

## Parâmetros cinéticos de actividade de aspartato-aminotransferases de folhas de *Lupinus albus* L. cv Estoril

LUIA LOURO MARTINS (<sup>1</sup>)

MIGUEL P. MOURATO (<sup>1</sup>)

FRANCISCO M. GÍRIO (<sup>2</sup>)

AMARILIS DE VARENNES (<sup>1</sup>)

### RESUMO

A aspartato-aminotransferase (EC 2.6.1.1) é uma enzima que existe em microrganismos, plantas e animais, sendo essencial no metabolismo do azoto e do carbono. Nas folhas de *Lupinus albus* L. cv Estoril é possível detectar a existência de 4 isoenzimas. Estas isoenzimas apresentam um mecanismo cinético ping-pong bi-bi. Numa representação de Lineweaver-Burk, este mecanismo de actividade caracteriza-se pela obtenção de um sistema de rectas paralelas, num gráfico de  $1/V$  em função do recíproco da concentração de substrato. Para este complexo enzimático foram determinadas as constantes cinéticas através do método descrito por Cleland para este tipo de mecanismo e utilizado por Reynolds *et al.* (1981).

Verificou-se que a AAT tem muito maior afinidade para os cetoácidos do que para os aminoácidos, nomeadamente para o oxaloacetato. A baixa afinidade das aminotransferases para os aminoácidos está de acordo com os altos valores de  $K_m$  encontrados.

### SYNOPSIS

Aspartate-aminotransferase (EC 2.6.1.1) is an essential enzyme used by microorganisms and plants in the carbon and nitrogen metabolic pathways. Four AAT isoenzymes can be detected in white lupin leaves (*Lupinus albus* L. cv Estoril). These isoenzymes have a ping-pong bi-bi reaction mechanism. In a Lineweaver-Burk representation, this kind of mechanism is characterized by several parallel lines in a  $1/V$  vs  $1/[S]$  plot. The kinetic constants for this enzymatic system were determined according to the method developed by Cleland and used by Reynolds *et al.* (1981).

The results were consistent with a greater affinity of AAT towards keto acids than amino acids, namely oxaloacetate. The lower affinity of AAT towards amino acids is in agreement with the high  $K_m$  values found.

---

(<sup>1</sup>) Departamento de Química Agrícola e Ambiental, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa Codex.

(<sup>2</sup>) INETI - IBQTA - U. Microbiologia Industrial, Azinhaga dos Lameiros, 1699 Lisboa Codex.

## 1. Introdução

A aspartato-aminotransferase (AAT: L-aspartato; 2-oxoglutarato aminotransferase, EC 2.6.1.1) catalisa a reacção reversível: aspartato + 2-oxoglutarato  $\leftrightarrow$  glutamato + oxaloacetato. É uma enzima que existe em microrganismos, plantas e animais, sendo essencial no metabolismo do azoto e do carbono. Nas plantas, a sua função em diversas vias metabólicas tem sido referida por vários autores (Hatch & Mau, 1973; Ireland & Joy, 1985; Vance & Gantt, 1992). Nas folhas de *Lupinus albus* L. cv Estoril é possível detectar a existência de 4 isoenzimas (Cabral, 1990).

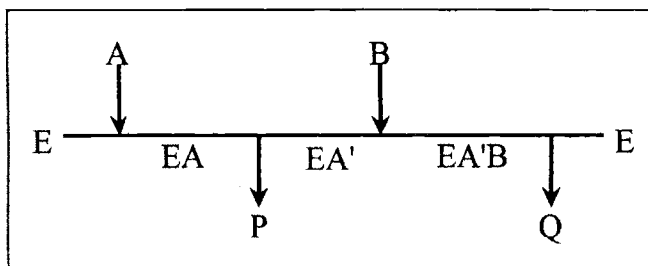
Diversos estudos de purificação e caracterização de isoenzimas de AAT têm sido feitos, a partir de diferentes tipos de plantas, nomeadamente em suspensão de células de cenoura — *Daucus carota* L. (Turano *et al.*, 1990), em nódulos de tremocilha — *Lupinus angustifolius* L. (Reynolds *et al.*, 1981), em arroz — *Oryza sativa* L. (Yagi *et al.*, 1993) e em cotilédones de ervilha — *Pisum sativum* L. (Wong & Cossins, 1969).

As AAT estudadas apresentam um mecanismo cinético ping-pong bi-bi (Reynolds *et al.*, 1981). Este mecanismo encontra-se esquematizado na Figura 1 e é definido pela seguinte equação (Dixon *et al.*, 1979):

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_{m_a}}{[a]} + \frac{K_{m_b}}{[b]}}$$

**Figura 1**

Representação do mecanismo cinético ping-pong bi-bi  
(A e B: substratos; P e Q: produtos; E: enzima; EA, EA', EA'B: formas intermédias)



A representação gráfica de  $1/V$  em função de  $1/[S]$  origina um sistema de rectas paralelas para diferentes concentrações do segundo substrato (gráficos primários). Os valores das ordenadas na origem das rectas anteriores em função da concentração do segundo substrato (gráfico secundário) permitem o cálculo dos valores de  $K_m$ .

O objectivo deste trabalho foi a determinação das constantes cinéticas de actividade da AAT de folhas de *Lupinus albus* L. cv Estoril.

## 2. Material e métodos

O material vegetal foi obtido por germinação de sementes de *Lupinus albus* L. cv Estoril, e crescimento em cultura líquida durante 1 mês, em câmara de vegetação climatizada, com as condições descritas por Cabral (1990).

A extracção da enzima foi feita por maceração e homogeneização das folhas na presença de 2% (p/p) de polivinilpirrolidona insolúvel (PVP) em tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0 com  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  de fosfato de piridoxal, seguida de centrifugação a 20 000 g, durante 30 minutos e filtração ( $0,2 \mu\text{m}$ ), a  $0-4^\circ\text{C}$ .

Na determinação da actividade enzimática de AAT, no sentido da formação de glutamato e oxaloacetato, foi utilizado o método espectrofotométrico contínuo referido por Rej & Hørder (1983); no sentido da formação de aspartato e 2-oxoglutarato foi utilizado o método espectrofotométrico contínuo referido por Hatch (1973). A proteína solúvel foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

As constantes cinéticas foram determinadas através do método descrito por Cleland e utilizado por Reynolds *et al.* (1981). Numa representação de Lineweaver-Burk, este mecanismo de actividade caracteriza-se pela obtenção de um sistema de rectas paralelas para diferentes concentrações de um dos substratos em função do recíproco do segundo substrato — gráficos primários. A partir dos valores da ordenada na origem é obtido o valor de  $K_m$  num gráfico secundário. Um processo idêntico foi seguido em relação a cada um dos substratos.

### 3. Resultados e Conclusões

Os resultados encontram-se nas figuras 2, 3, 4 e 5. Nos gráficos primários obtiveram-se rectas paralelas para as diferentes concentrações de cada um dos substratos o que é consistente com o mecanismo de actividade proposto para esta enzima. No gráfico secundário obtiveram-se os valores de  $K_m$  para cada um dos substratos (Tabela 1).

**Tabela 1**

Valores de  $K_m$  para os diferentes substratos

Substratos	$K_m$ (mM)
L-aspartato	1,68
2-oxoglutarato	0,45
L-glutamato	32,73
oxaloacetato	0,28

Tal como outros autores referiram para as diferentes AAT estudadas (Wightman & Forest, 1978; Reynolds *et al.*, 1981), verifica-se que a AAT das folhas de *L. albus* têm muito maior afinidade para os cetoácidos do que para os aminoácidos, nomeadamente para o oxaloacetato. Este aspecto está relacionado com os processos metabólicos em que a AAT está envolvida, nos diferentes compartimentos celulares, que pressupõem mecanismos de regulação muito complexos (Ireland & Joy, 1985). Por exemplo, durante o crescimento de diferentes partes das plantas, na regulação do metabolismo respiratório através do ciclo de Krebs (Hatch, 1973). O aspartato é também o aminoácido preferido em relação ao glutamato, mas ambos com valores mais elevados de  $K_m$ . A baixa afinidade das aminotransferases para os aminoácidos está de acordo com as concentrações relativamente elevadas de alguns deles nas células vegetais, nomeadamente de glutamato e aspartato, entre outros (Chapman & Leech, 1979).

Figura 2

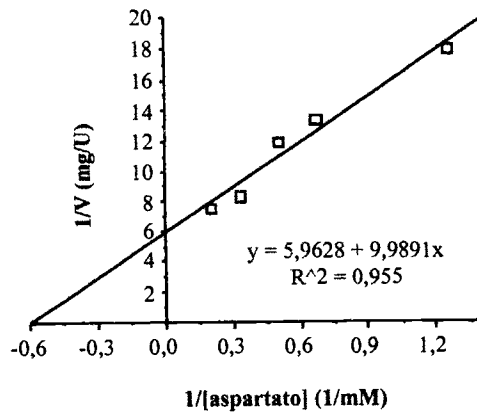
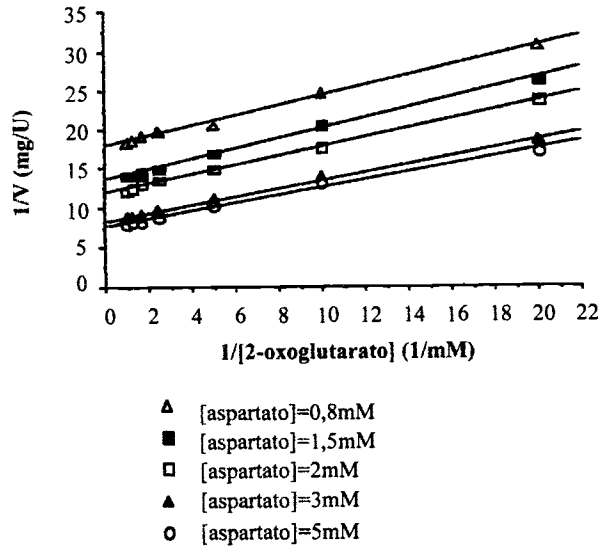
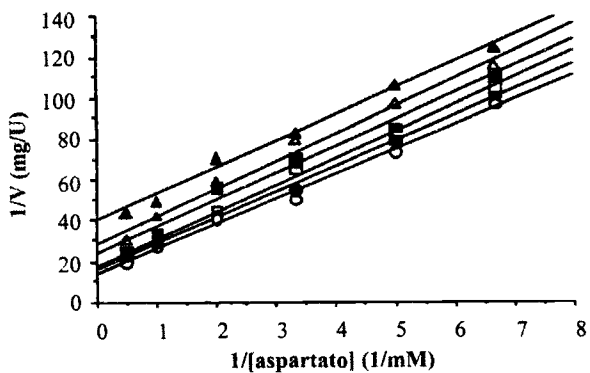
*Gráficos primário e secundário para o aspartato*

Figura 3

Gráficos primário e secundário para o 2-oxoglutarato



- ▲ [2-oxoglutarato]=0,25mM
- △ [2-oxoglutarato]=0,5mM
- [2-oxoglutarato]=1mM
- [2-oxoglutarato]=2mM
- [2-oxoglutarato]=3mM
- [2-oxoglutarato]=4mM

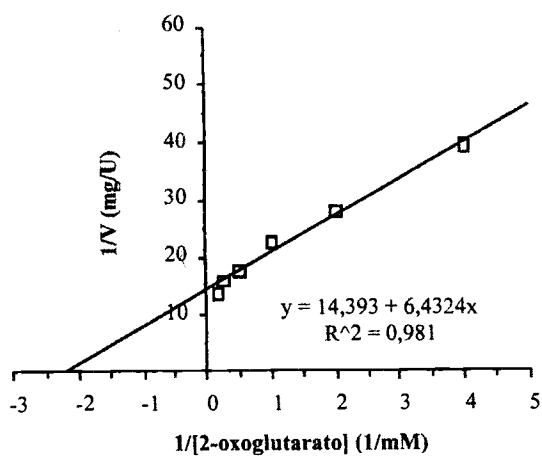


Figura 4

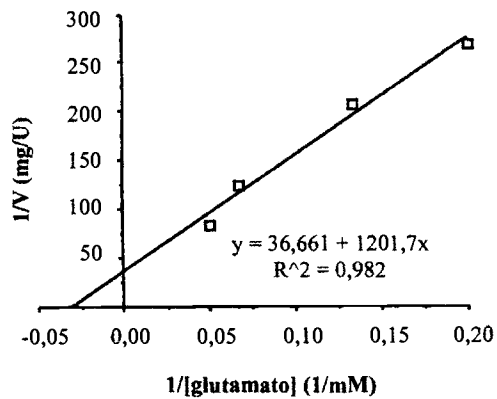
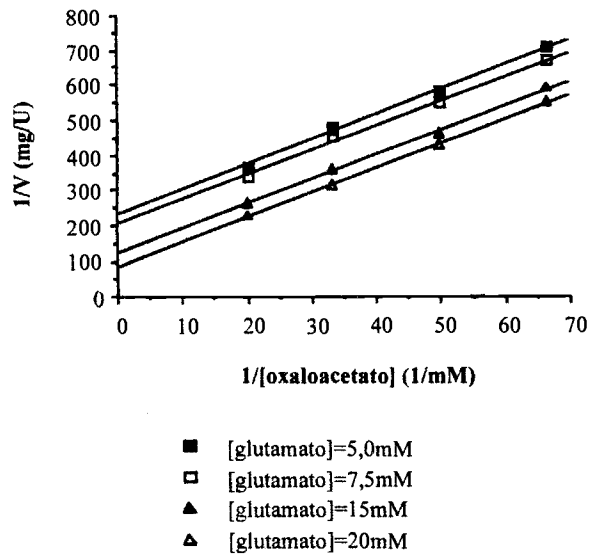
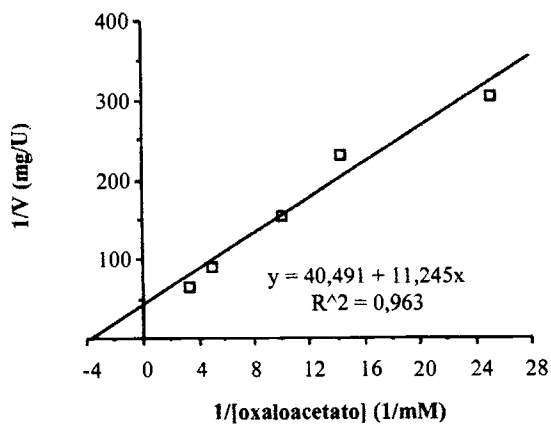
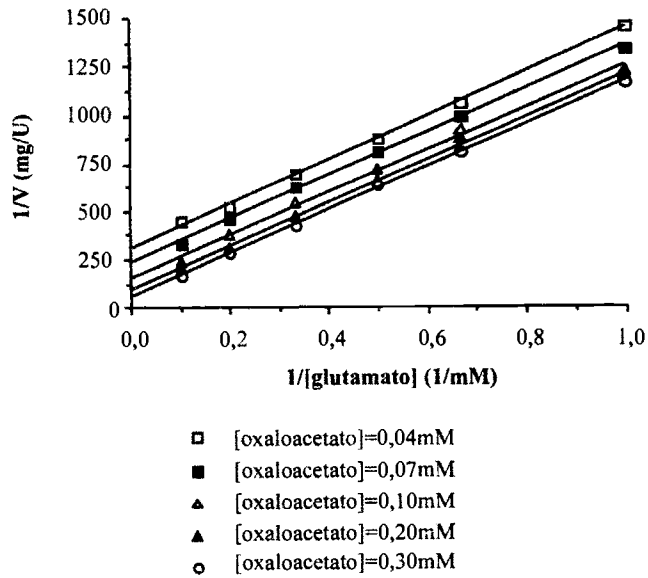
*Gráficos primário e secundário para o glutamato*

Figura 5

Gráficos primário e secundário para o oxaloacetato



## BIBLIOGRAFIA

- CABRAL, F.M. (1990) — *Polimorfismo Isoenzimático em Lupinus. Identificação e Caracterização de Populações (L. Albus L. e L. Luteus L.)*, Dissertação de Doutorado, UTL-ISA.
- CHAPMAN, D.J.; LEECH, R.M. (1979) — Changes in pool sizes of free amino acids and amides in leaves and plastids of zea mays during leaf development, *Plant Physiol.*, 63: 567-572.
- DIXON, M.; WEBB, E. (1979) — *Enzymes*, (M. DIXON; E. WEBB, Ed.), Longman Group, Ltd., London.
- HATCH, M.D. (1973) — Separation and properties of leaf aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase isoenzymes operative in the C4 pathway of photosynthesis, *Arch. Biochem. Biophys.*, 156: 207-214.
- HATCH, M.D.; MAU, S. (1973) — Activity, location and role of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase isoenzymes in leaves with C4 pathway photosynthesis, *Arch. Biochem. Biophys.*, 156: 195-206.
- IRELAND, R.J.; JOY, K.W. (1985) — *Plant Transaminases*, em "Transaminases" (P. CHRISTEN; D.E. METZLER, Ed.), John Wiley & Sons, 376-384.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951) — Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- REJ, R.; HØRDER, M. (1983) — *Aspartate Aminotransferase (Glutamate Oxaloacetate Transaminase)*, em "Methods of Enzymatic Analysis" (U.S. BERGMAYER, Ed.), Volume III: "Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases", Basel, Flórida, pp. 415-443.
- REYNOLDS, P.H.; BOLAND, M.J.; FARDEN, K.J. (1981) — Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: partial purification and properties of the aspartate aminotransferases from Lupine nodules, *Arch. Biochem. Biophys.*, 209: 524-533.
- TURANO, F.J.; WILSON, B.W.; MATTHEWS, B.F. (1990) — Purification and characterization of aspartate aminotransferase isoenzymes from carrot suspension cultures, *Plant Physiol.*, 92, 587-594.
- VANCE, C.P.; GANTT, J.S. (1992) — Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules, *Physiol. Plant.*, 85: 266-274.
- VARENNE, A.; CARVALHO, I. (1988-1993) — Alterations in isozyme patterns induced by different levels of iron, manganese and boron on white lupin, *An. Inst. Sup. Agron.*, 43: 107-120.
- WIGHTMAN, F.; FOREST, J.C. (1978) — Properties of Plant Aminotransferases - Reviews, *Phytochemistry*, 17: 1455-1471.
- WONG, K.F.; COSSINS, E.A. (1969) — Studies of the particulate and soluble aspartate aminotransferases in germinating pea cotyledons, *Phytochemistry*, 8: 1327-1338.
- YAGI, T.; SAKO, M.; MORIUTI, S.; SHOUNAKA, M.; MASAKI, K.; YAMAMOTO, S. (1993) — Purification and characterization of aspartate aminotransferase isoenzymes from rice bran, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 2074-2080.