

ATIVIDADE HEMOGLOBINÁSICA EM COTILÉDONES DE
Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. SERIDÓ

Carbene França Lopes

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

1980

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 nesta dissertação é permitida desde que se faça a citação necessária.

Carbene França Lopes

Iracema Lima Ainouz
Orientadora da Dissertação

Data

José Xavier Filho

Data

Renato de Azevedo Moreira

Data

À meus pais e irmãos

iii

AGRADECIMENTOS

À professora Iracema Lima Ainouz , pela orientação dedicada e amiga durante a realização deste trabalho.

Aos professores José Xavier Filho e Renato de Azevedo Moreira, pelo incentivo, valiosas sugestões e apoio durante a execução do presente trabalho.

À Fundação Universidade Federal de Mato Grosso, nas pessoas do Magnífico Reitor e do Coordenador do Centro de Ciências Agrárias, sem cuja valiosa colaboração não teria sido possível concretizar este trabalho.

A todos os professores, colegas e demais funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo estímulo e amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças às seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES/PICD), pelo convênio com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Programa de Ensino Agrícola Superior (PEAS) pela bolsa de Pós-Graduação concedida ao autor.

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

INDICE GERAL

	Página
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Abreviaturas	xiii
Sumário	xiv
I. Introdução	1
II. Materiais e Métodos	18
II.A. Materiais	18
1. Sementes	18
2. Outros materiais	18
II.B. Métodos	19
1. Preparação da farinha	19
2. Preparação dos extratos	19
3. Determinação de proteína.....	20
4. Fracionamento com sulfato de amônio.....	20
5. Preparação da fração 25/50.....	21
6. Preparação do inibidor bruto de feijão....	21
7. Preparação da Sepharose-hemoglobina.....	23
8. Preparação das soluções dos substratos....	25
8.1. Hemoglobina.....	25
8.2. Caseína.....	25
8.3. BAPA	26
8.4. LPA	26
9. Determinação das atividades enzimáticas...	26
9.1. Atividade BAPA-ásica.....	26
9.2. Atividade LPA-ásica.....	27

	Página
9.3. Atividade hemoglobínásica.....	27
9.4. Atividade caseínásica.....	28
9.5. Atividade anti-tríptica.....	28
10. Unidades de atividade.....	29
10.1. Atividades hemoglobínásica e caseíná sica.....	29
10.2. Atividades LPA-ásica e BAPA-ásica...	29
11. Ação do inibidor bruto sobre a hemoglobina se	30
12. Cromatografia em Sepharose-hemoglobina....	30
13. Cromatografia de troca iônica - SP-Sepha- dex C-50.....	32
14. Filtração em gel de dextrana - Sephadex G-100.....	32
15. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	33
III. Resultados	35
1. Comportamento das proteases no extrato e nas frações obtidas por diálise.....	35
2. Fracionamento com sulfato de amônio.....	42
3. Cromatografia em Sepharose-hemoglobina.....	45
4. Cromatografia em SP-Sephadex C-50.....	48
5. Cromatografia em Sephadex G-100 - filtração em gel	58
6. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	63
7. Atividade inibitória.....	63
8. Efeito do inibidor bruto sobre a atividade hemoglobínásica.....	67

	Página
IV. Discussão	73
V. Conclusões	79
VI. Bibliografia.....	80
VII. Comunicações a congressos.....	89

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página*
1. Esquema de obtenção da fração 25/50	22
2. Atividade hemoglobínica no extrato bruto.....	36
3. Cromatografia em Sepharose-4B da fração 25/50...	49
4. Cromatografia em Sepharose-hemoglobina da fração 25/50 com atividade hemoglobínica.....	50
5. Cromatografia em Sepharose-hemoglobina da fração com atividade caseínica.....	51
6. Cromatografia em SP-Sephadex C-50 da fração da cromatografia de afinidade com atividade hemoglo binásica.....	55
7. Cromatografia em SP-Sephadex C-50 da fração da cromatografia de afinidade com atividade caseíná sica.	56
8. Recromatografia em SP-Sephadex C-50.....	57
9. Cromatografia em Sephadex G-100 a pH 7,6 da fra ção 25/50.....	59
10. Cromatografia em Sephadex G-100 a pH 5,0 da fra ção 25/50.. ..	60
11. Cromatografia em Sephadex G-100 a pH 2,9 da fra ção 25/50.....	61
12. Cromatografia em Sephadex G-100 dos picos I e II da cromatografia em SP-Sephadex C-50.....	62

Figura	Página
13. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	64
14. Cromatografia da fração 25/50 em Sephadex G-100..	70
15. Efeito do inibidor bruto sobre a atividade hemo globinásica.	71

INDICE DE TABELAS

Tabela	Página
I. Atividade hemoglobínásica nas frações após diálise contra água.....	37
II. Atividade caseinásica nas frações após diálise contra água.....	39
III. Atividade LPA-ásica nas frações após diálise contra água:.....	40
IV. Atividade BAPA-ásica nas frações após diálise contra água.....	41
V. Atividade hemoglobínásica nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.....	43
VI. Atividade caseinásica nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.....	44
VII. Atividade LPA-ásica nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.....	46
VIII. Atividade BAPA-ásica nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio	47
IX. Purificação da fração com atividade hemoglobi násica	52
X. Purificação da fração com atividade caseinási ca	53
XI. Atividade anti-tríptica nas diversas frações com atividade proteolítica.....	65

Tabela	Página
XII. Atividade hemoglobínásica nas frações e picos ativos da cromatografia em SP-Sephadex C-50...	66
XIII. Atividade anti-tríptica nos picos da cromatografia em Sephadex G-100 da fração 25/50.....	68
XIV. Atividade hemoglobínásica nos picos da cromatografia em Sephadex G-100 da fração 25/50....	69

ABREVIATURAS USADAS

BAPA	- α -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
CM- elulose	- carboximetil-celulose
DEAE-celulose	- dietilaminoetil-celulose
LPA	- L-leucina-p-nitroanilida
SP-Sephadex	- sulfopropil-sephadex
SDS	- sódio dodecil sulfato
TCA	- ácido tricloroacético

SUMÁRIO

Um sistema proteolítico ácido, capaz de hidrolisar hemoglobina foi purificado 26 vezes por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica, a partir de cotilédones quiescentes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridó.

As frações obtidas por cromatografia de troca iônica (SP-Sephadex C-50), quando submetidas a cromatografia em gel de dextrana (Sephadex G-100) em pH 2,9, apresentaram pesos moleculares de 69.200 e 45.000 daltons.

O sistema proteolítico ácido mostrou-se bastante complexo, com forte tendência de dissociação em pH ácido extremamente sensível aos tratamentos empregados na purificação, especialmente após a remoção de parte dos inibidores de tripsina endógenos.

Evidenciou-se a presença de um outro sistema proteolítico que tem a habilidade de hidrolisar a caseína a pH 6,0, com características semelhantes ao sistema ácido, não sendo possível separá-los pelas técnicas empregadas na purificação.

Aparentemente os inibidores de tripsina endógenos não regulam a atividade proteolítica, mas há evidências de que os mesmos estabilizam a atividade enzimática.

I - INTRODUÇÃO

O esclarecimento dos eventos relacionados com as etapas iniciais do processo germinativo tem sido objeto de intensas pesquisas por parte de bioquímicos e fisiologistas, principalmente com relação ao papel das enzimas proteolíticas presentes nas sementes nos primeiros estágios da germinação. Ainda não se conseguiu estabelecer um consenso com relação ao controle das enzimas proteolíticas, a mobilização das proteínas de reserva e as mudanças que ocorrem nos órgãos de armazenamento durante a germinação.

Um grande número de enzimas proteolíticas de vários vegetais têm sido estudado extensivamente, particularmente em sementes germinadas, onde suas atividades tem sido relacionadas com os eventos do crescimento e desenvolvimento da plântula (44). Poucas referências no entanto existem com relação ao estudo das enzimas proteolíticas presentes em sementes não germinadas.

As dificuldades encontradas no isolamento e purificação das enzimas proteolíticas de sementes, constituem um dos maiores obstáculos para a caracterização dessas importantes enzimas. Um deles é a baixa atividade proteolítica e a tendência dessas proteases de se agregarem com outras proteínas (12). Um outro é a sua relativa labilidade sob as condições frequentemente requeridas para a sua purificação

ção (10). Além disso, a falta de ensaios adequados para a detecção das enzimas proteolíticas têm constituído uma séria limitação ao seu estudo. Substratos inapropriados, tanto de origem animal como sintéticos, são frequentemente usados porque a hidrólise das proteínas de reserva não é detectada por esses métodos (4). Ocasionalmente diferenças marcantes no desenvolvimento da atividade proteolítica tem sido observadas com diferentes substratos ou diferentes métodos utilizados para detectar os produtos de hidrólise(4) A maior limitação a esses métodos é que enzimas proteolíticas nativas de sementes germinantes podem ter uma alta especificidade para as proteínas de reserva e assim não atuar sobre esses substratos (43).

Classificação

A necessidade de se conhecer os mecanismos envolvidos na mobilização das proteínas de reserva durante a germinação proporcionou o isolamento de um grande número de enzimas proteolíticas e levou a necessidade de uma classificação adequada. Entretanto, para a classificação de uma enzima é preciso caracterizá-la totalmente e muitas têm sido classificadas como "proteases" por indefinição de sua especificidade.

As enzimas proteolíticas podem ser classificadas:
1. com relação à origem em proteinases animal, vegetal e microbiana; 2. com relação à natureza de seu centro ativo em: a) serino proteinases, que têm um resíduo de serina no

seu centro ativo e são inibidas por diisopropilfosfofluoridrato e outros organofosforados; b) tiol:proteinasas, que dependem de um grupo sulfidril intacto no seu centro ativo e são inibidas por reagentes tiólicos; c) metalo proteinasas, que dependem para a sua atividade de cátions divalentes, sendo inativadas por agentes quelantes e algumas vezes por simples diálise; d) proteinasas ácidas, que contêm um ou mais grupos carboxílicos no centro ativo; 3. de acordo com o seu ponto de ataque na cadeia polipeptídica em: a) exopeptidasas, proteinasas que clivam resíduos C- ou N-terminais; b) endopeptidasas, que clivam resíduos situados dentro da cadeia polipeptídica; c) dipeptidasas, que necessitam da presença de um grupo α -amino e um α -carboxílicos carregados e vizinhos (36).

Localização

Pouco se tem feito com relação à distribuição e aos níveis relativos de atividade proteolítica nas várias partes da planta e sobre sua localização intracelular. Os primeiros trabalhos com semente germinada e quiescente, foram feitos com homogenatos e sem qualquer preocupação com sua localização. Investigações utilizando camadas de aleurona isoladas, separação de organelas e métodos histoquímicos entre outros, têm possibilitado o estudo da localização de algumas dessas enzimas.

Os cotilédones de sementes de leguminosas contém grande quantidade de proteínas de reserva localizadas nos

corpos proteicos e, observação de sua morfologia durante a germinação (25), indicam que a membrana que os envolve permanece intacta enquanto as reservas desaparecem, sugerindo que as mesmas podem sofrer autólise.

O exame dessas organelas tem despertado bastante interesse, particularmente no que diz respeito aos mecanismos catabólicos das proteínas de reserva, bem como a localização intracelular das enzimas proteolíticas. A maioria dos trabalhos envolvem o isolamento dos corpos proteicos de sementes não germinadas, devido ao decréscimo da estabilidade dos mesmos com o decorrer da germinação (4).

Yatsu e Jacks (59), isolaram corpos proteicos de sementes não germinadas de algodão e verificaram que os mesmos encerram toda atividade proteolítica ácida, com pH ótimo entre 1-2 e 3-4, usando hemoglobina como substrato.

Uma protease ácida que hidrolisa gelatina foi encontrada em corpos proteicos de sementes de cevada não germinada (39). Foi também examinada a natureza das proteases ácidas liberadas por corpos proteicos de sementes de cevada em resposta ao ácido giberélico (52), encontrando-se como principal componente liberado uma enzima SH-dependente com pH ótimo 3,9.

Isolando corpos proteicos de sementes não germinadas de cânhamo, St Angelo e col. (50), demonstraram a presença de uma protease ácida com pH ótimo de 2,2 utilizando hemoglobina como substrato e pH 4,3 usando edestina.

Harris e Chrispeels (25), isolaram corpos proteicos de cotilédones germinantes de Phaseolus aureus e observaram sua morfologia durante a germinação, verificando que a membrana circundante permanece intacta enquanto as proteínas de reserva desaparecem. Observaram que os corpos proteicos continham atividade caseinásica, carboxipeptidásica, α -manosidásica e N-acetil- β -glucosamidásica e o citoplasma continha toda ou quase toda atividade leucinoaminopeptidásica e do tipo tripsina. A incubação dos corpos proteicos isolados resultou na liberação de aminoácidos. A análise dos produtos de hidrólise indicaram que muito pouca ou nenhuma proteína de reserva foi hidrolisada durante a incubação. Observaram que a hidrólise das proteínas de reserva foi grandemente acelerada pela adição de extratos de plantas com 4 dias de germinação. Por meio de uma técnica histoquímica utilizando filme de gelatina, Yomo e Taylor (60), detectaram atividade endopeptidásica em cotilédones germinados de Phaseolus vulgaris. Nos primeiros estágios da germinação a atividade proteolítica foi observada por todo o cotilédone, exceto em duas camadas de células ao redor do feixe vascular.

Endopeptidases ácidas foram também encontradas em corpos proteicos isolados de cotilédones de sementes germinadas de ervilha por centrifugação diferencial (33).

Adams e Novellie (2), isolaram corpos proteicos e esferosomas de grãos de sorgo não germinados, verificando que os primeiros tem grande quantidade de proteína insolúvel associada com proteases ácidas também insolúveis e com

capacidade autolítica; os esferosomas contêm proteases solúveis e também capacidade autolítica. Eles concluíram que essas duas organelas tem dupla função: armazenar proteínas de reserva e enzimas nas sementes não germinadas; e degradar proteínas durante a germinação.

A presença de proteases ácidas nos corpos proteicos suporta o conceito de que os mesmos são organelas semelhantes aos lisosomas onde a digestão celular ocorre (33). É bastante claro que durante os primeiros estágios da germinação as endopeptidases encontradas nos corpos proteicos são primariamente responsáveis pela iniciação dos processos de fragmentação das proteínas de reserva em polipeptídeos para posterior degradação e transporte necessários ao crescimento do embrião (44).

Propriedades

As enzimas proteolíticas encontradas nos tecidos de sementes e de plantas em desenvolvimento têm-se mostrado muito complexas e, apesar da importância atribuída às mesmas no processo germinativo (4, 16, 44), o número de dados disponíveis é ainda insuficiente. O conhecimento das propriedades químicas e físico-químicas de uma determinada enzima é um pré-requisito fundamental para o seu estudo.

O advento de técnicas mais refinadas possibilitou o isolamento e purificação de várias proteases ácidas de sementes germinadas e uma idéia mais clara de suas propriedades emergiu desses estudos.

Burger (10), isolou uma endopeptidase ácida de extratos de cevada germinada, purificando-a por cromatografia de afinidade (Sephacrose-hemoglobina) e eletrofocalização mostrando 3 a 4 componentes, que são similares em tamanho e em carga. A fração ativa tem um pH ótimo de 3,8 com hemoglobina como substrato e quando submetida à filtração em Sephadex G-75, mostra um pico assimétrico de atividade com um peso molecular de 14.100 daltons com evidência de 3 componentes, sendo fortemente inibida por β -mercaptoetanol.

Usando filtração em gel em Sephadex G-100 e cromatografia em CM-celulose, Moeller e col. (37), demonstraram a presença de uma carboxipeptidase que hidrolisa caseína mas tem ação negligível contra hemoglobina. A enzima se mostrou estável na faixa de pH 3,0 a 6,0 e perdeu de 30 a 40% da atividade após diálise a pH 4,5 por 16 horas a 4°C. Usando o mesmo procedimento anterior, Burger e col. (11), estudaram uma peptidil peptídio hidrolase; utilizando CM-celulose mostraram a presença de duas enzimas que são adsorvidas pela coluna e pelo menos 3 que não são adsorvidas e tem baixa atividade. Ambos os grupos de enzimas hidrolisam hemoglobina a pH 3,8 e caseína a pH 6,0.

Por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e exclusão molecular em Sephadex G-100 e eletroforese, Abe e col. (1), purificaram uma protease ácida de endosperma de milho germinante. A enzima purificada tem um peso molecular de 21.000 daltons e é mais ativa a pH 3,0 usando hemoglobina como substrato. A atividade au

menta com a germinação e a adição de β -mercaptoetanol promove um aumento acentuado na atividade. Cinco enzimas proteolíticas (20), ativas em pH 3,5, 5,4 e 7,5 usando caseína como substrato foram demonstradas em extratos brutos de vários órgãos de milho germinado. A atividade aumenta durante a germinação e a adição de β -mercaptoetanol aumenta sensivelmente as atividades em pH 3,5 e 5,4. O endosperma de milho germinado contém também uma protease ácida que degrada rapidamente zeína em pH 4,5 e caseína em pH 3,0. O extrato bruto mostrou um acentuado aumento na atividade proteolítica quando em presença de β -mercaptoetanol (21). A presença de uma protease ácida que aparece do 3º ao 8º dia de germinação e tem máxima atividade em pH 3,8 utilizando hemoglobina como substrato e temperatura ótima de 46°C foi demonstrada por Harvey e Oaks (26, 27). Moureaux (38), mostrou que a degradação de proteína durante a germinação estava correlacionada com o aparecimento de uma atividade proteolítica. Três proteases ácidas foram isoladas por cromatografia de afinidade em Sepharose-hemoglobina e filtração em Sephadex G-100. A primeira foi isolada nos grãos não germinados e apresentou um peso molecular de 40.000 daltons e atividade ótima em pH 3,2. As duas outras que aparecem no 5º dia de germinação apresentaram pesos moleculares de 36.000 e 12.000 daltons e com atividade máxima em pH 3,8.

Wang e Grant (61), trabalhando com extratos de farinha de trigo, extraídos com tampão acetato 0,2M pH 3,8 e

solução de ácido acético 0,2M, demonstraram a presença de duas frações com atividade hemoglobínica quando o extrato foi submetido a filtração em Sephadex G-100. Uma com peso molecular maior que 120.000 daltons e outra com peso molecular de 80.000 daltons. Uma preparação mais purificada da enzima mostrou um peso molecular de 65.000 daltons. A enzima tem um pH ótimo de 4,4 e é resistente ao calor. Estudos cinéticos mostraram que a atividade não aumenta linearmente com a concentração da enzima mas, o desvio da linearidade torna-se menor com o aumento da pureza da enzima. Uma protease ácida também foi demonstrada em farinha de trigo extraída com água a pH 8,0 e com um máximo de atividade em pH 3,8 usando hemoglobina como substrato (35). A protease não foi inibida por inibidores de tripsina e quimiotripsina. Usando uma coluna de Sepharose-hemoglobina Preston e Kruger (40), isolaram duas proteases que hidrolisam a hemoglobina a pH 4,0 e glúten a pH 5,8. Conseguiram uma purificação de 25 vezes e por filtração em gel com Sephadex G-100, apresentaram pesos moleculares de 63.000 e 54.000 daltons e, por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, pesos moleculares de 60.000 e 56.000 daltons. Também utilizando uma coluna de Sepharose-hemoglobina Chua e Bushuk (12), purificaram duas vezes uma protease ácida a partir de extratos brutos de farinha de trigo que tem a habilidade de hidrolisar a hemoglobina. Burger (9), detectou uma hemoglobinaase em pH 3,8 que precipita com sulfato de amônio entre 0-50% de saturação, e através de cromatografia em DEAE-celulose mostra várias regiões com atividade

hemoglobínásica, uma região com atividade BAPA-ásica coincidente com a mais ativa hemoglobinase e duas regiões com atividade gelatinásica. Através de filtração em gel em Sephadex G-100 mostrou duas regiões com atividade hemoglobínásica e uma com atividade BAPA-ásica.

Baumgartner e Chrispeels (6), isolaram e purificaram uma endopeptidase presente em cotilédones de plântulas de Vigna radiata que degrada rapidamente a vicilina, principal proteína de reserva da semente. A protease purificada tem um peso molecular aparente de 23.000 daltons, ativa em pH 5,1 com vicilina como substrato, não tem atividade contra BAPA, não é inibida pelo inibidor de tripsina endógeno e é ativada por β -mercaptoetanol. Demonstraram que a proteólise das proteínas de reserva é acompanhada pelo aparecimento de uma nova atividade proteolítica e que essa protease é sintetizada "de novo" durante os seis primeiros dias de germinação, sendo acumulada nos corpos proteicos.

Viney e Ramshaw (56), purificaram 470 vezes uma protease ácida de plântulas de Phaseolus aureus, usando fracionamento com sulfato de amônio e DEAE-celulose. A protease mostrou atividade máxima em pH 3,8 e a 45°C com albumina sérica bovina como substrato e vários componentes através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os autores mostram que uma posterior recromatografia em DEAE-celulose e filtração em gel promovem a perda total da atividade.

Salmia e col. (45), caracterizaram as proteinases presentes em sementes germinantes de Pinus sylvestris. Uti

lizando hemoglobina em pH 3,7 e caseína em pH 5,4 e 7,0, verificaram que os endospermas separados das sementes no período de rápida mobilização das reservas (plântulas de 20 a 50 mm) mostram uma alta atividade proteolítica.

ST. Angelo e col. (51), detectaram uma proteinase ácida em sementes não germinadas de cânhamo. A enzima foi purificada 25 vezes, tem peso molecular de 20.000 daltons e por eletroforese em gel de poliacrilamida mostra pelo menos 3 componentes. Tem atividade máxima em pH 3,2 com hemoglobina e em pH 4,3 com edestina como substrato a 53°C.

Uma purificação de 870 vezes de uma protease ácida foi conseguida por Shinano e Fukushima (48, 49), de sementes não germinadas de lotus, capaz de hidrolisar hemoglobina e caseína em pH 3,8 e com pesos moleculares de 36.800 e 35.500 daltons, determinados por estudos de sedimentação difusão e filtração em Sephadex G-100 respectivamente.

Uma protease ácida foi encontrada em sementes de arroz, com pH ótimo em 3,5 com caseína e em 2,5 a 3,0 com hemoglobina como substratos (18). A protease se mostrou estável na faixa de pH 5,0 a 9,0 e um peso molecular de 60.000 a 65.000 daltons quando submetida a filtração em Sephadex G-100. Por cromatografia em DEAE-celulose, foram obtidas várias frações e os autores admitem que as formas múltiplas sejam devidas a associação com outras proteínas inativas.

Uma protease ácida com peso molecular de 80.000 daltons determinado por filtração em gel, com atividade ótima

em pH 3,6, apresentando baixa atividade em sementes não germinadas e aumentando somente após o 2º dia de germinação, foi isolada de sementes de sorgo por Garg e Virupaksha (22).

Papel fisiológico

O mecanismo pelo qual as proteínas de reserva são convertidas em aminoácidos não é claramente entendido. Assume-se geralmente que a hidrólise é efetuada por várias enzimas que se desenvolvem durante a germinação, entretanto, evidências para a existência e operação de tais enzimas são poucas. A maquinaria enzimática para a hidrólise de proteínas e ácidos nucleicos está presente nas sementes germinantes. Há um aumento da atividade proteolítica durante a germinação mas neste estágio do conhecimento é difícil dizer a função fisiológica precisa para as enzimas. O acúmulo de aminoácidos e nucleotídeos durante a germinação indica que hidrólises ocorrem, entretanto, as enzimas envolvidas podem ser diferentes daquelas demonstradas nos ensaios (8). As enzimas proteolíticas podem tomar parte na ativação do DNA ou atuar liberando enzimas pela liberação de celulasas pré-formadas, por hidrólise da parede celular. Sua principal função, entretanto, é a hidrólise das proteínas (42).

Harris (25), encontrou um baixo nível de atividade endopeptidásica nos tecidos de reserva, que aumentou 48 a 60 horas após a embebição. Concluiu que o metabolismo das

proteínas de reserva depende do aumento das endopeptidases havendo uma forte relação entre o aparecimento da atividade enzimática e o metabolismo das proteínas de reserva.*

Korolyova e col. (30), mostram que legumina e vicilina as proteínas de reserva de sementes secas de Vicia sativa não são afetadas por enzimas proteolíticas dessas sementes mas, quando isoladas de sementes germinadas, são prontamente hidrolisadas por essas enzimas.

No decorrer da germinação de sementes de milho a perda de zeína e glutelina ocorre aparentemente após 20 horas de germinação e a perda total após 60 horas (26, 27), assim relativas proporções do endosperma são alteradas antes que a principal perda comece. Sugere-se que as proteases possivelmente presentes nas sementes secas são ativadas durante a germinação e degradem inicialmente zeína e glutelina, posteriormente são sintetizadas enzimas adicionais que participam na degradação efetiva das proteínas.

Guardiola e Sutcliffe (24), mostraram que a hidrólise da proteína de reserva de ervilha começou com o início da germinação, consistente com a presença de atividade proteolítica na semente não germinada.

Controle

O conhecimento das mudanças estruturais que ocorrem nos corpos proteicos durante a germinação é bastante avançado, entretanto, a fisiologia e a bioquímica dos proces

so são ainda pouco estudados. Um exame crítico da literatura mostra que ainda não se conhece a estrutura do substrato, o envolvimento das várias enzimas, o mecanismo de controle e a natureza dos produtos intermediários (4).

Não há dúvida que é essencial a existência de mecanismos de controle sobre as enzimas hidrolíticas para prevenir a degradação das proteínas funcionais e estruturais (4). Todas as enzimas proteolíticas em sementes germinantes provavelmente não são controladas da mesma maneira. Alguns mecanismos de controle que tem sido sugeridos envolvem o controle hormonal da síntese "de novo", inibidores endógenos, zimogênios, compartimentalização, pH, especificidade pelo substrato e inibição pelo produto final (4). Inibidores que inibem proteases de origem animal e microbiana são intensivamente estudados, enquanto relativamente pouco é conhecido sobre os inibidores que inibem proteases endógenas vegetais.

Foi demonstrado que a germinação é acompanhada por um declínio gradual no nível de inibidores de tripsina nos cotilédones de Vigna unguiculata (57), entretanto, não há evidência de que o aumento da atividade proteolítica que também acompanha a germinação (3), esteja relacionado com o decréscimo da atividade do inibidor; sua função fisiológica permanece controvertida.

Baumgartner e Chrispeels (5), isolaram e caracterizaram parcialmente um inibidor que inibe a maior endopeptidase presente em cotilédones de Vigna radiata, demonstra

ram que a atividade inibitória era devido a presença de dois inibidores de pesos moleculares 12.000 e 2.000 daltons, verificaram que o desaparecimento da atividade inibitória era acompanhado por um aumento na atividade endopeptidásica mas a cinética desses dois eventos sugeriu que eles não estão relacionados; demonstraram, também, que a atividade inibitória não estava associada aos corpos proteicos e sim ao citosol.

Hobday e col. (29), investigando a distribuição subcelular da atividade anti-tríptica, atividade proteolítica e efeito do inibidor na atividade de proteases endógenas de sementes de ervilhas, não encontraram evidências convincentes para sugerir que a atividade anti-tríptica esteja envolvida na regulação das proteases durante a germinação.

Salmia e col. (46, 47), mostraram que extratos de sementes de pinho não germinado inibem a atividade proteolítica presente em extratos de endospermas de sementes germinadas. Quando foi feita a diálise dos extratos germinados, houve um aumento na atividade proteolítica com o desaparecimento da atividade inibitória. Concluíram que o decréscimo dos inibidores durante a diálise foi devido à inativação enzimática e que o aumento da atividade proteolítica foi pelo menos em parte devido à destruição dos inibidores.

Preston e Kruger (41), mostraram que o aumento da atividade hemoglobínica em pH 4,0 em sementes íntegras durante a germinação e em sementes sem o embrião, após 5

dias de germinação, parecem ser insensíveis a presença do ácido giberélico. O aumento na atividade não foi devido à síntese "de novo" mas à ativação de enzimas presentes em sementes não germinadas, levando a conclusão de que a ativação provavelmente envolve o desaparecimento de inibidores endógenos. A adição desses inibidores presentes nas sementes de trigo não germinadas à preparação de enzimas parcialmente purificadas de sementes germinadas e quiescentes promove mais de 50% de inibição na atividade hemoglobínica. Concluíram, também, que a habilidade dessas frações de inibir a atividade hemoglobínica decresce durante a armazenagem e germinação.

Objetivos

Enzimas proteolíticas em sementes não germinadas tem sido pouco estudadas, principalmente devido ao fato dos níveis de atividade serem baixos ou mesmo inexistentes.

Embora já tenha sido investigada a utilização de hemoglobina como substrato, no estudo de enzimas proteolíticas em sementes não germinada de cevada, cânhamo, trigo e arroz, poucos trabalhos foram realizados com relação às leguminosas (9, 12, 18, 30, 39, 50, 51, 61).

O nosso principal objetivo foi o estudo de uma enzima proteolítica ativa contra hemoglobina em pH 3,5 presente em cotilédones de sementes quiescentes de Vigna unguiculata.

Na tentativa de relacionar a ação dos inibidores de tripsina com a atividade proteolítica presentes nas sementes quiescentes, foi feito um estudo dos mesmos durante todas as etapas de purificação.

Da mesma maneira foi feito um estudo concomitante das atividades BAP_A-ásica, LPA-ásica e caseinásica inicialmente presentes nas frações que encerravam atividade hemoglobinásica.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

II.A. Materiais

1. Sementes

No presente trabalho foram usadas sementes de feijão de corda Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridó, anteriormente denominada Vigna sinensis (55), fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

2. Outros materiais

Hemoglobina bovina, preparação cristalizada, Worthington Biochemical Corp, New Jersey, EUA.

Caseína, preparada segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt, Alemanha.

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

Sepharose 4B-200 (Lot. 44C-0760), adquirida de Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

SP-Sephadex C-50 (Lot. 2653, particle size 40-120) e Sephadex G-100 (Lot. To.5967, particle size 40-120), adquiridos de Pharmacia, Uppsala, Suécia.

ϵ -N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (Lot.91C-2460) e L-Leucina-p-nitroanilida (Lot.9125), adquiridos

de Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Tripsina Bovina, preparação duas vezes cristalizada
Nutritional Biochemicals Co. (NBCo), EUA.

Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

II.B. Métodos

1. Preparação da farinha

Foram usadas sementes quiescentes de feijão de cor da Vigna unguiculata (L.) Walp. após remoção do tegumento e do eixo. Os cotilédones foram triturados em moinho Wiley adaptado com telas de 40 e 60 malhas por polegada linear (mesh) e a farinha mantida em refrigerador a 5°C.

2. Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados utilizando-se farinha de cotilédones de sementes não germinadas deixadas em contacto por duas horas com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 a 5°C com agitação ocasional e na proporção de 1:5 (farinha:meio de extração). O homogenato foi filtrado através de tecido fino de algodão e centrifugado durante 30 minutos a 16.000 x g a 4°C (centrífuga Sorvall, mod. RC-5, Du Pont Instruments). O resíduo da extração foi ressuspensão no mesmo tampão e utilizado para determinação de proteína e das ativi

dades proteolíticas. O sobrenadante aqui chamado de extrato bruto, foi usado para determinação de proteína, para ensaios de atividade enzimática e para fracionamento com sulfato de amônio.

3. Determinação de proteína

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método do microbiureto (23), usando-se albumina sérica bovina 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. Fracionamento com sulfato de amônio

O extrato bruto de cotilédones de sementes quiescentes foi submetido ao 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 (26°C) e deixado em contacto com o sal por 4 horas. O precipitado formado foi removido por centrifugação a 16000 x g, ressuspensão no tampão de extração e dializado contra o mesmo tampão por cerca de 24 horas. As frações assim obtidas foram usadas para determinação de proteína e ensaios das atividades enzimáticas.

5. Preparação da fração 25/50

A fração 25/50, por apresentar a maior percentagem das atividades enzimáticas em estudo, foi preparada essencialmente segundo Benevides (7), quando do emprego de semente total, conforme o esquema apresentado na figura 1 e usada nas etapas posteriores de purificação do sistema proteolítico ácido.

6. Preparação do inibidor bruto de feijão

A purificação parcial dos inibidores de tripsina e quimiotripsina foi feita de acordo com o método estabelecido por Ventura e Xavier Filho (54) e descrito por Coelho (14), utilizando-se farinha de sementes de Vigna unguiculata moídas em moinho Wiley e passadas em peneiras de 60 malhas por polegada linear (mesh). A purificação parcial do inibidor bruto foi realizada em três etapas:

1ª Etapa - Extração: 500g de farinha foram deixadas em contacto com 2 litros de água destilada à temperatura ambiente (26°C) por 3 horas e com agitação constante. Em seguida a suspensão foi filtrada em tecido fino de algodão. O resíduo foi submetido à mesma operação acima descrita e os filtrados foram reunidos, desprezando-se o resíduo final.

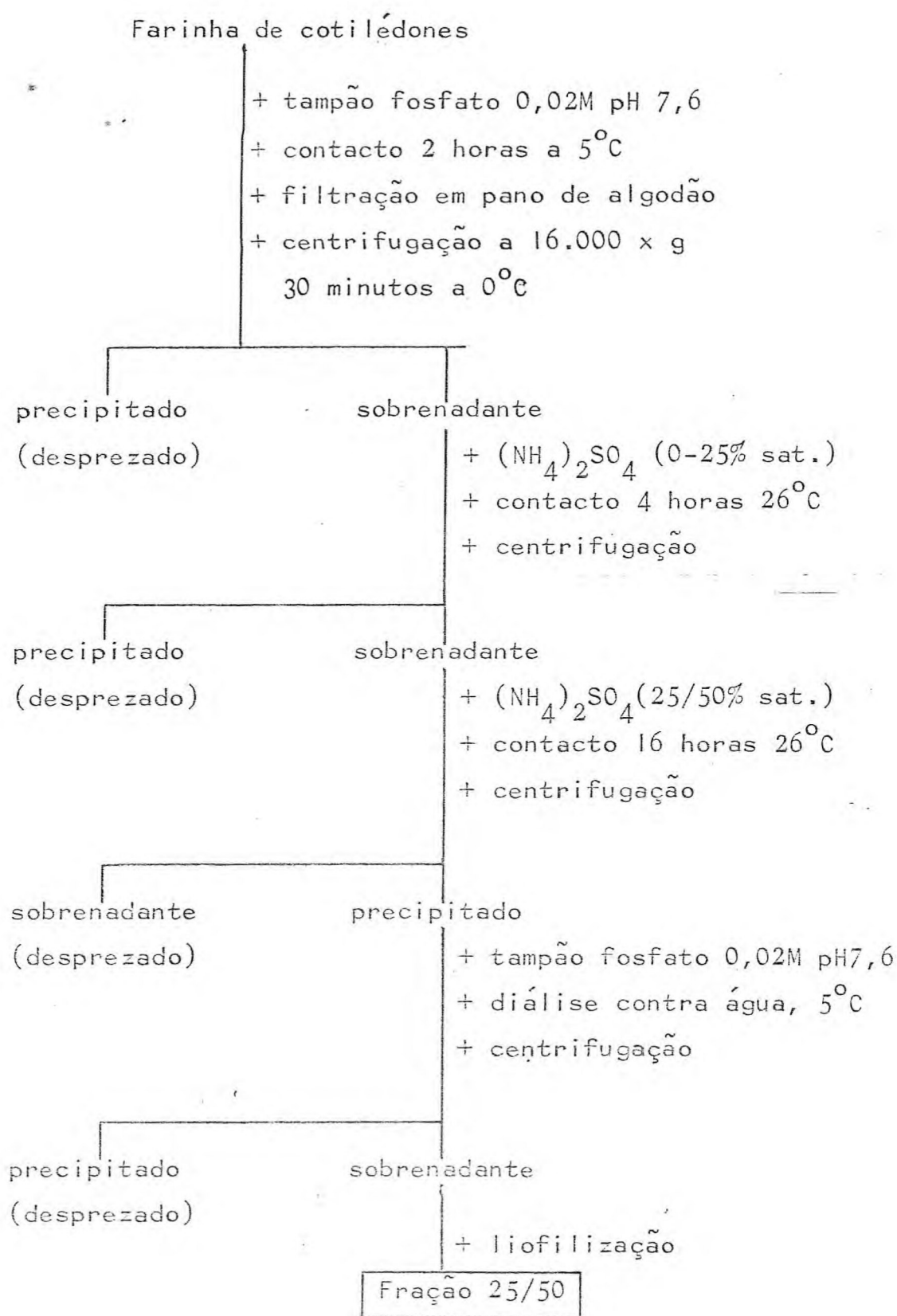


Figura 1 - Esquema de obtenção da fração 25/50.

2ª Etapa - Precipitação com ácido tricloroacético (TCA): ao sobrenadante da etapa anterior foi adicionado TCA 100% (p/v) sob agitação, em volume suficiente para que a concentração final de ácido ficasse 2,5%. A suspensão foi deixada em repouso por 16 horas, após o que foi filtrada à vácuo desprezando-se o precipitado.

3ª Etapa - Precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: ao sobrenadante da etapa anterior foi adicionado, sob agitação, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido, de modo que a solução final ficasse 80% saturada. A suspensão foi deixada em repouso por 16 horas a 4°C e em seguida centrifugada a 16000 x g por 30 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi redissolvido em água destilada e submetido à precipitação com TCA e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como descrito nas etapas anteriores. O precipitado foi então redissolvido em 10 ml de água destilada e dializada contra água a 12°C por 24 horas e liofilizado.

7. Preparação de Sepharose-hemoglobina

O procedimento descrito por March e col. (34) e Harvey e Dean (28) foi usado para ativação da Sepharose-4B com brometo de cianogênio, e envolve as seguintes etapas:

- 60 ml da suspensão de Sepharose-4B foram misturados com 200 ml de água destilada. Após sedimentação

sifona-se 50 ml (25%) do sobrenadante, e transfere-se a suspensão para um kitazato fazendo a desaeração em trompa de vácuo.

- O gel é transferido para um funil de placa porosa e lavado com 400 ml de água destilada a 0°C, seguido de nova lavagem com 300 ml de tampão bicarbonato de potássio ($K_2CO_3/KHCO_3$) 2M, pH 11 a 0°C.

- O gel é ressuspenso em 60 ml de tampão bicarbonato de potássio 2M pH 11 a 0°C e agitado em um banho de gelo com auxílio de um agitador magnético. Adiciona-se em seguida, gota a gota, 15 ml de brometo de cianogênio em acetonitrila (1g/ml), mantendo-se a temperatura da mistura a 18°C pela adição de gelo picado.

- Após 10 minutos a mistura é transferida para um funil de placa porosa e lavada sucessivamente com: 800ml de água destilada a 0°C; 200 ml de acetona 5% a 0°C e 400 ml de tampão bicarbonato de sódio ($NaHCO_3/Na_2CO_3$) 0,1M pH 8,5 com 0,5M de NaCl (tampão de acoplamento) a 0°C. O kitazato deve conter inicialmente 500 ml de solução saturada de sulfato ferroso.

- Após as lavagens o gel é ressuspenso em 60 ml de tampão de acoplamento a 0°C e combinado com 60ml de solução de hemoglobina (dializada exaustivamente contra água e liofilizada) a 4% em tampão de acoplamento. Deixa-se agitando por 20 horas em banho de gelo.

- Após 20 horas o gel é lavado com 400 ml de solução tampão de acoplamento a 0°C e em seguida incubado por 2 horas à temperatura ambiente com acetato de etanolamina 1M pH 8,0 com 0,5M de NaCl e lavado novamente com 200 ml de tampão de acoplamento, 400 ml de tampão acetato 1M pH 4,0 com 0,5M de NaCl e 200 ml de tampão de acoplamento.

8. Preparação das soluções dos substratos

No presente trabalho foram usados os seguintes substratos: hemoglobina, caseína e N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA) e L-leucina-p-nitroanilida (LPA).

8.1. Hemoglobina

Dissolve-se 1,0g de hemoglobina bovina em 50 ml de HCl 0,06N. Adiciona-se em seguida 30 ml de tampão acetato 0,28M pH 3,5, ajusta-se a pH 3,5 e completa-se o volume para 100 ml com tampão acetato. A solução é armazenada no congelador.

8.2. Caseina

As soluções de caseína foram preparadas suspendendo-se 1,0g de caseína em 100ml de tampão fosfato 0,02M pH 6,0 e aquecendo-se até ebulição por 15 minutos. Deixa-se esfriar, ajusta-se a pH 6,0 e completa-se o volume para 100 ml com água destilada, sendo a solução armazenada no congelador.

8.3. BAPA

As soluções de BAPA ($5 \times 10^{-4}M$) 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 fosfato 0,02M pH 8.0.

8.4. LPA

Soluções estoques de LPA ($5 \times 10^{-4}M$) foram preparadas dissolvendo-se inicialmente 12,56 mg de LPA em 1,0 ml de dimetilsulfóxido e completando-se o volume para 100 ml com tampão fosfato 0,02M pH 7,0 previamente aquecido a 40°C. As soluções usadas nos ensaios ($3 \times 10^{-4}M$) foram preparadas a partir da solução estoque, diluída com o mesmo tampão.

9. Determinação das atividades enzimáticas

Os ensaios de atividade BAPA-ásica e LPA-ásica no extrato bruto de cotilédones de sementes quiescentes de Vigna unguiculata foram feitos segundo Erlanger (19) usando as condições determinadas por Uchoa (53) e Benevides (7). Para as atividades hemoglobínica e caseínica foram utilizadas as condições descritas por Ainouz e col. (3).

9.1. Atividade BAPA-ásica

O meio de reação encerrava 2,5 ml de BAPA $5 \times 10^{-4}M$

pH 8,0, 0,5 ml da fração convenientemente diluída. A mistura era incubada por 15 minutos a 40°C e parada a reação pela adição de 1,0 ml de ácido acético 30%. A avaliação da atividade foi feita pela leitura da absorbância em 410 nm, após 15 minutos da adição de ácido acético 30%. A fim de corrigir a atividade autodigestiva do extrato, foram sempre usados controles onde o extrato e o substrato foram incubados separadamente e o substrato adicionado ao extrato após a adição de ácido acético.

9.2. Atividade LPA-ásica

O meio de reação continha 2,5 ml de LPA 3×10^{-4} M pH 7,0 e 0,5 ml do extrato diluído convenientemente, incubado por 15 minutos a 40°C. A reação foi parada com 1,0 ml de ácido acético 30%. As demais condições foram as mesmas descritas para a atividade BAPA-ásica.

9.3. Atividade hemoglobinásica

O meio de reação continha concentrações crescentes de extrato (0,2 a 1,0ml) completados os volumes para 1,0ml com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 e 5,0 ml de hemoglobina 1% pH 3,5, incubados por 60 minutos a 40°C, e parada a reação com 1,0 ml de TCA 40%. Após 30 minutos de repouso a suspensão era filtrada em papel de filtro quantitativo, sendo retirado 1,0ml do filtrado e alcalinizado com 0,15ml de NaOH 2N. A atividade hemoglobinásica foi determinada empregando

se o reagente de Folin, modificado por Lowry (32). A densidade ótica foi determinada num espectrofotômetro Spekol a 750 nm. Foram feitas provas em branco para concentrações extremas de extrato.

9.4. Atividade caseinásica

O meio de reação continha concentrações crescentes de extrato (0,2 a 1,0ml) completados os volumes para 1,0ml com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 e 5,0 ml de caseína 1% pH 6,0, incubados por 60 minutos a 40°C e parada a reação com 1,0 ml de TCA 40%. As demais condições foram as mesmas descritas para a atividade hemoglobínica.

9.5. Atividade anti-tríptica

As atividades inibitórias das frações estudadas foram avaliadas por comparação de amostras contendo quantidades crescentes de inibidores e quantidades fixas de tripsina. Foram feitas provas em branco para a enzima e concentrações extremas de inibidores. Para a determinação da atividade anti-tríptica usou-se caseína como substrato, segundo método de Kunitz (31), e as atividades expressas em unidades de inibidor (UI), definidas por Xavier Filho (58). Concentrações crescentes de amostras contendo inibidor (0,2 a 1,0 ml) foram colocadas em tubos e completados os volumes para 1,5 ml com tampão fosfato 0,1M pH 7,6. Em seguida foi acrescentado 0,5 ml de solução de tripsina em HCl 0,0025N (13µg/ml) e levadas ao banho-maria a 37°C.

Após 10 minutos, a reação foi iniciada pela adição de 1,0 ml de caseína 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,6. Decorridos 30 minutos, a reação foi parada pela adição de 3,0 ml de TCA 5%. Após repouso por 30 minutos as suspensões foram filtradas em papel de filtro quantitativo e suas atividades determinadas pelo reagente de Folin modificado por Lowry (32). A densidade ótica foi determinada num espectrofotômetro Spekol a 750 nm. Foram feitas provas em branco para concentrações extremas de inibidor e as correções para concentrações intermediárias foram feitas por interpolação.

10. Unidades de atividade

10.1. Atividades hemoglobínica e caseínica

Para efeito de cálculo das atividades hemoglobínica e caseínica, uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma absorbância de 0,100 em 750 nm por 1,0 ml de extrato por 60 minutos de reação a 40°C e pH 3,5 e 6,0, respectivamente.

10.2. Atividades LPA-ásica e BAPA-ásica

Para efeito de cálculos das atividades uma unidade de atividade foi definida de acordo com o coeficiente de extinção molar usado por Erlanger (19).

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

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

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

Fator de diluição: corresponde a diluição do extrato no volume total do ensaio (ml)

11. Ação do inibidor bruto sobre a hemoglobinase

O efeito do inibidor bruto de sementes, parcialmente purificado, conforme descrito anteriormente, sobre a atividade hemoglobínica, foi estudado medindo-se a atividade residual da hemoglobinase após incubação da fração proveniente da cromatografia de afinidade com o inibidor bruto, empregando-se o seguinte procedimento: duas alíquotas de 10 ml de solução da fração ativa da cromatografia de afinidade, contendo 8mg/ml em tampão fosfato 0,02M pH 7,6 foram colocados em frascos de erlenmeyer. Adicionou-se a um dos frascos 10 ml de solução de inibidor bruto contendo 5mg/ml, e ao outro frasco foram adicionados 10 ml de tampão. Após 60 minutos de contacto foram retiradas alíquotas convenientes e determinada a atividade hemoglobínica conforme procedimento descrito no item 9.3.

12. Cromatografia em Sepharose-hemoglobina

Sepharose-hemoglobina, preparada conforme descrito

anteriormente, foi usada para a preparação de uma coluna medindo 25 x 2,5 cm. A coluna, após montada, foi equilibrada com tampão acetato 0,05M pH 4,0. A fração 25/50 liofilizada, foi dissolvida com o tampão de equilíbrio, centrifugada para remover o precipitado formado e o sobrenadante aplicado na coluna. A amostra foi eluída inicialmente com o mesmo tampão de equilíbrio seguido de ácido acético 0,05 M pH 2,9 a temperatura ambiente (26°C). O fluxo foi mantido a 30 ml/hora com auxílio de uma bomba peristáltica e frações de 4,0 ml foram recolhidas por um coletor automático de frações, acoplado a um registrador (LKB 8300 UVICORDII). A absorvância dos efluentes foi determinada em 280 nm. A fim de localizar as frações com atividade hemoglobínica e caseínica foram utilizados os ensaios de atividade descritos anteriormente. As frações com atividade foram separadas, dializadas contra água por 24 horas, liofilizadas e guardadas no congelador (-19°C) até uso posterior.

Para a preparação de uma maior quantidade de amostra, foi utilizado o seguinte procedimento: em um funil de placa porosa, foi colocado o gel e equilibrado com o tampão de equilíbrio, utilizando-se filtração à vácuo. A amostra foi dissolvida no tampão de equilíbrio e misturada ao gel com o auxílio de um bastão de vidro, sendo deixada em contacto por 15 minutos. Em seguida lavada por 3 vezes com ácido acético 0,05M pH 2,9, utilizando-se um volume de ácido correspondente a 10 vezes o volume da amostra. Os filtrados foram reunidos, dializados contra água, liofilizados e guardados no congelador a -19°C.

13. Cromatografia de troca iônica - SP-Sephadex C-50

SP-Sephadex C-50 deixada em água, a fim de retirar as partículas finas, foi lavada sucessivamente com HCl 0,1N, água, NaOH 0,1N e água por filtração à vácuo e usada para a preparação de uma coluna de 24 x 2 cm. A coluna foi equilibrada com tampão acetato 0,05M pH 5,0. As frações com atividade hemoglobínica e caseínica, obtidas por cromatografia de afinidade foram dissolvidas no tampão de equilíbrio, centrifugadas para remover o precipitado formado e o sobrenadante aplicado na coluna. A amostra foi aliada inicialmente com o mesmo tampão de equilíbrio seguido de um gradiente linear de NaCl (0 a 1M, 300 ml). O fluxo foi mantido a 30 ml/hora com auxílio de uma bomba peristaltica e frações de 4,0 ml foram recolhidas por um coletor automático de frações acoplado a um registrador (LKB 8300 UVICORD II). A absorbância dos efluentes foi determinada a 280 nm. As atividades hemoglobínica e caseínica nas frações foram determinadas usando-se os ensaios de atividade já descritos. As frações que apresentaram atividades foram reunidas, dializadas contra água, liofilizadas e guardadas em congelador até uso posterior.

Os efluentes da cromatografia anterior foram dissolvidos no tampão de equilíbrio e recromatografados em coluna de SP-Sephadex C-50 nas mesmas condições.

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

Sephadex G-100 foi deixado em água por 3 dias com

agitação ocasional e usado, depois de desprezada as partículas finas, para a preparação de colunas medindo 24 x 2cm e 40 x 2,5 cm. As colunas foram equilibradas com tampão fosfato 0,02M pH 7,6, tampão acetato 0,05M pH 5,0 ou ácido acético 0,05M pH 2,9, a temperatura ambiente (26°C) e o fluxo ajustado para 30 ml/hora. Azul de dextrana (5 mg/ml) foi dissolvido em tampão fosfato 0,02M pH 7,6 contendo sacarose 10% e aplicado nas colunas para determinar os volumes de exclusão (Vo). A fração 25/50 dissolvida no 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 a 280 nm e atividade hemoglobínica, usando-se os ensaios de atividade anteriormente descritos.

Para os cálculos dos pesos moleculares foi usada a fórmula de Determann e Michel (17).

$$\text{Log } M = 5,941 - 0,847 (V_e/V_o)$$

V_e = volume de eluição

V_o = volume de exclusão

15. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo o método de Clarke (13). Foram usados tubos de vidro de 7 x 75 mm, uma amperagem de 2,5 mA/tubo, mantendo-se a voltagem constante. TRIS-glicina-HCl pH 8,3, foi usado como tampão de corrida. As amostras foram sempre aplica

das encerrando sacarose numa concentração final de 10%. A localização das frações obtidas por eletroforese foi feita pela reação com Coomassie Blue 0,05%. O descoramento foi feito com ácido acético a 7%.

III - RESULTADOS

Durante o estabelecimento das condições de ensaio foi verificado que a atividade hemoglobínica não aumentava linearmente com a concentração da enzima (fig. 2), levando-nos a acreditar que esse comportamento fosse devido a presença de inibidores endógenos. Numa análise preliminar observamos que preparações de inibidor bruto não promoviam nenhum decréscimo na atividade proteolítica ácida. Uma análise desse efeito sobre uma preparação mais purificada pareceu-nos ser o procedimento mais adequado para podermos investigar se a atividade proteolítica ácida nas sementes de Vigna unguiculata é afetada por inibidores endógenos.

1. Comportamento das proteases no extrato e nas frações obtidas por diálise

Foram feitas determinações das atividades proteolíticas nos extratos, nos resíduos das extrações com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 e nas frações obtidas após diálise contra água. Os resultados mostram que a fração responsável pela atividade proteolítica está quase que totalmente distribuída na fração solúvel em água.

Os dados da tabela 1, mostram que apesar de grande parte da atividade hemoglobínica ser solúvel em água (albumínica), uma fração substancial (33%) não é extraída,

Figura 2 - Atividade hemoglobínásica no extrato bruto. As condições de ensaio estão descritas em métodos.

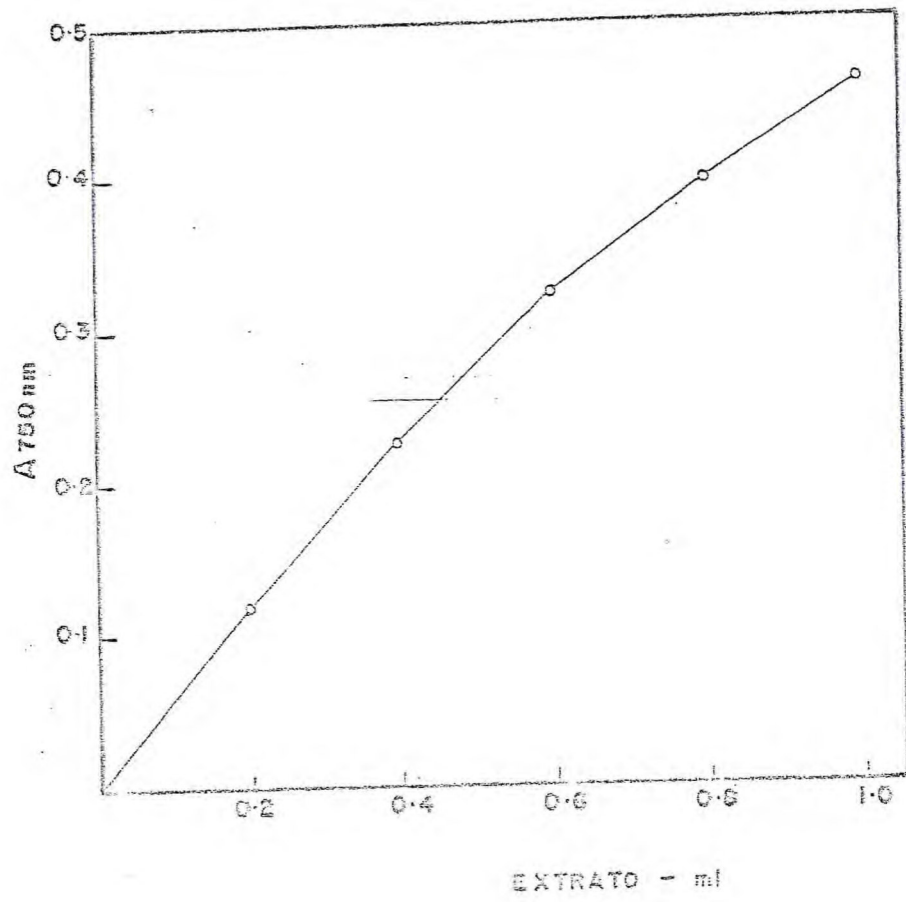


Tabela 1 - Atividade hemoglobínásica nas frações obtidas de cotilédones de sementes de feijão Vigna unguiculata, após diálise contra água.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEINA TOTAL(mg)	ATIVIDADE				
			UA	UA TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO%	PURIFICAÇÃO(x)
Extrato	42	1922,8	23,8	1000	0,52	66,7	1
Albumina	53	470,6	13,5	712,8	1,52	47,5	2,9
Globulina	25	882,7	10,1	252,5	0,29	16,9	-
Resíduo	46	684	10,9	500,5	0,73	33,4	1,4

* Os dados referem-se a 10g de farinha extraídos com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 na proporção 1:5 (farinha:meio de extração).

** Para os cálculos da recuperação foram considerados como 100% a soma das atividades do extrato bruto + atividade no resíduo da extração.

¹ - UA. mg proteína⁻¹.

permanecendo no resíduo da extração que contém cerca de 26% de proteína total.

Para a atividade caseinásica, mostrada na tabela II, a fração solúvel em água é também responsável pela quase totalidade da atividade, apesar de uma parte ainda permanecer no resíduo da extração.

Comparando-se as tabelas I e II com relação a atividade específica da fração albumínica e do resíduo, verificamos que a relação hemoglobinasase:caseinase nas albuminas é de 1,2:1 e no resíduo essa relação aumenta para 2,3:1, correspondendo a uma purificação de 2,9 vezes para a atividade hemoglobinasica e 3,5 vezes para a atividade caseinásica na fração solúvel (albumina). Ainda com relação aos dados das tabelas I e II, verificamos que a hemoglobinasase é cerca de 1,5 vezes mais ativa que a caseinase.

Os dados das atividades LPA-ásica e BAPA-ásica são mostrados nas tabelas III e IV. Verifica-se que quase toda atividade está na fração solúvel em água, sendo que somente 16% da atividade LPA-ásica e 8% da BAPA-ásica permanecem no resíduo da extração. As atividades específicas da fração albumina e do resíduo, mostram uma relação idêntica em torno de 9:1 entre as atividades LPAase:BAPAase. Verificamos também pela análise dos dados das tabelas III e IV que a atividade LPA-ásica é cerca de 4,5 vezes maior que a atividade BAPA-ásica tanto no extrato bruto como na fração solúvel em água (albumina). No resíduo da extração a atividade LPA-ásica é 9,5 vezes maior que a BAPA-ásica. Verifi

Tabela II - Atividade caseinásica nas frações obtidas de cotilédones de sementes de feijão Vigna unguiculata, após diálise contra água.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEINA TOTAL(mg)	ATIVIDADE				
			UA	UA TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO%	PURIFICAÇÃO(x)
Extrato	42	1922,8	16,9	712,0	0,37	79,8	1
Albumina	53	470,6	11,5	607,2	1,29	68,0	3,5
Globulina	25	882,7	5,0	125,1	0,14	14,0	-
Resíduo	46	684,0	3,9	179,8	0,26	20,0	-

* Os dados referem-se a 10g de farinha extraídas com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 na proporção de 1:5 (farinha:meio de extração).

** Para os cálculos da recuperação foram considerados como 100% a soma das atividades do extrato bruto + atividade no resíduo da extração.

¹ - UA . mg proteína⁻¹.

Tabela III - Atividade LPA-ásica nas frações obtidas de cotilédones de sementes de feijão Vigna unguiculata, após diálise contra água.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEÍNA TOTAL(mg)	ATIVIDADE			
			TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO(%)	PURIFICAÇÃO(x)
Extrato	42	1922,8	108,0	0,056	83	1
Albumina	53	470,6	98,7	0,209	76	3,7
Globulina	25	882,7	2,45	0,003	1,9	-
Resíduo	46	684,0	21,6	0,031	16,7	-

* Os dados referem-se a 10g de farinha extraídos com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 na proporção de 1:5 (farinha:meio de extração).

** Para os cálculos da recuperação foram considerados 100% a soma das atividades do extrato bruto + atividade do resíduo da extração.

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

Tabela IV - Atividade BAPA-ásica nas frações obtidas de cotilédones de sementes de feijão Vigna unguiculata, após diálise contra água.

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ATIVIDADE			
			TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO (%)	PURIFICAÇÃO (x)
Extrato	42	1922,8	25,2	0,013	91,6	1
Albumina	53	470,6	23,8	0,051	86,5	3,9
Globulina	25	882,7	0,3	-	1,0	-
Resíduo	46	684,0	2,3	0,003	8,3	-

* Os dados referem-se a 10g de farinha extraídos com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 na proporção de 1:5 (farinha:meio de extração).

** Para os cálculos da recuperação foram considerados 100% a soma das atividades do extrato bruto + atividade do resíduo da extração.

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

camos também que toda atividade é recuperada indicando que as atividades proteolíticas não foram afetadas pela diálise.

2. Fracionamento com sulfato de amônio

Extratos de cotilédones de sementes de feijão com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 foram usados para fracionamento 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 para a purificação das frações proteicas com atividades hemoglobinásica, caseinásica, LPA-ásica e BAPAásica.

Os resultados apresentados na tabela V mostram que a fração que precipita no intervalo de 25 a 50% de saturação detém 51% da atividade hemoglobinásica e representa 22% da proteína total extraída. Pela análise da tabela verifica-se que a atividade específica da fração 25/50 corresponde a uma purificação de 2,3 vezes. Se considerarmos que da proteína total extraída houve uma perda de 30% e que a atividade total recuperada nas frações foi de 65%, podemos dizer que esse procedimento não altera a atividade das enzimas responsáveis pela atividade proteolítica ácida. A perda de proteínas durante o fracionamento foi devido principalmente ao fato de ser necessário centrifugar as frações para remover o precipitado formado durante a diálise contra água e se obter frações claras, evitando com isso que os brancos das reações fossem muito altos.

A tabela VI mostra que a fração 25/50 detém a quase

Tabela V - Atividade hemoglobínica nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEÍNA TOTAL(mg)	ATIVIDADE			
			UA TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO(%)	PURIFICAÇÃO(x)
Extrato	438,0	19333,0	9636,0	0,498	100	1
0/25	41,7	559,0	300,0	0,537	3	-
25/50	102,6	4328,0	4925,0	1,140	51	2,3
50/75	67,3	2442,0	1010,0	0,414	10,5	-
75/100	122,3	4559,0	49,0	0,010	0,5	-

* Os dados referem-se a 100g de farinha extraída com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 na proporção de 1:5 (farinha:meio de extração).

¹ - UA . mg proteína⁻¹.

Tabela VI - Atividade caseinásica nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEINA TOTAL(mg)	ATIVIDADE			
			UA TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO(%) PURIFICAÇÃO(x)	
Extrato	438,0	19333,0	7884,0	0,410	100	1
0/25	41,7	559,0	200,0	0,360	2,5	-
25/50	102,6	4328,0	4720,0	1,100	60	2,7
50/75	67,3	2442,0	909,0	0,370	11,5	-
75/100	122,3	4559,0	-	-	-	-

* Os dados referem-se a 100g de farinha extraída com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 na proporção de 1:5 (farinha:meio de extração).

¹ - UA . mg proteína⁻¹.

totalidade da atividade caseinásica. Se compararmos a perda de proteína durante o fracionamento com a atividade nas diversas frações, verificaremos que houve um aumento efetivo na atividade de cerca de 12%. A atividade específica da fração 25/50 corresponde a uma purificação de 2,7 vezes

Os dados da tabela VII referem-se à atividade LPA-ásica durante o fracionamento com sulfato de amônio e mostram que a fração 25/50 detém a quase totalidade da atividade. Verificamos também que há um aumento efetivo na atividade em cerca de 9% se considerarmos que a proteína total das frações corresponde a somente 62% da proteína total extraída. A atividade específica corresponde a uma purificação de 3 vezes.

A tabela VIII mostra os resultados do fracionamento com relação a atividade BAPA-ásica. Verifica-se que a fração 25/50 detém a maior parte da atividade. Se considerarmos que houve uma perda de 30% de proteína durante o fracionamento, podemos dizer que houve uma perda efetiva de atividade BAPA-ásica de cerca de 18%. A atividade específica da fração 25/50 corresponde a uma purificação de 2 vezes. Analisando as tabelas VII e VIII, verificamos que a atividade LPAásica é cerca de 8,5 vezes superior à atividade de BAPAásica na fração 25/50.

3. Cromatografia em Sepharose-hemoglobina

Uma coluna de Sepharose-hemoglobina foi utilizada

Tabela VII - Atividade LPA-ásica nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEÍNA TOTAL(mg)	ATIVIDADE			
			UA TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO(%)	PURIFICAÇÃO(x)
Extrato	438,0	19333,0	1209,0	0,063	100	1
0/25	41,7	559,0	6,6	0,011	0,5	-
25/50	102,6	4328,0	816,0	0,188	67,5	3,2
50/75	67,3	2442,0	38,0	0,015	3,2	-
75/100	122,3	4559,0	-	-	-	-

* Os dados referem-se a 100g de farinha extraída com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 na proporção de 1:5 (farinha:meio de extração).

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

Tabela VIII - Atividade BAPA-ásica nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ATIVIDADE			
			UA TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO (%)	PURIFICAÇÃO (x)
Extrato	438,0	19333,0	228,3	0,012	100	1
0/25	41,7	559,0	1,6	0,003	0,7	-
25/50	102,6	4328,0	94,6	0,022	42,0	1,8
50/75	67,3	2442,0	1,5	-	0,7	-
75/100	122,3	4559,0	-	-	-	-

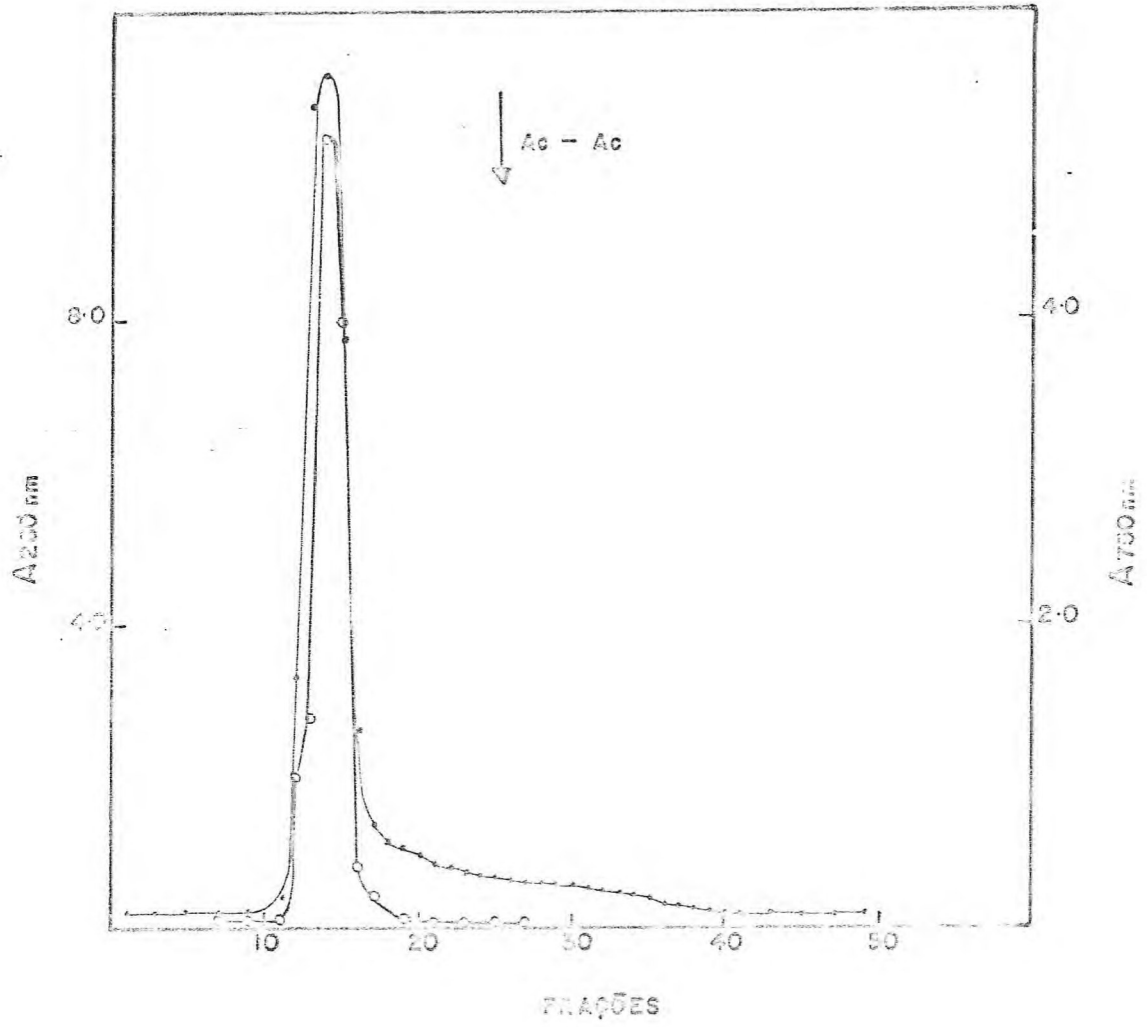
* Os dados referem-se a 100g de farinha extraída com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 na proporção de 1:5 (farinha:meio de extração).

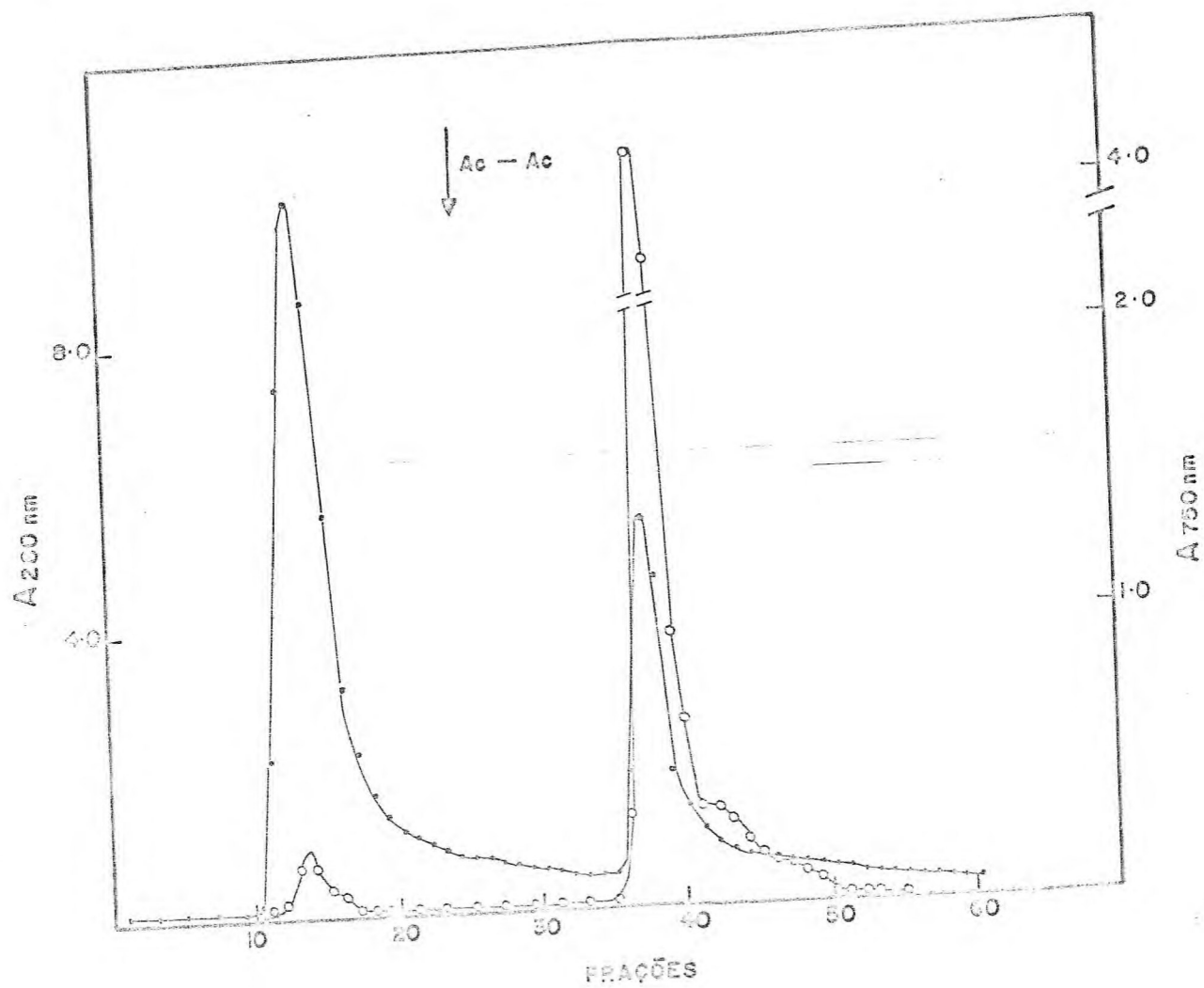
¹ - $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$.

como uma etapa na purificação das proteínas responsáveis pelas atividades enzimáticas. A figura 3 refere-se a cromatografia da fração 25/50 numa coluna de Sepharose não ativada e mostra que toda proteína e atividade enzimática foram eluídas com tampão acetato 0,05M pH 4,0. A cromatografia da fração 25/50 numa coluna de afinidade (Sepharose-hemoglobina), mostradas nas figuras 4 (atividade hemoglobínica) e 5 (atividade caseinásica) remove grande parte da proteína aplicada após lavagem com tampão acetato 0,05M pH 4,0, e encerra cerca de 9% da atividade hemoglobínica e 14% da atividade caseinásica. A quase totalidade das atividades hemoglobínica e caseinásica ficam retidas na coluna. Quando eluída com ácido acético 0,05M pH 2,9, apresenta um pico de atividade hemoglobínica e caseinásica bastante simétricos, não apresentando atividades LPAásica e BAPAásica. Nesta etapa de purificação houve uma perda de cerca de 18% da atividade hemoglobínica em relação a fração 25/50, conforme mostra a tabela IX e uma purificação de 16 vezes. Com relação a atividade caseinásica, verificamos que houve nesta etapa uma purificação de 13,5 vezes, conforme mostra a tabela X e uma perda de atividade em relação à fração 25/50 de cerca de 3%:

4. Cromatografia em SP-Sephadex C-50

Uma etapa adicional para a purificação das proteínas responsáveis pelas atividades hemoglobínica e caseinásica, foi desenvolvida empregando-se uma coluna de SP-Se





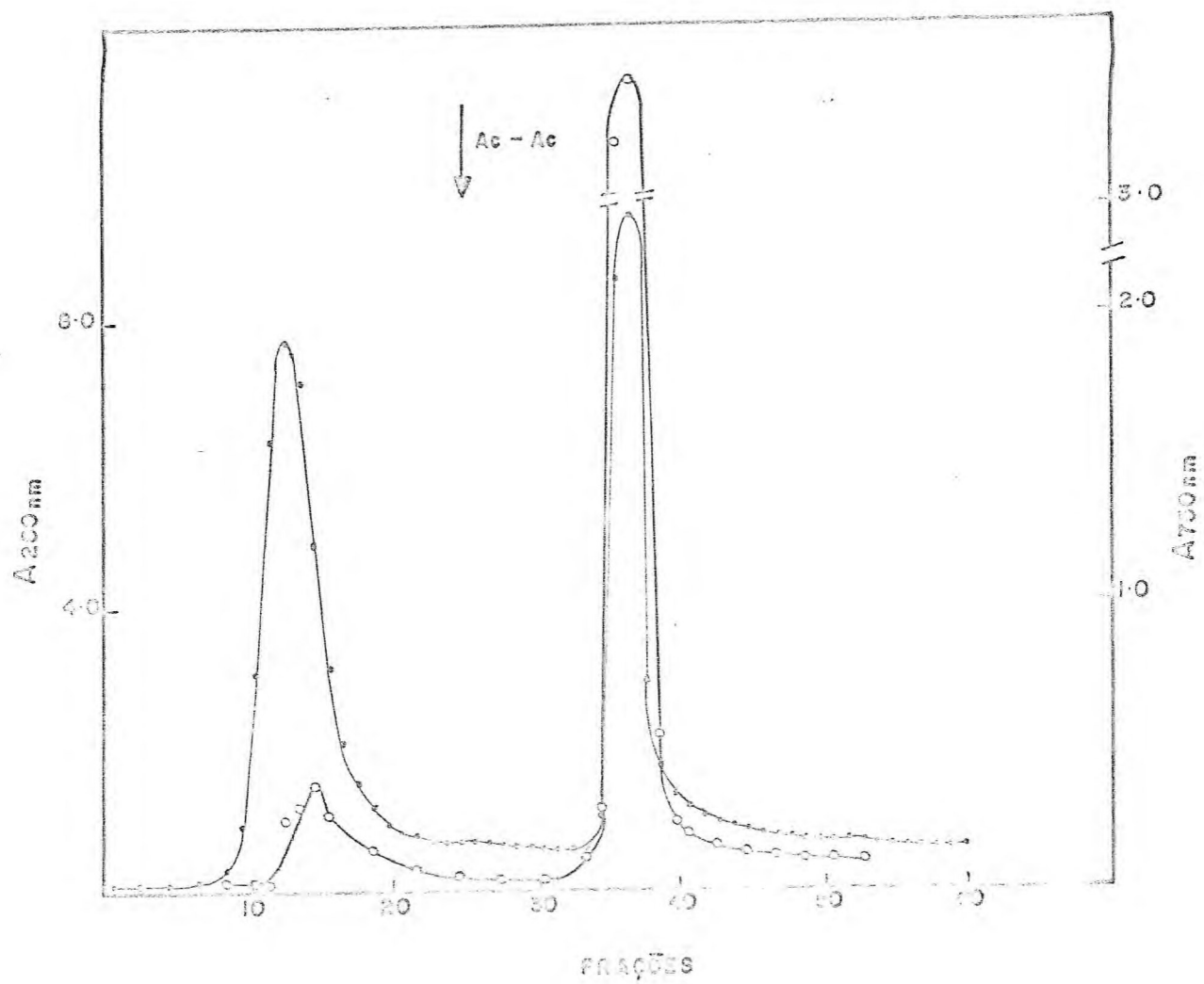


Tabela IX - Purificação da fração com atividade hemoglobínica presente em cotilédones de feijão Vigna unguiculata.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEÍNA TOTAL(mg)	ATIVIDADE				
			UA	UA TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO(%)	PURIFICAÇÃO(x)
Extrato	440,0	17622,0	12,0	5280,0	0,299	100	1
F 25/50	251,7	1412,6	12,0	3021,0	2,130	57,2	7,1
Afinidade	1212,5	426,8	1,7	2061,0	4,830	39	16,2
SP-Sepha- dex C-50	548,6	140,7	1,3	693,0	4,920	13	16,5
Recrom. SP-Sepha- dex C-50	187,7	43,6	1,8	342,0	7,900	6	26,4

¹ - UA . mg proteína⁻¹.

Tabela X - Purificação da fração com atividade caseinásica presente em cotilédones de feijão Vigna unguiculata.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEINA TOTAL(mg)	ATIVIDADE				
			UA	UA TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO(%)	PURIFICAÇÃO(x)
Extrato	440,0	17622,0	12,2	5368,0	0,304	100	1
F 25/50	251,7	1412,6	7,5	1887,7	1,330	35,2	4,4
Afinidade	1212,5	426,8	1,4	1758,1	4,120	32,7	13,5
SP-Sepha- dex C-50	548,6	104,7	1,3	713,2	5,100	13,3	16,8

¹ - UA . mg proteina⁻¹ .

phadex C-50. A figura 6 mostra o comportamento da fração com atividade hemoglobínica, proveniente da cromatografia de afinidade (fig. 4), em coluna de troca iônica. Grande parte da proteína aplicada é removida com tampão acetato 0,05M pH 5,0. A fração ativa retida é eluída entre 0,35 a 0,60 M de NaCl e mostra-se bastante complexa, evidenciando-se pelo menos quatro picos de atividade. Há uma perda acentuada da atividade (26%) em relação à etapa anterior, com uma purificação de 16,5 vezes (tabela IX). A figura 7 mostra o comportamento das proteínas com atividade caseínica e, da mesma forma que a anterior, apresenta-se bastante complexa, sendo eluída na mesma faixa de gradiente de NaCl. A atividade caseínica mostrou-se também bastante sensível a esta etapa, com uma perda de atividade de cerca de 20% em relação à anterior e uma purificação de 17 vezes (tab. X).

Os efluentes da cromatografia anterior com atividade hemoglobínica foram reunidos, dializados contra água, liofilizados e recromatografados, usando-se as mesmas condições acima. Os resultados (fig. 8), mostram a presença de 3 picos de proteína sendo que o pico II parece encerrar quase toda atividade proteolítica. Não há separação nítida entre os picos de atividade, evidenciando-se uma grande complexidade do sistema hemoglobínico, sendo eluídos na mesma faixa de gradiente de NaCl. Nesta etapa há uma perda acentuada (50%) da atividade em relação à fração 25/50, com um rendimento de 6% e uma purificação de 26,4 vezes (tab. IX).

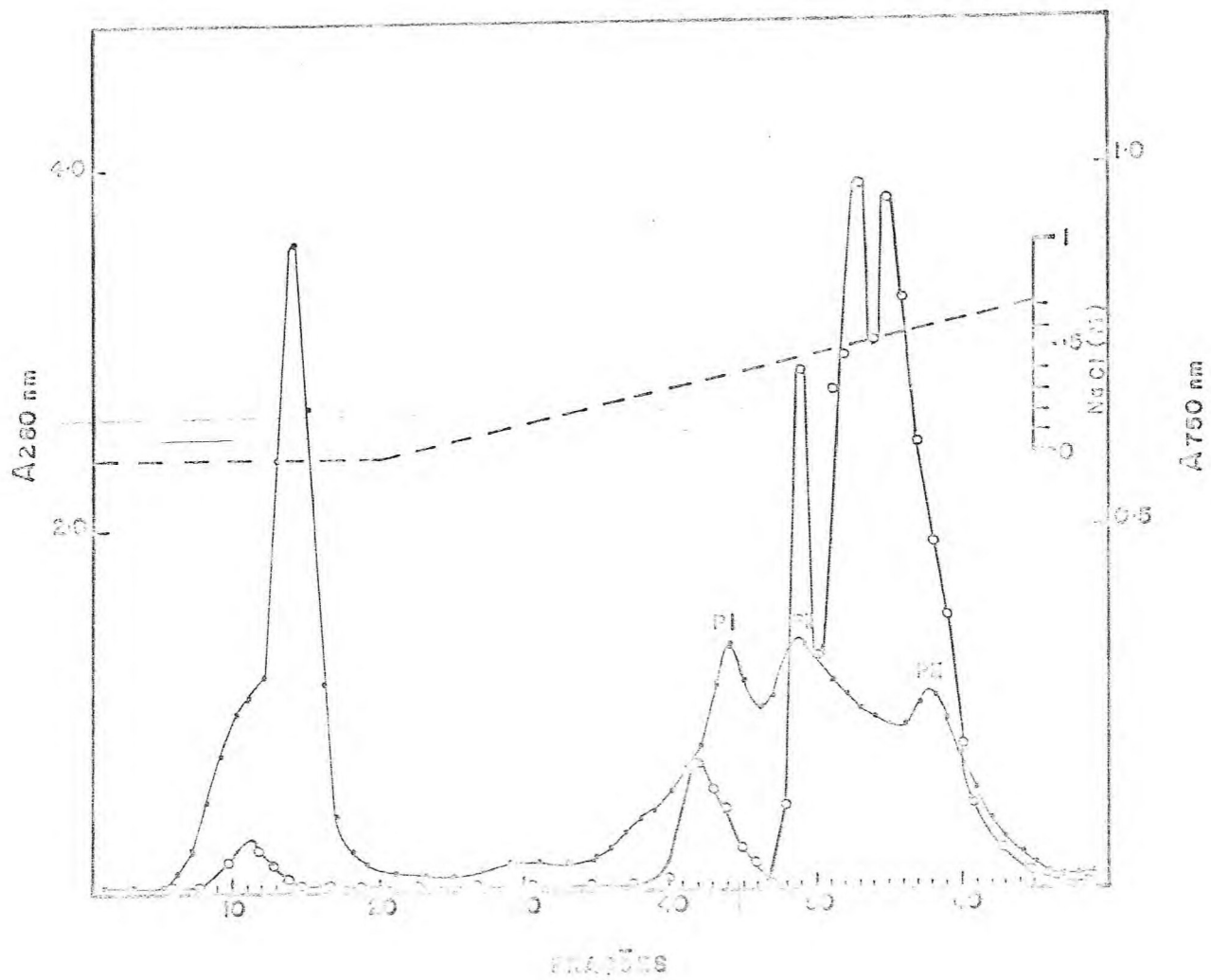


Figura 7 - Cromatografia em SP-Sephadex C-50 da fração com atividade caseinásica obtida na cromatografia de afinidade. Coluna de 24 x 2cm. Tampão de partida: acetato 0,05M pH 5,0 seguido de gradiente linear 0-1M de NaCl. Fluxo 30ml/hora; volume das frações 4ml/tubo. (—○—○) concentração de proteína (A_{280nm}); (—○—○) atividade caseinásica (A_{750nm}).

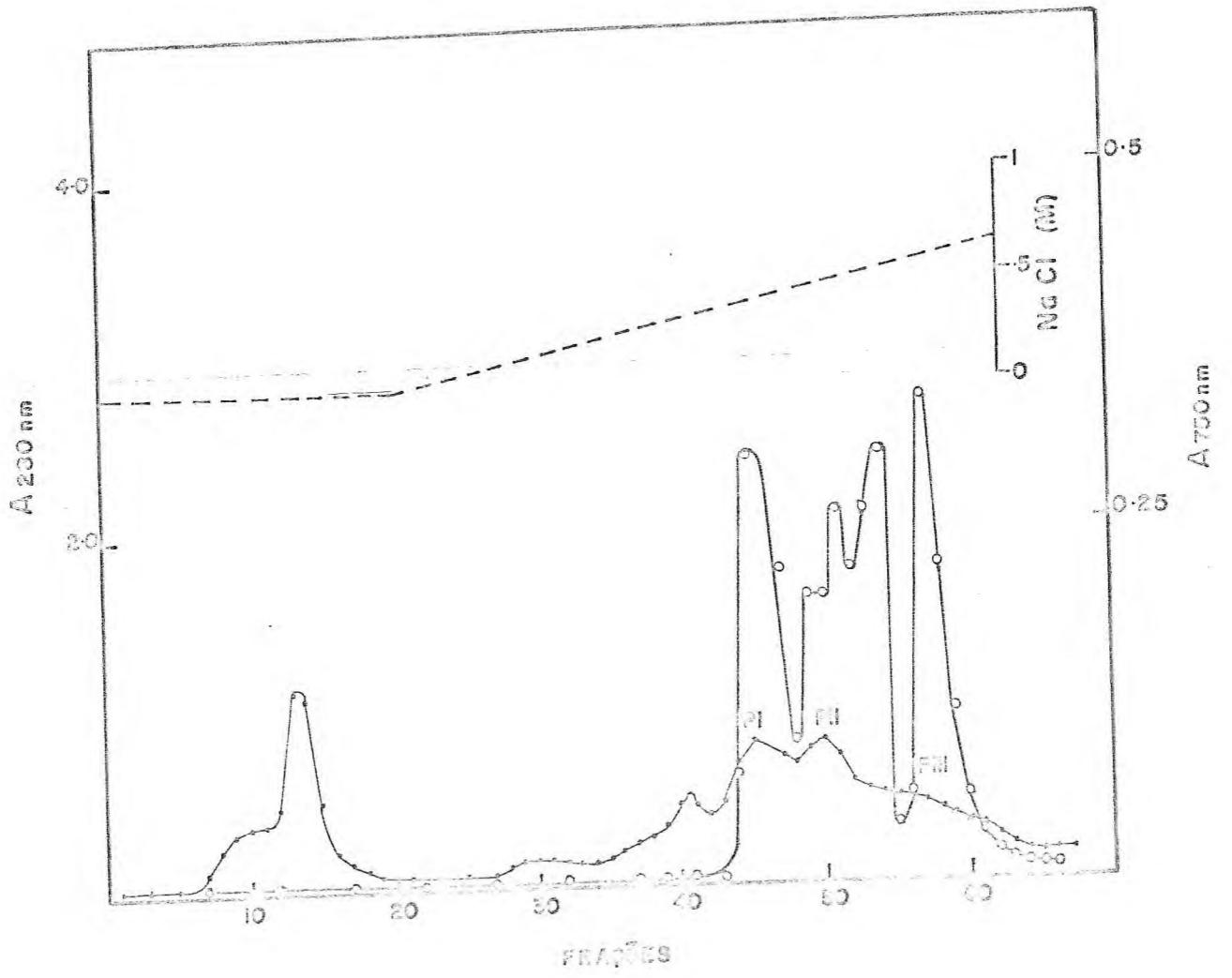
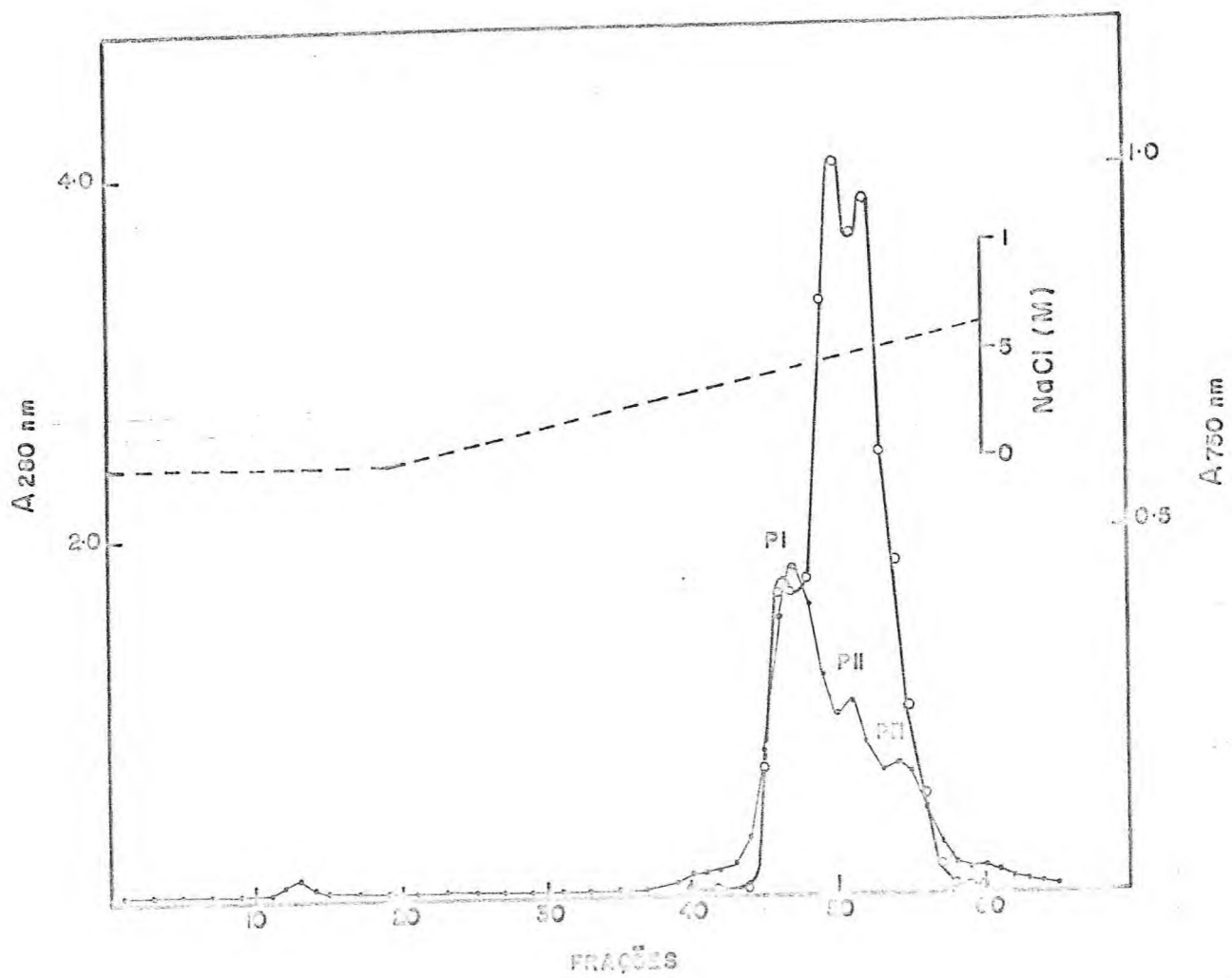


Figura 8 - Recromatografia em SP-Sephadex C-50 da fração com atividade hemoglobínica obtida na cromatografia da fig. 6. Coluna de 24 x 2cm; tampão de partida: acetato 0,05M pH 5,0 seguido por gradiente linear 0-1M de NaCl. Fluxo 30ml/hora; volume das frações 4ml/tubo. (—○—) concentração de proteína (A_{280nm}); (—○—) atividade hemoglobínica (A_{750nm}).



5. Cromatografia em Sephadex G-100 - filtração em gel

A fração 25/50 liofilizada, foi submetida a filtração em gel de dextrana e mostrou diferentes comportamentos quando eluidos em pH diferentes. Quando a eluição é feita com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 (fig. 9), observa-se a presença de três componentes sendo que quase toda a atividade hemoglobínica corresponde a fração de peso molecular de cerca de 124.000 daltons. A eluição da fração 25/50 com tampão acetato pH 5,0 (fig. 10), mostra também três componentes proteicos e três picos de atividade hemoglobínica um correspondendo a um peso molecular de 84.000 daltons e dois menores com pesos moleculares de 38.500 e 17.600 daltons. A fração 25/50 eluída com ácido acético 0,05M pH 2,9 (fig. 11), mostra 4 componentes proteicos e um pico de atividade bastante assimétrico com um máximo de peso molecular de cerca de 17.600 daltons. Esses dados evidenciam a forte tendência de dissociação em pH ácido. As frações com atividade hemoglobínica obtidas por cromatografia de troca iônica foram também submetidas a filtração em gel de dextrana com ácido-acético 0,05M pH 2,9 (fig. 12). A fração I apresentou dois componentes proteicos e um pico de atividade com um máximo em torno de peso molecular 69.200 daltons. A fração II também apresentou dois componentes proteicos e um pico de atividade com um máximo de peso molecular de 45.000 daltons.

Figura 9 - Cromatografia em Sephadex G-100 da fração 25/50. Coluna de 24 x 2cm. Eluida com tampão fosfato 0,02M pH 7,6; fluxo 30ml/hora; volume das frações 4ml/tubo. (—○—○—) concentração de proteína (A_{280nm}); (—○—○—) atividade hemoglobínica (A_{750nm}).

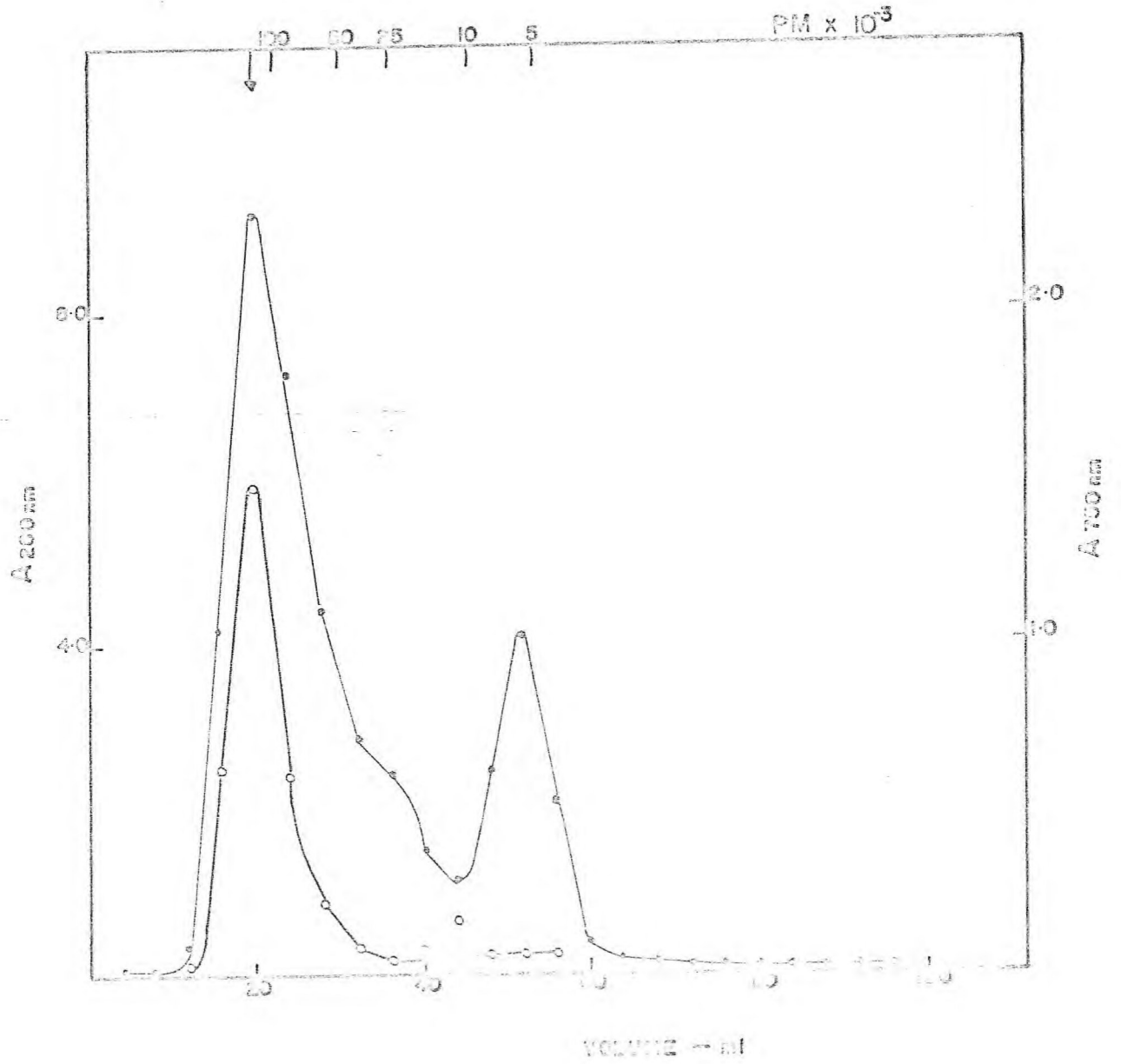


Figura 10 - Cromatografia em Sephadex G-100 da fração 25/50.

Coluna de 24 x 2cm. Eluída com tampão acetato 0,05M
pH 5,0. Fluxo 30ml/hora; volume das frações 4ml/tu
bo. (—○—○) concentração de proteína ($A_{280\text{nm}}$);
(—○—○) atividade hemoglobínica ($A_{750\text{nm}}$).

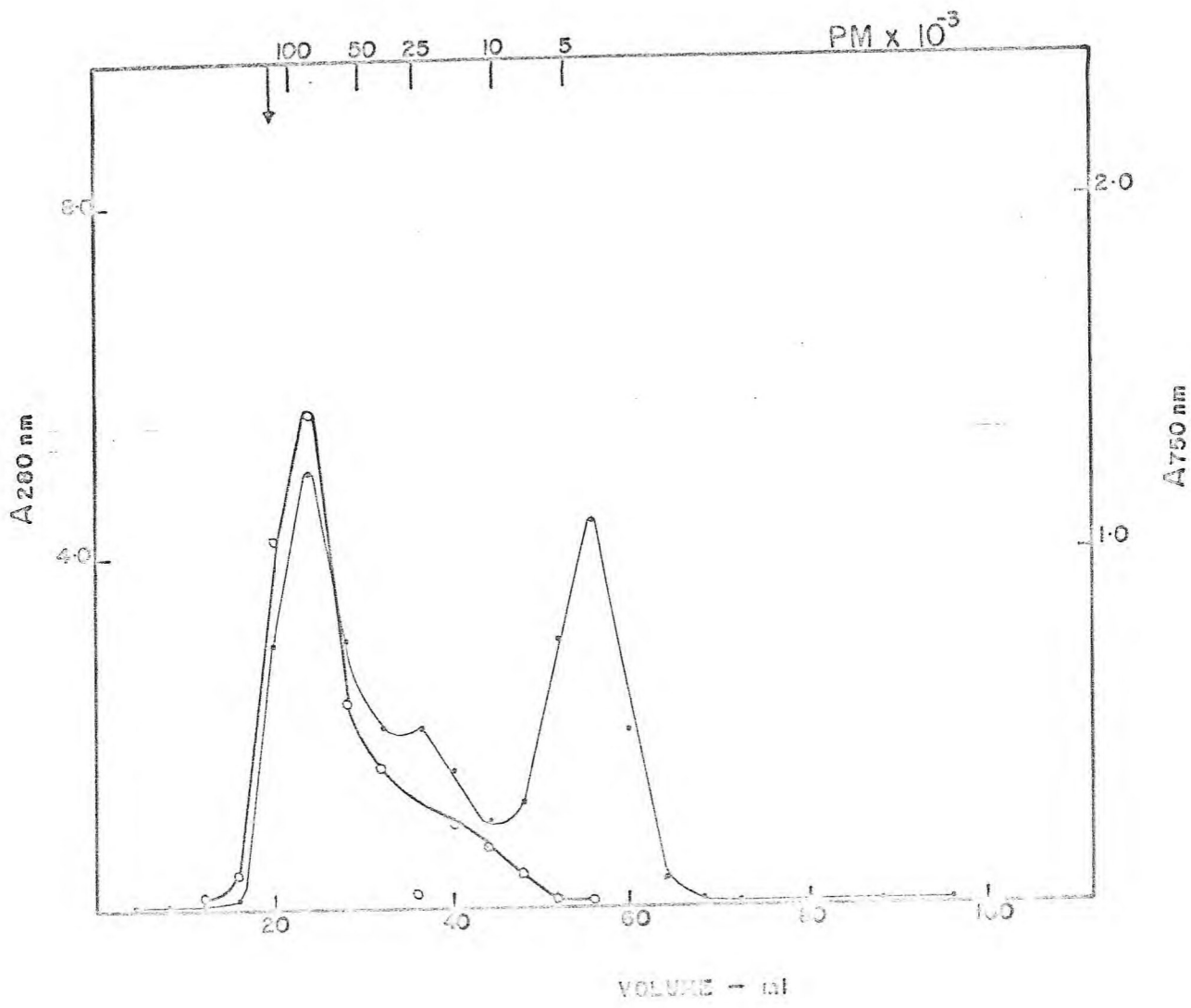


Figura II - Cromatografia em Sephadex G-100 da fração 25/50. Coluna de 24 x 2cm. Eluída com ácido acético 0,05M pH 2,9; fluxo 30ml/hora; volume das frações 4ml/tubo. (—●—●—) concentração de proteína (A_{280nm}); (—○—○—) atividade hemoglobinásica (A_{750nm}).

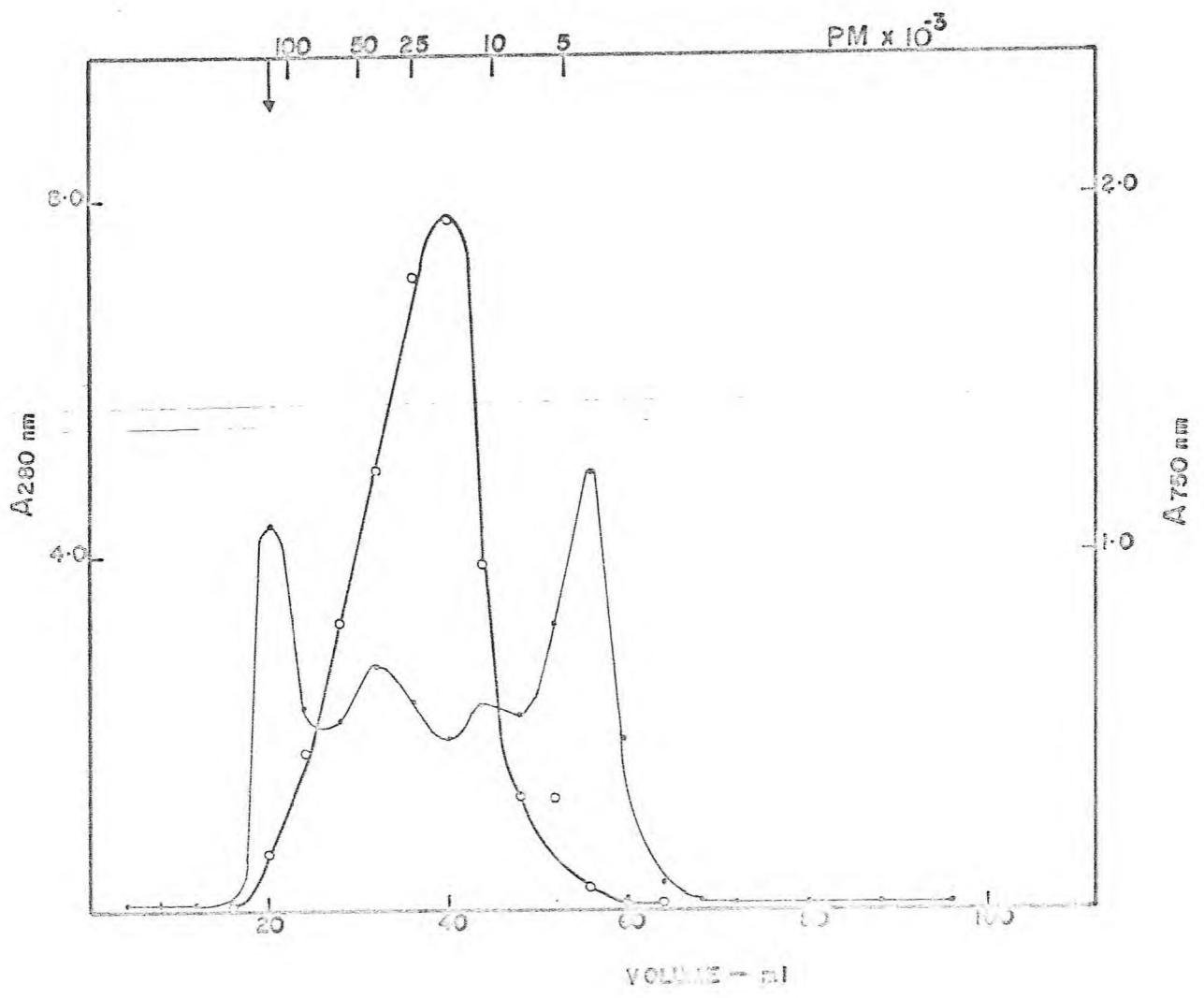
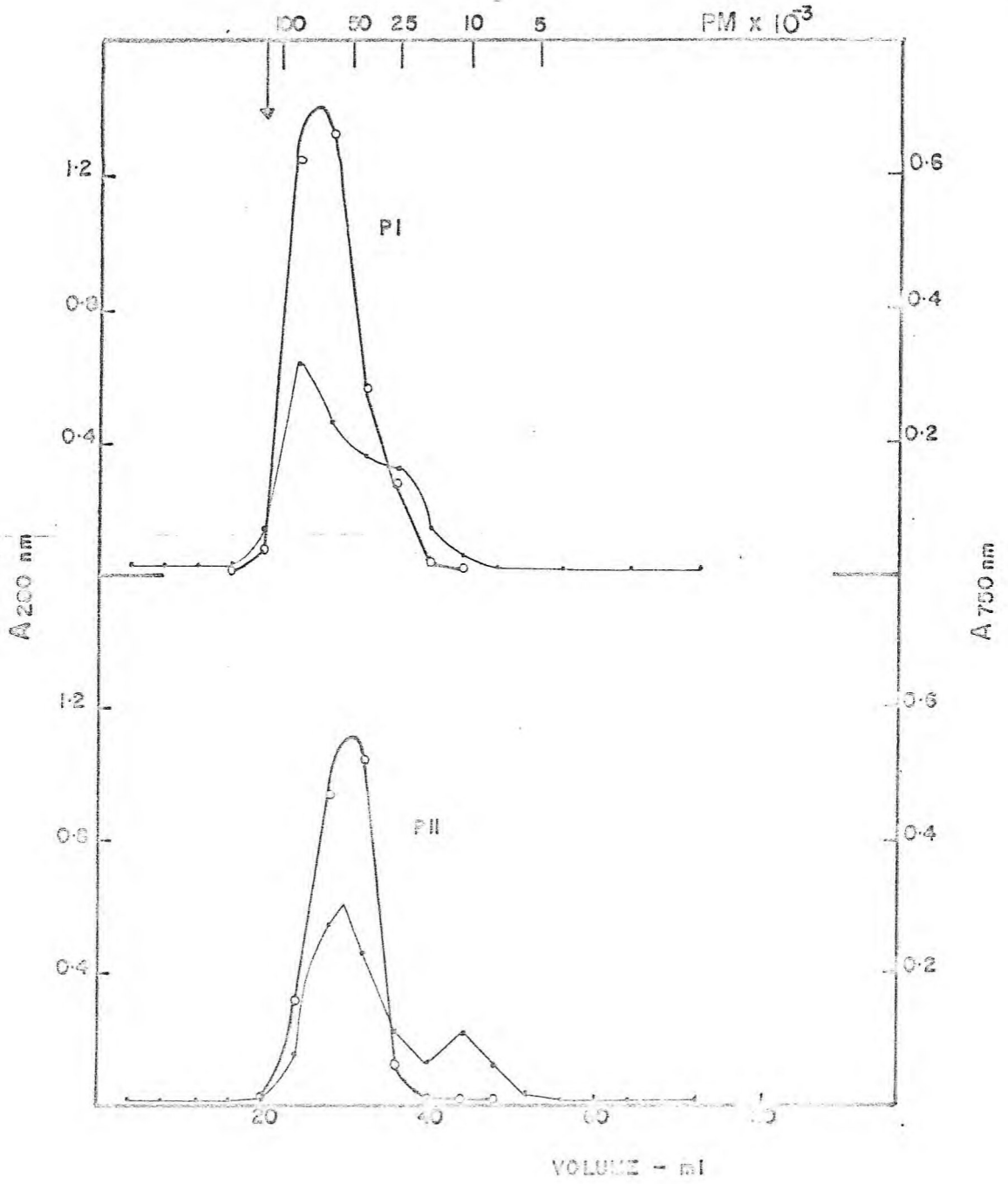


Figura 12 - Cromatografia em Sephadex G-100 dos picos I e II com atividade hemoglobínica da cromatografia em SP-Sephadex C-50, eluidos com ácido acético 0,05M pH 2,9. Fluxo 30ml/hora; volume das frações 4ml/tubo. (—○—○—) concentração de proteína (A_{280nm}); (—○—○—) atividade hemoglobínica (A_{750nm}).



6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As diversas frações obtidas nas etapas de purificação foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (fig. 13). Verifica-se que, enquanto o extrato bruto e a fração 25/50 apresentam vários componentes proteicos, após cromatografia de afinidade evidencia-se somente quatro componentes com baixa mobilidade eletroforética (R_f entre 0,08 e 0,4). As frações obtidas por cromatografia de troca iônica mostram-se bastante complexas, evidenciando-se três componentes na fração PI e pelo menos três componentes na fração PII.

7. Atividade inibitória

Os dados apresentados na tabela XI referem-se à atividade inibitória de tripsina durante a purificação das frações com atividade proteolítica. Observa-se que 42% dos inibidores de tripsina presentes na fração 25/50 ficam retidos na coluna de afinidade e são eluídos no pico com atividade proteolítica, havendo um decréscimo na atividade específica: A cromatografia dessa fração, que detém 42% da atividade inibitória, em coluna de troca iônica, mostra que toda atividade inibitória fica retida na coluna, sendo eluída nas mesmas frações com atividade proteolítica. Observa-se que o pico II (fig. 6), que apresenta a maior atividade inibitória específica com uma purificação de 66 vezes, coincide com o pico de maior atividade hemoglobínica específica (tab. XII), representando uma purificação de 13,5 vezes. Ainda pela análise dos dados das tabelas XI e

Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em pH 8,3.
I) extrato bruto; II) fração 25/50; III) cromatografia de afinidade; IV) pico I SP-Sephadex C-50
V) pico II SP-Sephadex C-50; VI) pico III SP-Sephadex C-50.

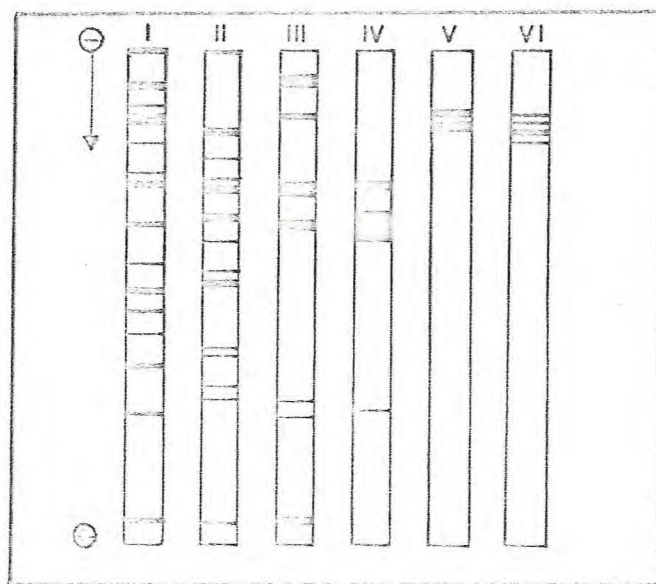


Tabela XI - Atividade anti-tríptica nas diversas frações com atividade proteolítica

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEINA TOTAL(mg)	ATIVIDADE				
			UI	UI	TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO(%)
Extrato	250,0	10557,5	518,7	129682,5	12,3	100	1
F 25/50	81,1	763,9	1470,6	119265,6	156,1	91,9	12,7
Afinidade	610,9	398,8	81,5	49788,4	124,8	38,4	10,2
SP-Sepha- dex C-50 Pico I	109,1	49,7	357,2	38970,5	783,5	30,0	63,7
SP-Sepha- dex C-50 Pico II	54,6	13,1	194,2	10603,3	809,4	8,2	65,8
SP-Sepha- dex C-50 Pico III	127,3	24,7	10,6	1354,5	54,7	1,0	4,5

¹ - UI . mg proteína⁻¹.

Tabela XII - Atividade hemoglobínica nas frações e picos ativos da cromatografia em SP-Sephadex C-50.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEÍNA TOTAL(mg)	ATIVIDADE			
			UA TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO(%)	PURIFICAÇÃO(x)
Extrato	250,0	10557,5	4937,5	0,467	100	1
F 25/50	81,1	763,9	1905,9	2,490	38,6	5,3
Afinidade	610,9	398,8	1343,9	3,370	27,2	7,2
SP-Sepha- dex C-50 Pico I	109,1	49,7	125,5	2,520	2,5	5,4
SP-Sepha- dex C-50 Pico II	54,6	13,1	81,9	6,250	11,6	13,4
SP-Sepha- dex C-50 Pico III	127,3	24,7	19,0	0,770	0,38	1,7

¹ - UA . mg proteína⁻¹.

XII, verificamos que há uma recuperação total da atividade inibitória na coluna de troca iônica, enquanto há uma perda acentuada (83%) da atividade hemoglobínica. Conforme mostram as tabelas XI e XII, não há uma separação das atividades inibitória e hemoglobínica nas várias fases de purificação.

O comportamento dos inibidores de tripsina quando a fração 25/50 é submetida a cromatografia de exclusão molecular é bastante diferente daquele apresentado durante as outras etapas de purificação. Os dados das tabelas XIII e XIV, mostram que há uma separação efetiva das atividades inibitórias e proteolíticas quando se faz a eluição da fração 25/50 com tampão fosfato 0,02M pH 7,6. A figura 14 mostra que enquanto as frações com atividade proteolítica são eluídas numa posição correspondente a um peso molecular de 124.000 daltons, as frações com atividade inibitória apresentam um peso molecular bem inferior.

8. Efeito do inibidor bruto sobre a atividade hemoglobínica

Para se verificar o efeito do inibidor bruto sobre a atividade hemoglobínica, testou-se a atividade residual da enzima em presença do inibidor, conforme descrito no item II dos métodos. A figura 15 mostra o efeito do inibidor bruto sobre a atividade hemoglobínica. Verifica-se que não há nenhum efeito inibitório quando se incuba a fração ativa da cromatografia de afinidade por períodos de 30

Tabela XIII - Atividade anti-tríptica nos picos da cromatografia em Sephadex G-100 da fração 25/50.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEINA TOTAL(mg)	ATIVIDADE				
			UI	UI TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO(%)	PURIFICAÇÃO(x)
F 25/50	3,0	86,0	480	9600	111,6	100	1
Pico I	25,0	39,3	5,0	126,1	3,2	-	-
Pico II	27,0	13,7	4,1	111,8	8,2	-	-
Pico III	39,0	6,98	148,4	5787,6	829,2	61	7,4

* - Os dados referem-se a 100 mg da F25/50 dissolvidos em 3 ml de tampão fosfato 0,02M pH 7,6.

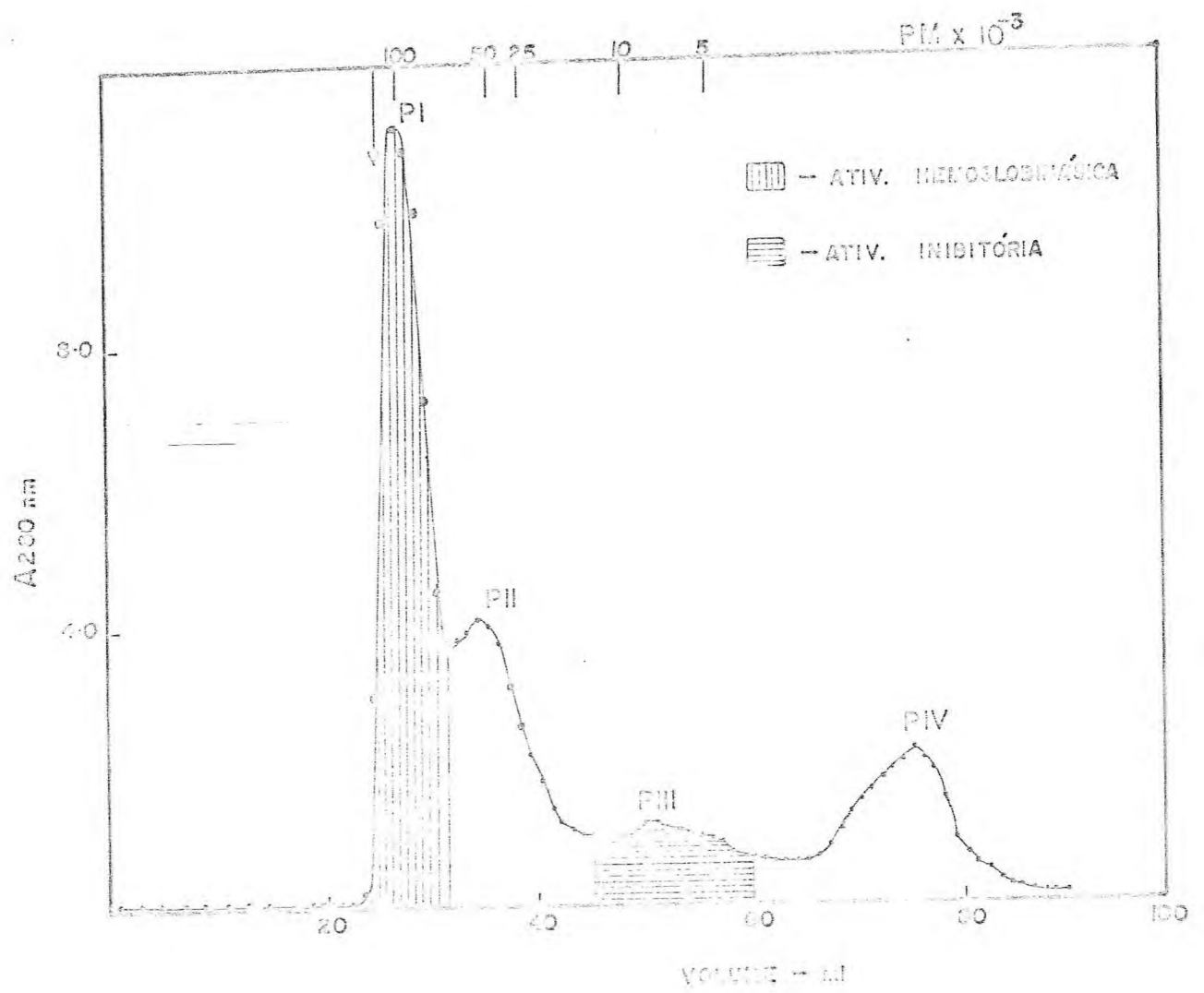
¹ - UI . mg proteína⁻¹.

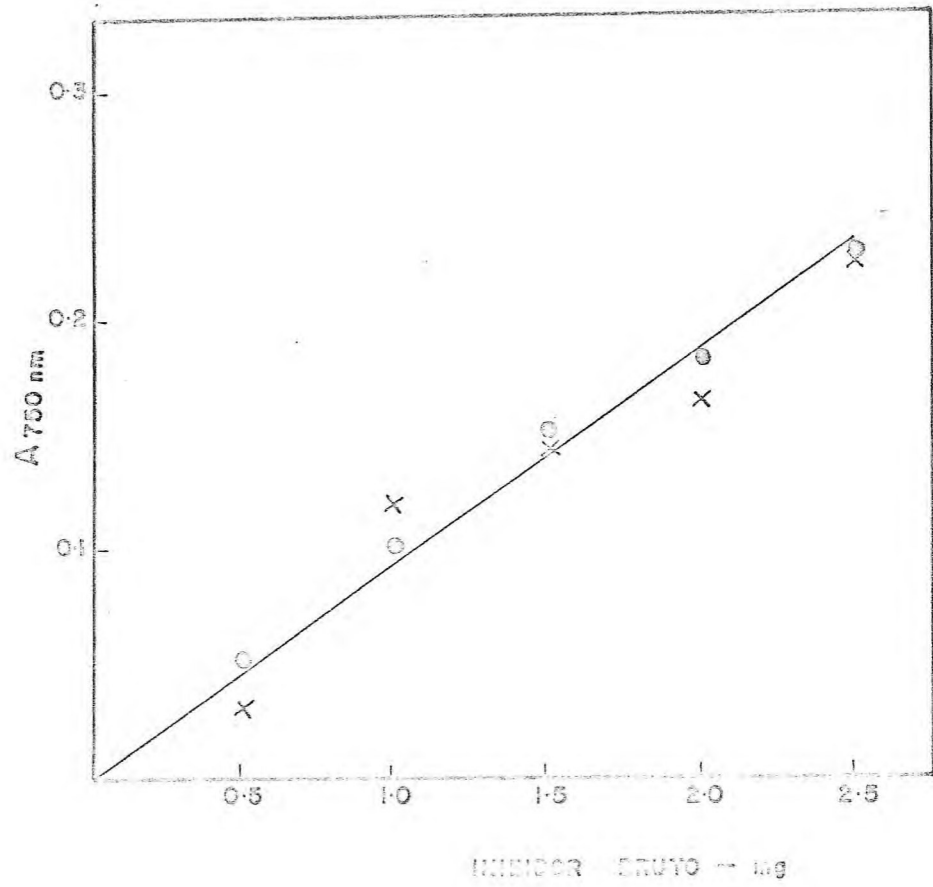
Tabela XIV - Atividade hemoglobínica nos picos da cromatografia em Sephadex G-100 da fração 25/50.

FRAÇÃO	VOLUME(ml)	PROTEINA TOTAL(mg)	ATIVIDADE				
			UI	UI TOTAL	ESPECÍFICA ¹	RECUPERAÇÃO(%)	PURIFICAÇÃO(x)
F 25/50	3,0	86,0	58,6	175,9	1,79	100	1
Pico I	25,0	39,3	2,7	67,5	1,73	38	1
Pico II	27,0	13,7	-	-	-	-	-
Pico III	39,0	6,9	-	-	-	-	-

* - Os dados referem-se a 100 mg da F 25/50 dissolvidos em 3 ml de tampão fosfato 0,02M pH 7,6.

¹ - UA . mg proteína⁻¹.





60 e 120 minutos com concentrações de inibidor variando de 0,5 a 2,5 mg/ml, correspondendo a uma faixa de 395 a 1975 unidades de inibição.

IV - DISCUSSÃO

É consenso geral que a degradação das proteínas de reserva de leguminosas durante a germinação está relacionada com o aparecimento de atividades proteolíticas. As poucas vezes no entanto em que foram demonstradas proteases em sementes não germinadas (9, 12, 18, 35, 39, 50, 51), os autores não conseguiram estabelecer uma função precisa para essas enzimas.

A presença de um sistema proteolítico em sementes não germinadas de Vigna unguiculata foi demonstrado por Ainouz e col. (3). Na presente investigação há a demonstração inequívoca que esse sistema é bastante complexo, provavelmente envolvendo várias enzimas com labilidades e afinidades diferentes pelos vários substratos utilizados. Essa evidência é sugerida pelo fato observado de que para as atividades peptidásicas (LPA), a velocidade da reação aumenta linearmente com a concentração da enzima, enquanto que para as endopeptidásicas (hemoglobina e caseína), há um desvio da linearidade quando se aumenta a concentração da enzima, sugerindo pelo menos dois sistemas proteolíticos distintos. Segundo Wang e Grant (61), isto é típico de sistemas onde algum outro fator, além da concentração da enzima, está envolvido na etapa determinante da velocidade da reação, inclusive a presença de inibidores dessa atividade.

Os resultados mostram que quase toda atividade enzi

mática está na fração solúvel em água, fato observado pela maioria dos pesquisadores em sementes (15). É interessante observar que 32% da atividade hemoglobínica permanece no resíduo da extração, provavelmente combinada ou coprecipitada com proteínas insolúveis, ou mesmo devido ao fato de que mais de uma enzima com solubilidades diferentes estejam relacionadas com essa atividade proteolítica.

A observação de que a atividade proteolítica precipita na faixa de 25/50% de saturação com sulfato de amônio (tab. V a VIII), difere um pouco dos resultados encontrados para sementes germinadas de *Phaseolus* (56), milho (1), trigo (40) e sorgo (22), quando se utilizou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80% de saturação, mas é semelhante ao descrito por Burger (9), onde a atividade precipita na faixa de 0-50% de saturação.

A existência de pelo menos dois sistemas proteolíticos é reforçada pela cromatografia de afinidade (fig. 4 e 5), onde há uma separação clara das atividades peptidásicas das endopeptidásicas. Apesar de se obter uma purificação de 16 vezes (tab. IX), bem maior do que as duas vezes obtidas por Chua e Bushuk (12), e semelhante as 25 vezes obtidas por Preston e Kruger (40), há uma perda de 22% da atividade hemoglobínica em contraste com os 7% da atividade caseínica. Entretanto essa recuperação de cerca de 80% da atividade está em concordância com os dados apresentados por Chua e Bushuk (12), mas são bastante diferentes daqueles apresentados por Preston e Kruger (40), onde houve um aumento de 20% da atividade após a afinidade que os

autores acreditam seja devido a remoção de inibidores de proteases endógenos. Mas o fato de que com esse procedimento 70% das proteínas inativas foram removidas, já o indica como um excelente método para a purificação dessas proteases.

A cromatografia de troca iônica (fig. 6), uma etapa adicional na purificação, além de remover os peptídios de hemoglobina eluidos com a enzima, mostrou um sistema complexo, evidenciando pelo menos quatro frações com atividade endopeptidásica eluidas entre 0,35 a 0,60M de NaCl.

A eletroforese dessas frações também mostrou várias faixas de proteína, mas devido a falta de um ensaio adequado é difícil dizer se todas estão envolvidas na atividade proteolítica.

Apesar de ter havido uma perda acentuada na atividade, houve um pequeno aumento na atividade específica. Essa perda de atividade após cromatografia de troca iônica foi também observada por Viney (56) com Phaseolus e Burger e col. (11) com cevada, e de acordo com esses autores é difícil obter uma boa recuperação e um bom grau de purificação quando várias enzimas com vários graus de estabilidade atuam num mesmo substrato. Várias regiões com atividade, após cromatografia de troca iônica, são citadas em trabalhos com malte (9), cevada (11) e arroz (18) e segundo Doi e col. (18) as formas múltiplas encontradas talvez sejam devido a formação de complexos com proteínas inativas. Uma posterior recromatografia (fig. 8 e tab. IX), levou a

uma perda acentuada na atividade, apesar de ter havido um aumento na atividade específica, levando-nos a crer que algumas frações enzimáticas responsáveis pela atividade ácida são inativadas durante esse processo.

O sistema proteolítico ácido de Vigna unguiculata mostrou uma forte tendência de dissociação em pH ácidos. Essa evidência é confirmada quando se faz a filtração em gel com Sephadex G-100 da fração 25/50 (fig. 9 a 11). Enquanto a pH 7,6 há o aparecimento de um pico com atividade de peso molecular 124.000 daltons, a pH 2,9 um pico assimétrico é evidenciado, com um máximo de 17.600 daltons. A filtração em gel dos picos I e II da cromatografia de troca iônica (fig. 12), mostrou um único pico ativo com pesos moleculares de 69.200 e 45.000 daltons respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos com sementes de lotus 36.800 e 35.500 daltons (49), arroz 60.000 e 65.000 daltons (18), cevada 55.000 e 61.000 daltons (39) e milho 40.000 daltons na semente não germinada e 36.000 e 12.000 daltons nas sementes germinadas (38).

Após todas as etapas de purificação não se conseguiu a separação da atividade hemoglobínica da atividade caseinásica. Apesar das diferenças observadas, os dados são insuficientes para podermos afirmar que se trata de dois grupos distintos de proteases com características semelhantes.

As etapas de purificação utilizadas não permitiram a separação dos inibidores de tripsina das frações com ati

vidade proteolítica. Verifica-se que na cromatografia de afinidade há a recuperação de somente 40% da atividade inibitória e um decréscimo na atividade específica (tab. XI), levando-nos a sugerir que a fração não adsorvida é mais ativa e não forma complexos muito estáveis com as enzimas. Por outro lado, verificamos que o pico de maior atividade inibitória coincide com o pico de maior atividade hemoglobínica específica (tab. XII), sugerindo que há uma efetiva associação inibidor-enzima, mas os dados não nos permitem concluir que os inibidores regulam a atividade enzimática. Se atentarmos para o fato de que após a remoção de 60% dos inibidores na cromatografia de afinidade, a estabilidade das proteases declinam grandemente, podemos dizer que o complexo enzima-inibidor estabiliza a enzima ou mesmo que a remoção dos inibidores facilita a autólise dessas enzimas. Um dado adicional que reforça a nossa sugestão de que os inibidores estabilizam as enzimas é proporcionado quando se faz a filtração em gel a pH 7,6 da fração 25/50. Há uma separação nítida das atividades proteolíticas e inibitória e uma perda acentuada da atividade proteolítica (60%).

A demonstração de que inibidores de tripsina endógenos não tem efeito sobre a atividade proteolítica (fig.15) mesmo numa fase de maior purificação, reforça a nossa sugestão de que os inibidores ou pelo menos a fração representada pelo inibidor bruto, não regulam a atividade das proteases presentes em sementes não germinadas de Vigna unguiculata, o que concorda com os dados citados na literatura (3, 5, 29).

Finalmente podemos concluir que há um sistema muito complexo, formado por enzimas diferentes mas com características bastante semelhantes, que tem afinidades diferentes pelos diversos substratos empregados, sendo que algumas para a sua estabilidade necessitam da presença dos inibidores.

V - CONCLUSÕES

1. O extrato de sementes não germinadas de Vigna unguiculata é capaz de hidrolisar hemoglobina em pH 3,5, indicando a presença de endopeptidases ativas nas sementes não germinadas.
2. Há um sistema proteolítico ácido bastante complexo nas sementes não germinadas de Vigna unguiculata.
3. A fração responsável pela atividade hemoglobinásica é de natureza albumínica (solúvel em água) e precipita na faixa de 25 a 50% de saturação com sulfato de amônio.
4. A fração com atividade hemoglobinásica apresenta forte tendência de dissociação em pH ácido.
5. A baixa purificação obtida, associada à baixa recuperação, reflete a labilidade do sistema proteolítico ácido quando submetido aos tratamentos empregados para sua purificação.
6. A filtração em gel de Sephadex G-100 da fração purificada 26 vezes apresentou pesos moleculares de 69.200 e 45.000 daltons.
7. Os inibidores de tripsina endógenos parecem estabilizar as enzimas proteolíticas presentes nas sementes.

VI - BIBLIOGRAFIA

01. ABE, M., ARAI, S. and FUJIMAKI, M. 1977. Purification and characterization of a protease occurring in endosperm of germinating corn. Agr. Biol. Chem., (Tokyo), 41, 893-899.
02. ADAMS, C. A. and NOVELLIE, L. 1975. Acid hydrolases and autolytic properties of protein bodies and spherosomes isolated from ungerminated seeds of Sorghum bicolor (Linn.) Moench. Plant Physiol., 55 7-11.
03. AINOUIZ, I. L., BENEVIDES, N. B. and FREITAS, A. L.P. 1980. Proteolytic activities in seeds of Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridó. Biol. Plantarum (Praha), aceito para publicação.
04. ASHTON, F. M. 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. Ann. Rev. Plant Physiol., 27, 95-117.
05. 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.
06. BAUMGARTNER, B. and CHRISPEELS, M. J. 1977. Purification and characterization of vicilin peptidohydrolase, the major endopeptidase in the cotyledons of Mung bean seedlings. Eur. J. Biochem., 77, 223-233

07. BENEVIDES, N. M. B. 1979. Atividade BAPA-ásica em sementes de Vigna sinensis (L.) savi cv. scridó. Fortaleza-UFC. Dissertação de Mestrado em Bioquímica
08. BEEVRS, L. and SPLITTSTOESSER, W. E. 1968. Protein and nucleic acid metabolism in germinating peas. J. Exp. Bot., 19, 698-711.
09. BURGER, W. C. 1966. The proteases of barley & malt: Recent research. Cer. Sci. Today., 11, 19-23.
10. BURGER, E. G. 1973. Multiple forms of acidic endo peptidase from germinated barley. Plant Physiol., 51, 1015-1021.
11. BURGER, W. C., PRENTICE, N., MOELLER, M. and ROBBINS G. S. 1970. Stabilization, partial purification and characterization of peptidyl peptide hydrolases from germinated barley. Phytochem., 9, 49-58.
12. CHUA, G. K. and BUSHUK, W. 1969. Purification of wheat proteases by affinity chromatography on hemoglobin-sepharose column. Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 545-550.
13. CLARKE, J. T. 1964. Simplified "Disc" (poliacrylamide/gel) electrophoresis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 428-436.
14. COELHO, A. N. 1980. Relação entre o sistema proteolítico de Callosobruchus maculatus (Fabr.) e inibidores de enzimas proteolíticas de Vigna sinensis (L.) savi. Fortaleza-UFC. Dissertação de Mestrado em Bioquímica.

15. DANIELSON, C. E. 1956. Plant proteins. Ann.Rev. Plant Physiol., 7, 215-236.
16. DECHARY, J. M. 1970. Seed proteases and proteases inhibitors. Econ. Bot., 24, 113-122.
17. 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.
18. DOI, E., SHIBATA, D., MATOBA, T. and YONEZAWA, D. 1980. Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting rice seeds. Agr. Biol. Chem., (Tokyo), 44, 741-747.
19. ERLANGER, B. F., NICHOLAS, K. and COHEN, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys., 95, 271-278.
20. FELLER, U., SOONG, T. T. and HAGEMAN, R. H. 1978. Patterns of proteolytic enzyme activities in different tissues of germinating corn (Zea mays L.) Planta., 140, 155-162.
21. FUJIMAKI, M., ABE, M. and ARAI, S. 1977. Degradation of zein during germination of corn. Agr. Biol. Chem., 41, 887-891.
22. GARG, G. K. and VIRUPAKSHA, T. K. 1970. Acid protease from germinated sorghum. I. Purification and characterization of the enzyme. Eur. J. Biochem., 17, 4-12.

23. GOA, J. 1953. A microbiuret method for protein determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 5, 218-222.
24. GUARDIOLA, J. L. and SUTCLIFFE, J. F. 1971. Control of protein hydrolysis in the cotyledons of germinating pea (Pisum sativum L.) seeds. Ann. Bot., 35, 791-807.
25. 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.
26. HARVEY, B. M. R. and OAKS, A. 1973. Characteristics of an acid protease from maize endosperm. Plant Physiol., 53, 449-452.
27. HARVEY, B. M. R. and OAKS, A. 1974. The hydrolysis of endosperm protein in Zea mays. Plant Physiol., 53, 453-457.
28. HARVEY, M. J. and DEAN, P. D. G. 1976. Suggestions on the use of Ultrogel agarose-polyacrylamide gels affinity chromatography. Sci. Tools., 23, 36-40.
29. HOBDDAY, S. M., THURMAN, D. A. and BARBER, D. J. 1973. Proteolytic and trypsin inhibitory activities in extracts of germinating Pisum sativum seeds. Phytochem., 12, 1041-1046.

30. KOROLYOVA, T. N., SHUTOV, A. D. and VAINTRAUB, I. A. 1975. The action of the proteolytic enzymes of dry-Vetch seeds on their own reserve proteins. Plant. Sci. Letters., 4, 309-313.
31. KUNITZ, M. 1947. Crystalline soybean trypsin, II. General properties. J. Gen. Physiol., 30, 291-310
32. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDAL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol Chem., 193, 265-275.
33. MATILE, Ph. 1968. Aleurone vacuoles as lysosomes. Z.Pflanzenphysiol., 58, 365-368.
34. MARCH, S. C., PARIKH, I. and CUATRACASAS, P. 1974. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal. Biochem., 60, 149-152.
35. McDONALD, C. E. and CHEN, L. L. 1964. Properties of wheat flour proteinases. Cereal Chem., 41, 443-455
36. MIHALYI, E. 1972. Application of proteolytic enzymes to protein structure studies. The Chemical Rubber Co. Cleveland, Ohio USA. Chapter 3. p.39-100.
37. MOELLER, M., ROBBINS, G. S., BURGER, W. C. and PRENTICE, N. 1970. A carboxipeptidase from germinated barley and its action on casein. J. Agr. Food Chem., 18, 886-890.
38. MOUFEAUX, T. 1979. Protein breakdown and protease properties of germinating maize endosperm. Phytochem., 18, 1113-1117.

39. ORY, R. L. and HENNINGSEN, K. W. 1969. Enzymes associated with bodies isolated from ungerminated barley seeds. Plant Physiol., 47, 1488-1498.
40. PRESTON, K. R. and KRUGER, J. E. 1976. Purification and properties of two proteolytic enzymes with carboxypeptidase activity in germinated wheat. Plant Physiol., 58, 516-520.
41. PRESTON, K. J. and KRUGER, J. E. 1979. Physiological control of exo- and endoproteolytic activities in germinating wheat and their relationship to storage protein hydrolysis. Plant Physiol., 64, 450-454.
42. PUZTAI, A. and DUNCAN, I. 1971. Changes in proteolytic enzyme activities and transformation of nitrogenous compounds in the germinating seeds of kidney bean (Phaseolus vulgaris). Planta., 96, 317-325.
43. REILLY, C. C., O'KEENEY, S. T., TITUS, J. S. and SPLITTSTOESSER, W. E. 1978. The solubilization and degradation of pumpkin seed globulin during germination. Plant Cell Physiol., 19, 235-246.
44. RYAN, C. A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Ann. N.Y. Acad. Sci., 24, 173-196.

45. SALMIA, M. A., NYMAN, S. A. and MIKOLA, J. J. 1978. Characterization of the proteinases present in germinating seeds of scots pine, Pinus sylvestris Physiol. Plant., 42, 252-256.
46. SALMIA, M. A. and MIKOLA, J. J. 1980. Inhibitors of endogenous proteinases in the seeds of scots pine, Pinus sylvestris. Physiol. Plant., 48, 126-130.
47. SALMIA, M. A. 1980. Inhibitors of endogenous proteinases in scots pine seeds: fractionation and activity changes during germination. Physiol. Plant., 48, 266-270.
48. SHINANO, S. and FUKUSHIMA, K. 1969. Studies on Lotus seed protease. Part II. Purification and some properties. Agr. Biol. Chem. (Tokyo), 33, 1236-1243
49. SHINANO, S. and FUKUSHIMA, K. 1971. Studies on Lotus seed protease. Part. III. Some physicochemical and enzymic properties. Agr. Biol. Chem. (Tokyo), 35, 1488-1494.
50. St ANGELO, A. J., ORY, R. L. and HANSEN, H. J. 1969. Localization of an acid proteinase in Hempseed. Phytochem., 8, 1135-1138.
51. St ANGELO, A. J., ORY, R. L. and HANSEN, H. J. 1969. Purification of acid proteinase from Cannabis sativa L. Phytochem., 8, 1873-1877.

52. SONDBLOM, N. and MIKOLA, J. 1972. On the nature of the proteinases secreted by the aleurone layer of barley grain. Physiol. Plant., 27, 281-284.
53. UCHOA, A. A. 1977. Atividade LPA-ásica em sementes de feijão de corda Vigna sinensis (L.) savi. cv. seridó. Fortaleza-UFC. Dissertação de Mestrado em Bioquímica.
54. VENTURA, M. M. and XAVIER FILHO, J. 1966. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (Vigna sinensis). I. Purification and partial characterization. Ann. Acad. Brasil Sci., 38, 553-566.
55. VERDCOURT, B. 1970. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the "flora of tropical east Africa": Kew Bulletin., 24, 507-569.
56. VINEY, J. R. and EANSRAW, J. A. M. 1975. Purification and properties of an acid protease from Phaseolus aureus. Phytochem., 44, 1283-1284.
57. XAVIER FILHO, J. 1973. Trypsin inhibitors during germination of Vigna sinensis seeds. Physiol. Plant., 28, 149-154.
58. XAVIER FILHO, J. 1974. Trypsin inhibitors in sorghum grain. J. Food Sci., 39, 422-423.
59. YATSU, L. Y. and JACKS, T. J. 1968. Association of lysosomal activity with aleurone grains in plant seeds. Arch. Biochem. Biophys., 124, 466-471.

60. YOMO, H. and TAYLOR, M. P. 1973. Histochemical studies on protease formation in the cotyledons of germinating bean seeds. Planta., 112, 35-43.
61. WANG, C. and GRANT, D. R. 1969. The proteolytic enzymes in wheat flour. Cereal Chem., 46, 537-544.

38 - G.1.12 PROTEASES ÁCIDAS EM COTILÉDONES DE SEMENTES DE *Vigna sinensis*(L.)Savi cv. seridó. Carbena França Lopes, Iracema Lima Ainoz e José Xavier Filho (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará)

As proteases ácidas presentes em sementes de Leguminosas tem sido pouco estudadas e o papel fisiológico das mesmas permanece obscuro. Na maioria dos estudos realizados com proteases de sementes tem sido empregados cotilédones de sementes germinantes e várias evidências indicam que esses enzimas diferem daquelas presentes nas sementes quiescentes. A atividade proteolítica ácida presente em cotilédones de *Vigna sinensis* cv. seridó foi estudada em pH 3,5, usando-se hemoglobina como substrato, mostrando-se bastante complexa. A fração proteica que precipita entre 25 e 50% de saturação com sulfato de amônio encerra a quase totalidade da atividade presente no extrato obtido com tampão fosfato pH 7,6. Por diálise do extrato contra água verifica-se que a fração responsável pela atividade é na sua maior parte de natureza albumínica, sendo que 32% da atividade total ficam retidos no resíduo da extração. A fração obtida por precipitação com sulfato de amônio (F25/50) quando submetida a cromatografia em Sephadex G-100 pH 7,6 e pH 2,9 mostra que as frações responsáveis pela atividade em estudo apresentam pesos moleculares de ca. de 100.000 e 12-15.000 daltons, respectivamente, sugerindo uma tendência de associação em pH alcalino. A preparação acima (F25/50) foi submetida a cromatografia em Sepharose-Hemoglobina (pH 4,0) seguida de cromatografia em SP-Sephadex C-50 (pH 5,0) obtendo-se pelo menos 3 frações, eluídas entre 0,40 e 0,45M de NaCl, responsáveis pela atividade hemoglobínica. A atividade foi purificada ca. de 26 vezes e a diversidade de comportamento das frações sugere uma grande complexidade do sistema responsável pela atividade proteolítica em sementes quiescentes.
(UFC, CNPq, PEAS)