

Ladaslav Sodek

- ENZIMOLOGIA DA UTILIZAÇÃO DE AMIDAS EM SEMENTES IMATURAS.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP para obtenção  
do título de livre docente em  
Fisiologia Vegetal - Metabolismo

CAMPINAS

1980

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

A minha esposa Elbe

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Jr., chefe do Departamento de Biouímica, por me ter facilitado a utilização dos equipamentos daquele departamento.
- Ao Prof. Dr. William José da Silva, chefe do Departamento de Genética e Evolução, pela sua colaboração na condução de fases experimentais importantes para o trabalho com milho.
- Aos Drs. B.J. Mifflin e P.J. Lea, do Rothamsted Experimental Station, Inglaterra, pelo interesse demonstrado pelo trabalho, o qual muito me incentivou cientificamente.
- Ao Prof. Dr. Benedito de Oliveira e Sr. Sergio Menegani, do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela colaboração prestada para a análise de aminoácidos.
- Ao Prof. Dr. Antonio Celso Magalhães, chefe do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelo interesse demonstrado e apoio recebido durante a realização deste trabalho.
- Aos Profs. Dra. Else B. Válio, Dr. William J. da Silva, Dr. Hilton S. Pinto e Dr. Luiz G. Santoro pela revisão do texto.
- À Sra. Luzia Makiyama Kiyono pela datilografia do manuscrito.

## ABREVIATURAS

AKS	$\alpha$ -cetosucinamato
ALA	Alanina
ASN	Asparagina
ASNase	Asparaginase
ASP	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
C (H <sub>2</sub> O)	Carboidrato
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
GDH	Glutamato desidrogenase
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GOGAT	L-glutamina(amida): 2-oxoglutarato amida transferase
GS	Glutamina sintetase
$\alpha$ KG	$\alpha$ -cetoglutarato
MES	Ácido 2(N-morfolino)-etano-sulfônico
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzi <u>da</u> )
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (for- ma reduzida)
OAA	oxaloacetato
POPOP	1,4-bis-(5-feniloxazol-2-il-benzeno)
PPO	2,5-difeniloxazole
PYR	Piruvato
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano

## ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO .....	1
II. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
1. MATERIAL VEGETAL.....	12
2. MÉTODOS .....	12
2.1. Dosagem de GOGAT em milho .....	13
2.1.1. Extração do endosperma de milho .....	13
2.1.2. Purificação parcial de GOGAT .....	13
2.1.3. Ensaio para GOGAT .....	13
2.2. Dosagem de asparaginase de ervilha .....	14
2.2.1. Extração da semente de ervilha .....	14
2.2.2. Purificação parcial de asparaginase .....	15
2.2.3. Ensaio para asparaginase .....	15
2.2.4. Purificação de asparagina .....	16
2.2.5. Peso molecular da asparaginase .....	18
2.3. Dosagem de glutamina sintetase e glutamato de- sidrogenase de ervilha .....	18
2.3.1. Extração de sementes de ervilha .....	18
2.3.2. Dosagem de glutamina sintetase .....	18
2.3.3. Dosagem de glutamato desidrogenase .....	19
2.4. Dosagem de ácido $\alpha$ -cetossucinâmico deamidase de ervilha .....	19
2.5. Transaminase .....	20
2.6. Cromatografia .....	20
2.6.1. Cromatografia em camada delgada .....	20
2.6.2. Reagente fluorescente.....	21
2.6.3. Reagente de ninhidrina .....	21

2.7. Sephadex G25 e LH20 .....	21
2.8. Análise de compostos nitrogenados .....	22
2.8.1. Dosagem de proteína .....	22
2.8.2. Dosagem de nitrogênio .....	22
2.8.3. Análise de aminoácidos .....	22
III. RESULTADOS E INTERPRETAÇÃO .....	23
1. ENDOSPERMA DE MILHO .....	23
1.1. Atividade de GOGAT - experimentos preliminares.	23
1.2. Purificação parcial de GOGAT .....	24
1.3. Especificidade para os substratos .....	24
1.4. Identificação dos produtos da reação .....	25
1.5. Estequiometria da reação .....	26
1.6. Propriedades cinéticas .....	26
1.7. Atividade de GOGAT durante a maturação do endosperma .....	27
1.8. Transaminase .....	28
2. SEMENTE DE ERVILHA.....	29
2.1. Asparagina: $\alpha$ -oxoglutarato amida transferase ..	29
2.2. Asparaginase, asparagina transaminase e ácido $\alpha$ -cetosucinâmico deamidase.....	30
2.3. Ensaio quantitativo para asparaginase .....	32
2.4. Purificação parcial de asparaginase.....	33
2.5. Efeito de cátions .....	35
2.6. Concentração de potássio .....	35
2.7. Efeito da forma de potássio .....	36
2.8. Peso molecular .....	36
2.9. Estabilidade .....	37
2.10. Propriedades cinéticas .....	38
2.11. Inibidores .....	39
2.12. Distribuição da enzima .....	39
2.13. Atividade de asparaginase durante a ontogenia da semente.....	40

2.14. Outras enzimas .....	40
IV. DISCUSSÃO .....	42
1. GOGAT DE MILHO .....	42
2. ASPARAGINASE DE ERVILHA .....	45
3. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DOS DADOS .....	50
V. RESUMO .....	58
VI. SUMMARY.....	61
VII. BIBLIOGRAFIA .....	64
APÊNDICE	
FIGURAS .....	75
TABELAS .....	90

## I - INTRODUÇÃO

Sementes são sítios da síntese e acúmulo de proteína. Estas reservas de proteína são indispensáveis para a sobrevivência da planta, sendo a única fonte de nitrogênio disponível ao embrião durante os primeiros estágios de germinação. Para o homem, essa proteína tem grande importância econômica, uma vez que sementes de plantas cultivadas, cereais e leguminosas principalmente, fornecem cerca de 70% da proteína consumida no mundo (KAUL, 1973).

Justamente devido a essa importância econômica, sementes de plantas cultivadas têm sido mais estudadas e portanto são melhor conhecidas em termos das características e do metabolismo das proteínas de reserva. Os cereais, por exemplo, geralmente apresentam teores de proteína no grão de 8 a 13%, enquanto que sementes de leguminosas possuem teores de proteína mais elevados em redor de 20 a 40% (KAUL, 1973). Tais níveis de proteínas não são encontrados em qualquer outra parte da planta. Nos cereais, o armazenamento desta proteína se localiza principalmente no endosperma, com níveis inferiores no embrião. Nas leguminosas, há também acúmulo de reservas no endosperma nas fases iniciais de desenvolvimento da semente, mas estes compostos são esgotados logo em seguida e proteínas e outras reservas são armazenadas no embrião.

A síntese de proteína de reserva se realiza durante um período relativamente curto, geralmente em menos de 20 dias. Para o milho (MURPHY e DALBY, 1971), Vicia faba (MILLERD et al., 1971; WRIGHT e BOULTER, 1972), Pisum sativum (BEEVERS e POULSON, 1972; STOREY e BEEVERS, 1977), Pisum arvense (FLINN e PATE, 1968) e a

soja(HILL e BRIEDENBACH, 1974) a síntese de proteína durante sua fase mais intensa atinge valores de 1 a 4 mg por dia por semente. É evidente que o elevado nível de síntese de proteína na semente exige o transporte de grandes quantidades de nitrogênio de outras partes da planta. Este nitrogênio tem que ser fornecido em forma reduzida devido a incapacidade, ou capacidade bastante limitada da semente em reduzir o nitrato(MILLERD et al., 1975; SCHELESIER, 1977; OAKS et al. 1978) a principal forma de nitrogênio inorgânico absorvido pela planta(BEEVERS, 1976). Possíveis fontes de nitrogênio reduzido incluem a folha, reconhecido sítio de assimilação de nitrogênio inorgânico(BEEVERS, 1976). Entretanto em termos da nutrição da semente, vários autores(LINCK e SUDIA, 1962; FLINN e PATE, 1970; LEWIS e PATE, 1973) consideram que tal função se restringe principalmente à folha do nó floral. A folha senescente também pode ser uma fonte importante, pelo menos em plantas que entram em senescência no começo do desenvolvimento das sementes. Durante a senescência foliar, tem sido verificado que o esgotamento de proteína da folha coincide com o acúmulo de proteína na semente(STOREY e BEEVERS, 1977), e que os níveis de aminoácidos encontrados nas vias de transporte aumentam(HALL e BAKER, 1972; PATE et al., 1974; VAN DIE e TAMMES, 1975).

As leguminosas, principalmente, dispõe de uma outra fonte importante de nitrogênio reduzido, aquele proveniente da fixação de nitrogênio atmosférico. Este processo se realiza nos nódulos por bactérias em associação simbiótica com as raízes(SCOTT, 1978). Além dessas fontes, vários trabalhos(McKEE et al., 1955; FLINN e PATE, 1970; LOVELL e LOVELL, 1970; KIPPS e BOULTER, 1974; MUNTZ et al., 1976) evidenciaram uma contribuição da vagem na nutrição da semente. Este órgão normalmente se desenvolve bastante antes da formação das sementes nele contido, fazendo o armazenamento provisório do nitrogênio translocado, cedendo-o poste-

riormente para a semente (RAACHE, 1957; FLINN e PATE, 1968). Evidentemente, a nutrição de sementes é complexa, envolvendo várias partes da planta de uma forma integrada.

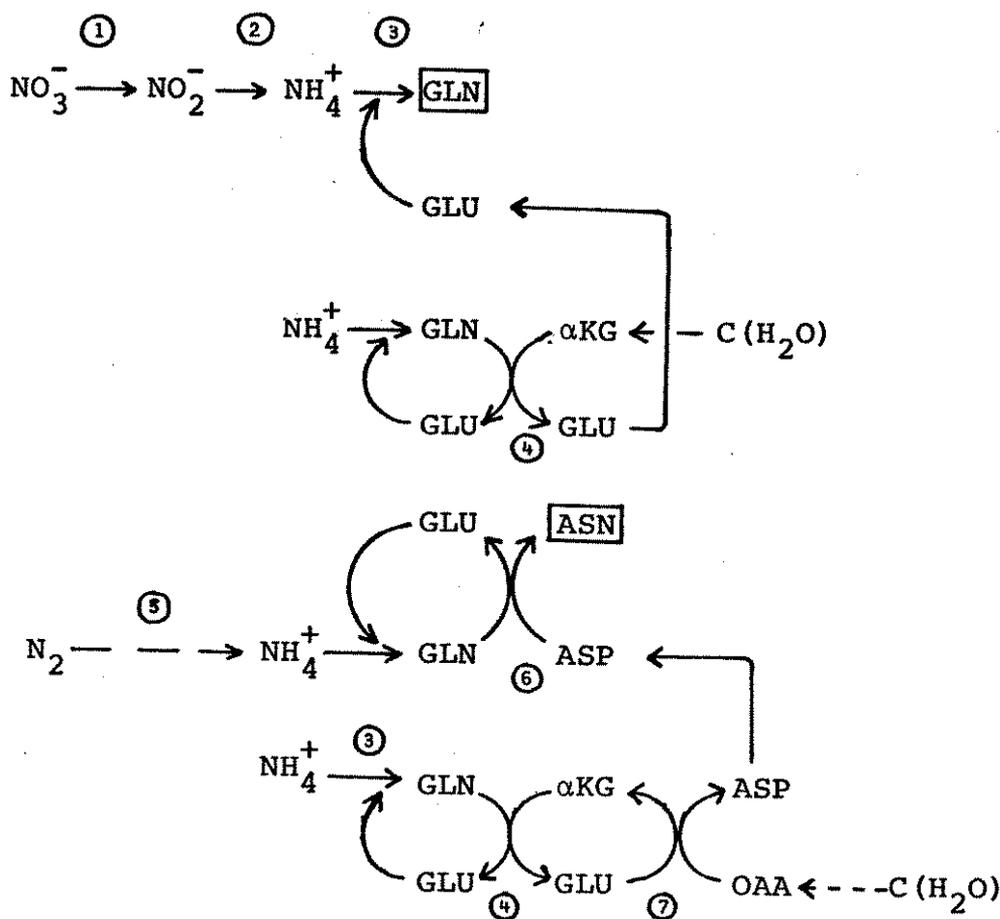
Quanto ao transporte de nitrogênio, parece que este processo não vem ao acaso uma vez que existem compostos específicos para este fim. Não são numerosos os trabalhos sobre este assunto, mas a evidência acumulada até o momento aponta as amidas como a forma principal de nitrogênio translocada dentro da planta (BEEVERS, 1976; MIFLIN e LEA, 1977). Principalmente nas leguminosas, a amida que se destaca no translocado é a asparagina (PATE 1971). Por exemplo, em Lupinus albus (PATE et. al., 1974; ATKINS et. al., 1975); Pisum arvense (PATE e WALLACE, 1964), Pisum sativum (LEWIS e PATE, 1973), soja (STREETER, 1972) e Medicago sativa (LEE e SMITH, 1972), mais do que a metade do nitrogênio translocado está na forma de asparagina. A importância da asparagina não se restringe às leguminosas, também ocorre em altas concentrações na seiva de beterraba (JOY e ANTCLIFF, 1966). Em certos casos, tal como Lupinus (ATKINS et al., 1975) Pisum (PATE et. al., 1965) e beterraba (JOY e ANTCLIFF, 1966), encontram-se também no translocado quantidades apreciáveis de outros aminoácidos, entre eles ácido glutâmico, glutamina e ácido aspártico, embora asparagina seja predominante. Por outro lado no milho (ARRUDA e SILVA, 1979) e Datura (LEWIS, 1975), a asparagina não é importante no sistema de transporte, sendo predominante a outra amida, glutamina.

Possivelmente, é mais do que mera coincidência que as plantas que utilizam asparagina como meio de transporte de nitrogênio também são fixadoras de nitrogênio atmosférico. Certamente asparagina é o produto final na fixação simbiótica de nitrogênio (SCOTT, 1978) e portanto o composto principal translocado dos nodulos às folhas (PATE, 1969; STREETER, 1972). De fato, o apareci

mento de asparagina no sistema de transporte de Pisum arvense coincidiu com o início da fixação de nitrogênio pelos nódulos , chegando a 60% de nitrogênio translocado. Em seguida, após a floração, quando os nódulos começavam a degenerar, o nível de asparagina na seiva também caiu (PATE et al., 1965). Estes dados até certo ponto, refletem a produção de asparagina pelos nódulos, mas não significam que toda a asparagina translocada é proveniente da fixação de nitrogênio. Pelo menos, tem sido demonstrado (PATE, 1971) que os altos níveis de asparagina no translocado de leguminosas é independente da origem do nitrogênio, seja de nitrogênio atmosférico ou de nitrato.

A escolha de asparagina e glutamina para o transporte de nitrogênio dentro da planta tem certa lógica. Estas amidas são derivadas de glutamato e aspartato que são, por sua vez, intimamente ligados aos cetoácidos do ciclo de Krebs e o metabolismo de carboidratos. Isto permite a pronta formação ou degradação do esqueleto de carbono. Além do mais, possuem uma relação N/C alta, assim reduzindo o investimento de carbono pela planta para o transporte de nitrogênio. Fora a glutamina (2N:5C) e a asparagina (2N:4C); apenas a arginina (4N:6C) possui uma relação mais alta. Entretanto, a arginina também desempenha um papel semelhante, sendo o componente principal no transporte de nitrogênio em árvores (TROMP e OVAA, 1973).

Outro fator a favor da seleção de amidas para o transporte de nitrogênio é o fato que são os produtos primários da assimilação de nitrogênio. Esquemas resumindo o aproveitamento de nitrogênio inorgânico do ambiente, seja na forma de nitrato ou nitrogênio atmosférico são apresentados abaixo.



Nos dois casos, a primeira etapa é uma redução do nitrogênio em questão para a amônia, seja pela nitrogenase<sup>(5)</sup> ou pelas redutases de nitrato<sup>(1)</sup> e nitrito<sup>(2)</sup> (MIFLIN e LEA, 1977). A partir deste ponto, os esquemas são semelhantes. A incorporação de amônia em forma orgânica se dá pela enzima glutamina sintetase<sup>(3)</sup> formando-se glutamina (MIFLIN e LEA, 1977). Quando há formação de asparagina, esta transformação realiza-se a partir de glutamina pela reação asparagina sintetase<sup>(6)</sup> (STREETER, 1973; ROGNES, 1975 LEA e FOWDEN, 1975a).

Quanto ao grupo  $\alpha$ -amino de glutamina e asparagina, este se forma a partir da assimilação de uma segunda molécula de amônia no grupo amida de glutamina (MIFLIN e LEA, 1977) que, mediante a ação de transaminase<sup>(7)</sup> e/ou GOGAT<sup>(4)</sup> é transferida para a posição de  $\alpha$ -amino.

O transporte dessas amidas do sítio de produção para outras partes da planta se dá ou pelo xilema ou pelo floema, con

forme o caso. Os produtos da fixação de nitrogênio se translocam dos nódulos, o sítio de produção, para as folhas e outros sítios de consumo, pelo xilema (OGHOGHORIE e PATE, 1972). Por outro lado, os produtos de assimilação de nitrato são transportados da folha para outras partes da planta pelo floema (WALLACE e PATE, 1967; OGHOGHORIE e PATE, 1972). O transporte para a semente, entretanto só é possível pelo floema, uma vez que a semente tem poucas ligações com o xilema e não transpira (PATE et al., 1975). Infelizmente, em termos do nosso conhecimento da nutrição da semente, a grande maioria dos trabalhos realizados sobre o transporte de nitrogênio baseiam-se em análises da seiva do xilema. Contudo, estes dados talvez tenham algum valor em relação a nutrição da semente, uma vez que, em Lupinus pelo menos, ocorre a pronta transferência de aminoácidos, principalmente amidas, do xilema para o floema, de modo que a composição de aminoácidos, chegando aos frutos via o floema, é pouco diferente qualitativamente daquele do xilema (PATE et al., 1975). Quantitativamente, a tendência é de aumentar a proporção de asparagina no floema, sugerindo, portanto, que esta amida seja mais importante ainda do que indicado pelos dados obtidos com a seiva do xilema.

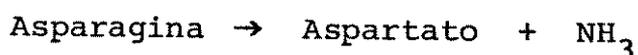
Quando se compara a composição dos aminoácidos encontrados no floema com a composição de aminoácidos livres e de proteínas da semente (JENNINGS e MORTON, 1963; FLINN e PATE, 1968; SO-DEK e WILSON, 1971; ATKINS et al., 1975) verificamos que há grandes diferenças. Principalmente na proteína de reserva, observam-se altos níveis de alguns aminoácidos que são translocados em quantidades baixíssimas. Por exemplo, aminoácidos como leucina compõe menos que 1% do translocado mas cerca de 10% da proteína de reserva. Por outro lado, o alto teor das amidas chegando a

semente fica bastante reduzido na semente, sendo que apenas 10% dos aminoácidos na proteína reserva são asparagina, enquanto que esta amida representa cerca de 50% dos aminoácidos translocados.

É evidente que os aminoácidos não são translocados para a semente na mesma proporção que são incorporados na proteína de reserva. O desequilíbrio dos aminoácidos translocados sugere que deve ocorrer uma intensa transformação de aminoácidos na semente, ou pelo menos a biossíntese de aminoácidos carentes a custo de aminoácidos em excesso (SODEK e WILSON, 1970; LEWIS e PATE, 1973; PATE et al., 1975; ATKINS et al., 1975). Uma vez que as amidas são os aminoácidos que chegam à semente em grande excesso é de se esperar que estas amidas sejam as principais fontes de nitrogênio para a formação de outros aminoácidos dentro da semente. De fato, estudos com amidas marcadas com  $^{15}\text{N}$  em Datura (LEWIS, 1975) Lupinus (ATKINS et al., 1975) e Pisum (LEWIS e PATE, 1973) tem demonstrado a pronta transferência do grupo amida para o grupo  $\alpha$ -amino de muitos outros aminoácidos incorporados subsequentemente em proteína. No caso de Lupinus (ATKINS et al., 1975), foi calculado que cerca de metade dos aminoácidos dos cotilédones foram sintetizados de novo a partir de asparagina translocada. Em ervilha, LEWIS e PATE (1973) concluíram que a maior parte da tirosina, leucina, fenilalanina, histidina, lisina, e arginina encontrada na semente foi sintetizada lá.

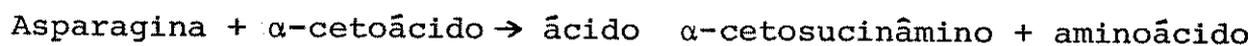
Dada a importância das amidas como fonte de nitrogênio para a semente, surge a questão de como são utilizadas estas amidas pela semente para a síntese de outros aminoácidos. É conhecido que o grupo  $\alpha$ -amino de todos os aminoácidos é formado, diretamente ou indiretamente, pela transaminação (BEEVERS 1976). Uma vez que o grupo amida não participa em reações de transaminação, temos que procurar outro mecanismo para a utilização do grupo amida.

Uma exame de reações metabólicas envolvendo as amidas revela a existência de várias possibilidades para explicar a utilização desses aminoácidos pela semente. No caso de asparagina, LEA e FOWDEN (1975b) sugeriram três possíveis reações para a degradação dessa amida. O mais óbvio, devido a larga distribuição em tecidos animais e bactérias, é a asparaginase:



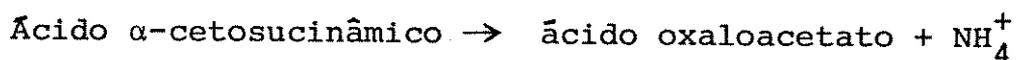
Entretanto, até hoje tem sido difícil encontrar esta enzima em tecidos vegetais. Os primeiros trabalhos descrevendo a existência da enzima em brotos de milho e leguminosas em geral (KRETOVICH et al., 1954; LEES e BLACKNEY, 1970) foram realizados com extratos crus e não eliminaram outras possibilidades que também poderiam explicar a formação de ácido aspártico. Mais recentemente, foi possível demonstrar e caracterizar uma asparaginase em sementes imaturas de Lupinus polyphyllus (LEA et al., 1978) e Lupinus albus (ATKINS et al., 1975). Entretanto, a enzima não foi encontrada em outras espécies de Lupinus nem em sementes imaturas de outras leguminosas ou cereais (LEA e FOWDEN, 1975b; LEA et al., 1978; STOREY e BEEVERS 1978).

A segunda possibilidade é a enzima asparagina transaminase, que cataliza a seguinte reação:



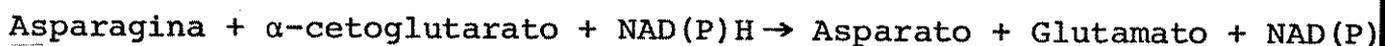
Esta enzima foi caracterizada inicialmente em extratos de fígado do rato por MEISTER e colaboradores em 1952 (MEISTER et al. 1952). Indicações da existência dessa enzima em tecidos vegetais apareceram em trabalhos sobre transaminase (WILSON et al., 1954; YAMAMOTO, 1955) onde foi constatada a transaminação de 19 aminoácidos, entre eles asparagina, com vários cetoácidos diferentes.

Recentemente (STREETER, 1977) foram obtidas evidências mais convincentes quanto à existência de asparagina transaminase em tecidos vegetais. Foi caracterizada a enzima de folhas de soja a partir de um ensaio envolvendo, pela primeira vez, a dosagem do produto específico da reação, o ácido  $\alpha$ -cetosucinâmico. A importância dessa enzima no metabolismo de asparagina na folha foi demonstrada subseqüentemente pelo grupo de Joy (BAUER et al., 1977), através de um estudo com asparagina marcada com  $^{14}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ . Eles verificaram a pronta transformação de asparagina em ácido  $\alpha$ -sucinâmico em folhas de ervilha após incubação com  $^{14}\text{C}$ -asparagina. Dos dados cinéticos, Joy e colaboradores (BAUER et al., 1977) concluíram que o nitrogênio de asparagina foi transferido diretamente à alanina, sugerindo que piruvato seja o cetoácido fisiológico de transaminação. De fato, os experimentos de STREETER (1977) com a enzima da folha de soja revelavam maior atividade com piruvato do que qualquer outro cetoácido. Após a transaminação de asparagina, acredita-se que o produto desta reação, o ácido  $\alpha$ -sucinâmico, seja transformado em oxaloacetato pela ação de ácido  $\alpha$ -sucinâmico deamidase (STREETER, 1977), permitindo, desta maneira, o aproveitamento do grupo amida:-



Apesar de existir poucos trabalhos sobre asparagina transaminase em tecidos vegetais a evidência é suficiente para considerar esta enzima uma boa candidata para explicar a utilização de asparagina pela semente.

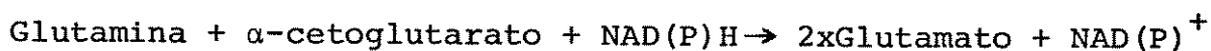
A terceira possibilidade considerada por Lea e Fowden é uma reação análoga a de GOGAT (veja reação 4 do esquema acima), mas com asparagina no lugar de glutamina:-



Este tipo de reação tem a vantagem da transferência direta do grupo amida para o  $\alpha$ -amino, evitando assim a necessidade de reassimilar a amônia. Tal atividade foi constatada em raízes de ervilha(FOWLER et al., 1974) e células de cenoura em cultura (DOUGAL, 1974). Entretanto, a validade destes resultados é duvidosa, uma vez que foi demonstrado(MIFLIN e LEA, 1975) que a atividade medida provavelmente é devido a impurezas na asparagina.

Para explicar a utilização de glutamina pela semente, podemos considerar a enzima glutaminase que cataliza a hidrólise de glutamina liberando o grupo amida em forma de amônia. Não existe, entretanto, nenhuma evidência para a ocorrência dessa enzima em tecidos vegetais(BEEVERS e STOREY, 1976).

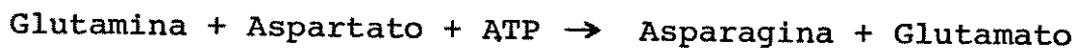
Uma outra possibilidade é a enzima "glutamina (amida): 2-oxoglutarato aminotransferase(oxido-reductase NAD(P))" ou GOGAT. Esta é uma enzima nova para a bioquímica, sendo descoberta em 1970 em bactérias(TEMPEST et al., 1970). A enzima foi encontrada recentemente em plantas superiores assim como em folha de ervilha(LEA e MIFLIN, 1974), raízes de ervilha(FOWLER et al., 1974 ; MIFLIN e LEA, 1975), nódulos de leguminosas(ROBERTSON, et al., 1975) e células de cenoura em cultura(DOUGAL, 1974). A enzima encontrada em folhas é algo diferente porque utiliza ferredoxina e não NAD(P) como doador de elétrons. Acredita-se que a enzima GOGAT desempenha um papel importante na assimilação de nitrogênio(veja esquema acima). A grande vantagem dessa reação para explicar a utilização de glutamina em sementes é que o grupo amida é transferido diretamente para a posição  $\alpha$ -amino:



Outras reações, nas quais a glutamina participa, como a síntese do grupo indole de triptofano e na síntese de purinas, não merecem consideração aqui porque não possibilitam a transfe-

rência do grupo amida para outros aminoácidos em geral.

Finalmente, a transferência do grupo amida para asparagina:



uma reação já conhecida em tecidos vegetais (ROGNES , 1975; LEA e FOWDEN, 1975a), também é uma possibilidade, mas ainda seria necessária uma explicação para a utilização da asparagina formada.

Chegamos a conclusão de que as amidas são de inegável importância na nutrição da semente, e que existe um desconhecimento quase total da maneira pelo qual são utilizadas estas amidas pela semente. Por este motivo, foi iniciado o presente estudo objetivando descobrir as enzimas envolvidas no metabolismo das amidas. Para estudar o metabolismo de glutamina foi escolhido o milho em virtude da importância da glutamina no sistema de transporte desta planta (ARRUDA e SILVA, 1979). A ervilha foi escolhida para estudar o metabolismo de asparagina, uma vez que este aminoácido ocorre em alto nível no translocado (LEWIS e PATE, 1973 ) e já foi constatado que cotilédones de ervilha podem sintetizar proteína utilizando asparagina como a única fonte de nitrogênio (MILLERD et al., 1975).

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 1. MATERIAL VEGETAL

O milho (Zea mays L.) utilizado neste estudo foi um híbrido simples designado HS 1406, sintetizado a partir de linhas puras de uma variedade de Tuxpeño. O cultivo do milho foi realizado no campo de Universidade Estadual de Campinas no verão de 1975 em fileiras de um metro de distância, e a separação entre as plantas foi de 0,2 m. Adubo foi aplicado na razão de 80 kg de N, 80 kg de  $P_2O_5$  e 30 kg de  $K_2O$  por hectare. As espigas foram autofecundadas, todas no mesmo dia após mantê-las cobertas com sacos plásticos.

Sementes de ervilha (Pisum sativum L., variedade Feltham's First) foram embebidas em água corrente durante 24 horas e semeadas em seguida em terra em vasos plásticos de  $2 \frac{1}{2}$  l., na razão de 4 plantas por pote. Os vasos foram mantidos em estufa durante o ciclo completo. A cada pote foi adicionado 15 ml de adubo líquido ( $NH_4NO_3$  10% e  $K_2HPO_4$  10%) antes do plantio e mais 5 ml ao florescer. As flores do primeiro nó reprodutivo foram datadas a partir da antese.

### 2. MÉTODOS

Todas as operações envolvendo o manuseio da enzimas durante a extração até o ensaio, foram realizadas a  $0-5^{\circ}C$ .

## 2.1. Dosagem de GOGAT em milho

### 2.1.1. Extração do endosperma de milho

Foram retirados 40 grãos da região central da espiga, e o embrião separado do endosperma. Os endospermas foram moídos num graal com 20 ml de tampão tris-HCl, 50 mM, pH 7,5, contendo EDTA 1 mM e 2-mercapto etanol 10 mM. O homogeneizado foi filtrado em gaze e em seguida centrifugado a 10.000 x g durante 15'. O sobrenadante resultante foi decantado em gaze para remover a camada de gordura flutuante. Uma alíquota de 5 ml foi dessalinizada numa coluna de Sephadex G25 (1,5 x 16 cm) equilibrada com o tampão de extração. A fração contendo as proteínas foi coletada num volume de 8 ml e alíquotas desta fração utilizadas para dosagem de GOGAT.

### 2.1.2. Purificação parcial de GOGAT

Quarenta endospermas foram homogeneizados em 10 ml de tampão de maneira descrita acima. Após centrifugação a 10.000 x g, foram dissolvidos 2,16 g de sulfato de amônio por 10 ml de sobrenadante, com agitação contínua durante 15 min.. A proteína precipitada foi removida por centrifugação a 10.000 x g por 10 min., e mais 1,56 g de sulfato de amônio dissolvidas no sobrenadante. O precipitado resultante, após centrifugação, foi retomado em 5 ml do tampão de extração, e dessalinizado na coluna de Sephadex G25.

### 2.1.3. Ensaio para GOGAT (E.C. 2.6.1.53)

O ensaio utilizado para dosar atividade de GOGAT foi baseado no método descrito por DOUGAL (1974), envolvendo a medição da oxidação de NADH no espectrofotômetro a 340 nm. Nos ensaios

de rotina, a mistura de reação de 3 ml continha tris-HCl pH 7,5 50 mM, L-glutamina 5 mM,  $\alpha$ -cetogluturato(neutralizado com KOH) 5 mM, NADH 0,1 mM e enzima. Os ensaios foram incubados em banho-maria a 30 °C e retirados brevemente a 0,15 e 30 min para leitura no espectrofotômetro. Sempre foi incluído um branco, omitindo-se glutamina e  $\alpha$ -cetogluturato, para avaliar a oxidação de NADH, in dependente de substrato.

## 2.2. Dosagem de asparaginase de ervilha

### 2.2.1. Extração de semente de ervilha

O tampão utilizado em todos os passos da extração e purificação de asparaginase foi composto de glicerol 10%(p/v), 2-mercaptoetanol 15 mM, fenilmetilsulfonilfluoreto 1 mM, KCl 50 mM, em tris-HCl 50 mM, pH 8. O fenilmetilsulfonilfluoreto, um inibidor específico de proteases possuindo o grupo serina no centro ativo(CHRISPEELS e BOULTER, 1975), foi dissolvido primeiro em 10 ml de 2-propanol e adicionado a 1 l de tampão sob agitação vigorosa.

Um a 20 a 40 sementes de ervilha geralmente separadas em cotilédone e testa, foram moídas num graal com 3 a 5 volumes de tampão. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g durante 20 min., e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio na razão de 0,5 g por ml, sob agitação contínua. Após meia hora, o precipitado proteico foi coletado por centrifugação a 10.000 x g por 20 min, e retomado em tampão(geralmente em metade do volume original). O pouco de material insolúvel foi removido por centrifugação, e uma alíquota de 2 ml da solução clarificada foi dessalinizada numa coluna de Sephadex G25(1,5 x 18 cm). A

fração proteica foi coletada em 5 ml e usada para dosagem de asparaginase.

### 2.2.2. Purificação parcial de asparaginase

Para este procedimento, aproveitou-se do fato da asparaginase ser solúvel em soluções etanólicas (veja 2.4, Resultados)

A extração da enzima, seja do cotilédone ou da testa, seguiu os mesmos passos descritos acima (2.2.1) até precipitação com sulfato de amônio. O precipitado, após tratamento com sulfato de amônio, foi retomado em volume menor de tampão (aproximadamente 2 ml por 10 cotilédones ou 1 ml por 10 testas). Foi acrescentada asparagina 100 mM, suficiente para dar uma concentração final de 10 mM. Em seguida, foi adicionado etanol gota por gota sob agitação contínua até a solução atingir 60% de etanol. Após meia hora de repouso, o precipitado de proteína foi removido por centrifugação a 10.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi colocado numa coluna de Sephadex LH 20 (2,25 x 10 cm) equilibrada com tampão (sem o KCl para os estudos com o potássio). A coluna de Sephadex LH20 teve a finalidade de simultaneamente dessalinizar o extrato e remover o etanol.

### 2.2.3. Ensaio para asparaginase (E.C. 3.5.1.1)

O princípio do método empregado para dosar asparaginase foi de incubar os extratos com  $^{14}\text{C}$ -asparagina e determinar a quantidade de  $^{14}\text{C}$ -aspartato formado após separação por cromatografia em camada delgada.

O ensaio foi realizado em micro-tubos de centrifuga de polipropileno. Num volume total de 120  $\mu\text{l}$  tinha  $^{14}\text{C}$ -asparagina

(veja 2.2.4) 10 mM, tris-HCl pH8, 50 mM, e enzima, mais KCl 50 mM ou outras adições conforme o caso. No tempo zero foram transferidos 60  $\mu$ l do ensaio para outro tubo mantido em gelo, e o primeiro tubo incubado a 30 °C durante uma hora. Para terminar a reação, os dois tubos foram tampados e mantidos em água fervendo por 5 min. Após esfriar, os tubos foram centrifugados numa centrífuga de mesa para remover proteína precipitada e condensação nas paredes do tubo. Frequentemente, neste ponto, os tubos foram guardados na geladeira até o dia seguinte.

Antes de aplicar uma amostra na placa cromatográfica, 2  $\mu$ l de uma solução de sulfato de amônio (20%) foram adicionados a cada tubo, para garantir uma mancha nítida de aspartato (veja 2.3., Resultados). Uma alíquota de 30  $\mu$ l de cada tubo foi aplicada dentro de uma faixa de 2 cm numa placa cromatográfica de celulose-sílica (veja 2.6.1). Após cromatografia em fenol-água, os aminoácidos foram localizados, pulverizando-se com um reagente fluorescente não-destrutivo (veja 2.6.2). Os aminoácidos fluorescentes foram localizados sob luz ultra-violeta e retirados para contagem como descrito por DAVIES e MIFLIN (1978). Este procedimento envolve a retirada da mancha e a coleta do pó num disco de fibra de vidro (Whatman GF/C), empregando um dispositivo de sucção. O pó, junto com o disco, foram introduzidos em frascos de cintilação contendo 5 ml de mistura cintiladora (4 g PPO e 100 mg POPOP por litro de tolueno), e submetidas à contagem em cintilador líquido (Beckman LS-100C).

A atividade enzimática é expressa em  $\mu$ moles de aspartato formado por hora, utilizando a atividade específica do substrato marcado para transformar cpm em  $\mu$ moles.

#### 2.2.4. Purificação de asparagina

Fontes comerciais de asparagina, tanto marcada como não, contem ácido aspártico como impureza. As quantidades presentes, embora pequenas, são suficientes para acarretar um "branco" alto no ensaio. Por este motivo, asparagina foi purificada para uso nos ensaios. Utilizou-se o procedimento de MIFLIN e LEA (1975) com modificações, para este fim.

Dowex-1(200-400 malhas) foi suspenso em NaOH 2M e lavado com água até pH neutro. Em seguida, a resina foi resuspensa em ácido acético 2N, e compactada numa coluna de 2,5 cm até uma altura de 16 cm. Após lavagem com água, foram percolados 200 ml de acetato de sódio 10% através da coluna. O excesso de acetato de sódio foi eliminado lavando-se a resina com água.

Uma solução de 2 g de L-asparagina em 100 ml de água foi percolada através da coluna. Aos 100 ml do eluado mais rico em asparagina foram acrescentados 300 ml de etanol. Após repousar a 4 °C durante dois dias, os cristais de asparagina foram coletadas, lavadas duas vezes com etanol absoluto, duas vezes com eter, e seco ao ar. A análise por cromatografia em camada delgada da preparação final revelou a ausência total de ácido aspártico, pelo menos quando aplicados em concentrações de ensaio onde a asparagina não purificada produz uma mancha evidente.

Para purificar asparagina marcada, foram dissolvidas 50 µC de <sup>14</sup>C-asparagina(133 mCi/mole) em 1 ml de água, mais 1 mg de asparagina não-marcada como carregador. Após passagem pela coluna de Dowex-1-acetato(1x2 cm), preparada como descrita acima, a asparagina foi coletada em volume de 5 ml. Acrescentou-se a esta solução 100 mg de asparagina purificada e etanol suficiente para tornar a solução um pouco turva. Após um dia a 4 °C, os cristais foram coletados e lavados do mesmo modo descrito acima. A análise do produto final revelou uma atividade específica de

60.000 cpm/umole, isto é, depois de ter sido realizada a cromatografia e contagem da mesma maneira descrita para o ensaio.

#### 2.2.5. Peso molecular da asparaginase

Foi empregado o método de MARTIN e AMES (1961), utilizando-se gradientes de sacarose de 5 a 20% (p/v), preparados em tampão com e sem KCl 50 mM. Os gradientes foram centrifugados em centrífuga L2-65B da Beckman, com o rotor SW27, a 25.000 rpm durante 24 horas. Catalase (P.M. = 250.000) foi utilizada como padrão.

### 2.3. Dosagem de glutamina sintetase e glutamato desidrogenase de ervilha

#### 2.3.1. Extração de sementes de ervilha

Utilizou-se o mesmo procedimento de extração para glutamina sintetase e glutamato desidrogenase.

Sementes de ervilha foram separadas em cotilédones e testa e moídas em graal com 4 volumes de tampão imidazol - (HCl 50 mM, pH 7,2, contendo ditioneitol 1 mM, EDTA 0,5 mM e triton x-100 0,1%). Após centrifugação a 10.000 xg por 20 min., uma alíquota do sobrenadante (2,5 ml) foi dessalinizada numa coluna de Sephadex G25 (1,5 x 18 ml) equilibrada com o tampão de extração, sem triton x-100. A fração proteica foi coletada em volume total de 5 ml e usada para dosagem de glutamina sintetase e glutamato desidrogenase.

#### 2.3.2. Dosagem de glutamina sintetase (E.C. 6.3.1.2)

O método descrito por RHODES et al. (1975) foi utilizado

do para dosar glutamina sintetase. Neste método, a formação de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato a partir de glutamato e hidroxilamina (ao invés de amônia) representa atividade dessa enzima. Este produto é medido no espectrofotômetro a 535 nm, após reação com reagente de  $\text{FeCl}_3$  (FERGUSON e SIMS, 1971). Os ensaios continham glutamato (100 mM), hidroxilamina (6,6 mM),  $\text{MgCl}_2$  (60 mM) e imidazole (50 mM) pH 7,2. As alíquotas do ensaio foram tratadas com o reagente a 0, 10 e 20 min. após incubação a 30 °C. Sob as condições do ensaio, 1  $\mu$ mole de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato tem uma absorvância de 0,34.

### 2.3.3. Dosagem de glutamato desidrogenase (E.C. 1.4.1.3.)

Utilizou-se o método descrito por MIFLIN (1974), que envolve a medição no espectrofotômetro a 340 nm da oxidação de NADH dependente da presença dos substratos  $\alpha$ -cetoglutarato e amônia. Alíquotas do extrato foram incubadas com  $\alpha$ -cetoglutarato (10 mM) sulfato de amônio (50 mM), NADH (0,1 mM),  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) e tricine pH 8,2 (50 mM) a 30 °C.

### 2.4. Dosagem de ácido $\alpha$ -cetosucinâmico deamidase de ervilha

A atividade de ácido  $\alpha$ -cetosucinâmico deamidase foi dosada pelo método descrito por STREETER (1977), utilizando-se extratos dessalinizados, preparados de acordo com 2.2.1. O ensaio, realizado a 30 °C, continha ácido  $\alpha$ -cetosucinâmico (1 mg/ml), NADH (100  $\mu$ M), tris-HCl, pH 8 (50 mM) e extrato num volume total de 1 ml. A oxidação de NADH foi seguida no espectrofotômetro a 340 nm e representava a ação de malato desidrogenase endógena acoplada a ácido  $\alpha$ -cetosucinâmico deamidase.

O substrato, ácido  $\alpha$ -cetosucinâmico foi sintetizado a partir de asparagina e L-aminoácido oxidase de acordo com MEISTER (1953).

## 2.5. Transaminase

A atividade de transaminase foi determinada num ensaio qualitativo, utilizando-se os mesmos extratos dessalinizados feitos, no caso de ervilha, para a dosagem de asparaginase e, no caso de milho, para a dosagem de GOGAT.

O ensaio qualitativo empregado possuía um aminoácido (2 mM), cetoácido (5 mM), piridoxal fosfato (0,1 mM), tampão de extração e enzima num volume total de 0,3 ml. Após incubação a 30 °C, durante uma hora, foram adicionados 0,5 ml de etanol para interromper a reação. O precipitado foi removido por centrifugação e uma alíquota (20 µl) do sobrenadante cromatografada em camada delgada (veja 2.6.1). Os aminoácidos foram localizados com ninhidrina (veja 2.6.3). A formação do aminoácido correspondente ao α-cetoácido incluído no ensaio, foi avaliada visualmente pela intensidade da mancha.

## 2.6. Cromatografia

### 2.6.1. Cromatografia em camada delgada

Toda análise feita por cromatografia em camada delgada foi realizada em placas preparadas segundo TURNER e REDGWELL (1966). Este método emprega uma camada mista de celulose (Machery Nagel MN 300) e sílica (Merck Kieselgel G-Stahl) na proporção de 10:4. As placas com espessura de 250 µ foram preparadas e secas ao ar. O solvente utilizado para cromatografia foi uma mistura de fenol-agua, 80:20 p/v. Após cromatografia, as placas permaneceram em capela até livre de solvente.

### 2.6.2. Reagente fluorescente

O reagente não destrutivo empregado para localizar aminoácidos marcados (ensaio de asparaginase) foi preparado segundo DAVIES e MIFLIN (1978). Foram dissolvidos 20 mg de o-ftalaldeído em 2 ml de etanol, juntando-se em seguida 25 ml de borato de sódio 50 mM. Antes do uso, foram adicionados 5 gotas de 2-mercaptoetanol.

As placas foram pulverizadas levemente com o reagente e examinadas em luz ultra-violeta (253 nm). As manchas fluorescentes de aminoácidos destacam-se do fundo escuro.

### 2.6.3. Reagente de ninhidrina

Nos ensaios qualitativos, visando identificar os produtos de reação (transaminase, asparagina transaminase, GOGAT) pela cromatografia em camada delgada, foi utilizado um reagente de ninhidrina 0,2% em etanol. As placas foram encharcadas com o reagente, pulverizando-se com piceta. Após secarem as placas foram levadas à estufa a 80 °C durante 10 min, para o desenvolvimento das manchas.

### 2.7. Sephadex G25 e LH20

A preparação do gel e as colunas foram feitas de acordo com as instruções do fabricante ("Sephadex-Gel Filtration in Theory and Practice" - Pharmacia). Após o uso, as colunas foram recuperadas, lavando-se com água e em seguida re-equilibradas com tampão. No caso de Sephadex LH20, uma lavagem com etanol 80% precedeu a lavagem com água, com a finalidade de remover pigmentos absorvidos pelo gel.

## 2.8. Análise de compostos nitrogenados

### 2.8.1. Dosagem de proteína

Aos extratos proteicos, acrescentou-se ácido tricloroacético 50% até uma concentração final de 5%. Após um tempo de repouso na geladeira, a proteína precipitada foi coletada por centrifugação e lavada com ácido tricloroacético 5%. O precipitado foi retomado em NaOH 0,1M e uma alíquota utilizada para a dosagem de proteína pelo método de ITZHAKI e GILL(1964). Leituras foram feitas a 300 nm (ao invés de 310 nm) para maior sensibilidade. Como padrão foi empregada a albumina de soro bovino (BSA).

### 2.8.2. Dosagem de nitrogênio

Material liofilizado foi processado para teor de nitrogênio total pelo método Kjeldahl.

### 2.8.3. Análise de aminoácidos

A análise quantitativa de aminoácidos foi realizada no Analisador de Aminoácidos pelo sistema de MOORE, et al (1958).

### III - RESULTADOS E INTERPRETAÇÃO

#### 1. ENDOSPERMA DE MILHO

##### 1.1. Atividade de GOGAT - experimentos preliminares

As nossas primeiras tentativas de encontrar atividade de GOGAT no endosperma imaturo do milho foram realizadas utilizando-se extratos crus. Tais extratos apresentaram brancos muito elevados, ou seja, oxidação de NADH independente dos substratos glutamina e  $\alpha$ -cetogluturato. Esta atividade possivelmente foi devido a presença de substratos endógenos que permitiram a ação de diversas NADH redutases. Mais importante, entretanto, foi a observação de que a intensidade de oxidação de NADH aumentou após adição de glutamina e  $\alpha$ -cetogluturato. Esse resultado deu a primeira indicação da presença de GOGAT nos extratos de endosperma de milho.

O primeiro passo para poder caracterizar melhor a atividade dependente nos dois substratos, foi eliminar a elevada oxidação de NADH nos brancos. A remoção de substratos endógenos, pela diálise do extrato, reduziu drasticamente os brancos porém, devido a instabilidade da enzima, a atividade de GOGAT foi bastante prejudicada. Nessa fase do trabalho, foi observado o efeito benéfico do 2-mercaptoetanol. A inclusão deste composto nos extratos melhorou a estabilidade da GOGAT, mas devido a morosidade da diálise o problema não foi eliminado completamente. A substituição da diálise pela dessalinização dos extratos em colunas de Sephadex G-25, um procedimento bem mais rápido, acarretou uma boa atividade de GOGAT.

Este procedimento contudo não eliminou totalmente a oxidação de NADH nos brancos, mas, pelo menos, fez com que esta atividade fosse menor do que a dependente dos substratos (Tabela 1). Assim, a atividade residual nos brancos, parece ser consequência de uma oxidase de NADH não específica, dado a ausência de substratos endógenos. Segundo a literatura, tal atividade é comum em tecidos vegetais (DOUGAL, 1974; FOWLER et al., 1974; BEEVERS e STOREY, 1976).

### 1.2. Purificação Parcial de GOGAT

A eliminação total de atividade no branco foi possível após purificação parcial da GOGAT, através de fracionamento por sulfato de amônio. Na tabela 2, pode ser observada a distribuição da atividade, em várias faixas de saturação por sulfato de amônio. Os dados mostram que a maior parte da enzima precipitou na faixa de 30 a 50% de saturação, não ocasionando nenhuma atividade no branco.

É particularmente interessante notar que a recuperação da atividade, após purificação, foi total. Assim, em trabalhos com o extrato cru, onde o branco é mais ou menos alto, justifica-se a subtração do valor do branco para calcular a atividade de GOGAT. Tal procedimento tem sido usado por outros (MEERS et al., 1970; DOUGAL, 1974; FOWLER et al., 1974), porém sem a devida justificativa.

### 1.3. Especificidade para os substratos

A especificidade da enzima para os três substratos, glutamina  $\alpha$ -cetoglutarato e NADH, foi averiguada substituindo-os por outros compostos semelhantes. Pela tabela 3, verifica-se que a

glutamina não pode ser substituída pela asparagina ou pela amônia, como doador do grupo amino. O piruvato não funcionou como aceitador do grupo amino em lugar de  $\alpha$ -cetoglutarato e o oxaloacetato, também testado, não permitiu se chegar a uma conclusão em virtude da oxidação quase instantâneo de NADH, inclusive no branco onde glutamina era ausente. Certamente, um alto nível endógeno de malato desidrogenase deve ser responsável por este resultado.

Quanto ao doador de eletrons, encontrou-se atividade tanto com o NADPH como com o NADH. Embora as atividades obtidas com NADPH chegassem a ser iguais aquelas com NADH, como consta na tabela 4, normalmente elas foram inferiores, até o nível de 20%, às obtidas com NADH. Estas variações entre diferentes preparações foram observadas tanto para extratos crus como purificados. A possibilidade de que o NADPH estava sendo transformado em NADH pela ação de fosfatase foi investigada com a utilização do fluoreto, um inibidor desta enzima. Não foi observado entretanto nenhum efeito de fluoreto na atividade obtida com NADPH (Tabela 4).

#### 1.4. Identificação dos produtos da reação

Nos experimentos realizados até este ponto do trabalho, a atividade de GOGAT foi medida exclusivamente pela oxidação de NADH. Embora tendo demonstrado que a enzima apresentava uma dependência específica com relação aos substratos glutamina e  $\alpha$ -cetoglutarato, considerou-se importante verificar a formação do outro produto mais específico, o ácido glutâmico.

Este experimento foi realizado empregando-se o ensaio qualitativo, no qual o produto da reação foi separado dos substratos por cromatografia em camada delgada. O ensaio foi modificado apenas pela adição de maior quantidade de NADH - 4 vezes o normal-

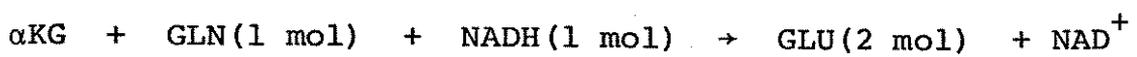
permitindo assim reação mais prolongada, facilitando a detecção do produto após a cromatografia.

A figura 1 apresenta a localização dos aminácidos na placa cromatográfica evidenciando a formação do ácido glutâmico durante a reação. Este fenômeno está ligado à oxidação do NADH, já que, na ausência deste composto (Figura 1-D), não houve formação de glutamato. Quando o  $\alpha$ -cetoglutarato ou a glutamina foram excluídos do ensaio não houve também formação de glutamato (Figura 1-E, F). Tais evidências reforçam a idéia de que a oxidação de NADH dependente da presença de glutamina e  $\alpha$ -cetoglutarato, seja atividade de GOGAT.

1.5. Estequiometria da reação

Em busca de mais evidência de que a dosagem da oxidação de NADH pode representar a atividade de GOGAT, foi verificada a relação estequiométrica entre os substratos e produtos. Este experimento envolveu a medição simultânea da oxidação de NADH no espectrofotômetro, e do consumo de glutamina e da formação de glutamato pelo analisador de aminoácidos.

Dos dados obtidos calculou-se que, para cada mole de NADH oxidado, foram consumidos 1,05 moles de glutamina, e 2,34 moles do glutamato produzidos. Esta relação está em concordância razoável com a estequiometria da reação.



1.6. Propriedades cinéticas

Empregando-se a enzima parcialmente purificada foram determinados vários parâmetros cinéticos visando estabelecer as condições ótimas de ensaio.

Através do estudo da influência do pH na dosagem da en

zima verificou-se que a atividade ótima ocorreu com o pH 7,5 (Fig. 2).

Foi calculado a partir de dados sobre a influência da concentração dos substratos na atividade (Fig. 3) o  $K_m$  aparente de cada um deles. Os valores encontrados foram 1,35 mM para glutamina, 0,57 mM para  $\alpha$ -cetoglutarato e 7  $\mu$ M para o NADH.

Baseado nas informações obtidas acima, foi estabelecido um ensaio para dosar a enzima em condições ótimas, de pH e de concentração de cada substrato. Foi escolhido um pH de 7,5, concentrações de substratos de 5 mM para a glutamina e para o  $\alpha$ -cetoglutarato, e de 0,1 mM para NADH. Para verificar a adequação do ensaio para dosar a GOGAT em extratos crus dessalinizados do endosperma de milho, foram estudadas a variação de atividade com o tempo de incubação e a relação entre atividade e quantidade de enzima. Observa-se pela figura 4 que a atividade foi linear durante pelo menos 1 hora de incubação e proporcional à quantidade de enzima no ensaio. Conclui-se portanto que o ensaio é perfeitamente adequado para a finalidade proposta.

#### 1.7. Atividade de GOGAT durante a maturação do endosperma

As variações de atividade de GOGAT, de nitrogênio total e de proteína solúvel, registradas durante a maturação de três variedades de milho, estão apresentados na figura 5(A, B e C). As curvas de atividade de GOGAT são muito semelhantes para as três variedades de milho mesmo no caso do opaco-2, cujo metabolismo de proteína de reserva se desloca drasticamente do normal (MURPHY e DALBY 1971). Pela forma da curva, pode ser observado um aumento da atividade de GOGAT na primeira fase de desenvolvimento do endosperma, atingindo um pico em torno de 3 a 4 semanas após a poleni-

zação. Em seguida, houve um declínio rápido na atividade até chegar no zero, na maturidade. A característica mais importante da curva, entretanto, é o fato de que o pico de atividade coincidiu com a fase de acúmulo de nitrogênio mais ativo. A íntima relação entre atividade de GOGAT e a velocidade de acúmulo de nitrogênio fica mais evidente quando os dados são apresentados na forma de figura 6.

A queda de atividade até zero ocorreu na fase em que é formada a zona de abscisão ou "black-layer", e portanto quando para o fluxo de metabolitos ao grão. Provavelmente, a síntese de GOGAT é desligada conforme vai diminuindo o fornecimento de substratos e sua presença se torna desnecessária. Uma outra possível explicação para o fato, a de que o endosperma vai ficando mais duro com a idade e portanto mais difícil extrair, não parece provável por duas razões: i) o teor de proteína nos extratos permaneceu mais ou menos constante em todas as idades. Neste caso a proteína extraída incluiria as classes de albumina e globulina, conhecidas por permanecer em nível constante, durante a maturação do endosperma (MURPHY e DALBY, 1971) e ii) o grão de milho opaco-2 não endureceu sensivelmente, permanecendo, entretanto, semelhante o padrão de atividade de GOGAT.

#### 1.8. Transaminase

A outra enzima procurada em extratos de endosperma de milho foi a transaminase. Esta enzima seria necessária para complementar a ação de GOGAT, transferindo o grupo amino de glutamato para outros aminoácidos. Considerou-se portanto, importante verificar a presença desta enzima no endosperma do milho.

Através de um ensaio qualitativo, foi constatada, con-

forme a figura 7, alta atividade dos sistemas glutamato-piruvato (Fig. 7-A) e glutamato-oxaloacetato (Fig. 7-C). A atividade no sentido reverso destes dois sistemas também ficou evidenciada (Fig. 7-B e D), porém apesar de alguns possíveis indícios, não foi detectada atividade para os sistemas envolvendo  $\alpha$ -cetoglutarato e os aminoácidos valina, isoleucina, leucina, fenilalanina ou tirosina. Possivelmente, a atividade nestes sistemas é abaixo da sensibilidade do ensaio empregado. Certamente, pelos resultados já obtidos com brotas de feijão (FOREST e WIGHTMAN, 1972), a atividade de desses sistemas é consideravelmente mais baixa do que a obtida com o sistema glutamato-piruvato.

## 2. SEMENTE DE ERVILHA

### 2.1. Asparagina: $\alpha$ -oxoglutarato amida transferase

A primeira enzima procurada para explicar o metabolismo de asparagina em sementes de ervilha foi a asparagina: $\alpha$ -oxoglutarato amida transferase. A reação catalisada por esta enzima é semelhante à causada por GOGAT, com a diferença que a asparagina é utilizada em lugar de glutamina como doador de nitrogênio. Para verificar a presença desta enzima nos extratos dessalinizados de sementes de ervilha, foi realizado um ensaio baseado no ensaio de GOGAT, trocando-se apenas a glutamina pela asparagina. Pela tabela 5 verifica-se que não foi possível detectar nenhuma atividade de amida transferase dependente da asparagina, embora a atividade dependente de glutamina (GOGAT) estivesse presente. Este resultado está em concordância com os obtidos com endosperma imaturo de milho (Tabela 3) onde foi demonstrado que a asparagina não substituiria a glutamina na reação GOGAT.

## 2.2. Asparaginase, Asparagina transaminase e Ácido $\alpha$ -cetosucínâmico deamidase.

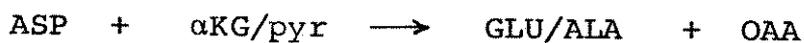
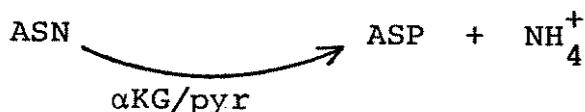
Como já era esperado, conforme consta na literatura, não foi encontrado nenhum sinal de atividade de asparaginase em extratos de sementes de ervilha. Através de um ensaio qualitativo, verificou-se a ausência de ácido aspártico após a incubação de tais extratos com asparagina (tabela 6, coluna A). Entretanto, outros experimentos preliminares evidenciaram a presença de asparagina transaminase. A incubação de asparagina com  $\alpha$ -cetogluturato ou piruvato na presença de extratos dessalinizados, acarretou a formação dos aminoácidos correspondentes, isto é, o ácido glutâmico e a alanina (colunas B e C). A formação de um pouco destes aminoácidos nos controles em ausência de asparagina (coluna D e E) provavelmente se deve ação de enzimas proteolíticas nos extratos.

Para caracterizar a atividade encontrada como sendo asparagina transaminase, seria imprescindível demonstrar a participação do ácido  $\alpha$ -cetosucínâmico como produto (ou substrato) da reação catalizada, uma vez que é o único composto específico envolvido. Não foi possível, entretanto, identificar este composto como substrato - isto é no sentido reverso da reação - já que não houve formação de asparagina a partir de  $\alpha$ -sucinamato e glutamato ou alanina (Tabela 6, colunas H e I). Por outro lado foi encontrada, nos extratos de ervilha, atividade da enzima ácido  $\alpha$ -cetosucínâmico deamidase (0,39  $\mu$ moles/hr/semente) que, segundo STREETER (1977), é responsável pelo metabolismo do  $\alpha$ -cetosucínamato gerado pela asparagina transaminase em folhas de soja.

Estudos mais profundos revelaram que a suposta atividade de asparagina transaminase (tabela 6, colunas B e C) era, na realidade, devido a outras enzimas. Isto ficou evidente quando os

ensaio com asparagina e outros ceto-ácidos foram repetidos na presença de amino-oxiacetato, um inibidor específico de transaminases (LEA e MIFLIN, 1975). Embora este inibidor eliminasse a formação dos aminoácidos correspondentes (colunas F e G), foi inesperada a produção de uma quantidade grande de ácido aspártico em lugar de glutamato e alanina. Evidentemente, na presença de  $\alpha$ -cetoglutarato e piruvato, há atividade de asparaginase. A formação de ácido glutâmico (col. B) e alanina (col. C) pode ser explicada então pela transaminação do ácido aspártico, formado inicialmente a partir da ação de asparaginase, com os ceto-ácidos presentes. De fato, foi observada a formação de um pouco de ácido aspártico nos ensaios de transaminase (colunas B e C).

Chega-se, portanto, a conclusão de que as seguintes reações são responsáveis pelos resultados obtidos na tabela 1:



Outro resultado interessante, que está de acordo com esta conclusão, foi a observação de que a permanência dos ensaios após terminados com a adição de etanol (60%) durante alguns dias na geladeira, levou a formação de quantidades apreciáveis de ácido aspártico. Isto só ocorreu com os experimentos que continham  $\alpha$ -cetoglutarato (ou piruvato), mesmo nos controles de tempo zero (tabela 7). Apesar da presença de etanol, concluiu-se que o fenômeno era mesmo enzimático, como evidenciado pela sua eliminação quando do uso de extratos fervidos (tabela 7 col. 3). Evidentemente, a asparaginase é estável e ativa em etanol 60%, proprie

dade esta aproveitada posteriormente na purificação da enzima. Deve-se observar que uma asparaginase já fora encontrada anteriormente em extratos etanólicos de nódulos de soja (STREETER, 1977).

Continuando ainda com o ensaio qualitativo, foram feitos alguns experimentos adicionais, para verificar a especificidade da suposta "ativação" de asparaginase pelo  $\alpha$ -cetogluturato, principalmente. Foram testados diversos ácidos orgânicos e outros ânions, entre eles oxaloacetato, glioxilato, citrato, malato, tartarato, sulfato e cloreto. Entretanto, todos estes ânions "ativaram" a asparaginase, mais ou menos com a mesma intensidade, a julgar pelo tamanho das manchas de ácido aspártico nas placas cromatográficas.

Este resultado levou à hipótese de que seria o cátion e não o ânion, o responsável pela "ativação" de asparaginase. Todos os ânions testados foram acrescentados ao ensaio como sais de potássio. Por este motivo estudou-se o efeito de vários cátions monovalentes, todos na forma de cloreto. Verificou-se dessa maneira que o "ativador" da enzima era mesmo o potássio.

### 2.3. Ensaio quantitativo para asparaginase

Terminados os experimentos preliminares para identificação de uma enzima capaz de metabolizar asparagina, tornou-se necessário o uso de um ensaio quantitativo para a sua dosagem. Os métodos descritos na literatura, referentes a dosagem de asparaginase, foram considerados inadequados para o presente caso. O mais usado é um ensaio radiométrico que envolve a separação do produto e do substrato pelo processo de troca-iônica em discos de papel ou por pequenas colunas de Dowex 1 (PRUSINER e MILNER, 1970). Tais métodos necessitam, de vez em quando, de verificação por cromatografia quanto à sua eficiência (STREETER, 1977). Por-

sempre realizado em presença de potássio e asparagina. Este procedimento levou à precipitação de maior parte da proteína dos extratos, de modo que a atividade específica de asparaginase no sobrenadante atingiu  $1 \mu\text{mole/hr/mg}$  proteína. O fator de purificação ficou ao redor de quinze vezes. Um grau de purificação semelhante foi obtido para a asparaginase da testa, porém com maior atividade específica (=  $31 \mu\text{mole/hr/mg}$  proteína) decorrente do alto teor da mesma no extrato cru.

Material purificado dessa maneira foi utilizado em todos os experimentos de caracterização da enzima.

### 2.5. Efeito de cátions.

O efeito de cátions foi a primeira propriedade da enzima estudada, utilizando-se para isto o ensaio quantitativo e a enzima parcialmente purificada. Pela tabela 11 verifica-se que praticamente nenhuma atividade da asparaginase foi registrada na presença dos íons Tris(o tampão), lítio, césio, amônio, cálcio ou magnésio. Além de potássio, registrou-se atividade na presença de sódio e rubídio, porém bastante diminuída em relação a potássio. Resultados semelhantes foram obtidos tanto para asparaginase do cotilédone como da testa.

### 2.6. Concentração de potássio

A ativação da asparaginase pelo potássio requer uma concentração elevada do cátion (figura 8). Até aproximadamente 20 mM, a atividade aumentou com a elevação da concentração de potássio, sendo que, acima desta concentração, a atividade permaneceu mais ou menos constante. A concentração de potássio neces

Partindo-se do fato da enzima ser estável em etanol, um solvente no qual a maioria das proteínas são insolúveis.

Inicialmente, foi necessário estabelecer a concentração de etanol mais apropriada para a purificação da enzima. Pelos dados apresentados na tabela 9 verifica-se que o etanol pode ser usado em concentrações até 60% sem prejudicar seriamente a atividade de asparaginase. Porém, essa concentração quando aumentado a 70%, acarretou uma queda brusca na atividade. A estabilidade dos extratos tratados com etanol até 60% era tal que foi possível guardar os mesmos no congelador, à noite, sem perda de atividade.

Para a remoção rápida de etanol do meio, verificou-se que uma coluna de Sephadex LH 20 foi bastante eficiente.

Detalhes da purificação da asparaginase de cotilédones de ervilha estão apresentados na tabela 10. Uma vez que a enzima também se encontrava na testa da semente, conforme descrito abaixo, e para fins de comparar as características das enzimas com as das duas fontes, a asparaginase da testa foi sujeita ao mesmo procedimento de purificação.

O uso de sulfato de amônio no tratamento inicial do extrato permitiu concentrar a enzima em pequeno volume com a finalidade de evitar a diluição excessiva após adição de etanol, na etapa seguinte. De qualquer forma, o uso de sulfato de amônio foi desejável, uma vez que tal procedimento eliminou um fator que acarreta a inativação da enzima. Extratos simplesmente dessalinizados em colunas de Sephadex G25 perderam rapidamente sua atividade de asparaginase. A possibilidade de se fazer um fracionamento com sulfato de amônio foi investigada mas o aumento de atividade específica conseguido foi insuficiente para justificar a inclusão deste procedimento na purificação.

Para estabilizar a enzima, o tratamento com etanol foi

tanto, seriam inúteis em trabalhos visando caracterizar a enzima. Isto porque nestes casos há a necessidade de alterações constantes das condições de ensaio que podem afetar a separação subsequente do produto.

Por essa razão achou-se preferível utilizar a cromatografia em camada delgada para separar o produto e substrato, uma vez que esta técnica permitirá a visualização da separação antes da dosagem de aspartato. Embora isto possibilitasse uma boa separação de asparagina e ácido aspártico, houve no início o inconveniente de que a mancha de ácido aspártico era pouca definida, necessitando a remoção de uma área relativamente grande para contagem. Subsequentemente, foi observado que a presença de íons de sulfato nas amostras submetidas a cromatografia, acarretava a formação de uma mancha de ácido aspártico bastante nítida. Verificou-se ainda que quanto mais sulfato de amônio ocorria mais compacta ficava a mancha, embora concentrações (finais) acima de 2% interferirem na separação. A presença de sulfato não afetou a contagem final da mancha obtida (Tabela 8), demonstrando a ausência de qualquer contra-indicação quanto ao uso dessa substância durante a cromatografia. A partir destes estudos foi escolhida uma concentração final de 0,66% como sendo a mais adequada para os ensaios de rotina. A descrição completa do método utilizado encontra-se no item Material e Métodos.

#### 2.4. Purificação parcial de asparaginase.

Considera-se sempre desejável utilizar uma enzima purificada para estudos visando sua caracterização. Para esse fim, em virtude da instabilidade da asparaginase na ausência de potássio, foi necessária uma purificação rápida e simples que permitisse realizar os ensaios no mesmo dia. Isto foi possível aprovei

sária para se obter metade da velocidade máxima foi de 6 mM para a enzima do cotilédone e de 4,5 mM da testa.

## 2.7. Efeito da forma de potássio

Utilizando-se os sais a 33 mM, verificou-se que a forma de potássio presente no ensaio exercia pouca influência no grau de ativação (Tabela 12). Entre os sais cloreto, brometo, iodeto, nitrato, sulfato, fosfato,  $\alpha$ -cetogluturato e tartarato, apenas o brometo acarretou uma ligeira diminuição na atividade. Estes resultados estão de acordo com os experimentos preliminares descritos acima quanto ao efeito de diversos sais orgânicos de potássio, e demonstram claramente que o efeito é exclusivamente catiônico.

## 2.8. Peso molecular

Dos exemplos encontrados na literatura (EVANS e WILDES, 1971) referentes às diversas enzimas ativadas pelo potássio, fica evidente que o mecanismo de ativação pode tomar formas diferentes, conforme o caso. Uma delas é a dissociação da enzima ativa em subunidades inativas, na ausência de potássio.

Para verificar esta possibilidade foi determinado o peso molecular da enzima na presença e na ausência do potássio, através de centrifugação em gradientes de sacarose. Dos dados obtidos (Tabela 13) fica evidente que o potássio não influiu no peso molecular da enzima, tanto para asparaginase da testa como do cotilédone. No caso do cotilédone, o resultado obtido na ausência de potássio não foi muito satisfatório devido a instabilidade da

enzima nessas condições e a baixa atividade inicial. Em média o peso molecular da enzima foi estimado em 68.300.

Portanto, neste experimento, a evidência sugere que a enzima não se dissocia na ausência de potássio.

### 2.9. Estabilidade

A estabilidade da enzima é outro fator no qual o potássio pode influir (EVANS e WILDES, 1971), embora pouca atenção tenha sido dada a este fenômeno.

No presente trabalho a investigação da influência do potássio sobre a estabilidade de asparaginase foi conduzida também em presença e ausência de asparagina, já que muitas enzimas apresentam maior estabilidade na presença do seus substratos. Este estudo foi realizado em duas condições de temperatura, 20 e 30 °C. Dos resultados obtidos (Figura 9) fica evidente que a enzima é muito instável na ausência do potássio e que a presença ou não do substrato parece ter pouca influência na sua estabilidade. Na presença do potássio a enzima ficou perfeitamente estável, mesmo a 30° ao passo que à mesma temperatura, na ausência daquele elemento, apenas 25% da atividade foi observada após 5 minutos. À 20 °C a enzima ficou um pouco mais estável.

O fato de que, na ausência de potássio e nas condições do ensaio, isto é, na presença do substrato a 30 °C, a atividade da enzima se perde rapidamente, traz dúvidas quanto ao papel de potássio como ativador. Na realidade, a enzima pode não precisar do potássio para atividade mas apenas para estabilidade. Isto significa que, se a enzima fosse estável na ausência de potássio, a sua atividade seria a mesma tanto na ausência como na presença desse elemento.

Para resolver este problema foi feito um ensaio a 20 °C com o mesmo extrato utilizado nos experimentos de estabilidade. A atividade obtida após 20 minutos foi de 2.100 (cpm de aspartato), ao passo que na ausência do potássio foi de 160 cpm no mesmo tempo. Os dados sobre a estabilidade da enzima (Figura 9) mostram que, a 20 °C, durante 20 minutos, a enzima manteve cerca de metade da sua atividade na ausência de potássio. Sendo essas condições iguais ao ensaio feito, pode-se ajustar a atividade obtida na ausência do potássio de 160 para 320 cpm por 20 minutos em compensação à instabilidade da enzima na ausência de potássio. Pode-se verificar assim, que este valor ainda é muito inferior àquele obtido na presença do potássio. Pode-se afirmar que a enzima precisa do potássio, tanto para atividade como para estabilidade.

#### 2.10. Propriedades cinéticas

Alguns estudos cinéticos com asparaginase foram realizados visando principalmente determinar as condições ótimas de ensaio.

A variação de atividade com o pH está apresentada na figura 10. O aumento do pH promoveu um crescimento da atividade atingindo a seu ponto máximo com pH 8. Acima desse valor a atividade permaneceu mais ou menos constante, até o limite estudado de pH 9,5. Baseado nesses dados foi escolhido o pH 8 para os ensaios de rotina.

Um estudo de atividade em relação à concentração do substrato (Figura 11) revelou que a concentração mínima para saturar a enzima fica em torno de 10 mM. Esta concentração foi usada nos ensaios. A partir desses dados o Km aparente da enzima foi

estimado em 3,2 mM. O valor obtido para a enzima da testa foi de 3,7 mM. Não foi possível verificar a influência do potássio no Km devido a instabilidade da enzima na presença de concentrações subótimas de potássio.

Empregando-se um extrato dessalinizado verificou-se uma relação linear de atividade com o tempo, até 3 horas de incubação (Figura 12-B). A atividade também foi proporcional à quantidade de enzima colocada no ensaio (Figura 12-A).

Com base nesses resultados pode-se afirmar que o ensaio foi perfeitamente adequado para dosagem de asparaginase em extratos dessalinizados.

### 2.11. Inibidores

A enzima mostrou alta sensibilidade aos íons de mercúrio. A atividade foi praticamente eliminada pelo cloreto de mercúrio a 1 mM (tabela 14). Os produtos da reação, o ácido aspártico e amônia, também tiveram efeitos inibitórios sobre a enzima.

### 2.12. Distribuição da enzima

Pelo fato de não ser encontrada atividade de asparaginase em sementes de muitas leguminosas (vide Introdução), torna-se possível, com a descoberta em ervilha de uma asparaginase dependente do potássio, a existência de enzima semelhante, em outras leguminosas. Uma investigação em torno desta possibilidade revelou a presença de asparaginase em sementes de todas as leguminosas estudadas (tabela 15). A dependência da atividade no potássio provavelmente explica porque não foi possível encontrar anteriormente a enzima nessas sementes. Foi confirmada a presença de uma asparaginase em Lupinus polyphyllus cuja atividade é

independente do potássio. Por outro lado, as outras espécies de Lupinus possuem a asparaginase dependente do potássio.

Embora tenham sido usados apenas os cotilédones das sementes, em ervilha, pelo menos, a testa também possui a enzima e, segundo os dados apresentados acima, com as mesmas características da asparaginase do cotilédone.

### 2.13 Atividade de asparaginase durante a ontogenia da semente

A atividade de asparaginase foi dosada a várias idades de desenvolvimento da semente, juntamente com outros parâmetros como peso fresco, peso seco e conteúdo de nitrogênio, com a finalidade de estabelecer prováveis mudanças com o estágio de desenvolvimento da semente.

Dos resultados obtidos (figura 13) verifica-se que a atividade apareceu primeiro na testa, atingindo o máximo aos 13 dias após floração. Este pico coincidiu com o início de crescimento dos cotilédones e, a partir desse ponto, enquanto decrescia a atividade na testa ocorria um acréscimo nos cotilédones, chegando a um máximo aos 21 dias. Dai em diante a atividade nos cotilédones permaneceu alta durante vários dias, caindo finalmente para zero quando o crescimento dos cotilédones chegou ao fim.

A característica mais importante da curva é a coincidência da fase de alta atividade de asparaginase no cotilédone (18 a 30 dias) com a fase de síntese de proteína.

### 2.14 Outras enzimas

A ação de asparaginase faz com que o grupo amida de asparagina seja liberado na forma de amônia. Objetivando explicar

a maneira de aproveitamento dessa amônia, na síntese de aminoácidos, foram analisadas outras enzimas, conhecidas por estarem envolvidas em tais processos.

Para a assimilação de amônia (MIFLIN e LEA, 1976) é necessária a presença da enzima glutamina sintetase ou glutamato desidrogenase. Estas duas enzimas foram dosadas em várias idades durante o desenvolvimento da semente (Figura 14). As suas atividades foram determinadas na testa e no cotilédone, durante toda a fase estudada (de 10 a 35 dias) sendo os valores máximos atingidos alguns dias após a máxima de asparaginase, tanto no cotilédone como na testa. Entretanto, houve um pico de atividade de glutamina sintetase no cotilédone, correspondente àquele de asparaginase aos 21 dias, embora a atividade voltasse a subir novamente no final de desenvolvimento, atingindo um valor bem mais alto.

Além de glutamina sintetase e glutamato desidrogenase foi constatada a presença das enzimas transaminase (Figura 15) e GOGAT (veja tabela 5) no cotilédone aos 21 dias de idade.

#### IV - DISCUSSÃO

##### 1. GOGAT DE MILHO

A enzima GOGAT tem sido encontrado em diversos órgãos vegetais, tal como folhas (LEA e MIFLIN, 1974; RHODES et al., 1975; WALLSGROVE et al., 1977) e raízes (FOWLER et al., 1974; MIFLIN e LEA, 1975), bem como em células vegetais em cultura (DOUGALL, 1974; FOWLER, et al., 1974), onde acredita-se desempenhar um importante papel na assimilação de nitrogênio (MIFLIN e LEA, 1977).

O fato de sementes imaturas não terem capacidade para a redução de nitrato (MILLERD et al., 1975; SCHLESIER, 1977) e portanto não serem considerados sítios de assimilação de nitrogênio, atrasou possivelmente a procura dessa enzima nesse órgão. Somente após o conhecimento recente da importância das amidas, como a glutamina, na nutrição da semente, é que surgiu o estímulo para a descoberta desta enzima em sementes em desenvolvimento, por outros autores (LEA e FOWDEN, 1975a; MIFLIN e LEA, 1976; STOREY e BEEVERS, 1976) e independentemente por nós em nosso laboratório.

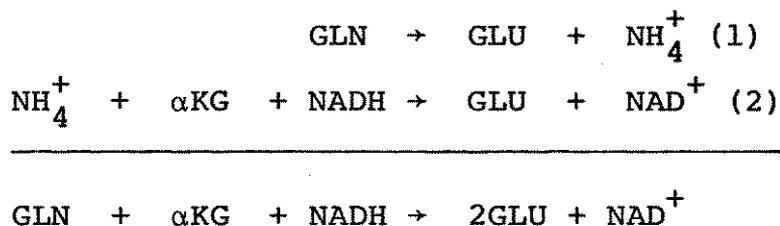
As características da enzima GOGAT dos diversos tecidos de plantas superiores são basicamente semelhantes. Apenas a especificidade pelo doador de elétrons diferencia a enzima de folhas da enzima de tecidos não verdes. A primeira é específica para ferredoxina enquanto a última apresenta atividade com NADH ou NADPH. Não é possível até agora dizer se alguma enzima GOGAT de tecidos não-verdes tem especificidade absoluta para um destes nucleotídeos de piridina. Em nossos experimentos, a enzima do endosperma de milho apresentou grandes variações de atividade com NADPH em relação ao NADH. Frequentemente a atividade com NADPH

foi bem inferior aquela observada para NADH, embora as vezes te nha chegado a ser igual, porém nunca superior. Tais variações fora m observadas por MIFLIN e LEA(1975) para o caso da enzima de raizes de ervilha enquanto que BEEVERS e STOREY(1976) encontrara m atividade inferior com NADPH, e DOUGALL(1974) encontrou ativida des iguais. Como esses trabalhos foram realizados com extratos relativamente crus, sempre existe a possibilidade do NADPH ser transformado em NADH pela ação da enzima fosfatase. Isso foi realme nte o que ocorreu com problema semelhante envolvendo a redutase de nitrato(WELLS e HAGEMAN, 1974). Esta enzima também demonstr ou atividade com ambos NADPH e NADH, mas através do uso de fluore to como inibidor de fosfatase, foi possível demonstrar a especi ficidade dessa enzima para o NADH. No nosso caso entretanto, o uso de fluoreto não alterou a atividade obtida com NADPH no ensa io de GOGAT(Tabela 4). Evidentemente a questão de especificidade para o doador de eletrons só poderá ser resolvida após purifica ção da enzima.

A especificidade para os outros dois substratos, glutami na e ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, parece ser semelhante em todos os casos. Existe apenas alguma polêmica quanto a especificidade da glutamina uma vez que em dois trabalhos(DOUGALL, 1974; FOWLER et al., 1975) foi constatada atividade também com asparagina como doador de nitrogênio. Segundo MIFLIN e LEA(1975) a atividade observa da com asparagina é devido a outras enzimas e não a GOGAT. Eles verificaram que fontes comerciais de asparagina estão contaminada s com ácido aspártico ao nível de 1%. A presença de ácido aspárti co nos ensaios possibilita a transaminação com o  $\alpha$ -cetoglutarato e o produto, o oxaloacetato, leva a oxidação de NADH através de malato desidrogenase, sempre muito ativa em tecidos vegetais(veja por exemplo na Tabela 3). Desta maneira, a oxidação de NADH dependente de "asparagina" e  $\alpha$ -cetoglutarato daria uma im-

pressão falsa quanto a participação da asparagina em reações envolvendo a enzima GOGAT. Em nosso caso, graças a utilização de asparagina purificada, esse problema não se manifestou.

A possibilidade de que a atividade registrada nos extratos de endosperma de milho seja devido a outras enzimas foi cuidadosamente eliminada em nossos experimentos. Apesar do fato de ter-se demonstrada a estequiometria da reação(III - 1.5), ainda poder-se-ia alegar que a atividade medida foi devido a um acoplamento das reações de glutaminase(1) e glutamato desidrogenase(2). A soma destas reações daria uma estequiometria igual àquela de GOGAT:-



Contra esse argumento, foram apresentadas evidências(Figura 1) de que a formação de glutamato no ensaio é dependente da presença de NADH. Este fato elimina a presença de glutaminase nos extratos. Além do mais, não foi observada nenhuma atividade quando a glutamina foi substituída por amônia no ensaio de GOGAT(Tabela 3), que daria condições para a manifestação de atividade da glutamato desidrogenase.

Outras características da enzima GOGAT do endosperma de milho são semelhantes àquelas encontradas para a GOGAT de outros tecidos não-verdes. Os  $K_m$ s aparentes para glutamina(1,35 mM) e  $\alpha$ -cetoglutarato(0,57 mM) encontrados no endosperma de milho são comparáveis aos valores de 1,43 mM e 0,96 mM para a enzima de cotilédones de ervilha(BEEVERS e STOREY, 1976), e de 1 mM e 0,5 mM para a enzima de raízes de ervilha(MIFLIN e LEA, 1975). Entretanto

to a enzima dependente da ferredoxina de folhas (LEA e MIFLIN, 1974; WALLSGROVE et al., 1977) e do NADPH de E. coli (MILLER e STADTMAN, 1972) apresentaram valores bem mais baixos, ou sejam 330  $\mu\text{M}$  e 150  $\mu\text{M}$ , e 250  $\mu\text{M}$  e 7,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente para glutamina e  $\alpha$ -cetogluturato. No caso de NADH obtivemos um valor de 7  $\mu\text{M}$  para o  $K_m$ , valor este semelhante aos valores de 7  $\mu\text{M}$  e 13,3  $\mu\text{M}$  obtidos para GOGAT de raízes de ervilha (MIFLIN e LEA, 1975) e do cotilédone de ervilha (STOREY e BEEVERS, 1976). É notável observar que valores igualmente baixos foram obtidos para o doador de elétrons da enzima de folha de feijão (ferredoxina, 2  $\mu\text{M}$ ) por WALLSGROVE et al. (1977) e da enzima bacteriana (NADPH, 7,7  $\mu\text{M}$ ) por MILLER e STADTMAN (1972). O pH ótimo de 7,5 obtido aqui para a enzima de endosperma do milho é igual o valor obtido para a enzima de outras fontes tais como tecidos vegetais não-verdes (BEEVERS e STOREY, 1976) e verdes, (WALLSGROVE et al., 1977) e bactérias (MEERS et al., 1970; MILLER e STADTMAN, 1972).

## 2. ASPARAGINASE DE ERVILHA

O fato da asparaginase encontrada por nós em sementes de ervilha ser totalmente dependente do potássio parece explicar porque vários pesquisadores (LEA e FOWDEN, 1975b; LEA et al., 1978; STOREY e BEEVERS, 1978) não a acharam em sementes imaturas de leguminosas. Entretanto não existe nenhuma evidência de que as asparaginases de outras fontes (WRISTIN e YELLIN, 1973) sejam dependentes do potássio. Além disso, em tecidos vegetais, tem sido demonstrado que relativamente poucas enzimas são dependentes do potássio, apesar do efeito drástico acarretado nas plantas em decorrência da deficiência desse nutriente. O potássio é o cátion mais abundante em tecidos vegetais sendo normalmente encontrado em concentrações que variam ao redor de 50 mM. A deficiência de

potássio acarreta consequências sérias no metabolismo de carboidratos e proteínas reduzindo a síntese destas macromoléculas e causando o acúmulo de açúcares livres e aminoácidos (EVANS e SORGER, 1966). Contudo, numa lista de aproximadamente cinquenta enzimas, cuja atividade necessita do potássio (EVANS e SORGER, 1966), apenas quatro foram encontradas em plantas superiores. À esta lista podemos acrescentar agora mais duas enzimas de plantas: a amido sintetase, que é uma enzima chave no metabolismo de carboidratos armazenados em sementes, também dependente do potássio (AKATSUKA e NELSON, 1966; NITOS e EVANS, 1969), e a asparaginase por nós identificada em sementes de ervilha.

A maioria das enzimas dependentes do potássio, incluindo a amido sintetase, são frequentemente ativadas também pelo rubídio e amônia, embora normalmente em nível inferior (EVANS e SORGER, 1966). Uma característica que esses três íons monovalentes tem em comum, é a semelhança de seus raios atômicos, apresentando valores de 5,32 Å, 5,09 Å, e 5,37 Å para potássio, rubídio e amônia, respectivamente (KACHMAR e BOYER, 1953). O raio atômico do íon, provavelmente, não é o único fator responsável pela propriedade de ativador, uma vez que os três apresentam diferentes graus de ativação. Esta idéia é reforçada por nossos dados uma vez que a asparaginase de sementes de ervilha não apresentou atividade na presença de amônia (Tabela 11) mas foi ativada pelo sódio cujo raio atômico é muito maior (7,9 Å). Evidentemente as propriedades químicas desses íons deve ser outro fator que influi no processo de ativação.

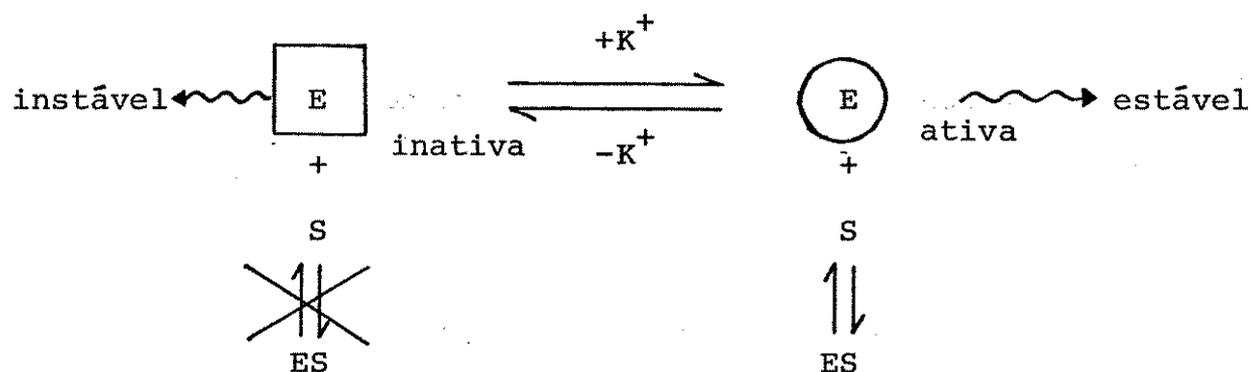
O fato do íon amônio não ter ativado a asparaginase não significa, necessariamente, que este íon não tenha essa propriedade. Pois considerando-se que a amônia é produto da reação catalisada, ela poderá atuar como inibidor da enzima. A inibição (veja Tabela 14) poderá portanto suprimir qualquer efeito estimulatório que este íon possa ter na asparaginase.

Embora outros íons como rubídio, amônio e sódio possam substituir o potássio no papel de ativador, em condições fisiológicas apenas o potássio tem possibilidades de exercer esta função. A ativação de enzimas por íons monovalentes necessita de altas concentrações dos mesmos, geralmente na faixa de 10 mM para que a enzima possa operar com a metade da velocidade máxima e 50 mM para que a velocidade seja máxima (EVANS e SORGER, 1966). Dos cátions monovalentes apenas o potássio ocorre em tais níveis em tecidos vegetais. É notável, entretanto, observar que os íons de sódio e rubídio produzem efeitos benéficos em algumas espécies de plantas, em condições de deficiência de potássio (EVANS e WILDES, 1971).

Quanto ao mecanismo de ativação pelo potássio, diversos estudos encontrados na literatura indicam que o processo não é simples e que pode tomar várias formas, conforme a enzima. É comum, por exemplo, a enzima sofrer mudanças na sua conformação na presença de potássio (EVANS e WILDES, 1971). Esta mudança pode ser aloestérica, como é o caso da piruvato kinase (SORGER et al, 1965; HUNSLEY e SUELTER, 1969; JIMÉNEZ DE ASÚA et al, 1970; REUBEN e COHN, 1970), da adenosina 5-monofosfato deaminase (SMILEY e SUELTER, 1967) e da ATPase (ROBINSON, 1967). Em outros casos, tal como a glicerol desidratase (SCHNEIDER et al, 1966) e a formil-tetraidrofolato sintetase (SCOTT e RABINOWITZ, 1967), ambos de origem bacteriana, o potássio controla a dissociação reversível da enzima em subunidades inativas, o que não acontece no caso da piruvato kinase (WILSON et al., 1967). O potássio pode ainda promover a ligação de um co-fator à apoenzima, como é o caso de piridoxal fosfato e as enzimas serina desidratase (PESTANA e SOLS, 1970) e triptofanase (HAPPOLD e BEECHEY, 1958), e da vitamina B<sub>12</sub> e propanodiol desidratase (TORAYA et al, 1970). Apesar da evidência de diversos efeitos do potássio sobre as propriedades físicas

da enzima, SUELTER(1970) sugeriu um mecanismo único de ativação de enzimas pelo potássio no qual o cátion desempenha um papel direto no ato catalítico. Como todas as reações catalisadas por enzimas dependentes do potássio, envolvem como intermediários da catálise os tautômeros ceto-enol, aquele autor formulou a hipótese de que o potássio tem a função de estabilizar tais intermediarios, participando na sua ligação ao centro ativo. Entretanto , tal mecanismo, sozinho, não poderia explicar todos os efeitos do potássio, uma vez que ficou evidente nos exemplos citados que o cátion afeta profundamente as propriedades de muitas enzimas, na ausência de intermediários da reação.

No nosso caso não encontramos nenhuma evidência de que a asparaginase se dissocia em subunidades na ausência de potássio (veja Tabela 13). Foi possível concluir apenas, que o potássio é necessário para atividade da asparaginase e que tem um efeito acentuado na estabilidade da enzima. Dos modelos existentes para a ativação de enzimas pelo potássio, na ausência de dados mais completos, talvez a asparaginase se enquadra melhor, naquele no qual o potássio induz uma mudança na conformação da enzima, de uma forma inativa para uma ativa.



Neste modelo a forma inativa seria muito instável e a forma ativa estável. Desse modo, de acordo com os dados obtidos, a 20 °C a forma inativa se desnaturaria mais lentamente de modo que a atividade seria maior quando dosada subsequentemente na

49

presença de potássio. Uma vez que a forma inativa não mostrou me-  
lhor estabilidade na presença de asparagina (Figura 9), possivel-  
mente a enzima nesta forma não se ligaria ao substrato, conside-  
rando-se que substratos normalmente têm um efeito estabilizador  
sobre as enzimas. Neste respeito deveria ser frisado que o potás-  
sio sozinho estabiliza a enzima e portanto este efeito não seria  
produzido através da ligação com o substrato. Por outro lado no-  
ta-se que a reação catalisada por asparaginase é do tipo que en-  
volve os tautômeros ceto-enol no mecanismo de reação e, portanto,  
a ativação pelo potássio poderá funcionar de acordo com o modelo  
proposto por SUELTER (1970). Contudo, para explicar o efeito de  
potássio sobre a estabilidade, registrado na ausência do substra-  
to, será necessário outro mecanismo do tipo sugerido acima.

Em virtude do fato que um número limitado de espécies  
de Lupinus possuem uma asparaginase independente do potássio  
(LEA et al., 1978), surge a possibilidade das duas enzimas serem  
proteínas semelhantes, apenas diferentes em algum detalhe que  
torna uma delas independente do potássio. Se isto realmente ocor-  
reu, um estudo ao nível molecular das duas enzimas, poderá reve-  
lar informações importantes, quanto ao mecanismo de ação do po-  
tássio nesta enzima. Além da dependência do potássio, observamos  
algumas outras diferenças nas propriedades destas duas enzimas. A  
enzima dependente do potássio é fortemente inibida pelo mercúrio  
(Tabela 14), ao passo que aquela de Lupinus polyphyllus é total-  
mente insensível. Esta evidência indica a importância de grupos  
sulfidrílicos para a atividade da asparaginase por nós encontrada,  
e explica o efeito benéfico da inclusão de 2-mercaptoetanol no  
tampão. O  $K_m$  da asparaginase dependente do potássio tem um valor  
(3,2 mM) maior do que aquele da enzima de Lupinus Polyphyllus  
(12,2 mM). Por outro lado existem algumas propriedades semelhan-  
tes entre as duas enzimas, tal como o peso molecular e o pH óti-

mo. Nos dois casos são encontrados um pH ótimo de 8, sendo que acima deste valor a atividade não se altera muito, pelo menos até o pH 9. O peso molecular, determinado pelo mesmo método usado aqui, foi de 72.000 para a enzima de L.polyphyllus e 68.300 para a asparaginase de ervilha.

Quanto à asparaginase de sementes de Lupinus albus (ATKINS et al., 1975), acreditamos ser ela independente do potássio, como a enzima de L. polyphyllus uma vez que o  $K_m$  (11,9 mM) é praticamente igual. O fato que nesse trabalho foi utilizado um tampão fosfato de potássio (100 mM) não permite uma conclusão final a respeito dessa propriedade. As asparaginases de origem bacteriana, é interessante notar, tem  $K_m$  bem mais baixo, sendo a maioria na faixa de 0,005 a 0,03 mM (WRISTON e YELLIN, 1973).

### 3. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DOS DADOS

O objetivo do presente trabalho, além de encontrar enzimas que pudessem explicar a utilização das amidas translocadas à sementes imaturas, foi de obter evidências de que as enzimas encontradas, no caso asparaginase e GOGAT, pudessem realmente desempenhar um papel fundamental neste processo. Assim foi verificado que ambas as enzimas apresentaram um padrão de atividade característico durante a ontogenia da semente, com picos de atividade correspondentes ao período de síntese de proteína mais intensa. É justamente nesta fase que as enzimas realmente envolvidas no fornecimento de aminoácidos para síntese de proteína seriam mais necessitadas. No caso de GOGAT do endosperma de milho (Figura 5) verificamos também que as mudanças em atividade durante a ontogenia do endosperma não simplesmente acompanham os níveis de proteína extraídos com a enzima, sugerindo algum significado fisiológico nas mudanças observadas. Para ambas as enzimas,

encontramos atividade suficiente para processar todo o nitrogênio entrando na semente, mesmo que estivesse totalmente na forma de amidas. Isto é fundamental para que estas enzimas possam desempenhar um papel principal no metabolismo das amidas. Por exemplo, pela figura 6 podemos verificar que o fluxo máximo possível de nitrogênio através do sistema GOGAT é várias vezes maior do que o acúmulo de nitrogênio durante todo período de desenvolvimento. No ponto máximo de acúmulo de nitrogênio, a atividade de GOGAT permite a formação de 56 nmoles de glutamato (= 1N) por minuto, enquanto 9,5 nmoles de nitrogênio acumulava no endosperma por minuto. No caso da semente de ervilha verificamos um valor ao redor de 2  $\mu$ moles por hora para o acúmulo de nitrogênio nos cotilédones durante a fase mais intensa (Figura 13). Nesta fase a atividade de asparaginase fica, em média, em torno de 1,35  $\mu$ moles de asparagina hidrolisada por hora, por semente, ou seja 2,7  $\mu$ moles de nitrogênio processados por hora (asparagina = 2N). Portanto a atividade de asparaginase nos cotilédones é suficiente para que esta enzima possa ser responsável pelo metabolismo de toda asparagina processada nestes órgãos. No caso, o pequeno excesso de atividade pode ser considerado insuficiente para compensar o fato de que a atividade foi dosada em condições ótimas e a 30 °C. Por outro lado deve-se lembrar que nem todo nitrogênio translocado está na forma de asparagina e que nem toda a asparagina é metabolizada.

Além da atividade no cotilédone, foi encontrada alta atividade de asparaginase na testa durante os estágios iniciais de desenvolvimento da semente de ervilha. A função fisiológica de asparaginase neste tecido é difícil de se racionalizar. Possivelmente, a testa faz o processamento da asparagina translocada, até que os cotilédones começam a crescer e podem assim tomar con

ta dessa função. De fato, antes de crescimento cotiledonário, altos níveis de aminoácidos (FLINN e PATE, 1968; ATKINS et al., 1975) e amônia (ATKINS et al., 1975) acumulam no endosperma líquido. Desta maneira, o endosperma líquido forma um tipo de "meio de cultura" para o crescimento subsequente dos cotilédones, sendo posteriormente totalmente absorvido por estes órgãos na sua fase inicial de crescimento (BEEVERS, 1976). O acúmulo de compostos nitrogenados no endosperma líquido pode ser o resultado do metabolismo, dentro da testa, de substâncias nela translocadas, uma vez que o endosperma líquido não possui, aparentemente, nenhuma atividade enzimática (ATKINS et al., 1975). Embora haja possibilidade da asparaginase da testa ser responsável pela amônia no endosperma líquido, deve ser frisado que a testa possui atividade suficiente de glutamina sintetase (Figura 14) para assimilar a maior parte da amônia gerada pela ação de asparaginase.

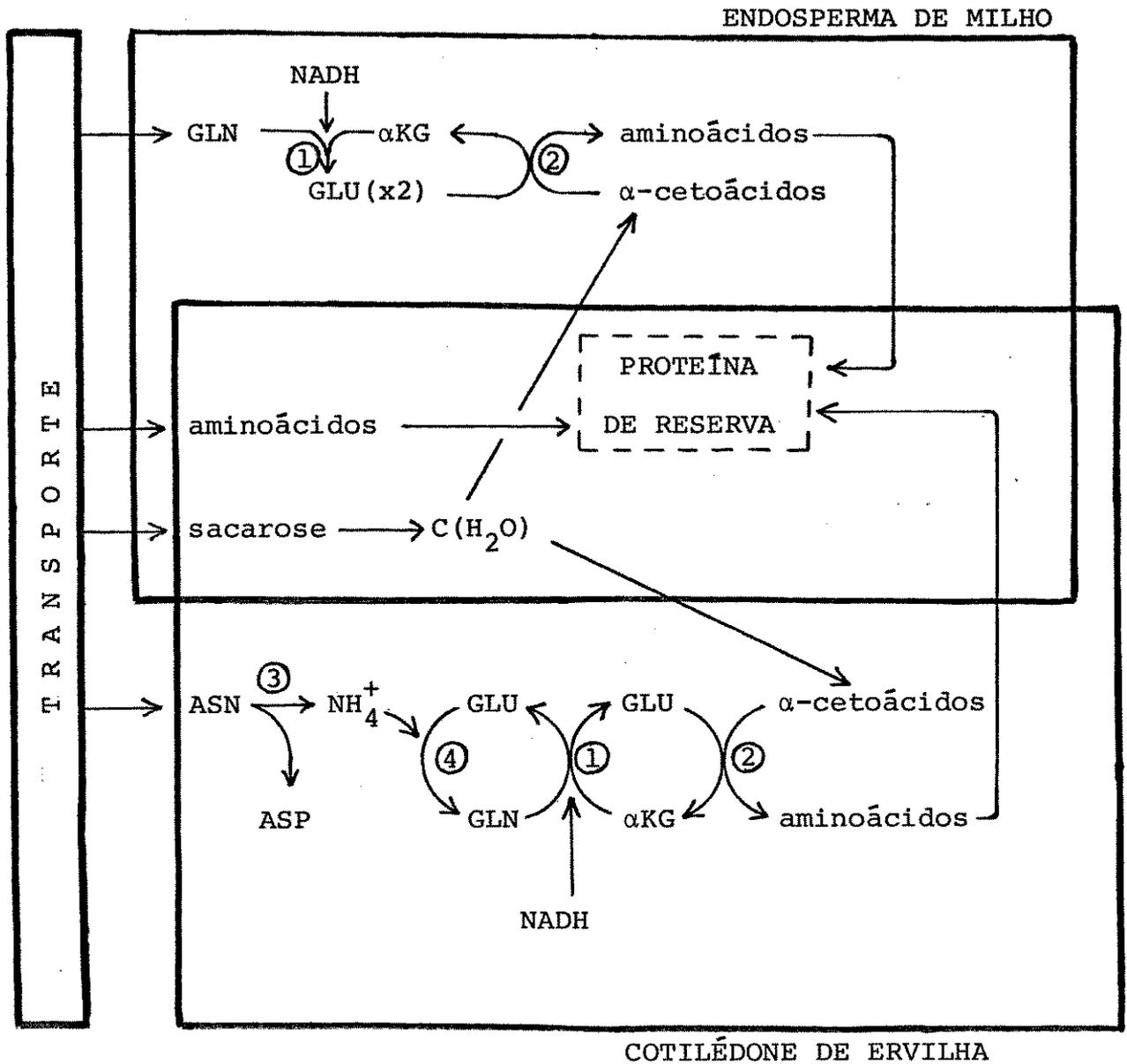
Outras evidências que reforçam a idéia de que a asparaginase e a GOGAT desempenham um papel importante na utilização de amidas pela semente, foram obtidas com a eliminação das várias alternativas. Pois as outras duas enzimas possivelmente envolvidas no metabolismo de asparagina (LEA e FOWDEN, 1975b), a asparagina transaminase e asparagina amida transferase (tipo GOGAT), não revelaram, em nosso trabalho, qualquer vestígio de atividade nos extratos de sementes de ervilha (Tabela 5 e 6). No caso do endosperma de milho, não obtivemos também, qualquer evidência da presença de glutaminase (Figura 1). Além disso, teoricamente, a participação desta enzima não teria qualquer fundamento, uma vez que a re-assimilação pela glutamina sintetase da amônia liberado criaria um ciclo vicioso de síntese e degradação de glutamina. A possibilidade da assimilação de amônia pela reação catalisada pela glutamato desidrogenase, também não pode ser considerada, pois esta enzima não pode mais ser considerada importante neste pro-

cesso (MIFLIN e LEA, 1976).

A provável importância da asparagina e GOGAT na utilização de amidas nos levou a formular o esquema seguinte para explicar o aproveitamento das grandes quantidades de amidas translocadas à semente bem como a origem em geral de aminoácidos utilizados na síntese de reserva.

Neste esquema postulamos que o nitrogênio da glutamina no endosperma de milho, caminha por um sistema catalisada por GOGAT e transaminase, para chegar ao grupo  $\alpha$ -amino de novos aminoácidos. Além da evidência já discutida para a participação de GOGAT neste processo, foi demonstrada também a presença de transaminase neste tecido. Do mesmo modo, todas as enzimas necessárias para o funcionamento do sistema postulado para a utilização de asparagina foram encontradas no cotilédone de ervilha, isto é asparaginase, glutamina sintetase, GOGAT, e transaminase. A presença de glutamina sintetase e GOGAT no cotilédone imaturo de ervilha (STOREY e BEEVERS, 1978) e soja (STOREY e REPORTER, 1978) também foi constatada por outros, após o término de nossos estudos. Embora a enzima glutamato desidrogenase estivesse presente no cotilédone de ervilha, não pudemos sugerir uma possível participação desta enzima na assimilação de amônia. Isto porque, além das razões dadas por MIFLIN e LEA (1976) afastando uma possível função da glutamato desidrogenase neste processo, principalmente devido ao alto Km para a amônia, foi evidenciado que a utilização da asparagina para síntese de proteína no cotilédone de ervilha é inibida fortemente pela metionina sulfoximina (P.J. LEA, comunicação pessoal), um inibidor específico de glutamina sintetase. Contudo, apesar dessa evidência contrária, não podemos eliminar totalmente a possibilidade da participação de glutamato desidrogenase, especialmente considerando-se que ocorrem altas concentrações de amônia no endosperma líquido e quantidades elevadas da

ORIGEM DOS AMINOÁCIDOS UTILIZADOS NA SÍNTESE DE  
PROTEÍNA DE RESERVA EM SEMENTES



1. GOGAT
2. Transaminase
3. Asparaginase
4. Glutamina Sintetase

enzima na testa e nos cotilédones.

A curva de atividade para glutamina sintetase( e glutamato desidrogenase) durante a ontogenia da semente de ervilha(figura 14) não coincide com aquele de asparaginase(Figura 13). Pois os níveis máximos dessas enzimas são atingidos vários dias após o máximo de asparaginase, tanto no cotilédone como na testa. Apesar disto, a atividade de glutamina sintetase fica sempre em excesso em relação a da asparaginase e, portanto, tem capacidade suficiente para assimilar toda amônia liberada por esta enzima. Neste respeito pode ter significado o pequeno pico de glutamina sintetase observado aos 21 dias no cotilédone, ponto que corresponde à atividade máxima da asparaginase. A razão do grande aumento dessa enzima nas fases finais de maturação do cotilédone é de difícil explicação, mas é possível que isso ocorra para a síntese de glutamina durante a degradação de proteínas de reserva após a germinação da semente.

O fato que o nitrogênio de amidas é utilizado na formação do grupo  $\alpha$ -amino de novos aminoácidos, como indicado no esquema acima, implica que a semente tem todos os mecanismos necessários para sintetizar os esqueletos de carbono destes aminoácidos. Evidências de que a biossíntese de todos os aminoácidos tem lugar em sementes imaturas de cereais e leguminosas tem sido obtido por nós(SODEK, 1976) e outros(BILISKI E McCONNELL, 1957; McCONNELL, 1969; PATE et al., 1975) empregando precursores marcados com  $^{14}\text{C}$ . Além do mais, algumas enzimas ligadas à biossíntese de aminoácidos têm sido encontrado em extratos de sementes imaturas tal como aspartokinase(HENKE e WAHNBAECK, 1977) e diaminopimelato descarboxilase(SODEK, 1978), ambas da biossíntese de lisina. No esquema acima, a fonte dos precursores da biossíntese de aminoácidos foi indicada como sendo sendo sacarose, uma vez que esta substância é sabidamente conhecida como forma de carboidrato

translocada dentro da planta (LOOMIS, 1945; HOFSTRA e NELSON, 1969; PATE et al, 1974). Embora a maior parte da sacarose transportada à semente imatura seja utilizada na síntese de amido (SHANNON, 1968), é viável que um pouco poderia ser metabolizada para fornecer os precursores da biossíntese de aminoácidos.

Contudo, nem todos os aminoácidos utilizados na síntese de proteína de reserva são sintetizados na própria semente. Uma certa quantidade de todos os aminoácidos proteicos chegam pelas vias de transporte já prontos para incorporação em proteína, embora em níveis baixos em relação às amidas (PATE et al, 1965; JOY e ANTCLIFF, 1966; STREETER, 1972; LEE e SMITH, 1972; ATKINS et al, 1975; LEWIS, 1975; ARRUDA e SILVA, 1979).

Trabalhos anteriores feitos por nós (SODEK e WILSON, 1970) e outros (LAWRENCE e GRANT, 1964; FINLAYSON e McCONNELL, 1969, PATE et al, 1975; ATKINS et al, 1975) tem mostrado que vários aminoácidos, incluindo lisina, leucina, fenilalanina, asparagina, glutamina e serina não são simplesmente degradados mas são incorporados intactos na proteína de reserva da semente. Isto foi demonstrado após introdução do aminoácido marcado nas vias de transporte. Evidentemente, a maior parte da asparagina, por ser translocada em excesso, é degradada (ATKINS et al., 1975). Também, alguns outros aminoácidos, tal como lisina (LAWRENCE e GRANT, 1964; SODEK e WILSON, 1970; BRANDT, 1975) e fenilalanina (FINLAYSON e McCONNELL, 1969) podem ser parcialmente metabolizados dentro da semente, enquanto outros como a leucina (SODEK e WILSON, 1970) não sofrem nenhum metabolismo. Aparentemente, portanto, existe uma certa preferência para os aminoácidos pré-formados na síntese de proteínas de reserva. Provavelmente, mecanismos de controle tipo "feedback" garantem que a síntese de novo de aminoácidos na semente ocorre apenas na medida necessária para compensar qualquer carência no aminoácido translocado. Assim, a

importância da biossíntese de aminoácidos na semente imatura de  
penderá do grau de desequilíbrio entre os aminoácidos a ela for-  
necidos.

## V - RESUMO

As amidas glutamina e a asparagina são, reconhecidamente, importantes formas de transporte do nitrogênio em muitas plantas. Representam a fonte principal de nitrogênio para a síntese de proteínas de reserva em sementes imaturas. Entretanto, nada se conhece a respeito da maneira pelo qual o nitrogênio desses aminoácidos se torna disponível para a biossintese de outros aminoácidos proteicos. Objetivando esclarecer este ponto, foi realizada uma investigação sobre enzimas possivelmente envolvidas neste processo.

O endosperma do milho foi escolhido para se estudar a utilização de glutamina, em virtude da importância deste composto no sistema de transporte dessa planta. Verificou-se que o endosperma apresentou atividade da enzima glutamina oxoglutarato amida transferase (GOGAT, E.C. 2.6.1.53), em níveis suficientemente altos para metabolizar toda glutamina translocada ao grão. A enzima apresentou um padrão de atividade bem definido durante a fase de maturação do endosperma, com um pico de atividade (max. = 56 nmoles GLU/min/endosperma) correspondente ao período de síntese mais intensa de proteína. Os dados sugerem que a glutamina pode ser metabolizada mediante a ação de GOGAT, ocasionando a transferência do nitrogênio amida para a posição  $\alpha$  do  $\alpha$ -cetoglutarato. O glutamato assim formado poderia doar o nitrogênio para outros aminoácidos, mediante transaminação.

Para se estudar a utilização de asparagina, foi escolhida a semente imatura de ervilha, em virtude da importância deste composto no seu sistema de transporte bem como no de outras leguminosas. Das várias enzimas investigadas, capazes de metabolizar asparagina, a única encontrada foi a asparaginase (E.

C. 3.5.1.1). O nível de atividade apresentado nos cotilédones imaturos foi suficiente para que asparaginase fosse considerada responsável por todo metabolismo de asparagina aí realizado. Verificou-se também alta atividade dessa enzima na testa (max. = 3,7  $\mu$ moles ASN/hr/semente), durante a fase inicial de maturação. Em seguida, com o início do crescimento dos cotilédones, a atividade caiu bruscamente na testa aumentando nos cotilédones. A atividade máxima nos cotilédones (1,35  $\mu$ moles ASN/hr/semente) ocorreu durante o período de alta síntese de proteína. Sugere-se que a asparaginase desempenhe um papel importante na nutrição nitrogenada do cotilédone imatura de ervilha, e que a utilização subsequente da amônia liberada mediante ação de asparaginase poderia envolver uma sequência metabólica catalisada pela glutamina sintetase (E.C. 6.3.1.2), GOGAT e transaminase. Foi verificado que essas enzimas também ocorrem no cotilédone de ervilha.

A asparaginase de ervilha e GOGAT de milho foram caracterizadas empregando-se enzimas parcialmente purificadas. A GOGAT foi parcialmente purificada do endosperma de milho através de fracionamento com sulfato de amônio. Esta enzima apresentou um pH ótimo de 7,5 e demonstrou especificidade pelos substratos, isto é, glutamina como doador de nitrogênio e  $\alpha$ -cetoglutatato como aceitador. A especificidade pelo doador de elétrons ficou indefinida, uma vez que o NADPH substituiria o NADH com eficiência variável. Os  $K_m$ s aparentes para glutamina,  $\alpha$ -cetoglutatarato e NADH foram estimados em 1,35 mM, 0,57 mM e 7  $\mu$ M, respectivamente. Foi demonstrado que a formação de glutamato dependia da presença dos três substratos, e que a reação catalizada envolvia uma relação estequiométrica próxima àquela esperada.

Para a purificação parcial da asparaginase de cotilédones de ervilha adotou-se um procedimento baseado na solubilidade da enzima em etanol 60%. Verificou-se uma dependência total da

enzima, da presença de íons de potássio, sendo necessárias concentrações de pelo menos 20 mM para atividade total. Os íons sódio e rubídio substituíram parcialmente o potássio na ativação da enzima, sendo, porém, sem efeito, os íons lítio, amônio, césio, tris, magnésio e cálcio. Além de ser necessário para a atividade, o potássio apresentou uma capacidade para estabilizar a enzima. A atividade máxima foi encontrada acima de pH 8 e o  $K_m$  aparente para asparagina, foi estimado em 3,2 mM. Propriedades semelhantes foram encontradas tanto para a asparaginase da testa como para a do cotilédone.

## VI - SUMMARY

It is well established that the amides glutamine and asparagine are important transport forms of nitrogen in many plants. They also represent the principal source of nitrogen for reserve protein synthesis in developing seeds. Since it is not known how the nitrogen of these amino acids is made available for the biosynthesis of other protein amino acids in the developing seed, an investigation was made of enzymes possibly involved in this process.

The utilization of glutamine was studied in the developing maize endosperm, in view of its importance as a transport compound in this plant. It was found that the endosperm contains glutamine: oxoglutarate amide transferase (GOGAT, E.C. 2.6.1.53) activity, at levels sufficient to metabolize all glutamine arriving via the translocation stream. The activity pattern throughout endosperm development revealed a well-defined peak (max. = 56  $\mu$ moles GLU/min/endosperm) coinciding with the period of most active nitrogen accumulation. The data suggest that glutamine may be metabolized by transfer of the amide nitrogen to the  $\alpha$ -position of  $\alpha$ -ketoglutarate to form glutamate, via the GOGAT reaction, and subsequently to other amino acids via transamination reactions involving glutamate.

The utilization of asparagine was studied in the developing seeds of pea, in view of its importance in the transport of nitrogen in this as well as other legumes. Of several enzymes investigated, capable of metabolising asparagine, the only one found was asparaginase (E.C. 3.5.1.1). Again, sufficient activity was found in the developing cotyledons to

account for all asparagine metabolised in this organ. High activity was also found in the testa (max = 3.7  $\mu$ moles ASN/hr/seed) during early stages of seed development. Then, as the cotyledons started to grow, activity fell sharply in the testa and increased in the cotyledons. Maximum activity in the cotyledons (= 1.35  $\mu$ moles ASN/hr/seed) occurred during the period of most active reserve protein synthesis. It is suggested that asparaginase plays a key role in the nitrogen nutrition of the developing pea cotyledon. The subsequent utilization of ammonia liberated by asparaginase action may involve a sequence catalysed by glutamine synthetase (E.C. 6.3.1.2), GOGAT and transaminase. The presence of these enzymes in the pea cotyledon was demonstrated.

Asparaginase of pea and GOGAT of maize were characterized using partially purified preparations. GOGAT was partially purified from maize endosperm by ammonium sulphate fractionation. The enzyme had a pH optimum of 7.5 and showed specificity towards its substrates, namely glutamine as nitrogen donor and  $\alpha$ -ketoglutarate as nitrogen acceptor. Specificity for the electron donor was less clear cut, since NADPH would substitute with varying efficiency for NADH. The apparent  $K_m$ s for glutamine,  $\alpha$ -ketoglutarate and NADH were 1.35 mM, 0.57 mM and 7  $\mu$ M, respectively. The formation of glutamate in the reaction was shown to be dependent on the presence of all three substrates, and involve close to expected stoichiometric amounts.

Asparaginase was partially purified from pea cotyledons using a procedure based on its solubility in 60% ethanol. The enzyme was shown to be totally dependent on potassium ions, requiring at least 20 mM for full activity. Sodium and rubidium

ions would partially replace potassium for enzyme activation, but lithium, ammonium, cesium, tris, magnesium and calcium ions were without effect. Potassium was shown to stabilize the enzyme besides being necessary for activity. Enzyme activity was optimal above pH 8 and the apparent  $K_m$  for asparagine was 3,2 mM. The asparaginases from the testa and cotyledons were similar in their properties.

## VII - BIBLIOGRAFIA

- AKATSUKA, T. e NELSON, O.E. (1966). Starch granule-bound adenosine diphosphate glucose-starch glucosyltransferases of maize seeds. *J. Biol. Chem.* 241:2280-2286.
- ARNOLD, W.N. (1968). The selection of sucrose as the translocate of higher plants. *J. Theor. Biol.* 21:13-19.
- ARRUDA, P. e SILVA, W.J.DA (1979). Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochemistry* 18:409-410.
- ATKINS, C.A., PATE, J.S. e SHARKEY, P.J. (1975). Asparagine metabolism - key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiol.* 56:807-812.
- BAUER, A., JOY, K.W. e URQUHART, A.A. (1977). Amino acid metabolism in pea leaves. Labelling studies on utilization of amides. *Plant Physiol.* 59:920-924.
- BEEVERS, L. (1976). Nitrogen metabolism in plants. Edward Arnold (Publishers) Ltd. Londres.
- BEEVERS, L. e POULSON, R. (1972). Protein synthesis in cotyledons of Pisum sativum. I. Changes in cell-free amino acid incorporation capacity during seed development and maturation. *Plant Physiol.* 49:476-481.
- BEEVERS, L. e STOREY, R. (1976). Glutamate synthetase in developing cotyledons of Pisum sativum. *Plant Physiol.* 57:862-866.
- BILINSKI, E. e McCONNELL, W.B. (1957). Studies on wheat plants using  $^{14}\text{C}$  compounds. III. The utilization of acetate for amino acid biosynthesis. *Can. J. Biochem.* 35:357-363.
- BRANDT, A.B. (1975). In vivo incorporation of  $^{14}\text{C}$ -lysine into the endosperm proteins of wild type and high-lysine barley. *FEBS Lett.* 52:288-291.

- CHRISPEELS, M.J. e BOULTER, D. (1975). Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans: role of endopeptidase. *Plant Physiol.* 55:1031-1037.
- DAVIES, H.M. e MIFLIN, B.J. (1978). Advantage of o-phthalaldehyde for visualising  $^{14}\text{C}$ -labelled amino acids on thin-layer chromatograms and an improved method for their recovery. *J. Chromatog.* 153:284-286.
- DOUGALL, D.K. (1974). Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58:639-646.
- EISENTHAL, R. e CORNISH-BOWDEN, A. (1974). The direct linear plot. *Biochem. J.* 139:715-720.
- EVANS, H.J. e SORGER, G. (1966). Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17:47-76.
- EVANS, H.J. e WILDES, R. A. (1971). Potassium and its role in enzyme activation. Em: Potassium in Biochemistry and Physiology. International Potash Institute, Berne, pp. 13-39.
- FERGUSON, A.R. e SIMS, A.P. (1971). Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. *J. Gen Microbiol.* 69:423-427.
- FINLAYSON, A. J. e McCONNELL, W.B. (1969). The utilization of  $^{15}\text{N}$  and phenylalanine -  $2\text{-}^{14}\text{C}$  by wheat plants. *Can. J. Biochem.* 47:415-418.
- FLINN, A.M. e PATE, J.S. (1968). Biochemical and physiological changes during maturation of fruit of the field pea (Pisum arvense L.). *Ann. Bot.* 32:479-495.
- FLINN, A.M. e PATE, J.S. (1970). A quantitative study of carbon transfer from pod and subtending leaf to the ripening seeds of the field pea (pisum arvense L.). *J. Exp. Bot.* 21:71-82.

- FOREST, J.C. e WIGHTMAN, F. (1972). Amino acid metabolism in plants  
II. Transamination reactions of free protein amino acids  
in cell-free extracts of cotyledons and growing tissue of  
bushbean seedlings (Phaseolus vulgaris L.). *Can. J. Biochem.*  
50:538-542.
- FOWLER, M.W., JESSUP, W. e SARKISSIAN, G.S. (1974). Glutamate  
synthase type activity in higher plants. *FEBS Lett.* 46:340-  
342.
- HALL, J.M. e BAKER, D.A. (1972). The chemical composition of  
Ricinus phloem exudate. *Planta* 106:131-141.
- HAPPOLD, F.C. e BEECHEY, R.B. (1958). Univalent metals and other  
losse or non-specific activations. *Biochem. Soc. Symp.*  
(Cambridge) 15:52-63.
- HENKE, R.R. e WAHNBAECK, R. (1977).  $\beta$ -Aspartokinase from developing  
endosperm of maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79:38-45
- HILL, J.E. e BRIEDENBACH, R.W. (1974). Proteins of soybean seeds.  
II. Accumulation of the major protein components during seed  
development and maturation. *Plant Physiol.* 53:747-751.
- HOFSTRA, G. e NELSON, C.D. (1969). The translocation of  
photosynthetically assimilated  $^{14}\text{C}$  in corn. *Can. J. Bot.* 47:  
1435-1439.
- HUNSLEY, J.R. e SUELTER, C.H. (1969). Yeast pyruvate kinase. II.  
Kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 244:4819-4822.
- ITZHAKI, R.F. e GILL, D.M. (1964). A micro-biuret method for  
estimating proteins. *Anal. Biochem.* 9:401-410.
- JENNINGS, A.C. e MORTON, R.K. (1963). Amino acids and protein  
synthesis in developing wheat endosperm. *Aust. J. Biol. Sci.*  
16:384-394.
- JIMÉNEZ DE ASÚA, L., ROZENGURT, E. e CARMINATTI, H. (1970). Some  
kinetic properties of liver pyruvate kinase (type L). III.  
Effect of monovalent cations on its allosteric behavior.  
*J. Biol. Chem.* 245:3901-3905.

- JOY, K.W. e ANTCLIFF, A.J. (1966). Translocation of amino acids in sugar beet. *Nature* 211:210-211.
- KACHMAR, J.F. e BOYER, P.D. (1953). Kinetic analysis of enzyme reactions II. The potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphoferase. *J.Biol. Chem.* 200:669-682.
- KAUL, A. K. (1973). Mutation breeding and crop protein improvement Em: Improving plant protein by nuclear techniques. International Atomic Energy Agency, Vienna, ppl-106.
- KIPPS, A.E. e BOULTER, D. (1974). Origins of the amino acids in pods and seeds of Vicia faba L. *New Phytol.* 73:675-684.
- KRETOVICH, W.L., EUSTIGNEYEUA, Z. G. e MARKARENKO, M.M. (1954). *Biokhim. Zema, Akad. Nauk SSSR, Sbornik.* 2:161-176.
- LAWRENCE, J. M. e GRANT, D.R. (1964). Incorporation of Lysine-<sup>14</sup>C into the developing grain of wheat. *Archiv. Biochem. Biophys.* 104:73-78.
- LEA, P.J. e FOWDEN, L. (1975a). The purification and properties of glutamine-dependent asparagine synthetase isolated from Lupinus albus. *Proc. R. Soc. London B.* 192:13-26.
- LEA, P.J. e FOWDEN, L. (1975b). Asparagine metabolism in higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 168:3-14.
- LEA, P.J., FOWDEN, L. e MIFLIN, B.J. (1978). The purification and properties of asparaginase from Lupinus species. *Phytochemistry* 17:217-222.
- LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 246:614-616.
- LEE, C. e SMITH, D. (1972). Changes in the concentration of nitrogenous fractions in Alfalfa herbage with advance in maturity. *Agron. J.* 64:326-327.
- LEES, E.M. e BLAKENEY, A.B. (1970). The distribution of asparaginase activity in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 215:145-151.

- LEWIS, O.A.M. (1975). An  $^{15}\text{N}$  -  $^{14}\text{C}$  study of the role of the leaf in the nitrogen nutrition of the seed of Datura stamonium L. *J. Exp. Bot.* 26:361-372.
- LEWIS, O. A.M. e PATE; J.S. (1973). The significance of transpirationally derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of pea (Pisum sativum L.) *J. Exp. Bot.* 24: 596-609.
- LINCK, A.S. e SUDIA, T.W. (1962). Translocation of labelled photosynthate from the bloom node leaf to the fruit of Pisum sativum. *Experimentia* 18:69-70.
- LOOMIS, W.E. (1945). Translocation of carbohydrates in maize. *Science* 101:398-400.
- LOVELL, P.H. e LOVELL, P.S. (1970). Fixation of  $\text{CO}_2$  and export of photosynthate by the carpel in Pisum sativum. *Physiol. Plant.* 23:316-322.
- MARTIN, D.W. JR. (1972). Radioassay for enzymatic production of glutamate from glutamine. *Anal. Biochem.* 46:239-243.
- MARTIN, R.G. e AMES, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236:1372-1379.
- McCONNELL, W.B. (1969). Studies on wheat plants using  $^{14}\text{C}$ -labelled compounds. XXII. Incorporation into wheat protein. *Can. J. Biochem.* 47:19-23.
- McKEE, H.S., ROBERTSON, R.N. e LEE, J.B. (1955). Physiology of pea fruits. I. The developing fruit. *Aust. J. Biol. Sci.* 8:136-163.
- MEERS, J.L., TEMPEST, P.W. e BROWN, C.M. (1970). Glutamine(amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase(NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64:187-194.

- MEISTER, A. (1953). Preparation and enzymic reactions of the keto analogues of asparagine and glutamine. *J. Biol. Chem.* 200:571-589.
- MEISTER, A., SOBER, H.A., TICE, S.V. e FRASER, P.E. (1952). Transamination and associated deamination of asparagine and glutamine. *J. Biol. Chem.* 197:319-339.
- MIFLIN, B.J. (1974). The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of roots and leaves. *Plant Physiol.* 54:550-555.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. (1975). Glutamine and asparagine as nitrogen donors for reductant-dependent glutamate synthase in pea roots. *Biochem. J.* 149:403-409.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. (1976). The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* 15: 873-885.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. (1977). Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:299-329.
- MILLER, R.E. e STADTMAN, E.R. (1972). Glutamate synthase from Escherichia coli. An iron-sulfide flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 247:7407-7419.
- MILLERD, A., SIMON, M. e STERN, H. (1971). Legumin synthesis in developing cotyledons of Vicia faba. *Plant Physiol.* 48:419-425.
- MILLERD, A., SPENCER, D., DODMAN, D. e STILLER, M. (1975). Growth of imature cotyledons in culture. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:51-59.
- MOORE, S. SPACKMAN, D.H. e STEIN, W.H. (1958). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins: an improved system. *Anal. Chem.* 30:1185-1189.
- MUNTZ, K., SCHALLDACH, I. e MANTEUFFEL, R. (1976). The function of the pod for protein storage in seeds of Vicia faba L. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 170:465-477.

- MURPHY, J.J. e DALBY, A. (1971). Changes in the protein fractions of developing normal and opaque-2 maize endosperm. *Cereal Chem.* 48:336-349.
- NITOS, R.E. e EVANS, H.J. (1969). Effects of univalent cations on the activity of particulate starch synthetase. *Plant Physiol.* 44:1260-1266.
- OAKS, A., JONES, K.E., ROSS, D.W., BOESEL, I., LENZ, D. e MISRA, S. (1978). Enzymes of nitrogen assimilation in developing seeds of Zea mays; Em: FAO/IAEA International Symposium on Seed Protein Improvement in Cereal and Grain Legumes, Neuherberg.
- OGHOGHORIE, C.G.O. e PATE, J.S. (1972). Exploration of the nitrogen transport system of a nodulated legume using  $^{15}\text{N}$ . *Planta* 104:35-49.
- PATE, J.S. (1971). Movement of nitrogenous solutes in plants. Em Nitrogen-15 in soil-plant studies. International Atomic Energy Agency, Vienna. pp. 165-187.
- PATE, J.S., SHARKEY, P.M. e LEWIS, O.A.M. (1974). Phloem bleeding from legume fruits - a technique for study of fruit nutrition. *Planta* 120:229-243.
- PATE, J.S., SHARKEY, P.M. e LEWIS, O.A.M. (1975). Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes studied by aphloem bleeding technique. *Planta* 122:11-26.
- PATE, J.S. e WALLACE, W. (1964). Movement of assimilated nitrogen from the root system of the field pea (Pisum arvense L.) *Ann. Bot.* 28:83-99.
- PATE, J.S., WALKER, J. e WALLACE, W. (1965). Nitrogen containing compounds in the shoot of Pisum arvense L. *Ann. Bot.* 29:475-493.
- PESTANA, A e SOLS, A. (1970). Reversible inactivation of rat liver serine dehydratase by its substances. *FEBS Lett.* 7:29-31.

- PRUSINER, S e MILNER, L. (1970). A rapid radioassay assay for glutamine synthetase, glutaminase, asparagine synthetase and asparaginase. *Anal. Biochem.* 37:429-439.
- RAACHE, I.D. (1957). Protein synthesis in ripening pea seeds III. Study of the pods. *Biochem. J.* 66:113-118.
- REUBEN, J. e COHN, M. (1970). Magnetic resonance studies of manganese(II) binding sites of pyruvate kinase. Temperature effects and frequency dependence of proton relaxation rates of water. *J. Biol. Chem.* 245:6539-6546.
- RHODES, D., RENDON, G.R. e STEWART, G.R. (1975). The control of glutamine synthetase level in Lemna minor L. *Planta* 125: 201-211.
- ROBERTSON, J. G., WARBURTON, M.P. e FARNDEN, K.J. (1975). Induction of glutamate synthase during nodule development in lupin. *FEBS Lett.* 55:33-37.
- ROBINSON; J.D. (1967). Kinetic studies on a brain microsomal adenosine triphosphatase. Evidence suggesting conformational changes. *Biochemistry* 6:3250-3258.
- ROGNES, S.E. (1975). Glutamine-dependent asparagine synthetase from Lupinus lutens. *Phytochemistry* 14:1975-1982.
- SCHLESIER, G. (1977). Nitratreduktase-aktivitat in blattern und fruchten verschiedener leguminosen. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 171:511-523.
- SCHNEIDER, Z., PECH, K. e PAWELKIEWICZ, J. (1966). Enzyme transformation of glycerol to  $\beta$ -hydroxypropionic aldehyde. II. Dissociation of the enzyme into two protein fragments. *Bull. Acad. Polonaise.* 14:7-12.
- SCOTT, D.B. (1978). Recent developments in the biochemistry of nitrogen fixation in the legume - rhizobium symbiosis. *Ciência e Cultura* 30:185-194.

- SCOTT, J.M. e RABINOWITZ, J.C. (1967). The association-dissociation of formyltetrahydrofolate synthetase and its relation to monovalent cation activation of catalytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29:418-423.
- SHANNON, J.C. (1968). Carbon-14 distribution in carbohydrates of immature Zea mays kernels following  $^{14}\text{CO}_2$  treatment of intact plants. *Plant Physiol.* 43:1215-1220.
- SMILEY, K.L. Jr. e SUELTER, C.H. (1967). Univalent cations as allosteric activators of muscle adenosine-5'-phosphate deaminase. *J. Biol. Chem.* 242:1980-1981.
- SODEK, L. (1976). Biosynthesis of lysine and other amino acids in the developing maize endosperm. *Phytochemistry* 15:1903-1906.
- SODEK, L. (1978). Partial purification and properties of diaminopimelate decarboxylase from maize endosperm. *Revta. brasil. Bot.* 1:65-69.
- SODEK, L. e WILSON, C.M. (1970). Incorporation of leucine- $^{14}\text{C}$  and lysine- $^{14}\text{C}$  into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. *Arch. Biochem. Biophys.* 140:29-38.
- SODEK, L. e WILSON, C.M. (1971). Amino acid composition of proteins isolated from normal, opaque-2, and flowry-2 corn endosperms by a modified Osborne procedure. *Agric. Food. Chem.* 19:1144-1150.
- SORGER, G.J., FORD, R.E. e EVANS, H.J. (1965). Effect of univalent cations on the immunoelectrophoretic behavior of pyruvate kinase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 54:1614-1621.
- STOREY, R. e BEEVERS, L. (1977). Proteolytic activity in relationship to senescence and cotyledonary development in Pisum sativum L. *Planta* 137:37-44.
- STOREY, R. e BEEVERS, L. (1978). Enzymology of glutamine metabolism

- related to senescence and seed development in the pea (Pisum sativum L.). *Plant Physiol.* 61:494-500.
- STOREY, R. e REPORTER, M. (1978). Glutamate synthase in developing soybeans. *Plant Physiol.* 61(suppl.) abstr. n° 365. American Society of Plant Physiology Meetings, Virginia.
- STREETER, J.G. (1972). Nitrogen nutrition of field-grown soybean plants. I. Seasonal variations in soil nitrogen and nitrogen composition of stem exudate. *Agron. J.* 64:311-314.
- STREETER, J.G. (1973). In vivo and in vitro studies of asparagine biosynthesis in soybean seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 157:613-624.
- STREETER, J.G. (1977). Asparaginase and asparagine transaminase in soybean leaves and root nodules. *Plant Physiol.* 60:235-239.
- SUELTER, C.H. (1970). Enzymes activated by monovalent cations. *Science* 168:789-795.
- TEMPEST, D.W., MEERS, J.L. e BROWN, C.M. (1970). Synthesis of glutamate in Aerobacter aerogenes by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* 117:405-407.
- TORAYA, T., SUGIMOTO, Y., TAMAO, Y., SHIMIZU, S. e FUKUI, S. (1970) Potassium ion as an essential factor for binding of vitamin B<sub>12</sub> coenzyme to apo-propanediol dehydratase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41:1314-1320.
- TROMP, P.J. e OVAA, J.C. (1973). Spring mobilization of protein nitrogen in apple book. *Plant Physiol.* 29:1-5.
- TURNER, N.A. e REDGWELL, R. J. (1966). A mixed layer for separation of amino acids by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.* 21:129-132.
- VAN DIE, J. e TAMMES, P.M.L. (1975). Phloem exudation from monocotyledon axes. Em. *Encyclopedia of Plant Physiology*, N. S., vol. 1, pp. 196-222. Eds. Zimmerman, M.H. e Milburn, J.A. Springer, Berlin - Heidelberg, New York.

- WALLACE, W. e PATE, J.S. (1967). Nitrate assimilation in higher plants with special reference to the cocklebur(Xanthium pennsylvanicum Wallr.). *Ann. Bot.*, N.S. 31:213-228.
- WALLSGROVE, R.M., HAREL, E., LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. (1977). Studies on glutamate synthase from the leaves of higher plants. *J. Exp. Bot.* 28:588-596.
- WELLS, G.N. e HAGEMAN, R.H. (1974). Specificity for nicotinamide adenine dinucleotide by nitrate reductase from leaves. *Plant Physiol.* 54:136-141.
- WILSON, D.G., KING, K.W. e BURRIS, R.H. (1954). Transamination reactions in plants. *J. Biol. Chem.* 208:863-874.
- WILSON, R.H., EVANS, H.J. e BECKER, R. R. (1967). The effect of univalent cation salts on the stability and on certain physical properties of pyruvate kinase. *J. Biol. Chem.* 242: 3825-3832.
- WRIGHT, D.J. e BOULTER, D. (1972). The characterisation of vicilin during seed development in Vicia faba L. *Planta* 105:60-65.
- WRISTON, J. C. JR. e YELLIN, T.D. (1973). Em:Advances in Enzymology (Meister, A., ed.) vol. 39 p. 185. Interscience, New York.
- YAMAMOTO, Y. (1955). Asparagine metabolism in the germination stage of a bean, Vigna sesquipedalis. *J. Biochem.* 42:763-774.

FIGURA 1 - Análise de aminoácidos dos ensaios de GOGAT por cromatografia em camada delgada

A- ensaio completo, tempo zero; B- ensaio completo, 30 min de incubação; C- ensaio completo, 60 min de incubação; D- ensaio completo, menos NADH; E- ensaio completo, menos  $\alpha$ -cetogluturato; F- ensaio completo, menos glutamina; G- ensaio completo, glutamina substituída por asparagina.



A B C D E F G

FIGURA 2 - GOGAT: curva de atividade em função do pH.

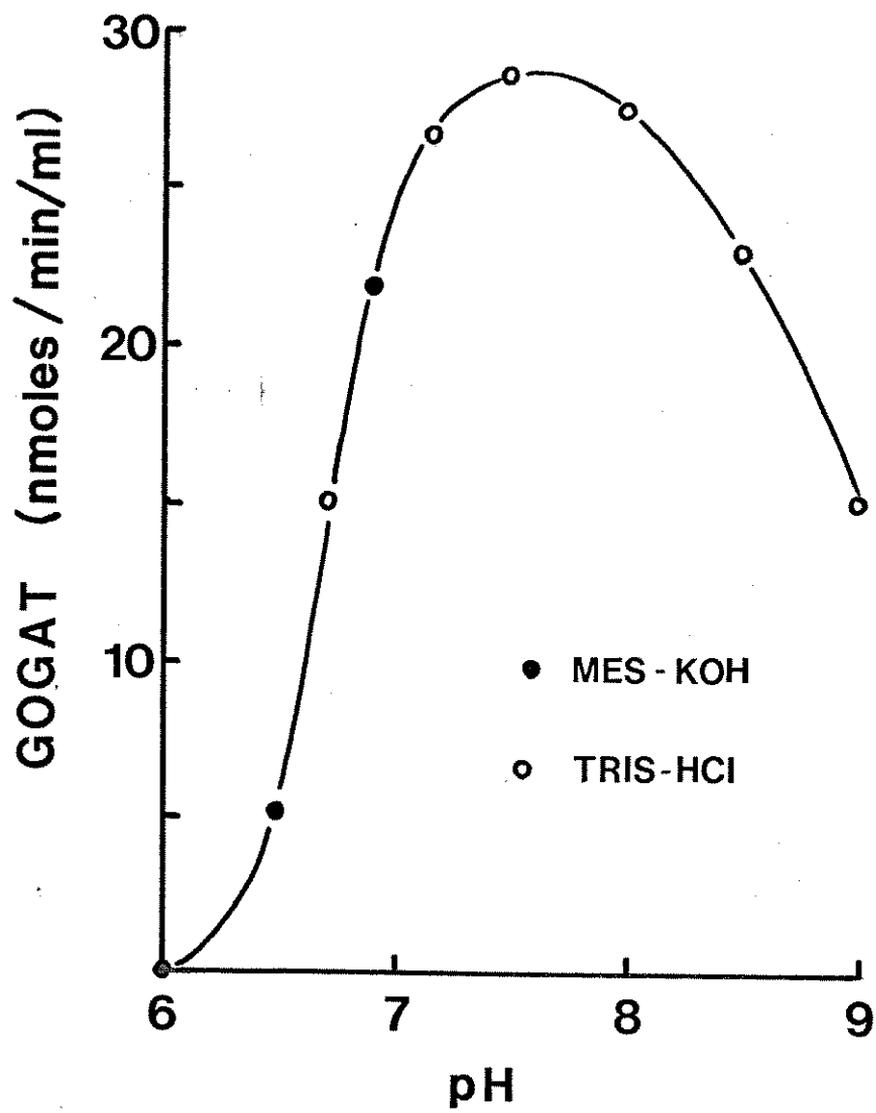


FIGURA 3 - Atividade de GOGAT em função da concentração do substrato:

Km calculado pelo método de EISENTHAL e CORNISH-BOWDEN (1974).

Km de glutamina = 1,35 mM

Km de  $\alpha$ -cetoglutarato = 0,57 mM

Km de NADH = 7  $\mu$ M

GOGAT (nmoles NADH oxidado /min /ml)

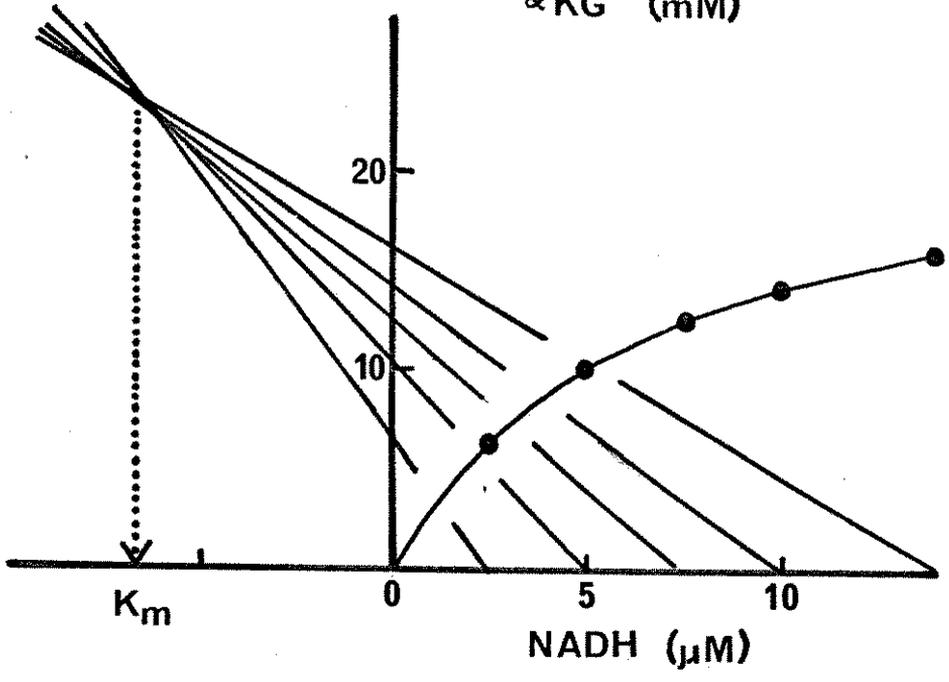
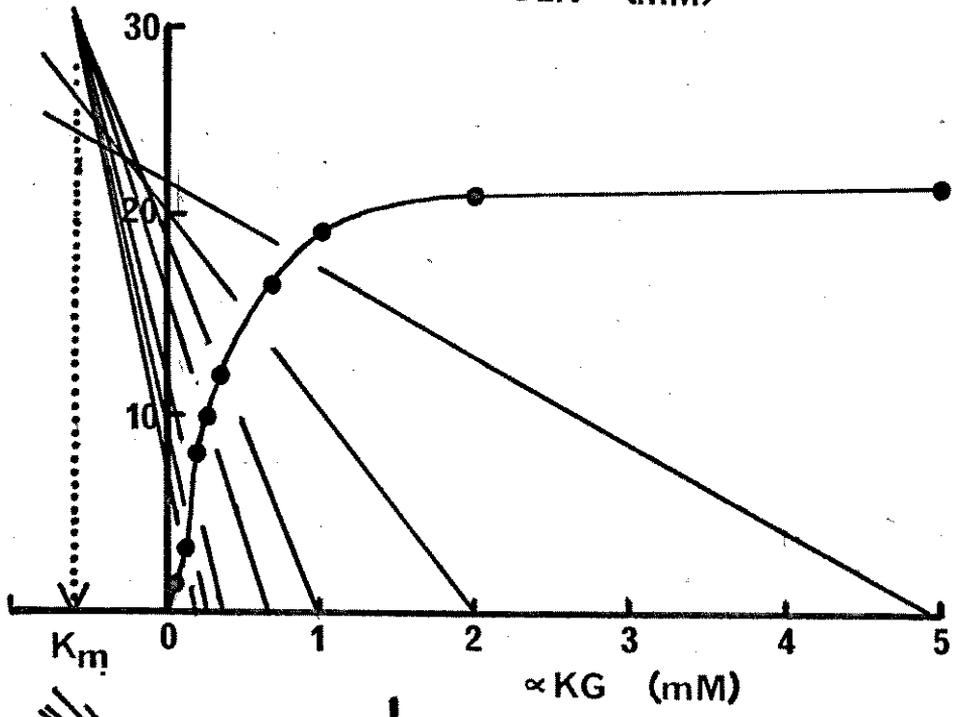
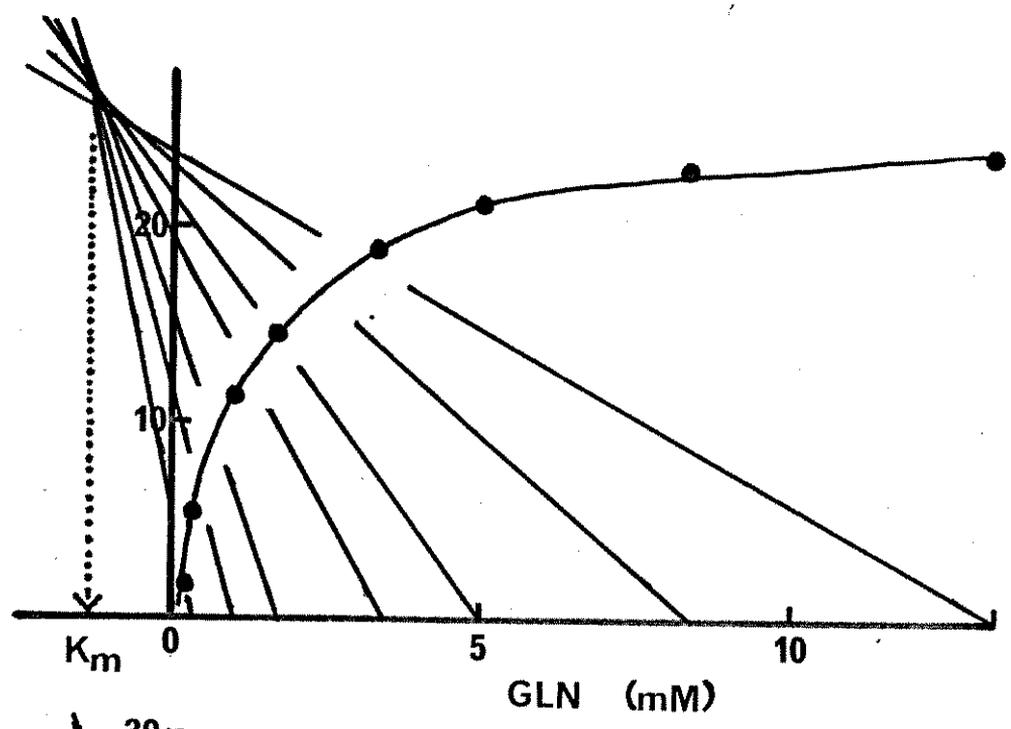


FIGURA 4 - Atividade de GOGAT em função (A) da concentração da enzima e (B) do tempo de incubação

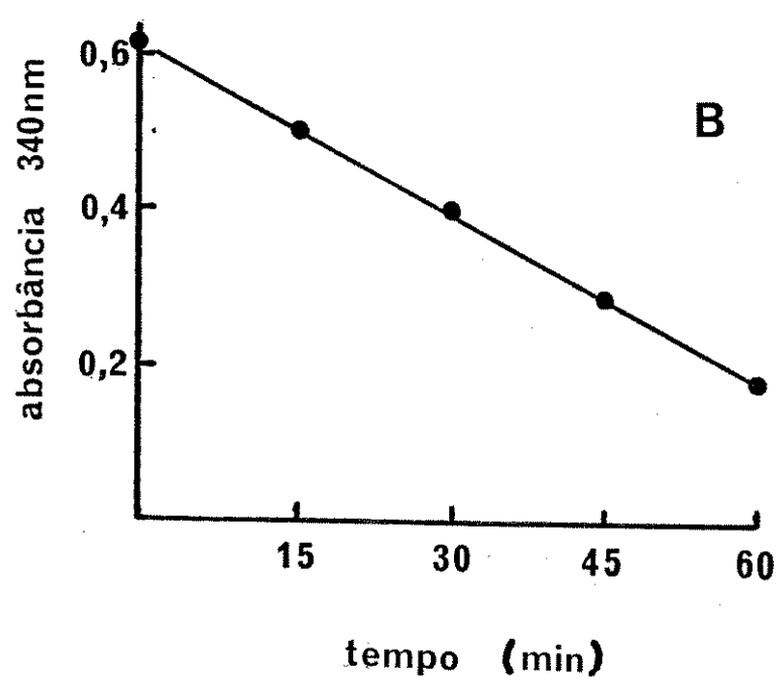
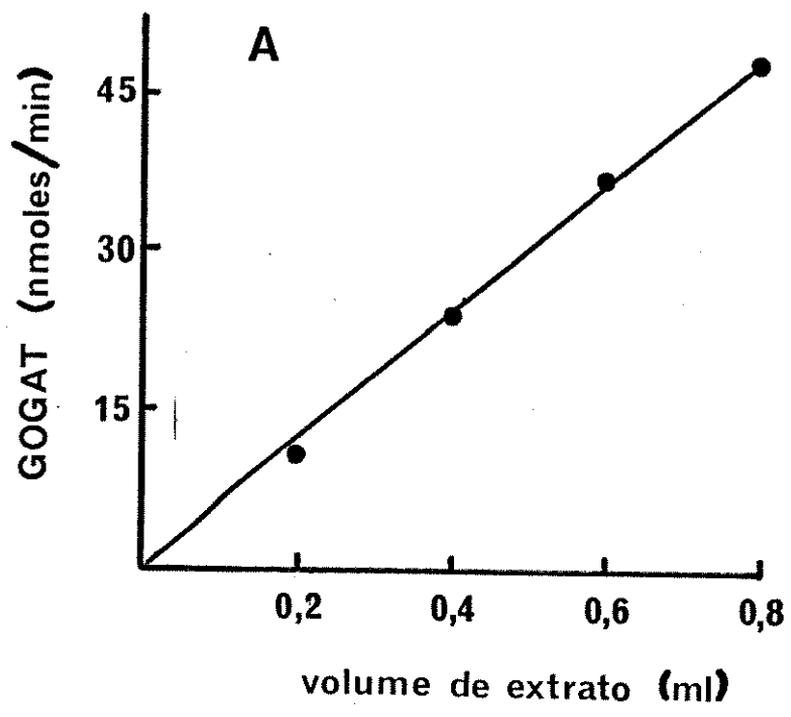


FIGURA 5(A e B) - Níveis de GOGAP, proteína solúvel, e nitrogênio total, no endosperma do milho durante a fase de maturação

- A) milho normal
- B) milho opaco-2

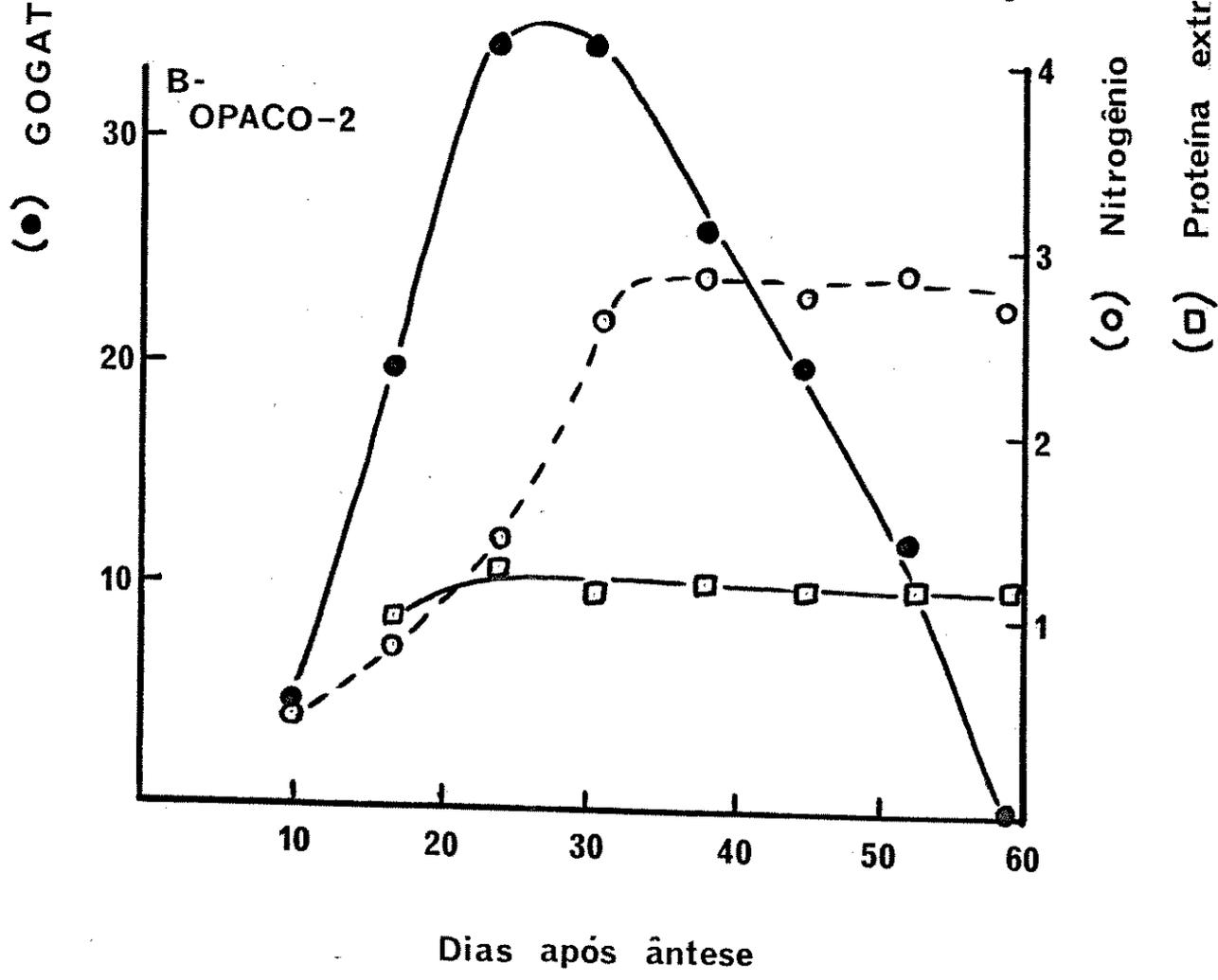
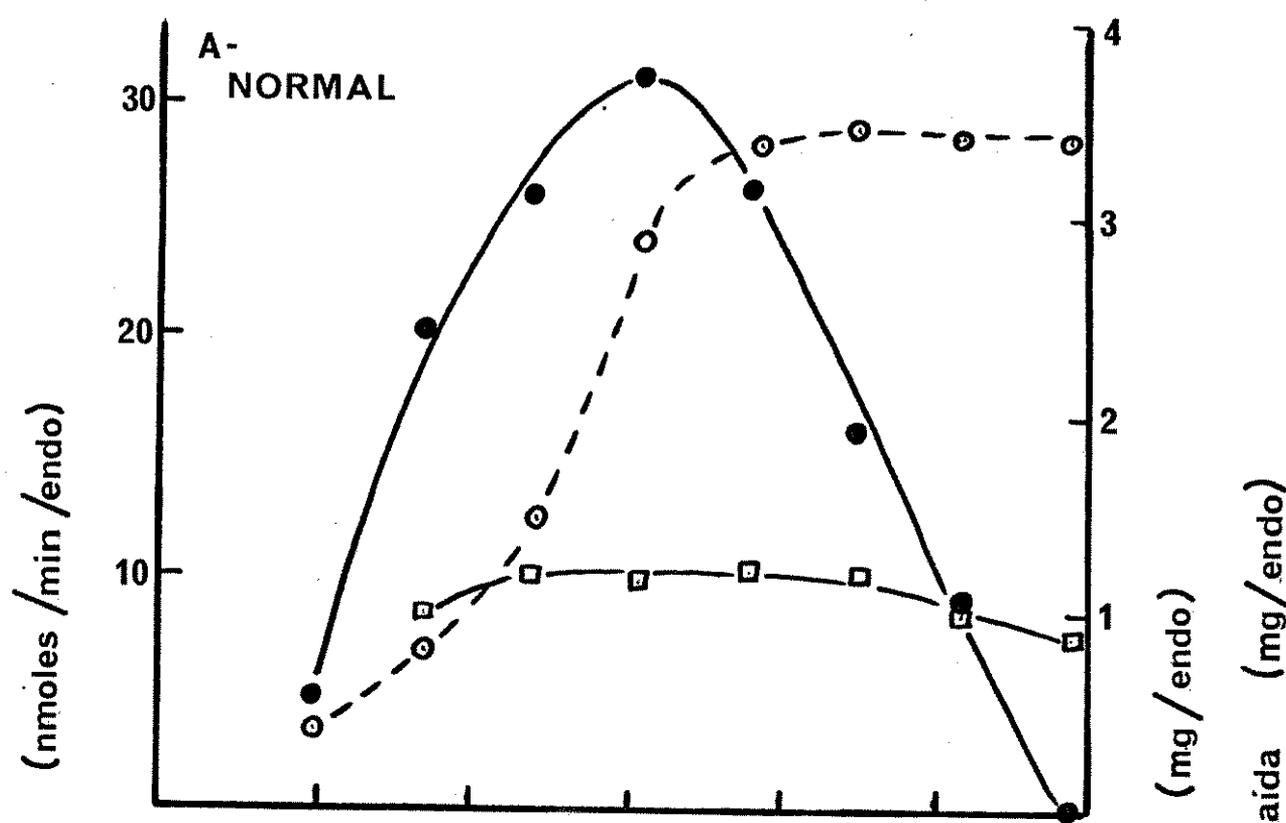


FIGURA 5(c) - Níveis de GOGAT, proteína solúvel, e nitrogênio total, no endosperma do milho durante a fase de maturação

C) milho normal(flint)

FIGURA 6 - Atividade de GOGAT e velocidade de acúmulo de nitrogênio no endosperma de milho durante a fase de maturação

(D) Dados calculados a partir da figura 5(A) - GOGAT(●) e acúmulo de nitrogênio(histograma)

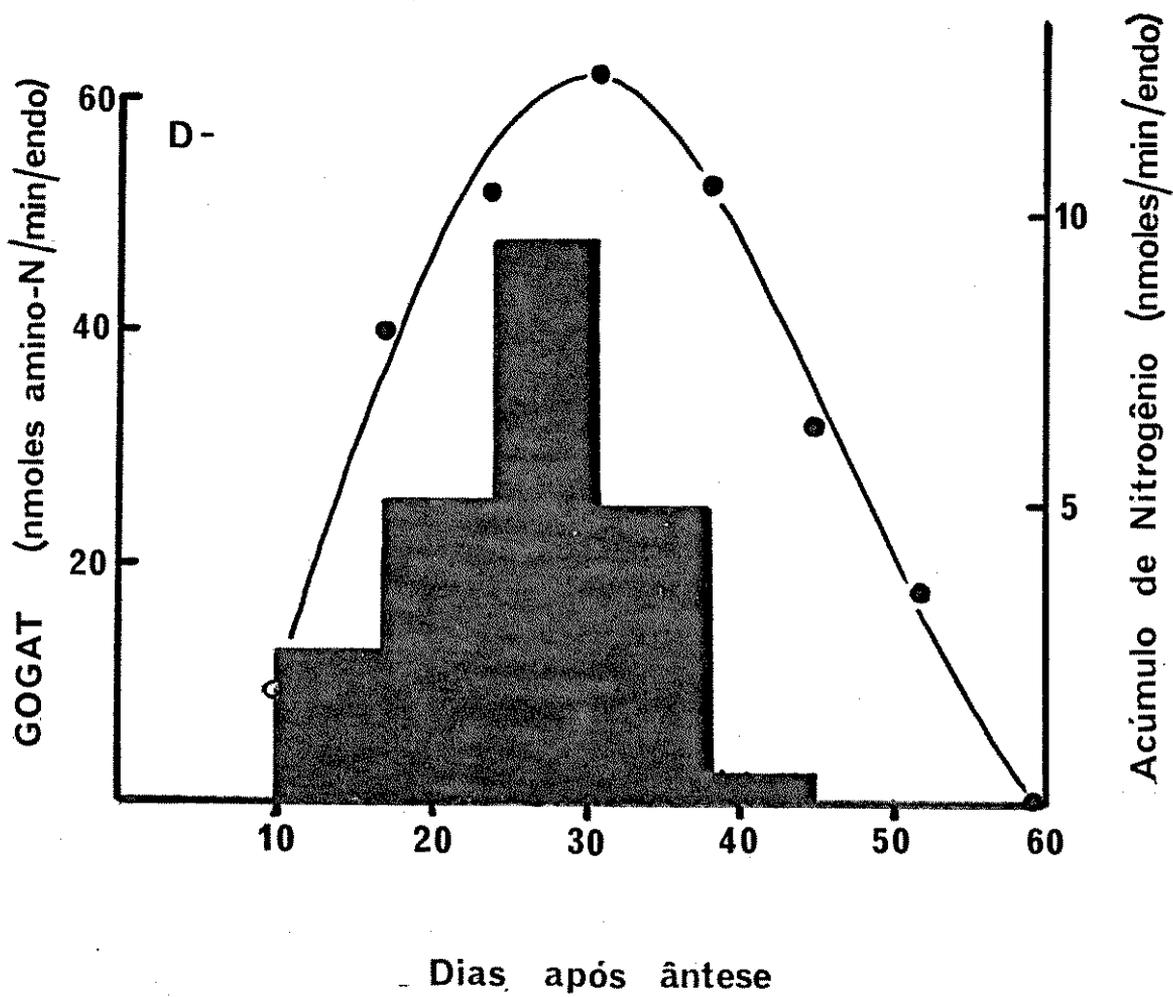
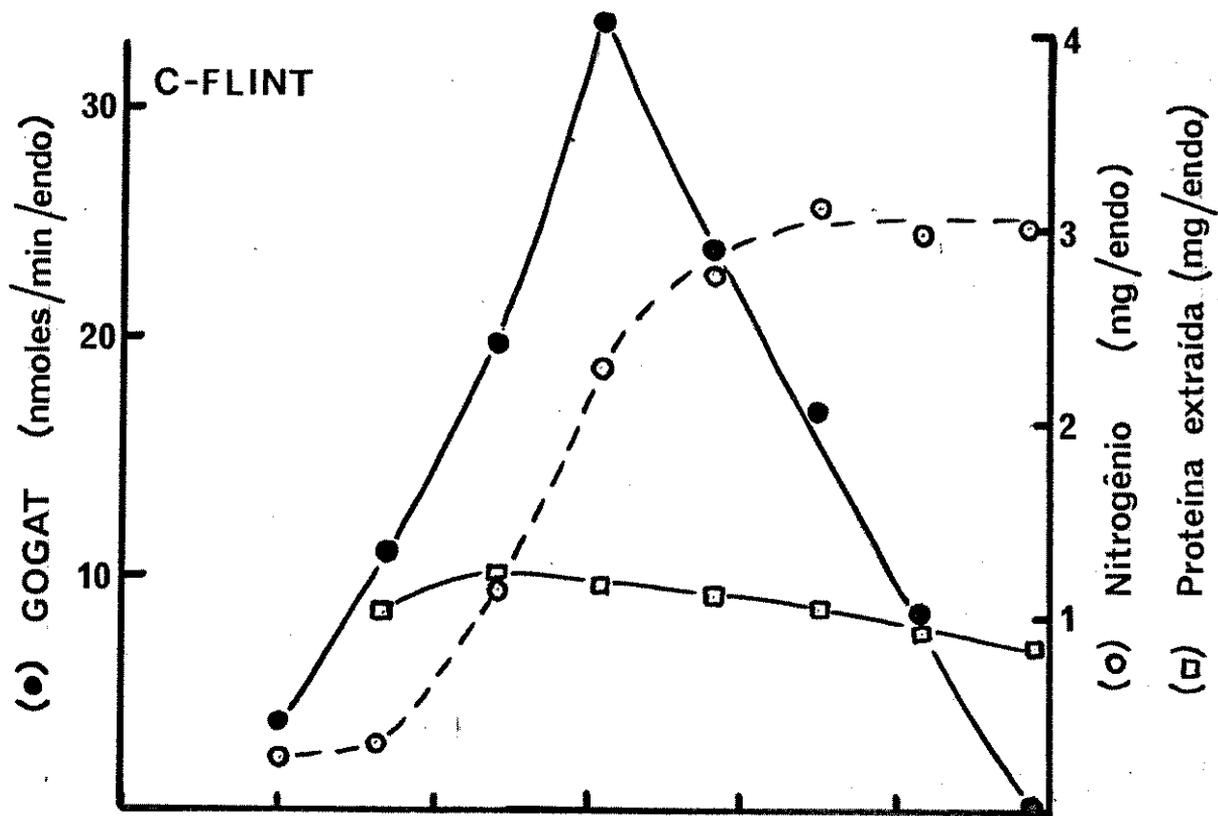


FIGURA 7 - Atividade de transaminase no endosperma de milho

A- Glutamato/piruvato. B- alanina/ $\alpha$ -cetogluturato.  
C- Glutamato/oxaloacetato. D- aspartato/ $\alpha$ -cetoglu  
tarato. E, F, G, H e I- valina, isoleucina, leucina,  
fenilalanina e tirosina com  $\alpha$ -cetogluturato.

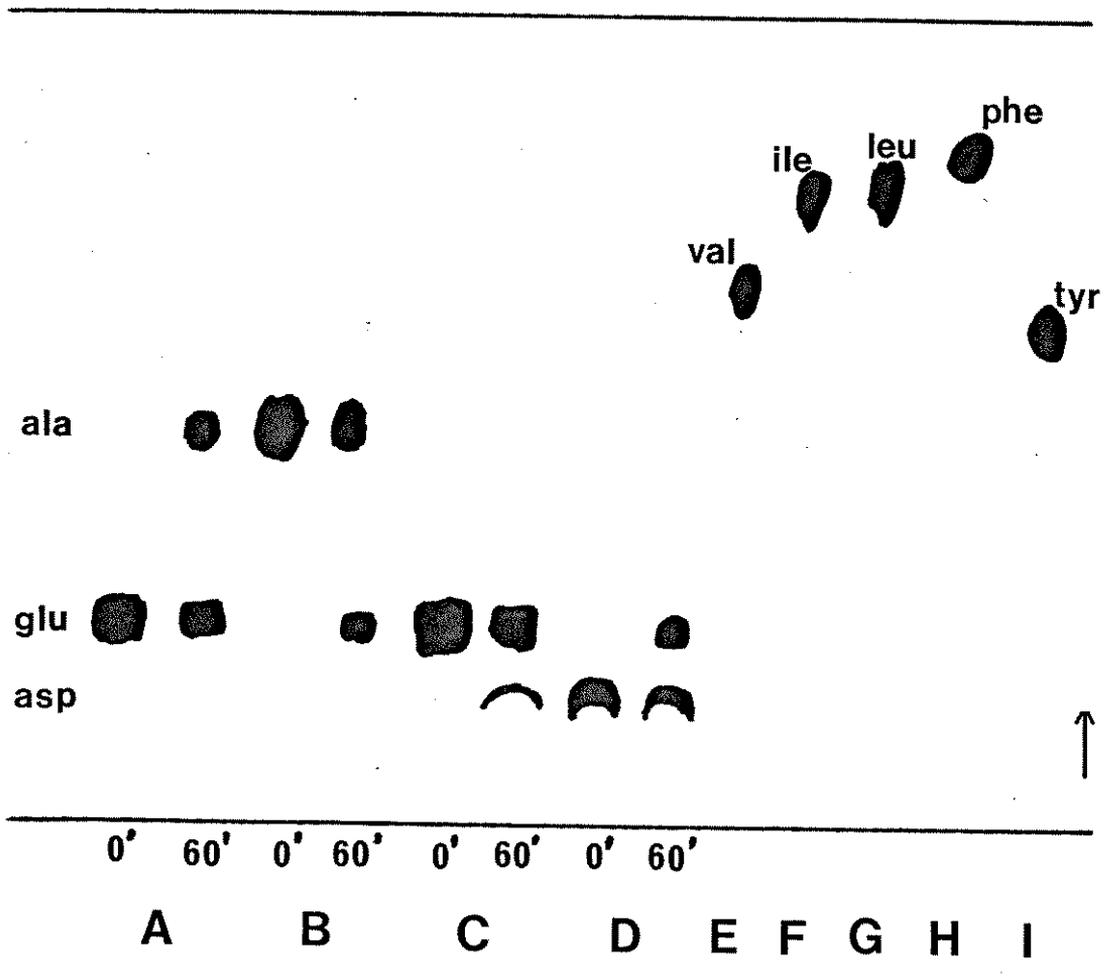


FIGURA 8 - Atividade de asparaginase a várias concentrações de potássio (cloreto)

Enzima parcialmente purificada do cotilédono e da testa.

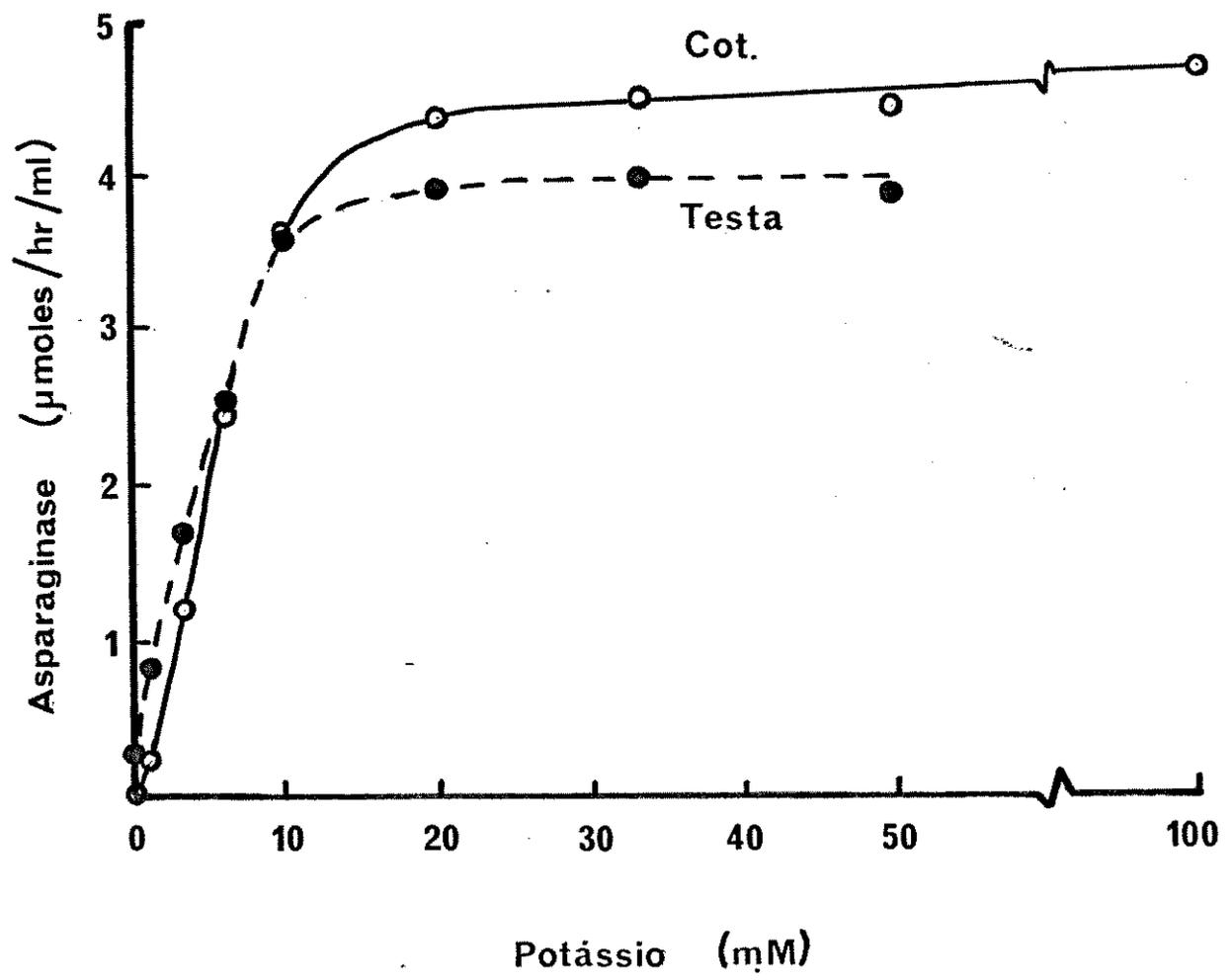


FIGURA 9 - Estabilidade de asparaginase

Presença de cloreto de potássio (50 mM) e/ou asparagina (10 mM) durante a incubação do extrato a 20 e 30 °C. Dosagem da enzima feita a 30 °C na presença de potássio. Extrato dessalinizado da testa.

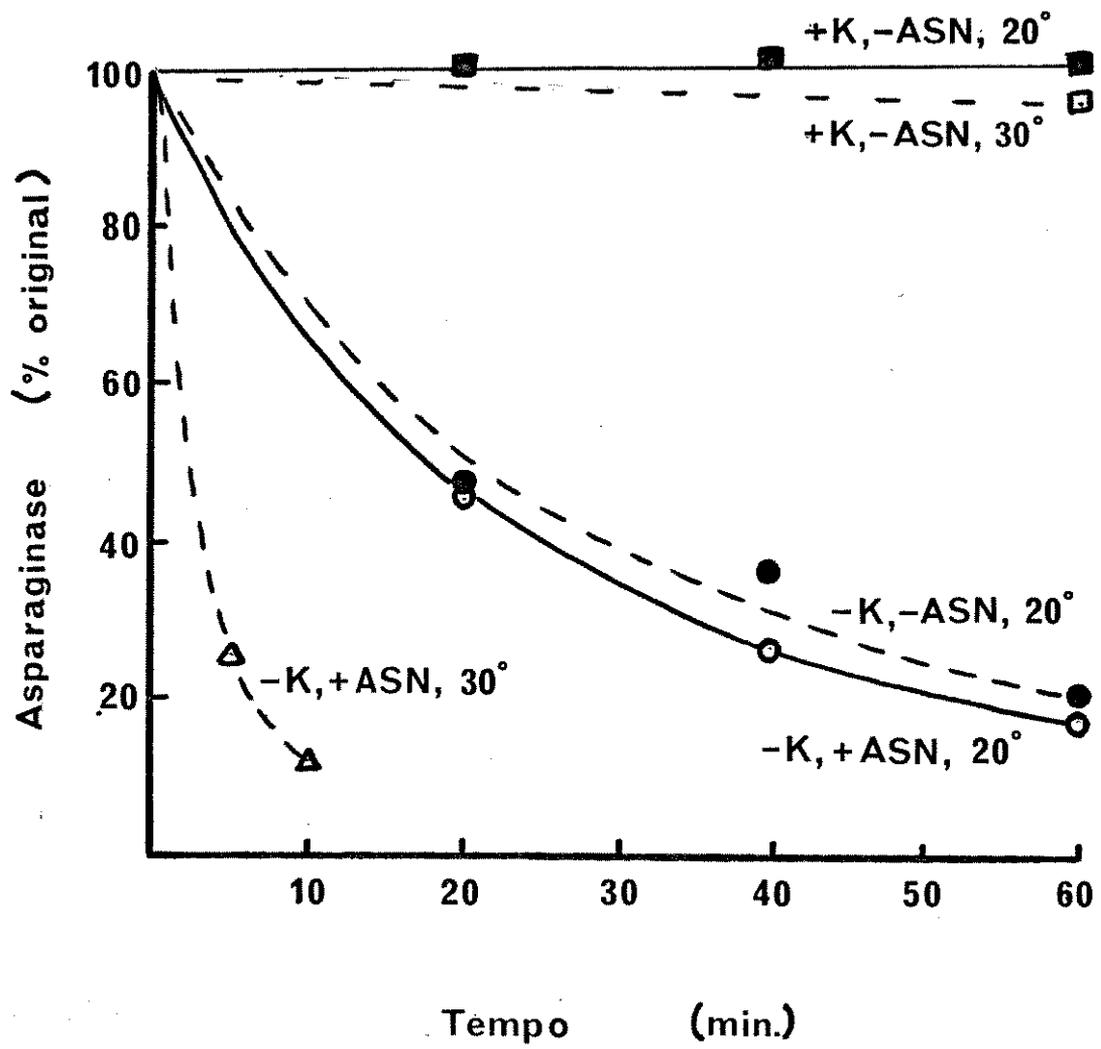


FIGURA 10 - Atividade de asparaginase em função do pH do ensaio  
Extrato dessalinizado do cotilédone. Tampão Tris(HCl)  
pH 7 a 9,5 e MES(Tris)pH 5,5 a 7.

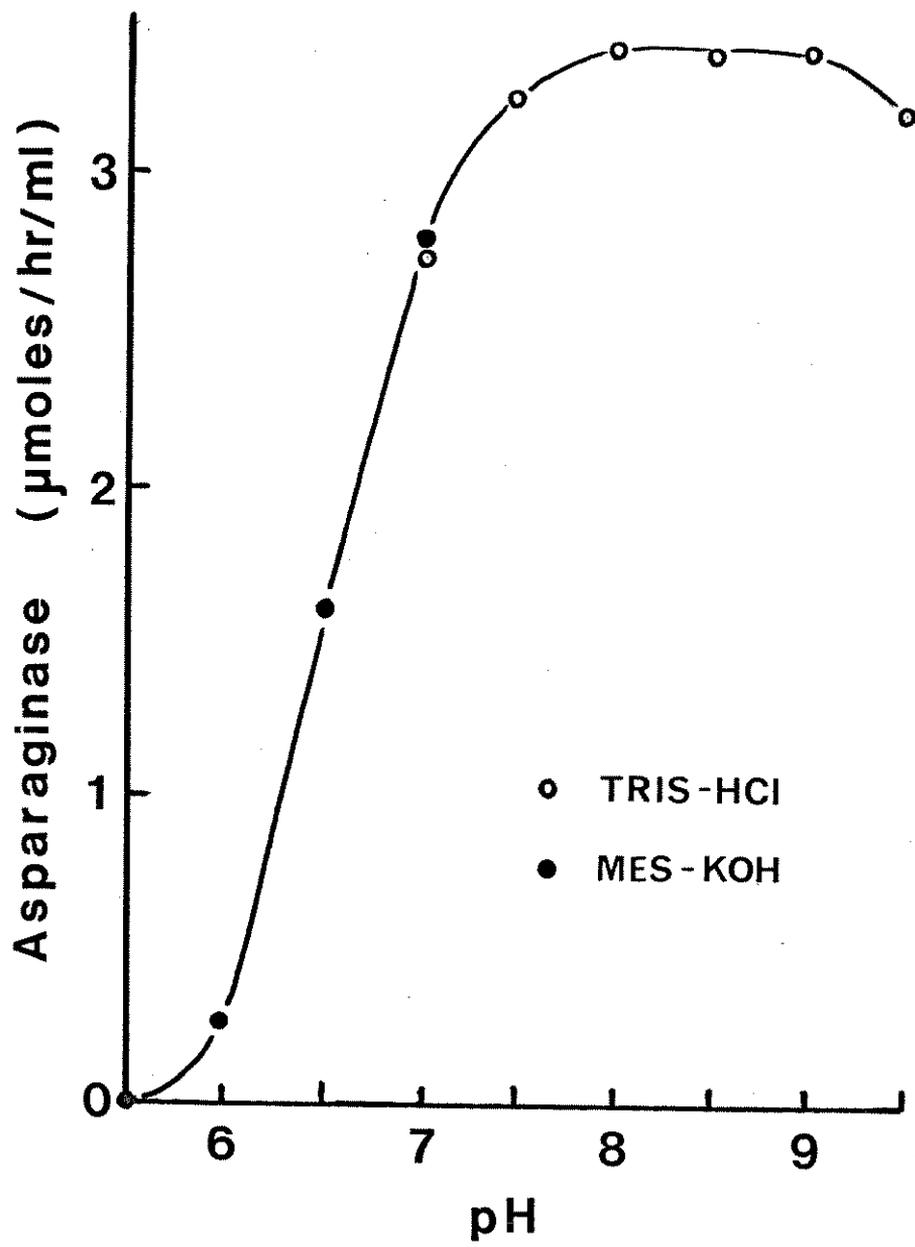


FIGURA 11 - Atividade de asparaginase a várias concentrações do substrato.

Potássio(cloreto) presente a 50 mM. Extrato do cotilédone parcialmente purificado,  $K_m (= 3,2 \text{ mM})$  calculado pelo método de EISENTHAL e CORNISH-BOWDEN (1974).

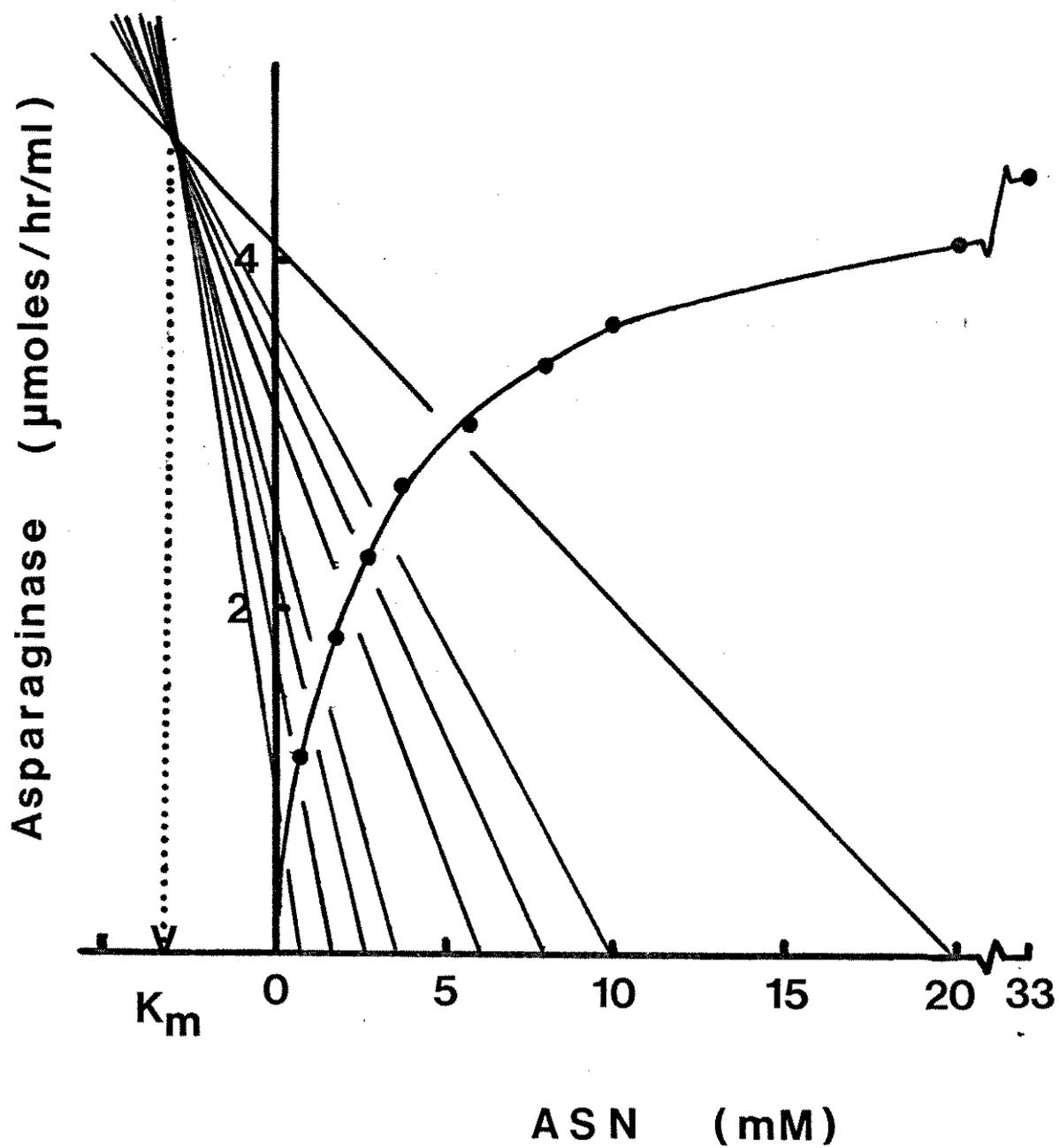


FIGURA 12 - Atividade de asparaginase em função(A) da concentração da enzima e (B) do tempo de incubação

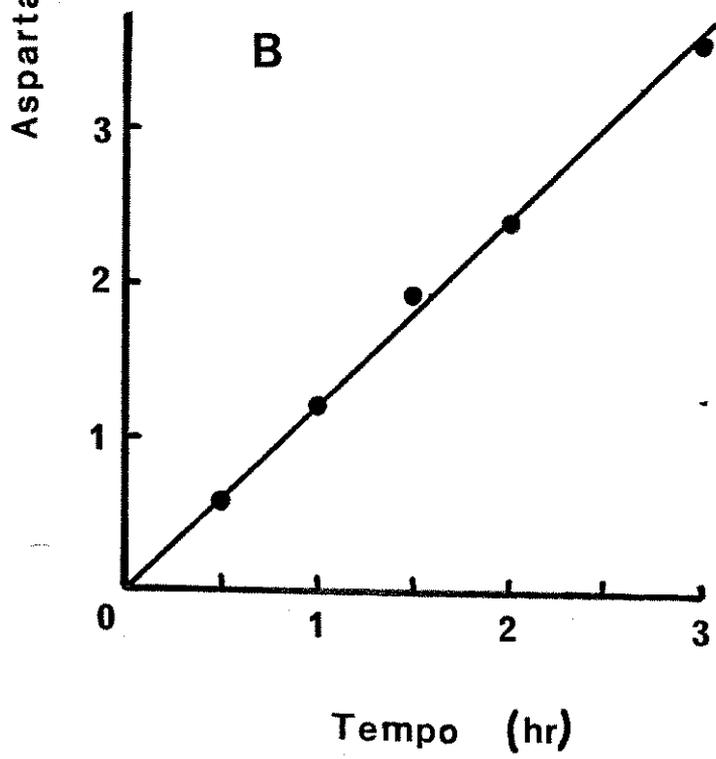
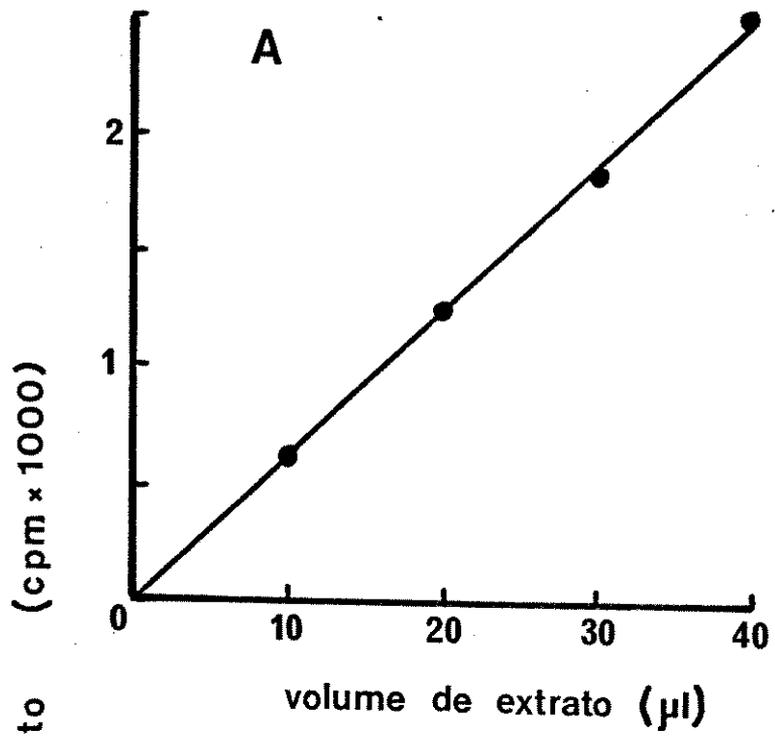


FIGURA 13 - Atividade de asparaginase, nitrogênio total, peso seco e peso fresco, durante a ontogenia da semente de ervilha

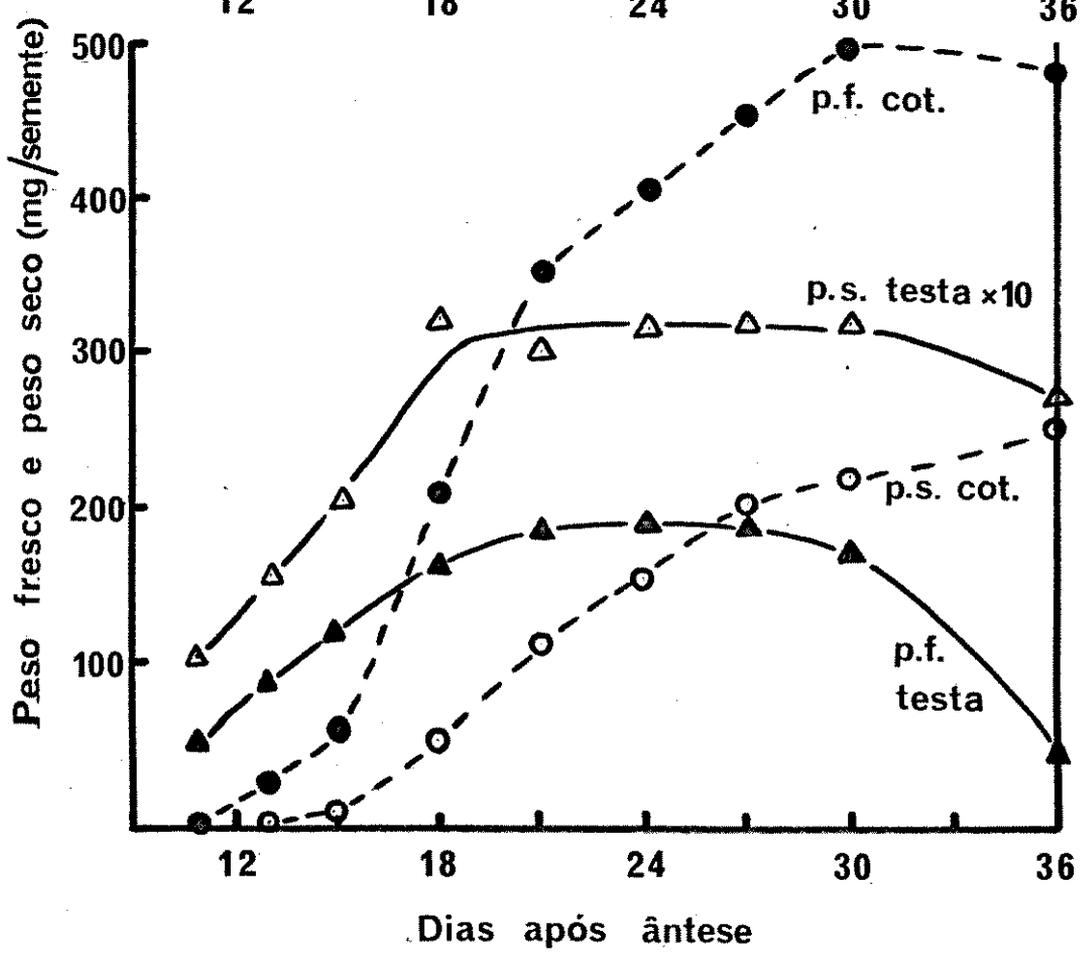
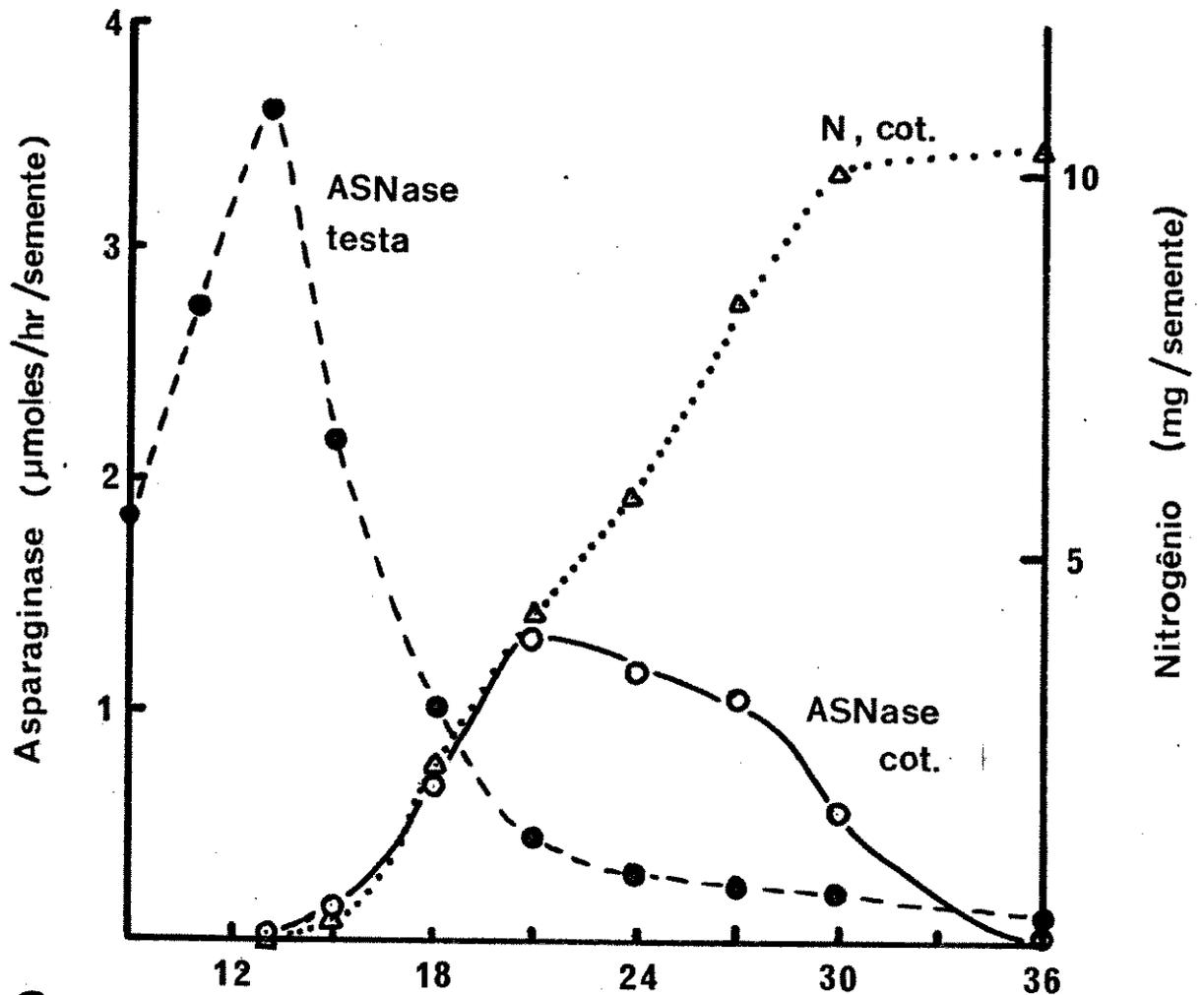


FIGURA 14 - Atividade de glutamina sintetase e glutamato desidrogenase durante a ontogenia da semente de ervilha

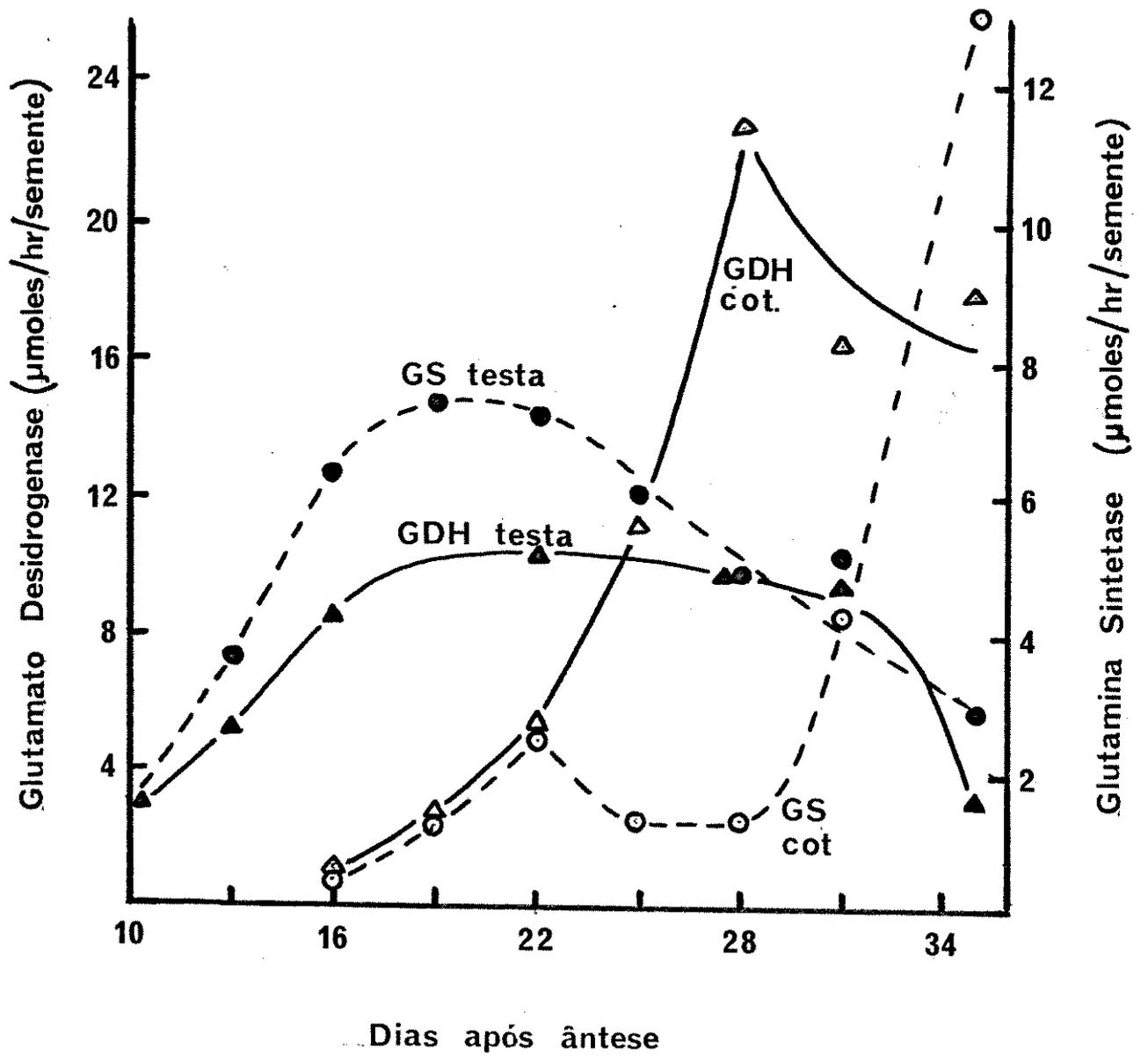


FIGURA 15 - Atividade de transaminase na semente imatura de ervi  
lha

A- Aspartato/ $\alpha$ -cetoglutarato; B- aspartato/piruvato  
C- glutamato/piruvato.

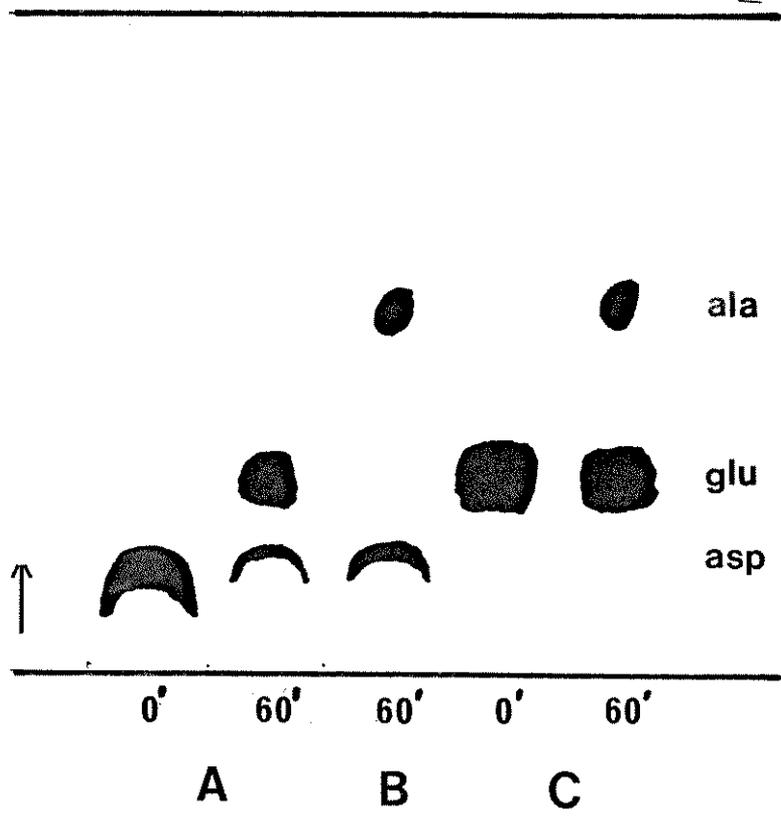


TABELA 1

Oxidação de NADH catalisada por extratos de endosperma  
de milho

	nmole NADH oxidado/min/ml	
	exptº 1	exptº 2
ensaio completo	58	80
- menos GLN	28	20
- menos $\alpha$ KG	28	22
- menos GLN e $\alpha$ KG	28	20

TABELA 2

Fracionamento de GOGAT com sulfato de amônio

fração*	nmole NADH oxidado/min/ml		proteína (mg/ml)	atividade específica
	completo (A)	-αKG(B) (A - B)		
0 - 40	0	0	8,37	-
40 - 55	82	0	9,95	8,24
55 - 70	14	12	4,97	-
original	88	10	24,26	3,22

\*grau de saturação a 0 °C com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

TABELA 3

Oxidação de NADH catalisada por extratos do endosperma de milho na presença de diversos substratos

Composição do ensaio	nmole NADH oxidado/min/ml
ensaio completo	60
-GLN	0
-GLN + ASN	0
-GLN + $\text{NH}_4^+$	0
- $\alpha$ KG	0
- $\alpha$ KG + piruvato	0
- $\alpha$ KG + oxaloacetato	$\infty^*$
- $\alpha$ KG - GLN + oxaloacetato	$\infty$

\*oxidação instantânea

TABELA 4

Atividade de GOGAT com NADH e NADPH e o efeito de fluoreto

Extrato do endosperma de milho parcialmente purificado. Fluoreto de sódio acrescentado: 5  $\mu$ mole/ml

doador de elétrons	NaF	atividade de GOGAT (nmole NAD(P)H oxidado/min/ml)
NADH	-	40
	+	42,5
NADPH	-	41
	+	41

TABELA 5

Atividade de amida transferase em extratos de cotilédones imaturos de ervilha

Extrato dessalinizado

Asparagina, glutamina e  $\alpha$ -cetoglutarato, 5 mM

ensaio	nmole NADH oxidado/min/ml
ASN + $\alpha$ KG	14
O + $\alpha$ KG	14
GLN + $\alpha$ KG	43



TABELA 7

Análise de aminoácidos nos ensaios após 5 dias a 4 °C

Ensaio equivalente a A e B da tabela 6, exceto que a análise cromatográfica foi feita após permanência dos ensaios a 4 °C durante 5 dias na presença de etanol 60%. Avaliação visual(+) da intensidade da mancha após separação por cromatografia.

	ASN	ASN	ASN
	+	+	+
	0	αKG	αKG
	0' 60'	0' 60'	60' extrato fervido
GLU	- -	- ++++	-
ASP	- -	∞ ∞	-

TABELA 8

Influência da presença de sulfato de amônio durante a cromatografia sobre a dosagem de aspartato

Ensaio de rotina de asparaginase dividido em quatro alíquotas de 60  $\mu$ l, e 2  $\mu$ l de sulfato de amônio adicionado a cada uma antes da aplicação de amostras na placa cromatográfica. Aspartato separado, localizado e contado como descrito no ensaio de rotina.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ conc. final	ASP (cpm)
0	963
0,33%	1.066
0,66%	1.078
1%	1.027
2%	1.038

TABELA 9

Purificação de asparaginase com etanol

Após tratamento do extrato com etanol, o sobrenadante foi dosado para asparaginase e proteína.

EtOH (%)	Atividade de asparaginase (cpm de ASP formado/ml)	teor de proteína (mg/ml)	atividade específica
33	185.000	2,49	74.297
50	172.000	1,10	156.363
60	158.000	0,96	164.583
70	37.000	0,78	47.436

TABELA 10

Purificação de asparaginase de cotilédone e de testa de sementes imaturas de ervilha

Fração	volume (ml)	atividade ( $\mu$ mole/hr/ml)	atividade total	proteína (mg/ml)	atividade específica	grau de purificação	recuperação
<u>Cotilédone</u>							
cru	23	1,36	31,3	20,0	0,07	x1	100%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (+G25)	30	0,64	19,2	4,6	0,14	x2	61%
LH20	20	0,96	19,2	0,93	1,03	x15	61%
<u>Testa</u>							
cru	22	9,87	217,1	3,8	2,6	x1	100%
LH20	10	16,9	169,0	0,54	31,3	x12	78%

TABELA 13

Influência de potássio no peso molecular de asparaginase

Extratos dessalinizados da testa e do cotilédone

		peso molecular
testa	-K	61.400
	+K	74.600
cotilédone	-K	( 70.000)*
	+K	68.800

\*atividade insuficiente para localizar o pico com precisão.

TABELA 14

Efeito de diversas substâncias na atividade de asparaginase

Extrato do cotilédone, parcialmente purificado.

adição	atividade relativa de asparaginase(%)
controle	100
HgCl <sub>2</sub> , 1mM	3
NH <sub>4</sub> Cl, 6mM	94
ASP, 10mM	67

TABELA 15

Atividade de asparaginase em cotilédones imaturos de  
várias leguminosas

Extratos dessalinizados. Idade das semenetes desconhecida.

		Atividade de asparaginase	
		$\mu\text{mole/hr/semente}$	$\mu\text{mole/hr/g peso fresco}$
Pisum sativum			
cotilédones	+K	0,66	1,81
	-K	0	
testa	+K	2,7	32,4
	-K	0,05	
Pisum arvense			
	+K	2,27	6,17
	-K	0	
Lupinus polyphyllus			
	+K	0,487	9,75
	-K	0,445	8,9
Lupinus angustifolis			
cv. Unicrop	+K	0,88	4,7
	-K	0,02	
cv. Horizon	+K	0,91	4,54
	-K	0	
Vicia faba			
	+K	1,79	2,56
	-K	0,02	
Phaseolus multiflorus			
	+K	0,205	0,156
	-K	0	
Phaseolus vulgaris			
	+K	0,12	0,34
	-K	0	