212	0,1871	-	154

1 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1}$

2 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protefina}^{-1}$

TABELA IX - Purificação da fração com atividade LPA-ásica presente em sementes de feijão.

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ATIVIDADE			
			TOTAL ¹	ESPECÍFICA ²	RECUPERAÇÃO (%)	PURIFICAÇÃO x
Extrato	380	22367	201,5151	0,0089	-	-
25/50	6,5	237	10,2424	0,0431	100	4,8
DEAE I	28	62	0,5075	0,0007	-	-
DEAE II	28	21	-	-	-	-

1 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1}$

2 - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$

Os efluentes da primeira cromatografia (DEAE-I) foram reunidos, dialisados contra tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M pH 7,6 e recromatografados em uma coluna de DEAE-celulose de menores dimensões (DEAE-II). A eluição foi feita com o mesmo gradiente salino usado na primeira cromatografia, como mostra a figura 15. Os dados da tabela VIII mostram que houve um aumento substancial da atividade específica da enzima BAPA-ase com uma purificação de 42 vezes e um rendimento de 54%.

Os resultados apresentados na figura 16 (DEAE-III) mostram que na última recromatografia a atividade enzimática total está contida no pico principal de proteína, sendo a enzima eluída a um gradiente de concentração de 0,04 a 0,08 M de NaCl. O produto final desta cromatografia (DEAE-III) mostrando atividade somente contra o substrato BAPA, apresentou um rendimento de 42% e uma purificação de 80 vezes. O efluente do tubo 36 apresentou uma atividade específica que corresponde a uma purificação de 154 vezes.

A purificação da fração, com atividade BAPA-ásica por cromatografia em DEAE-celulose, levou a uma perda completa da atividade LPA-ásica, enquanto foi obtida uma purificação de 154 vezes da BAPA-ase presente no extrato de sementes de feijão.

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As frações obtidas nas recromatografias em DEAE-celulose foram examinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os diagramas eletroforéticos representados nas figuras 15 e 16, correspondentes as recromatografias (DEAE-II e DEAE-III), mostram a presença de no máximo quatro componentes e de no mínimo, dois componentes quando corados com negro de amido. O segundo componente de maior mobilidade (R_f 0.95) comum a todos os diagramas é o responsável pela atividade BAPA-ásica, co

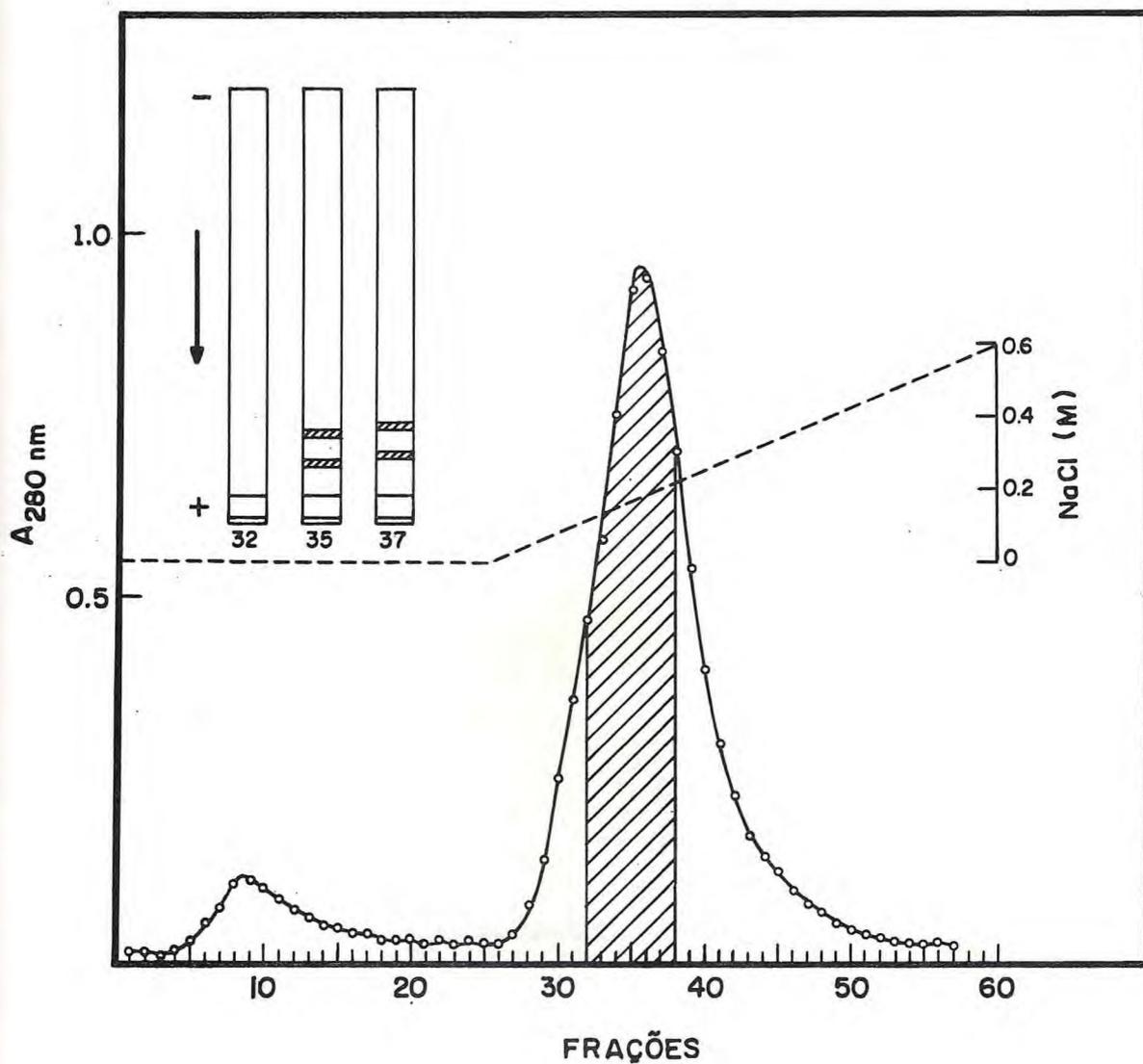


Fig. 15. Recromatografia em DEAE-celulose das frações com atividade BAPA-ásica obtidas na cromatografia da figura 14. Coluna 18 x 1,5 cm; tampão de partida: fosfato 0,02 M pH 7,6 seguido por gradiente linear de 0 - 1 M de NaCl. Fluxo: 40 ml/hora; volume das frações: 4 ml/tubo.

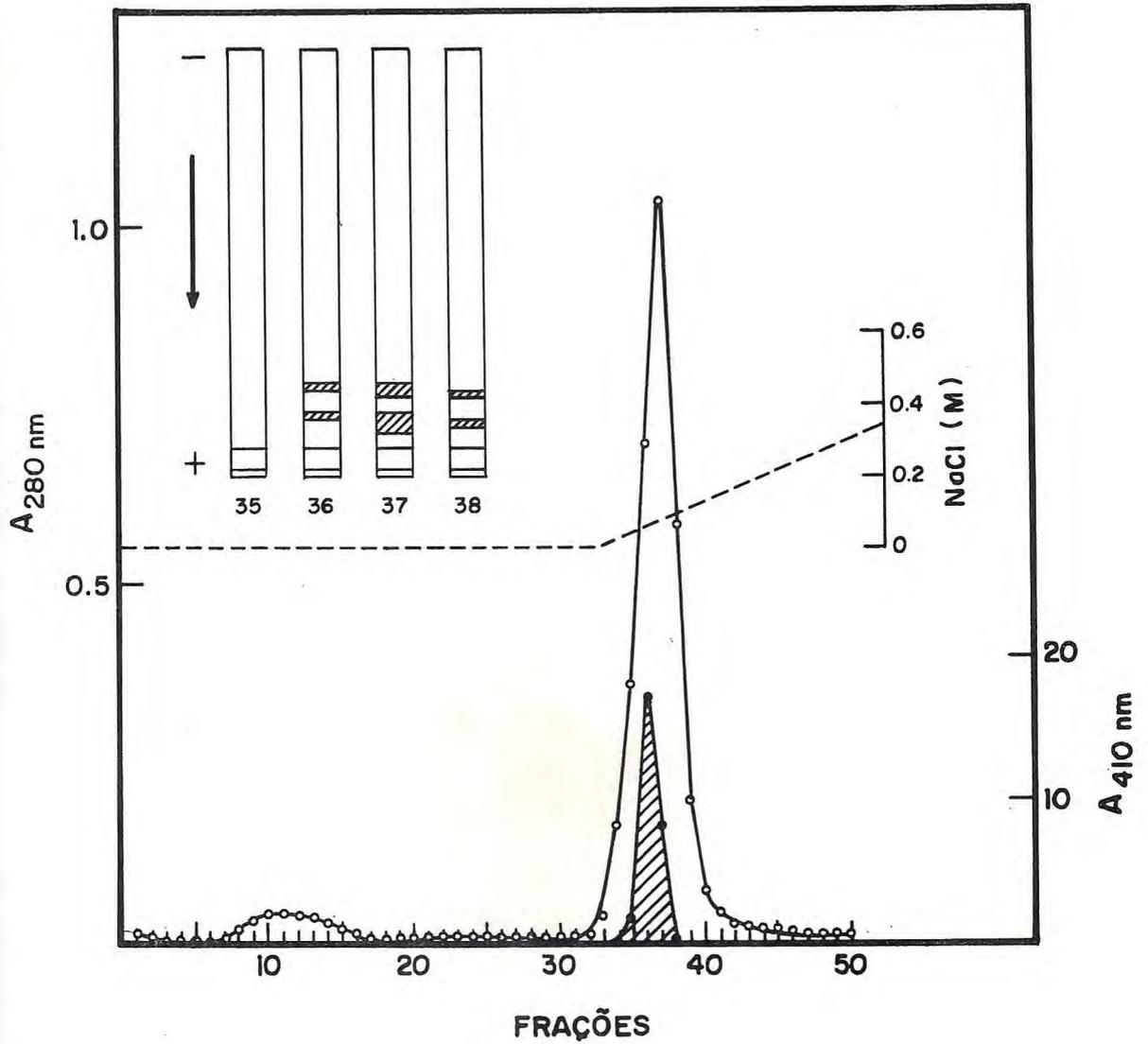


Fig. 16. Segunda recromatografia em DEAE-celulose das frações com atividade BAPA-ásica, obtidas na cromatografia da figura 15. Coluna 18 x 1,5 cm; tampão de partida: fosfato 0,02 M pH 7,6 seguido por gradiente linear de 0 - 1 M de NaCl. Fluxo: 40 ml/hora; volume das frações: 4 ml/tubo.

mo foi confirmado pela coloração com BAPA (20). O mesmo componente deu também reação positiva quando o gel foi tratado por APNE. O componente de maior mobilidade é fixado pelo azul de bromofenol usado para indicar o final das corridas e não apresenta atividade BAPA-ásica.

IV. DISCUSSÃO

A atividade BAPA-ásica encontrada em sementes quiescentes de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridõ mostrou-se mais alta em pH de 7 a 9. Os ensaios de atividade foram feitos em pH 7,6 por ser uma região de atividade máxima aliada a uma maior estabilidade da enzima. Os resultados obtidos estão em boa concordância com aqueles obtidos para trigo germinado (28), trigo maltado (20), ervilha (10) e amendoim. Os autores encontraram atividade máxima nos valores de pH de 7,5 a 9,0 para trigo germinado, 8,6 a 9,1 para trigo maltado, 7 para sementes de ervilha e 8,1 para "arachain".

A estabilidade ao pH da atividade BAPA-ásica presente em extrato de sementes de feijão, preparado em presença de 2-mercaptoetanol, está em concordância com aquela encontrada no estudo de peptidases presentes em extrato aquoso de sementes de cevada (33). Os resultados obtidos na ausência de 2-mercaptoetanol não diferem muito daqueles observados na presença do mesmo reagente, principalmente no que diz respeito a atividade BAPA-ásica. O decréscimo no lado alcalino da curva é mais acentuado para a atividade LPA-ásica. As atividades em estudo apresentam uma maior estabilidade em pH 7 e 8 e a presença de 2-mercaptoetanol parece não alterar as atividades.

A estabilidade térmica da atividade BAPA-ásica presente na fração 25/50 é relativamente alta. Verifica-se que 94% da atividade é mantida quando a amostra é tratada por 40 minutos a temperaturas de 30° e 40°C e há um decréscimo de atividade em torno de 10%, quando pré-incubada a 50°C por 40 minutos. A enzima com atividade BAPA-ásica encontrada em trigo maltado é relativamente termolábil, sendo completamente inativada quando aquecida por 30 minutos a 50°C (20). Em trigo germinado a atividade é eliminada quando do aquecimento por

uma hora a 45°C (28). Burger (9) verificou que o tratamento a 45°C por uma hora resultou na inativação da atividade BAPA-ásica presente em cevada. Graf e Hoagland (17) verificaram que a atividade BAPA-ásica presente em raízes de soja decresce rapidamente após exposição por 5 minutos a 45°C. Quanto à estabilidade, a atividade BAPA-ásica detectada na fração 25/50 pode ser comparada com a hidrólise do BAPA pela "arachain" que é mantida após o tratamento por 15 e 30 minutos a 40°C (11).

O efeito do pH sobre a estabilidade da atividade BAPA-ásica detectada em sementes de feijão é mais acentuado quando a atividade é determinada no extrato e o pH é ajustado com NaOH ou HCl. Verifica-se que quando as mudanças de pH são feitas lentamente por diálise usando-se a fração 25/50 há uma maior estabilidade da atividade BAPA-ásica. Usando-se a fração 25/50 e diálise contra tampão acetato pH 5, há uma recuperação de 65% da atividade e um aumento da atividade específica, enquanto o extrato levado a pH 5 por adição de HCl apresentou uma recuperação de 35%. As atividades BAPA-ásica encontradas em cevada (28) e trigo germinado (28) apresentam boa estabilidade na região de pH entre 5 e 10 quando submetidas a diálise contra diferentes tampões por 18 horas. Embora a atividade específica mais alta tenha sido obtida após diálise da fração contra tampão acetato, houve maior recuperação com o uso de tampão fosfato na diálise.

O peso molecular de 58.000 daltons encontrado, por filtração em gel de Sephadex G-100, para o componente da fração 25/50 encerrando as atividades BAPA-ásica e LPA-ásica é comparável com os valores de 59.000 para o trigo maltado, 60.000 para amendoim, 63.000 para soja e 65.000 para ervilha (10). A recuperação da atividade BAPA-ásica por filtração em gel pode ser comparada com aquela encontrada para raízes de soja (17), sendo que a purificação é maior para o feijão.

A fração 25/50, quando liofilizada e submetida a

cromatografia e recromatografias em DEAE-celulose em pH 7,6, foi em sua quase totalidade retida na coluna e o componente eluído a uma concentração de 0,04 a 0,08 M de cloreto de sódio apresentou maior atividade BAPA-ásica. Porém, o tratamento por DEAE-celulose não levou a uma purificação suficiente de modo a permitir uma melhor caracterização da enzima.

As frações obtidas por cromatografia, quando submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentam um componente com atividade BAPA-ásica de $R_f = 0,95$. Observa-se que o mesmo é acompanhado de dois ou três outros componentes que não têm atividade BAPA-ásica, como pode ser verificado pelos diagramas eletroforéticos. A banda que deu reação positiva com o BAPA, indicativa da quebra de ligação amídica, deu também reação positiva com o APNE, indicando a quebra de ligação éster. Isto nos levou a pensar que a enzima é responsável por essas duas atividades como no caso da peptídio-hidrolase A de cevada.

O presente trabalho não nos permite atribuir a enzima uma função precisa do ponto de vista da fisiologia da planta. Beevers (5) sugere que enzimas capazes de usar o BAPA como substrato podem ser consideradas peptidases que provavelmente estão associadas com a utilização das proteínas de reserva, enquanto as enzimas caseinolíticas estariam relacionadas com a degradação e "turnover" das proteínas associadas com o crescimento e desenvolvimento. Isto porque embora o BAPA seja sugerido como um substrato para enzimas do tipo tripsina, o desenvolvimento da atividade caseinolítica (tipo tripsina) em sementes germinantes é completamente diferente daquele registrado para a atividade BAPA-ásica em ervilha (5) (6) e em cevada (9). Em *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô parece que as enzimas responsáveis pelas atividades caseinolítica e BAPA-ásica são diferentes, tendo em vista a filtração em gel de Sephadex G-100 da fração 25/50.

V. CONCLUSÕES

1. As atividades BAPA-ásica e LPA-ásica em diferentes cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi apresentaram-se iguais.
2. A atividade BAPA-ásica é cerca de 5 vezes menor do que a atividade LPA-ásica tanto nos cotilédones como no eixo embrionário de sementes de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô.
3. A fração do extrato de sementes que precipita entre 25 e 50% de saturação com sulfato de amônio encerra cerca de 97 e 86% das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica respectivamente.
4. A atividade BAPA-ásica detectada na fração 25/50 é estável ao aquecimento a 40°C por 40 minutos e sofre um decréscimo de cerca de 10% quando aquecida a 50°C durante o mesmo tempo.
5. A atividade BAPA-ásica na fração 25/50 é estável na região de pH em torno de 7 e 8 e a presença de 2-mercaptoetanol parece não alterar a atividade.
6. A fração 25/50 quando submetida a filtração em gel de Sephadex G-100 em pH 7,6 apresenta um componente com peso molecular de 58.000 daltons, encerrando as atividades BAPA-ásica e LPA-ásica.
7. Por cromatografia em DEAE pH 7,6 e um gradiente linear de NaCl foi possível purificar 80 vezes o componente da fração 25/50 associado a atividade BAPA-ásica.

8. Por eletroforese em gel, das frações obtidas por cromatografia em DEAE, verifica-se que o componente associado a atividade BAPA-ásica apresenta um $R_f = 0,95$.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Ashton, F.M. 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. Ann. Rev. Plant Physiol., 27, 95-117.
2. Bailey, J.L. 1967. Techniques in protein chemistry. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, pp. 341.
3. Baumgartner, B. and Chrispeels, M.J. 1976. Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. Plant Physiol., 58, 1-6.
4. Baumgartner, B. and Chrispeels, M.J. 1977. Purification and characterization of vicilin peptidehydrolase, the major endopeptidase in the cotyledons of mung bean seedlings. Eur. J. Biochem., 77, 223-233.
5. Beevers, L. 1968. Protein degradation and proteolytic activity in the cotyledons of germinating pea seeds. (*Pisum sativum*). Phytochem., 7, 1837-1844.
6. Beevers, L. and Splittstoesser, W.E. 1968. Protein and nucleic acid metabolism in germinating peas. J. Exp. Bot., 19, 698-711.
7. Burger, W.C. 1966. The proteases of barley and malt: recent research. Cereal Sci. Today, 11, 19-23.
8. Burger, W.C., Prentice, N., Kastenschmidt, J. and Huddle, J.D. 1966. Partial purification of proteases from germinated barley. Cereal Chem., 43, 546-554.
9. Burger, W.C., Prentice, N., Kastenschmidt, J. and Moeller, M. 1968. Partial purification and characterization of barley peptide hydrolases. Phytochem., 7, 1261-1270.

10. Caldwell, J.B. and Sparrow, L.G. 1976. Partial purification and characterization of two peptide hydrolases from pea seeds. Plant Physiol., 57, 795-798.
11. Cameron, E.C. and Mazelis, M. 1971. A nonproteolytic "trypsin-like" enzyme, Plant Physiol., 48, 278-281.
12. Clarke, J.T. 1964. Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 428-436.
13. Cyril Long, Ed. 1961. Biochemist's Handbook. F. and F. N. Spon Ltda. London. pp. 32-41.
14. Dechary, J.M. 1970. Seed proteases and protease inhibitors. Econ. Bot., 24, 113-122.
15. Determann, H. and Michel, W. 1966. The correlation between molecular weight and elution behavior in the gel chromatography of proteins. J. Chromatog., 25, 303-313.
16. Erlanger, B.F., Nicholas, K. and William, C. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys., 95, 271-278.
17. Graf, G. and Hoagland, R.E. 1969. Partial purification and characterization of an amidohydrolase from soybean. Phytochem., 8, 827-830.
18. Harris, N. and Chrispeels, M.J. 1975. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans. Plant Physiol., 56, 292-299.
19. Irving, G.W., Jr., and Fontaine, T.D. 1945. Purification and properties of arachain, a newly discovered proteolytic enzyme of peanut. Arch. Biochem. 6, 351-364.
20. Kruger, J.E. 1971. Purification and some properties of malted-wheat BAPA-ase. Cereal Chem., 48, 512-522.

21. Lima Ainouz, I., Albuquerque, A.U., Benevides, N.B. and Ponte, A.L. 1978. Endo and exopeptidases in *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridõ. 2nd. Congress PAABS, Caracas, Venezuela.
22. Miège, M-N., Mascherpa, J-M., Royer-Spierer, A., Grange, A. and Miège, J. 1976. Analyse des corps proteiques isolés de *Lablab purpureus* (L.) Sweet: localization intra cellulaire des glubolines, protéases et inhibiteurs de la trypsine. Planta (Berl.), 131, 81-86.
23. Millerd, A. 1976. Biochemistry of legume seed protein. Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 53-72.
24. Moeller, M., Burger, W.C. and Prentice, N. 1969. Purification of a barley peptidehydrolase by disc electrophoresis. Phytochem. 8, 2153-2156.
25. Nakano, M. and Asahi, T. 1973. Increases in activities of membrane-bound hydrolases in pea cotyledons during germination. Plant and Cell Physiol., 14, 1205-1208.
26. Nakano, M. and Asahi, T. 1974. Isolation of membrane containing protease from cotyledons of germinating pea seeds. Plant and Cell Physiol., 15, 331-340.
27. Ory, R.L. and Henningsen, K.W. 1969. Enzymes associated with protein bodies isolated from ungerminated barley seeds. Plant Physiol., 44, 1488-1498.
28. Prentice, N., Burger, W.C. and Moeller, M. 1968. Partial purification and characterization of peptide hydrolases from germinated wheat. Phytochem., 7, 1899-1905.
29. Royer, A., Miège, M.N., Grange, A., Miège, J. and Mascherpa, J-M. 1974. Inhibiteurs anti-trypsine et activités protéolytiques des albumines de graine de *Vigna unguiculata*. Planta (Berl.), 119, 1-16.

30. Royer, A. 1975. Activites protéolytiques et anti-trypsi-
ne des graines de *Vigna unguiculata*: repartition et
interaction. Phytochem., 14, 915-919.
31. Ryan, A.C. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibi-
tors in plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 123-126.
32. Sephadex gel filtration in theory and practice. 1968.
Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden.
33. Sopanen, T. and Mikola, J. 1975. Purification and
partial characterization of barley leucine aminopepti-
dase. Plant Physiol., 55, 809-814.
34. Uchoa de Albuquerque, A. 1977. Atividade LPA-ásica em
sementes de feijão de corda *Vigna sinensis* (L.) Savi
cv. seridô. Fortaleza - UFC. Dissertação de mestrado
em Bioquímica.
35. Uriel, J. and Berges, J. 1968. Characterization of
natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by
electrophoresis in acrylamide-agarose gels. Nature,
218, 578-580.
36. Xavier Filho, J. and Lima Ainouz, I. 1977. Proteinase
inhibitors in meal of Anacardium occidentale seeds.
Biol. Plant., 19, 183-189.

VII. COMUNICAÇÃO A CONGRESSO

065 ENDO- AND EXOPEPTIDASES IN Vigna sinensis
(L.) Savi cv. seridõ.
I. LIMA AINOZ, A. U. ALBUQUERQUE, N. B. BENE-
VIDES, and A. L. PONTE

Universidade Federal do Ceará, Depto. de Bioquímica
e Biologia Molecular, Caixa Postal, 1065, Fortaleza,
Ceará, BRASIL.

Endo- and exopeptidase activities were studied in cotyledons of ungerminated and germinated seeds of Vigna sinensis (L.) Savi cv. seridõ using casein, hemoglobin, L-Leucine-p-nitroanilide (LPA), and alpha-N-Benzoyl-arginine-p-nitroanilide (BAPA) as substrates.

The following assay conditions were used: NaK-phosphate buffer pH 6.0, 60 min, 50°C for 1% casein; Na-citrate buffer pH 3.5, 60 min, 40°C for 1% hemoglobin; NaK-phosphate buffer pH 7.0, 15 min, 40°C for 3×10^{-4} M LPA; and NaK-phosphate buffer pH 7.6, 15 min, 40°C for 5×10^{-4} M BAPA.

Total activities of caseinase and hemoglobinase increase in cotyledons up to the third day of germination and decrease until the sixth day. Total activities of LPA-ase and BAPA-ase decrease in cotyledons during germination from day 0 to day 6 following the protein depletion.

Most of the activities detected in the crude extract (NaCl 0.1 M in phosphate buffer pH 7.6) from ungerminated seeds could be precipitated by ammonium sulfate 25 to 50 per cent saturation. The precipitate retains 60, 80, 85, and 96% of the caseinase, hemoglobinase, LPA-ase and BAPA-ase activities, respectively. The activities also remain in the soluble fraction after dialysis of the crude extract against water. When submitted to gel filtration (Sephadex G-100) the 25/50 per cent fraction shows two active peaks: one with both caseinase and hemoglobinase activities (MW 100,000) and other corresponding to LPA-ase and BAPA-ase activities (MW 56,000).

Segundo Congresso de PAABS

Caracas - Venezuela, 1978.