

PROPRIEDADES DA TRANSCARBAMILASE DE ORNITINA
PARCIALMENTE PURIFICADA DE FOLHAS DE
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

L.E. Gutierrez*

O.J. Crocomo*

RESUMO: Transcarbamilase de ornitina (E.C. 2.1.3.3) extraída de folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca) com 31 dias de maturidade foi parcialmente purificada com sulfato de amônio em pH 7,2 e 7,8. A enzima apresentou as seguintes propriedades: pH ótimo 7,8, temperatura ótima 40°C, Constante de Michaelis para ornitina de 3,18mM e para carbamil-fosfato de 3,93mM.

Termos para indexação: transcarbamilase de ornitina, feijoeiro, *Phaseolus vulgaris*.

PARTIAL PURIFICATION AND PROPERTIES OF ORNITHINE
TRANSCARBAMYLASE FROM BEAN LEAVES
(*Phaseolus vulgaris* L.)

ABSTRACT: Ornithine transcarbamylase (E.C. 2.1.3.3) was extracted from leaves of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca) and partially purified by ammonium sulfate precipitation at pH 7,2 and 7.8. The enzyme preparation showed an optimum pH of 7.8 and Km of 3.18mM for ornithine and of 3.93mM for carbamil-phosphate.

* Departamento de Química da E.S.A. "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, 13.400 - Piracicaba, SP. e CEBTEC/FEALQ.

Index terms: ornithine transcarbamylase, bean, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

A transcarbamilase de ornitina (OTC) (E.C. 2.1.3.3) catalisa a condensação de ornitina com carbamil-fosfato produzindo citrulina (BROWN & COHEN, 1959). A enzima é largamente distribuída em plantas superiores (BONE, 1959) particularmente na família *Papilionaceae* (KLECZKOWSKI, 1957). Foi detectada a sua presença nas partículas mitocondriais de *Phaseolus aureus* (BONE, 1959) e de *Neurospora* (WEISS & DAVIS, 1973).

O ciclo da uréia (Krebs-Henseleit) é um processo metabólico que exige a participação de enzimas citoplasmáticas e mitocondriais. A existência do ciclo da uréia em plantas foi demonstrada por KASTING & DELWICHE (1958) em plântulas de *Citrullus vulgaris* e por SPLITTSTOESSER (1969) para *Cucurbita moschata*. A enzima OTC, participante do ciclo da uréia, pode ter a sua atividade alterada por diversos fatores, como estação do ano (SPENCER & TITUS, 1974), germinação (KOLLOFFEL & STROBAND, 1973), estágio de maturidade e deficiência em potássio, (GUTIERREZ, 1977).

Diversos procedimentos para a purificação de OTC de tecidos vegetais, microrganismos e plantas superiores foram anteriormente descritos (JOSEPH *et alii*, 1963; KLECZKOWSKI & COHEN, 1964; TAM & PATIL, 1972; SPENCER & TITUS, 1974). O valor do pH ótimo da OTC não foi o mesmo para os diferentes organismos utilizados como fonte da enzima, variando de 7,3 para *Pseudomonas* (RAMOS *et alii*, 1967) até 8,50 para folhas de feijoeiro (TAM & PATIL, 1972).

O objetivo do presente trabalho foi o de purificar a OTC extraída de folhas de feijoeiro e determinar os valores de pH ótimo, temperatura ótima, constante

de Michaelis para ornitina e carbamil-fosfato.

MATERIAL E MÉTODOS

Germinação e cultivo das plantas: sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca) foram utilizados para a obtenção de plantas conforme descrito anteriormente por GUTIERREZ (1977).

Extração da transcarbamilase de ornitina (OTC): as folhas com 31 dias de maturidade foram homogeneizadas em almofariz com sílica moída na presença de tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2) na proporção de 3ml/g de peso fresco. O extrato foi filtrado em tecido e centrifugado a 10.000g durante 20 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado para posterior purificação.

Purificação do extrato: foi adotada a metodologia de KLECZKOWSKI & COHEN (1964), com fracionamento com sulfato de amônio (30-65% de saturação) em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2) e tampão Tris-HCl 0,1M (pH 7,8). A enzima parcialmente purificada foi utilizada para as determinações das propriedades. Todas as operações de extração e purificação foram realizadas em temperatura inferior a 5°C.

Ensaio enzimático: o sistema (1ml) consistiu de 20 micromoles de L-ornitina (pH 7,8), 20 micromoles de carbamil-fosfato de lítio, 100 micromoles de tampão Tris-HCl (pH 7,8), 0,1 a 0,3 unidades da enzima e água desmineralizada para completar volume. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade que sintetiza 1 micromol de citrulina em 15 minutos. A atividade específica da OTC é expressa em micromoles de citrulina formada em 15 minutos e por miligrama de proteína. A citrulina formada foi determinada segundo método de ARCHIBALD (1944) modificado por SPECTOR & JONES (1973) e descrito por GUTIERREZ (1977).

Determinação de proteína: a proteína foi determinada segundo LOWRY *et alii* (1951) após purificada com

TCA a 10% e utilizando soroalbumina bovina como padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os dados da purificação parcial da OTC de folhas de feijoeiro com o fracionamento de sulfato de amônio. Foi obtida uma preparação enzimática com purificação de cerca de 9 vezes. Foram testados procedimentos para purificações mais completas como solventes e alterações no pH, mas os resultados foram negativos. Outros procedimentos como cromatografia em DEAE-celulose e filtração em gel de Sephadex não foram utilizados, porque segundo TAM e PATIL (1972) resultariam em enzima altamente instável. KLECZKOWSKI & COHEN (1964) verificaram que a OTC purificada de plântulas de ervilha perdia 50% da atividade em dois minutos quando incubada a 37°C, enquanto a enzima parcialmente purificada de folhas de feijoeiro retinha atividade a 37°C durante 60 minutos (TAM & PATIL, 1972). Nos ensaios do presente trabalho não houve perda da atividade a 37°C em até 10 minutos.

Em comparação com preparações enzimáticas obtidas de microrganismos, animais e plantas a enzima extraída de folhas de feijoeiro no presente trabalho apresentou algumas diferenças. A temperatura ótima (Figura 2) foi de 40°C confirmando observações feitas por TAM & PATIL (1972). O valor do pH ótimo foi de 7,8 (Figura 1) e é inferior ao obtido por TAM & PATIL (1972) para folhas de feijoeiro e por KLECZKOWSKI & COHEN (1964) para plântulas de ervilha. O valor mais baixo encontrado no presente trabalho poderia ser explicado pelo uso do tampão Tris, que de acordo com JOSEPH *et alii* (1963) provocou redução no pH ótimo da OTC extraída de fígado de boi. Na Tabela 2 são apresentados diversos valores de pH ótimo para comparação com o valor obtido no presente trabalho.

As constantes de Michaelis (k_m) para ornitina (3,18mM) e carbamil-fosfato (3,93mM) foram determinadas

pelo processo de Lineweaver-Burk (DIXON & WEBB, 1964) e estão representadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Esses valores podem ser comparados com OTC extraída de outras fontes na Tabela 3. Observa-se nesta tabela um comportamento desigual nos diversos organismos, em alguns casos o Km para ornitina é maior do que carbamil-fosfato e em outros é menor.

O valor da energia de ativação aparente calculado segundo método de Arrhenius foi de 13,12K cal/mol, próximo do obtido por BOGGESS & NAYLOR (1975) para algas.

Tabela 1. Purificação parcial de transcarbamilase de ornitina de folhas de feijoeiro cv. carioca com 31 dias

Tratamento	Volume total	Proteína Total	Unid. Totais	Atividade Espec.	Rend.
Ext. bruto (10.000g 20')	50	91,2	18,2	0,20	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30-65%) pH 7,2	35	44,7	17,0	0,38	93
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30-65%) pH 7,8	20	15,0	15,3	1,02	84
(NH ₄) ₂ SO ₄ (25-50%) pH 7,2	5	3,8	7,1	1,86	39

Tabela 2. pH ótimo de transcarbamilase de ornitina de diversas fontes

Fonte	pH ótimo	Referência
Fígado de rato	7,4 a 7,8	CARAVACA & GRISOLIA (1960)
Fígado de boi	6,9	JOSEPH <i>et alii</i> (1963)
<i>Pseudomonas</i>	7,3 a 8,8	STALON <i>et alii</i> (1967)
Macieira	7,8 a 8,6	SPENCER & TITUS (1974)
Ervilha	8,45	KLECZKOWSKI & COHEN (1964)
Algas	9,5	BOGGESS & NAYLOR (1975)
Feijoeiro	8,5	TAM & PATIL (1972)
Feijoeiro	7,8	Presente trabalho

Tabela 3. Constantes de Michaelis de transcarbamilase de ornitina de diversas fontes. Ornitina(orn.) e Carbamil fosfato (Carb.)

Fontes	Orn.	Carb.	Referência
Fígado de boi	1,4	1,7	JOSEPH <i>et alii</i> (1963)
Algas	2,5	0,7	BOGGESS & NAYLOR (1975)
Ervilha	4,7	3,9	EID <i>et alii</i> (1974)
Macieira pH 7,8	1,2	1,9	SPENCER & TITUS (1974)
pH 8,6	4,8	6,0	
Feijoeiro	5,0	1,7	TAM & PATIL (1972)
Feijoeiro	3,2	3,9	Presente trabalho

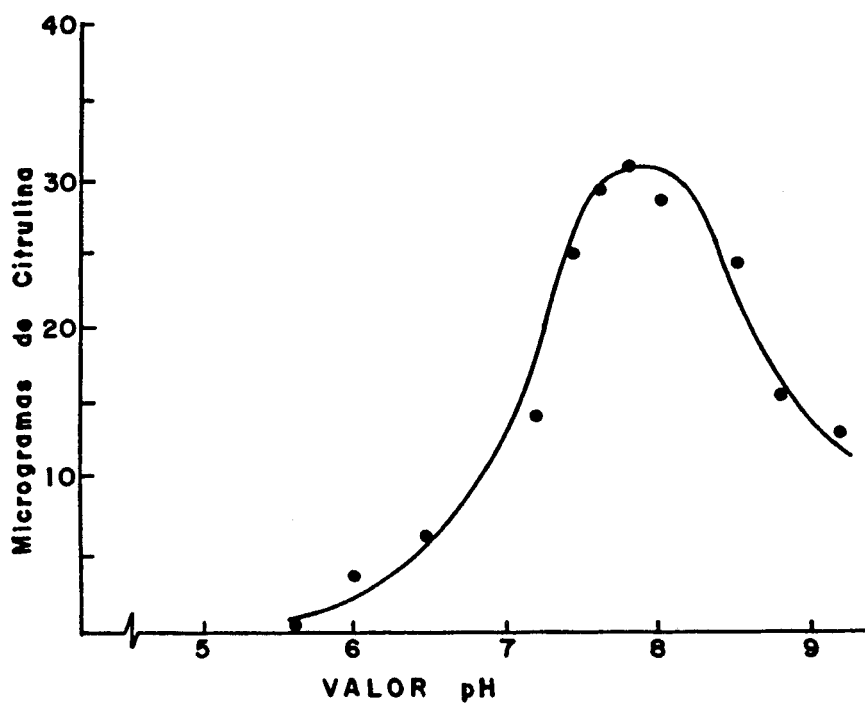


Figura 1. Efeito do pH sobre a atividade de transcarbamilase de ornitina. Condições do ensaio: 0,2 unidades da enzima, 20 micromoles de ornitina, 20 micromoles de carbamil-fosfato, 100 micromoles de Tris-HCl e Tris-Maleato, 37°C e 15 minutos de incubação

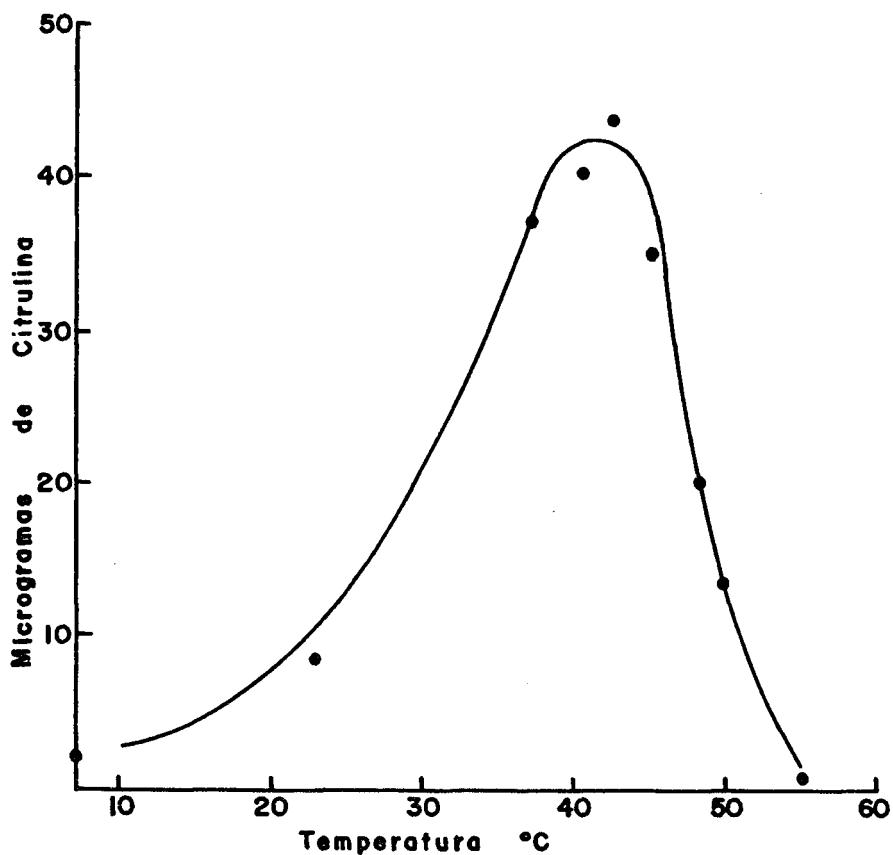


Figura 2. Temperatura ótima de transcarbamilase de ornitina. Condições do ensaio: 0,2-0,3 unidades de enzima, 20 micromoles de carbamilsfosfato, 20 micromoles de ornitina, 100 micromoles de Tris-HCl pH 7,80, 15 minutos de incubação e temperaturas variáveis

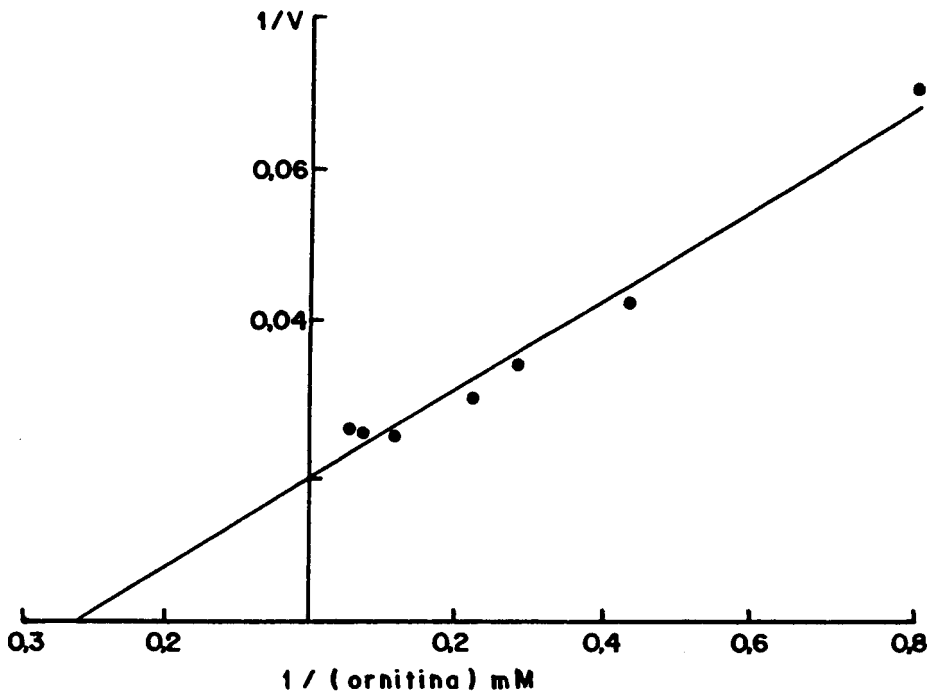


Figura 3. Efeito da concentração de ornitina sobre a atividade de transcarbamilase de ornitina. Condições do ensaio: 0,2 unidades da enzima, 20 micromoles de carbamil-fosfato, concentrações variáveis de ornitina, 100 micromoles de Tris-HCl pH 7,80; 3,7°C e 15 minutos de incubação

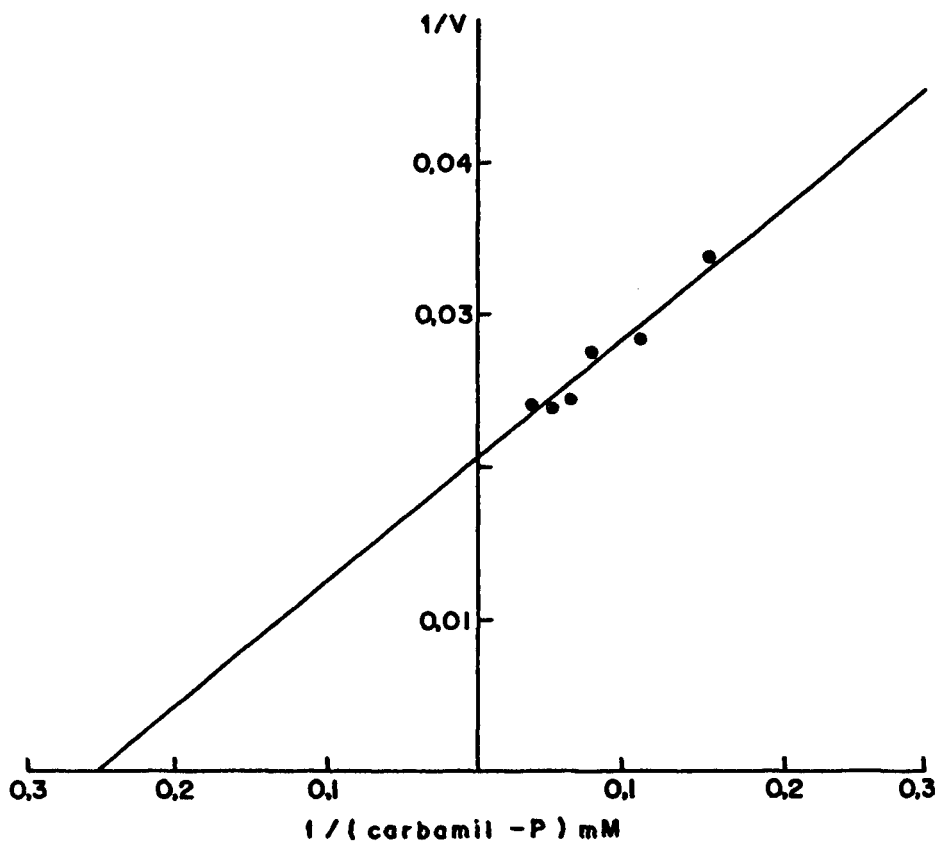


Figura 4. Efeito da concentração de carbamil-fosfato sobre a atividade de transcarbamilase de ornitina. Condições do ensaio: 0,2 unidades da enzima, 20 micromoles de ornitina, 100 micromoles de Tris-HCl pH 7,80, concentrações variáveis de carbamil-fosfato, a 37°C e 15 minutos de incubação

CONCLUSÕES

A transcarbamilase de ornitina parcialmente purificada (9 vezes) de folhas de feijoeiro apresentou pH ótimo de 7,8, temperatura ótima de 40°C, constante de Michaelis para ornitina de 3,18mM e para carbamil-fosfato de 3,93mM. A energia de ativação aparente foi de 13,12 Kcal/mol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCHIBALD, E.M. Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 156: 121-42, 1944.
- BOGGESE, S.F. & NAYLOR, A.W. Partial purification and properties of ornithine transcarbamilase from *Nostoc muscorum*. *Plant Physiology*, Lancaster, 56:640-4, 1975.
- BONE, D.H. Metabolism of citrulline and ornithine in mung bean mitochondria. *Plant Physiology*, Lancaster, 34:171-5, 1959.
- BROWN, G.W. & COHEN, P.P. Comparative biochemistry of urea synthesis. I. Methods for the quantitative assay of urea cycle enzymes in liver. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 234:1769-74, 1959.
- CARAVACA, J. & GRISOLIA, S. Synthesis of citrulline with animal and bacterial enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 235:684-93, 1960.
- DIXON, M. & WEBB, E.C. *Enzymes*. 2.ed. New York, Academic Press, 1964. 950p.
- EID, S.; WALY, Y.; ABDELAL, A.T. Separation and properties of two ornithine carbamoyl - transferases from *Pisum sativum* seedlings. *Phytochemistry*, Oxford, 13:99-102, 1974.

- GUTIERREZ, L.E. Atividade de enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio afetada pela deficiência de potássio e maturidade em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). São Paulo, 1977. 108p. (Doutorado - Instituto de Química/USP).
- JOSEPH, R.L.; BALDWIN, E.; WATTS, D.C. Studies on carbamoyl phosphate-L-ornithine carbamoyl-transferase from of liver. *Biochemical Journal*, London, 87:409-16, 1963.
- KASTING, R. & DELWICHE, C. Ornithine, citrulline and arginine metabolism in water melon seedlings. *Plant Physiology*, Lancaster, 33:350-4, 1958.
- KLECKZKOWSKI, K. Biosynthesis of citrulline in bean seedlings. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences. Serie des Sciences Chimiques*, Varsovie, 5: 83-7, 1957. Apud *Chemical Abstracts*, Columbus, 54: 1662c, 1960.
- KLECKZKOWSKI, K. & COHEN, P.P. Purification of ornithine transcarbamylase from pea seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, 107:271-8, 1964.
- KOLLOFFEL, C. & STROABAND, H.W.J. Ornithine carbamoyl-transferase activity from the cotyledons of developing and germinating seeds of *Vicia faba*. *Phytochemistry*, Oxford, 12:2635-8, 1973.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 193: 265-75, 1951.
- RAMOS, F.; STALON, V.; PIERARD, A.; WIAME, J.M. The specialization of the two ornithine carbamoyl-transferases of *Pseudomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 139:98-106, 1967.
- SPECTOR, L. & JONES, M.E. Acetyl-glutamic acid. *Methods in Enzymology*, New York, 6:557-62, 1963.

- SPENCER, P.W. & TITUS, J.S. The occurrence and nature of ornithine carbamoyl-transferase in senescing apple leaf tissue. *Plant Physiology*, Lancaster, 54: 382-5, 1974.
- SPLITTSTOESSER, W.E. Metabolism of arginine by aging in 7 days old punpkin seedlings. *Plant Physiology*, Lancaster, 44:361-6, 1969.
- STALON, V.; RAMOS, P.; PERARD, A.; WIAME, J.M. The occurrence of a carbamoyltransferase in *Pseudomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 139:91-7, 1967.
- TAM, L.Q. & PATIL, S.S. Mode of action of the toxin from *Pseudomonas phaseolicola*. II. Mechanism of inhibition of bean ornithine carbamoyltransferase. *Plant Physiology*, Lancaster, 49:808-12, 1972.
- WEISS, R.L. & DAVIS, R.H. Intra-celular localization of enzymes of arginine metabolism in *Neurospora*. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 248: 5403-8, 1973.

Recebido para publicação em: 29/03/89

Aprovado para publicação em: 12/06/89