

210

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA ENZIMA DO TIPO TRIPSINA DE SEMENTES DE *CANAVALLIA ENSIFORMIS*. Wagner, C.B., Ramos, R.C., Carlini, C.R. (Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS)

A atividade de enzimas proteolíticas é importante na germinação e no crescimento de vegetais, para a aquisição de material de origem protéica durante o desenvolvimento da plântula. O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar a cinética de uma enzima do tipo serino-protease, presente em sementes de *Canavalia ensiformis*, comparando-a com a tripsina bovina. A atividade proteásica foi determinada em ensaio otimizado em placas de ELISA no sistema SpectraMAX (Molecular Devices), equipado com um programa para estudos cinéticos. Os ensaios foram feitos com N-benzoil-DL-arginina nitroanilida (BAPNA), um clássico substrato de tripsina, em tampão Tris HCl 20mM, pH 7.5. A enzima de origem vegetal foi obtida através do fracionamento do extrato bruto de sementes maduras em sulfato de amônio entre 0,35-0,55. Esta fração foi submetida a cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose em pH 7.5, onde a atividade proteásica foi recuperada na fração eluída com 300mM de NaCl. O pH ótimo para a atividade hidrolítica foi 10.0 para enzima vegetal e 7.5-9.5 para a enzima bovina. O Km aparente para BAPNA da enzima vegetal foi 6 vezes menor quando comparado com o Km da enzima de origem animal. Benzamidina, um clássico inibidor de serino-proteases, inibiu ambas enzimas, mas SBTI (Soybean Trypsin Inhibitor), um tradicional inibidor de tripsina bovina, não inibiu a tripsina vegetal. Estes resultados sugerem que a enzima do tipo tripsina das sementes de *Canavalia ensiformis*, apresenta características cinéticas distintas da enzima de mamífero, provavelmente adequada às suas funções no vegetal de origem. Suporte: CNPq, FINEP-BID, PRONEX 76.97.10.700.00