

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**GLUTAMATO SINTASE: ESTUDO DE ALGUMAS
PROPRIEDADES QUÍMICAS E CINÉTICAS DA EN-
ZIMA DE RADÍCULAS DE Zea mays L.**

Ricardo Manuel de Seixas Boavida Ferreira

CURSO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

1983

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

GLUTAMATO SINTASE : ALGUMAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E
CINÉTICAS DA ENZIMA DE RADÍCULAS DE *Zea mays* L.

Ricardo Manuel de Seixas Boavida Ferreira

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre no
CURSO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

1983

ÍNDICE

ABREVIATURAS	iii
SUMÁRIO.	v
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Importância do azoto no metabolismo das plantas.	1
1.2 - Absorção de azoto pelas raízes das plantas	2
1.3 - Redução do nitrato a amónio.	3
1.4 - Assimilação do amónio.	4
1.4.1 - A descoberta da glutamato sintase.	4
1.4.2 - As duas vias principais de assimilação do amónio	6
1.4.3 - Evidências em favor da assimilação do amónio via glutamato desidrogenase, em condições normais de concentração de amónio.	9
1.4.4 - Evidências em favor da via glutamina sintetase/glutamato sintase como via principal da assimilação do amónio.	9
1.4.5 - Conclusões	13
2 - MATERIAL E MÉTODOS	15
3 - ESTABILIDADE E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA	21
4 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA VELOCIDADE INICIAL DA REACÇÃO.	31
5 - pH ÓPTIMO.	33
6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS NA VELOCIDADE INICIAL DA REACÇÃO.	35
6.1 - Introdução teórica	35
1. Método de Lineweaver-Burk ou "double reciprocal plot"	37
2. Método de Hanes	38
3. Método de Eadie-Hofstee	39
4. Representação gráfica linear directa (direct linear plot)	43
5. Ajustamento directo de uma hipérbole rectangular aos pontos experimentais, pelo método dos mínimos quadrados.	49

6.2 - Resultados obtidos	56
- Km aparente para a L-glutamina	56
- Km aparente para o 2-oxoglutarato.	60
- Km aparente para o NADH.	60
6.3 - Discussão.	64
7 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NUCLEÓTIDOS PIRIDÍNICOS NA VELOCIDADE INICIAL DE REACÇÃO	69
7.1 - Especificidade da glutamato sintase em relação ao dador de electrões.	69
7.2 - Efeito da concentração de NADH	71
7.3 - Efeito da concentração de NADPH.	74
7.4 - Efeito da concentração de nucleótidos piridínicos.	74
8 - EFEITO DA CATALASE E DE VÁRIOS METABOLITOS NA INIBIÇÃO PROVOCADA PELOS NUCLEÓTIDOS PIRIDÍNICOS.	79
8.1 - Introdução	79
8.1.1 - A glutamato sintase como amidotransferase da glutamina	79
8.1.2 - Inibição pelo ditiotretitol da actividade dependente da glutamina da carbamil fosfato sintetase.	81
8.1.3 - A inibição pelo NADPH da actividade dependente da glutamina da glutamato sintase de origem bacteriana.	83
8.2 - Resultados obtidos e discussão	84
8.3 - Conclusão.	94
9 - EFEITO DE SAIS, EDTA, ADP E ATP NA VELOCIDADE INICIAL DA REACÇÃO .	97
9.1 - Efeito de vários catiões	97
9.1.1 - Resultados obtidos	97
9.1.2 - Discussão.	97
9.2 - Efeito do zinco.	101
9.3 - Efeito do cálcio e do estrôncio.	101
9.4 - Efeito do EDTA	104
9.5 - Efeito do ADP e do ATP	105
10 - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR APROXIMADO	107
10.1 - Resultados obtidos.	107
10.2 - Discussão	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

ABREVIATURAS

ADP : Adenosina difosfato
ATP : Adenosina trifosfato
BDH : British Drug Houses
DON : 6-Diazo-5-oxo-L-norvalina
EDTA : Etilenodiaminotetraacetato
HEPES : N-2-Hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etanosulfonato
Km : Constante de Michaelis
MSO : Metionina sulfoximina
MW : Peso molecular (molecular weight)
*N : Isótopos de azoto
NAD : Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAD(P) : NAD e/ou NADP
 r^2 : Coeficiente de determinação
S : Concentração de substrato
TRIS : Tris (hidroximetil) aminometano
UE : Unidades de enzima
v : Velocidade inicial
V_{máx} : Velocidade inicial máxima

CAPÍTULO 6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS NA VELOCIDADE INICIAL DA REACÇÃO

6.1 - Introdução teórica

Para uma reacção enzimática que segue a cinética de Michaelis-Menten, o gráfico da velocidade inicial da reacção (v) em função da concentração de substrato (S) é uma hipérbole rectangular (figura 6.1) da forma:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} \cdot S}{K_m + S}$$

Os parâmetros que caracterizam esta equação e que são em geral estimados a partir dos resultados observados são $V_{\text{máx}}$ (a velocidade inicial máxima, que é teoricamente atingida quando a enzima estiver saturada por uma concentração infinita de substrato) e K_m (a constante de Michaelis, numericamente igual à concentração de substrato que corresponde a metade da velocidade inicial máxima).

Uma vez que a relação entre a variável independente S e a variável dependente v é não-linear, Michaelis e Menten (1913) reconheceram desde logo que não era prática a determinação de $V_{\text{máx}}$ e K_m a partir da equação da hipérbole. Para tal, contribuía o facto de haverem restrições de natureza física, as quais tornam apenas possível a medição de v para valores positivos e finitos de S . Não era assim fácil determinar com rigor aqueles parâmetros, já que as assíntotas não podiam ser localizadas com precisão; além disso, era difícil traçar com rigor uma hipérbole rectangular. Assim, foram as próprias Michaelis e Menten (1913) que usaram a representação gráfica de v em função de $-\log S$. Esta curva tem um ponto de inflexão em $S = K_m$ e a inclinação máxima da curva nesse ponto é 0,576. Este método é aceitável em termos estatísticos mas não foi aceite posteriormente, possivelmente porque se tratou de outro método não linear e, como tal, difícil de manusear (Eisenthal e Cornish-Bowden, 1974).

Hoje, a equação de Michaelis-Menten pode ser representada de maneira diferente para a determinação de $V_{\text{máx}}$ e K_m , a partir de uma série de medições da velocidade inicial a diferentes concentrações de substrato: uns métodos são simples, rápidos e expeditos, mas de menor precisão; outros são

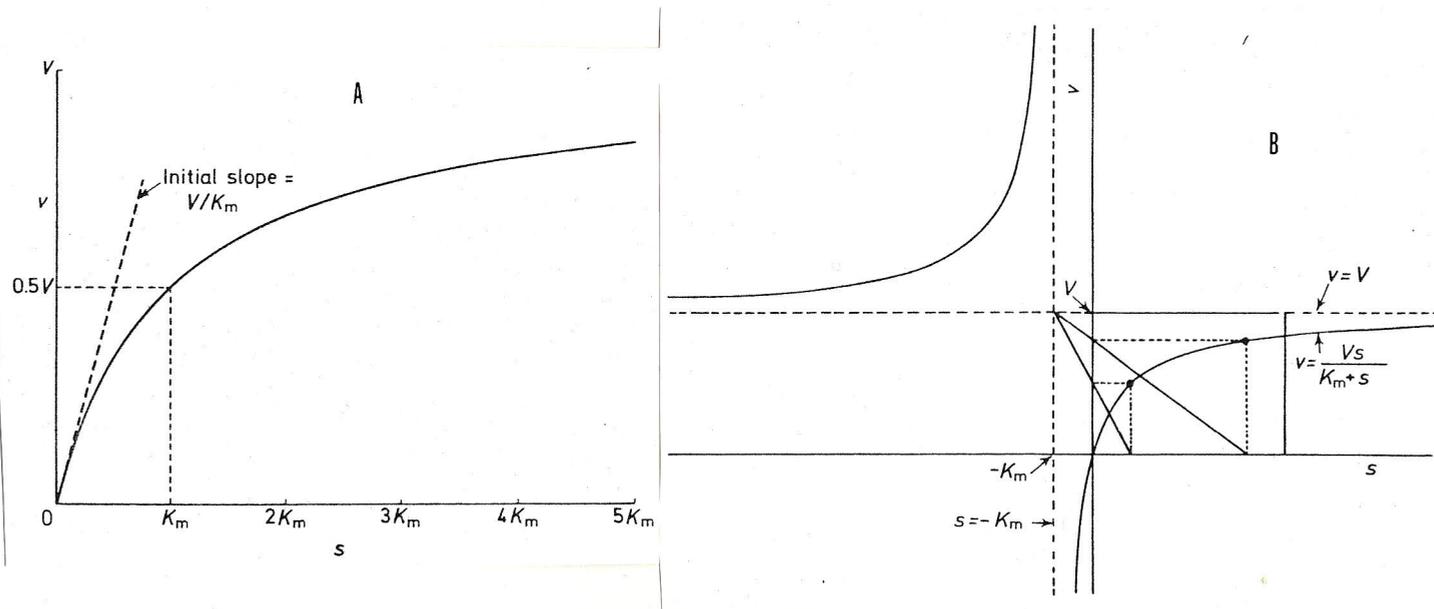


Fig. 6.1 - Representação gráfica da velocidade inicial de uma reacção enzimática que obedece à equação de Michaelis-Menten, em função da concentração do substrato. Em A está representada a parte da curva correspondente a $0 < S < 5 K_m$. Em B está representada a mesma curva para um intervalo mais amplo de valores de S , incluindo valores fisicamente impossíveis, de modo a ilustrar a relação da curva com as duas assíntotas, $S = -K_m$ e $v = V_{máx}$ (Cornish-Bowden, 1979).

mais precisos e complexos, complexidade esta apenas aparente dada a possibilidade de utilização de calculadores cada vez mais exactos e rápidos. De todos eles, apenas faremos referência a 5, por serem talvez os de utilização mais corrente. Dentro destes, os 3 mais conhecidos resultam de transformações lineares da equação de Michaelis-Menten.

1 - Método de Lineweaver-Burk ou "double reciprocal plot"

Invertendo ambos os membros da equação de Michaelis-Menten obtém-se a seguinte equação:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{S}$$

Esta equação mostra que a representação gráfica de $1/v$ em função de $1/S$ é uma recta, com derivada igual a $K_m/V_{m\acute{a}x}$, ordenada na origem igual a $1/V_{m\acute{a}x}$ e abcissa na origem igual a $-1/K_m$ (figura 6.2).

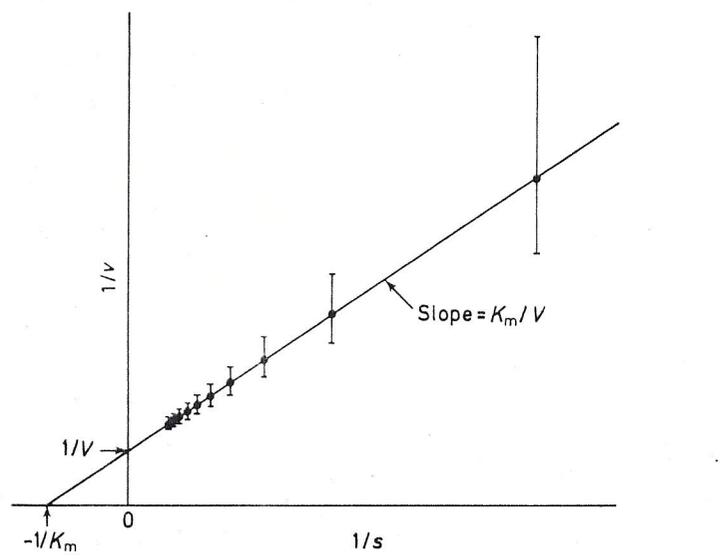


Fig. 6.2 - Gráfico de Lineweaver-Burk ou "double reciprocal plot". As barras verticais correspondem a um erro de $\pm 0,05 \cdot V_{m\acute{a}x}$ em v (Cornish-Bowden, 1979).

A representação gráfica de Lineweaver-Burk tem sido, de longe, a mais frequentemente utilizada. Apesar da sua grande popularidade, este método não deve ser recomendado. O seu principal defeito é que, tomando o inverso de v , os menores valores de v (que são precisamente aqueles valores que têm maior percentagem de erro) desempenham um papel exageradamente importante na determinação da posição da recta ajustada (Dowd e Riggs, 1965)-

- ver sub-capítulo 6.2, Km para a L-glutamina; isto é, para valores baixos de v, pequenos erros experimentais na sua determinação originam erros enormes em 1/v; mas para valores grande de v, os mesmos pequenos erros experimentais originam erros insignificantes em 1/v. Isto está ilustrado pelas barras verticais na figura 6.2, as quais correspondem todas à mesma amplitude de erro em v. Assim, se o valor mais pequeno de v for medido muito por baixo, o valor correspondente de 1/v virá muito por cima - como resultado, a recta dos mínimos quadrados deslocar-se-á no sentido dos ponteiros do relógio, à volta do ponto cujas coordenadas são a média das coordenadas de todos os pontos e através do qual passa a linha de regressão. Se esta rotação for suficientemente grande, a ordenada na origem aproximar-se-á ou passará para baixo da origem, originando estimativas absurdas para Vmáx e Km (Dowd e Riggs, 1965).

Estas dificuldades podem, em princípio, ser ultrapassadas pela utilização de pesos apropriados, mas esta solução não parece muito satisfatória na medida em que origina, muito frequentemente, rectas muito mal ajustadas (Cornish-Bowden, 1979).

Markus *et al.* (1976) referem como vantagem principal deste método o facto de as variáveis v e S estarem separadas.

2 - Método de Hanes

Multiplicando ambos os membros da equação de Lineweaver-Burk por S, obtém-se a equação de Hanes:

$$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{V_{máx}} + \frac{1}{V_{máx}} \cdot S$$

Esta equação mostra que a representação gráfica de S/v em função de S é uma recta, com derivada igual a 1/Vmáx, ordenada na origem igual a Km/Vmáx e abcissa na origem igual a -Km (figura 6.3).

Estudos estatísticos sugerem que podem ser obtidas estimativas mais precisas pela utilização do método de Hanes do que pelo método de Lineweaver-Burk, já que, assumindo que v é razoavelmente constante quanto a variância, ao longo de uma gama razoável de valores de S os erros em v reflectem-se mais homogeneamente em S/v do que em 1/v - estes exibem maior variação (Wilkinson, 1961), como se pode ver pelas barras verticais da figura 6.3. No entanto, tal como no método anterior, tomando o inverso de v, dá-se ênfase exagerado aos valores mais baixos de v, que são precisa-

mente os valores que têm maior percentagem de erro (Dowd e Riggs, 1965).

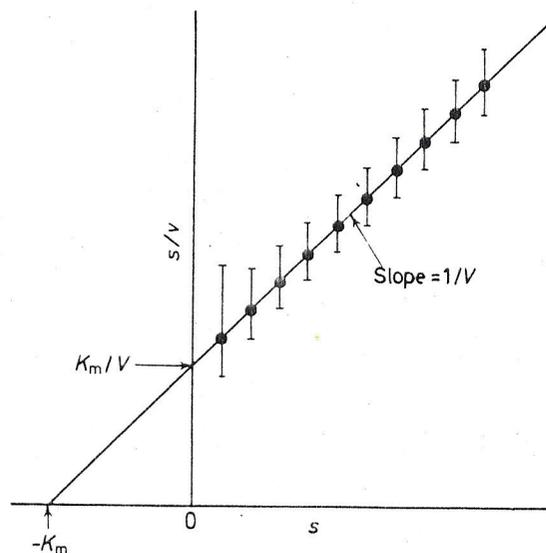


Fig. 6.3 - Gráfico de Hanes. As barras verticais correspondem a um erro de $\pm 0,05 \cdot V_{\text{máx}}$ em v (Cornish-Bowden, 1979).

A variável independente, S , aparece em ambos os membros da equação de tal modo que um gráfico de S/v em função de S mostra um certo grau de correlação inevitável - inevitável no sentido em que, mesmo se v e S fossem variáveis aleatórias independentes, as variáveis S/v e S estariam correlacionadas entre si. Esta correlação inevitável, sendo positiva, tende a fortalecer a correlação observada entre as duas variáveis porque a relação teórica contida na equação de Hanes é também positiva (Dowd e Riggs, 1965).

Segundo Markus *et al.* (1976) este método tem o inconveniente de não separar as variáveis S e v .

3 - Método de Eadie-Hofstee

Multiplicando ambos os membros da equação de Lineweaver-Burk por $v \cdot V_{\text{máx}}$ e rearranjando a equação, obtém-se a 3ª transformação linear da equação de Michaelis-Menten: a equação de Eadie-Hofstee:

$$v = V_{\text{máx}} - K_m \cdot \frac{v}{S}$$

Esta equação mostra que a representação gráfica de v em função de v/S é uma recta, com derivada igual a $-K_m$, ordenada na origem igual a $V_{\text{máx}}$ e ab

cissa na origem igual a $V_{\text{máx}}/K_m$ (figura 6.4).

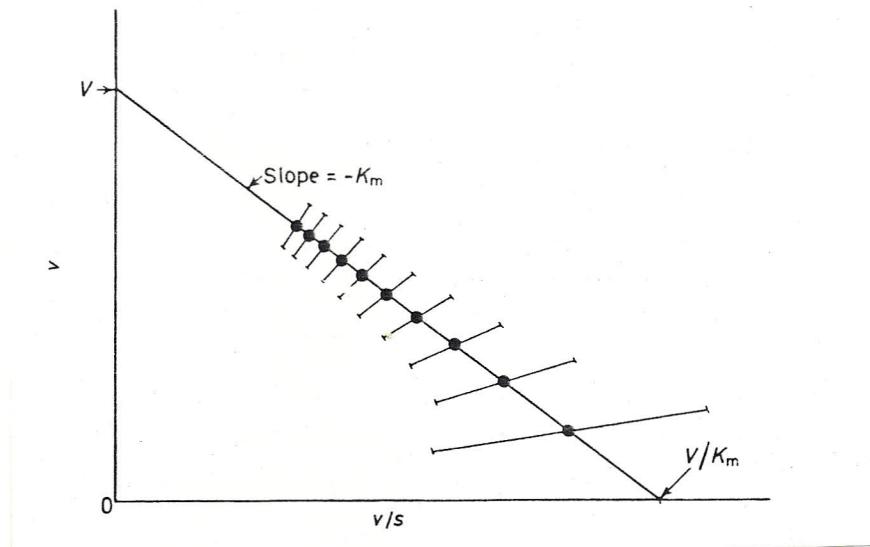


Fig. 6.4 - Gráfico de Eadie-Hofstee. As barras oblíquas correspondem a um erro de $\pm 0,05 \cdot V_{\text{máx}}$ em v (Cornish-Bowden, 1979).

O método de Eadie-Hofstee sofre, mas em menor extensão, do mesmo inconveniente estatístico que o método de Lineweaver-Burk, com a complicação adicional de que ambas as variáveis são afectadas pela variabilidade experimental em v (Wilkinson, 1961). Este método dá resultados razoáveis na prática, embora o facto de v aparecer em ambas as coordenadas significar que os erros em v causam afastamentos ou aproximações da origem, em vez de desvios paralelos aos eixos - como se pode ver pelas barras oblíquas na figura 6.4 (Cornish-Bowden, 1979). Por outras palavras, o facto de v aparecer em ambos os membros da equação provoca um certo grau de correlação inevitável entre as variáveis v e v/S de tal modo que, mesmo quando S e v são duas variáveis aleatórias independentes, as variáveis v e v/S estão relacionadas entre si. Esta correlação, sendo positiva, tende a enfraquecer a correlação observada entre as variáveis no gráfico, já que a relação teórica dada pela equação entre v e v/S é negativa (Dowd e Riggs, 1965).

Este método tem ainda os inconvenientes:

- Não separar as variáveis v e S (Markus *et al.*, 1976)
- Como ambas as variáveis estão sujeitas a erro, o método geral do ajustamento de uma recta a pontos pelo método dos mínimos quadrados não é, teoricamente, aplicável (Dowd e Riggs, 1965).

Segundo Haldane e Stern (1932), estas três transformações lineares

res foram originalmente introduzidas (mas não publicadas) por Woolf. No entanto, tais transformações foram posteriormente divulgadas em trabalhos publicados por outros cientistas (Hanes, 1932; Lineweaver-Burk, 1934; Eadie, 1942; Hofstee, 1952), passando a ser conhecidas pelos nomes destes últimos.

Uma vez que todas estas 3 transformações são meras variantes da equação de Michaelis-Menten, poderia parecer à primeira vista que qualquer delas pode ser usada para estimar K_m e $V_{m\acute{a}x}$ com igual rigor, a partir de um dado conjunto de resultados experimentais. Isto seria verdade se os parâmetros v e S não estivessem sujeitos a erros experimentais. Na verdade, embora S possa, em geral, ser controlado com certa precisão pelo investigador, v está sujeito a um maior ou menor erro experimental. Nestas condições, as 3 transformações lineares já não fornecem estimativas igualmente rigorosas de $V_{m\acute{a}x}$ e de K_m , particularmente se a recta é ajustada "a olho" ou pelo método dos mínimos quadrados sem a utilização de pesos apropriados para cada ponto.

A não utilização de pesos convenientes é o que parece acontecer na prática corrente. Com efeito, a maior parte dos investigadores contenta-se com o ajustamento "a olho", dando aproximadamente peso igual a cada ponto. Tal curva, tendo sido ajustada por um investigador cuidadoso e experiente, estará geralmente muito próxima da linha calculada pelo método dos mínimos quadrados, determinada a partir dos pontos "não pesados". Contudo, o erro a que os pontos estão sujeitos não é, em geral, constante, obtendo-se estimativas muito melhores dos parâmetros se a cada ponto for dado um peso, o qual é inversamente proporcional ao quadrado do erro ao qual está sujeito.

Com a utilização apropriada de pesos, resultados idênticos serão obtidos com as 3 transformações lineares acima referidas; além disso, obtêm-se melhores estimativas de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m . Contudo, na prática, o inconveniente do cálculo e da utilização de pesos apropriados, frequentemente associados ao desconhecimento dos erros que afectam v , continuarão provavelmente a desencorajar o uso geral dos pesos (Dowd e Riggs, 1965).

Em relação a estes 3 métodos lineares, considerados globalmente, Markus *et al.* (1976) fazem uma síntese das suas vantagens e inconvenientes, que passamos a referir:

Vantagens: estes gráficos dão directamente os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , a partir dos valores da derivada, ordenada na origem e abcissa na origem; são

de fácil execução e muito bem conhecidos; os desvios da linearidade podem ser usados para diagnosticar variantes (Frieden, 1967; Wharton *et al.*, 1974; Bardsley e Childs, 1975);

Inconvenientes: os resultados obtidos com estes métodos afastam-se, por vezes apreciavelmente, dos que são conseguidos por métodos mais precisos (Cornish-Bowden e Eisenthal, 1974); devem ser determinados pesos para usar no ajustamento da recta (Wilkinson, 1961) - Isto não é feito em geral porque complica a análise. Deste modo, os resultados obtidos por estes métodos não são tão satisfatórios como os obtidos por métodos mais precisos.

Dowd e Riggs (1965) demonstraram que estes 3 métodos lineares são imperfeitos do ponto de vista estatístico, e que o método de Lineweaver-Burk é, de longe, o pior, mesmo quando o erro associado aos valores de v é pequeno. Naturalmente que a imperfeição é amplificada quando o erro em v é grande, podendo mesmo as estimativas $V_{m\acute{a}x}$ e K_m serem negativas.

A marcada imprecisão do método de Lineweaver-Burk tem levado alguns autores a sugerirem fortemente o seu abandono como método de estimar os parâmetros $V_{m\acute{a}x}$ e K_m a partir de pontos para os quais não foram calculados pesos apropriados, tanto no caso de ajustamento "a olho" como no caso de ajustamento pelo método dos mínimos quadrados.

A escolha entre as outras duas transformações lineares não é fácil. Tal escolha depende, em certo grau, da natureza do erro associado a v , embora o método de Eadie-Hofstee pareça, em termos gerais, ser ligeiramente superior. Quando se sabe que o erro associado a v é pequeno, o método de Hanes parece fornecer melhores resultados que o método de Eadie-Hofstee em bora, em tal situação, ambos os métodos originem estimativas razoavelmente precisas dos parâmetros $V_{m\acute{a}x}$ e K_m . Se o erro associado a v é grande (ou quando não temos a certeza de que ele é pequeno), é preferível utilizar o método de Eadie-Hofstee pois, em tais situações, embora estimativas pouco precisas possam ser obtidas mais frequentemente pelo método de Eadie-Hofstee, o método de Hanes pode dar origem à obtenção de valores bastante incorrectos (Dowd e Riggs, 1965).

No que respeita à precisão com que as rectas se ajustam aos pontos experimentais, o método de Lineweaver-Burk parece ser o melhor, seguido pelo de Hanes e, finalmente, pelo de Eadie-Hofstee. A precisão com que estes métodos estimam $V_{m\acute{a}x}$ e K_m está, como referido atrás, na ordem inversa. Estamos portanto confrontados com o paradoxo de obter as melhores estimativas com a recta que pior se ajusta aos pontos, e as piores estimativas com

a recta que melhor se ajusta aos pontos. A imerecida popularidade do método de Lineweaver-Burk poderá estar baseada nesta capacidade de originar um bom ajustamento da recta aos pontos, mesmo quando os resultados experimentais são pouco precisos. Por outro lado, o método de Eadie-Hofstee tende a exagerar qualquer afastamento dos pontos da verdadeira linha prevista pela fórmula de Michaelis-Menten, uma vez que ambas as variáveis são influenciadas na mesma direcção por um erro em v . Por isso, além das vantagens já referidas, este último método tem ainda a vantagem de ser o mais sensível a desvios da linearidade, avisando o investigador quando as suas observações não correspondem à relação prevista na cinética de Michaelis-Menten (Dowd e Riggs, 1965).

4 - Representação gráfica linear directa (direct linear plot)

Trata-se de um método estatístico não-paramétrico, gráfico, introduzido por Eisenthal e Cornish-Bowden (1974).

Rearranjando a equação de Michaelis-Menten de modo a obter $V_{m\acute{a}x}$ em função de K_m , chega-se à seguinte equação:

$$V_{m\acute{a}x} = v + \frac{v}{S} K_m$$

Então, se tratarmos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m como sendo variáveis e v e S como constantes, esta equação define uma linha recta, com derivada v/S , ordenada na origem v e abcissa na origem $-S$. Cornish-Bowden (1979) refere que isto não é tão estranho como pode parecer à primeira vista - com efeito, uma vez S e v medidos experimentalmente, eles passam a ser constantes já que qualquer análise dos resultados os mantém inalterados; em relação a $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , eles podem ser tratados como variáveis enquanto não forem estimados os seus valores.

Exemplifiquemos o método para um primeiro caso de $n=2$ observações. Uma vez construídos os eixos coordenados ($V_{m\acute{a}x}$ em função de K_m) e obtidas as duas observações experimentais, ficamos com 2 pares de valores (S_i, v_i) , com $i=1,2$. Para o primeiro par de valores (S_1, v_1) marcam-se os pontos $K_m=-S_1$ no eixo dos K_m e $V_{m\acute{a}x}=v_1$ no eixo dos $V_{m\acute{a}x}$; em seguida, traça-se uma recta que passa por estes dois pontos, a qual é prolongada para o 1º quadrante. Para este par de valores (S_1, v_1) há portanto uma infinidade de pares de valores $V_{m\acute{a}x}$ e K_m que satisfazem a equação:

.44.

$$V_{\text{máx}} = v_1 + v_1/S_1 \cdot K_m$$

É conveniente notar que esta recta não é um gráfico, no mesmo sentido dos que se obtêm pelo 3 métodos anteriores; no "direct linear plot" cada recta corresponde a um só ponto experimental.

Traçando do mesmo modo a recta que corresponde a uma segunda observação (com diferentes valores de S e v, isto é, com $S_2 \neq S_1$ e $v_2 \neq v_1$), verifica-se igualmente que há uma infinidade de valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m que satisfazem a nova equação:

$$V_{\text{máx}} = v_2 + v_2/S_2 \cdot K_m$$

Para o caso em que $S_2 \neq S_1$ e $v_2 \neq v_1$, estas duas rectas não definem os mesmos pares de valores de K_m e $V_{\text{máx}}$, excepto no ponto de intersecção - este ponto define o único par de valores K_m e $V_{\text{máx}}$ que satisfaz ambas as observações (exceptuam-se os casos em que $v_1/S_1 = v_2/S_2$, isto é, casos em que as duas rectas são paralelas, por não haver ponto de intersecção entre elas).

É fácil demonstrar que as coordenadas do ponto de intersecção são dadas por:

$$K_{m_{1,2}} = \frac{v_2 - v_1}{\frac{v_1}{S_1} - \frac{v_2}{S_2}}$$

$$V_{\text{máx}_{1,2}} = \frac{S_1 - S_2}{\frac{S_1}{v_1} - \frac{S_2}{v_2}}$$

isto é, o ponto de intersecção tem as coordenadas

$$(K_{m_{1,2}}, V_{\text{máx}_{1,2}}) = \left(\frac{v_2 - v_1}{\frac{v_1}{S_1} - \frac{v_2}{S_2}}, \frac{S_1 - S_2}{\frac{S_1}{v_1} - \frac{S_2}{v_2}} \right)$$

Quando isto é feito para um número qualquer de observações, as n rectas intersectam-se num único ponto comum, cujas coordenadas (K_m , $V_{\text{máx}}$), fornecem directamente os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ que satisfazem a equação de

Michaelis-Menten. Isto está ilustrado na figura 6.5.

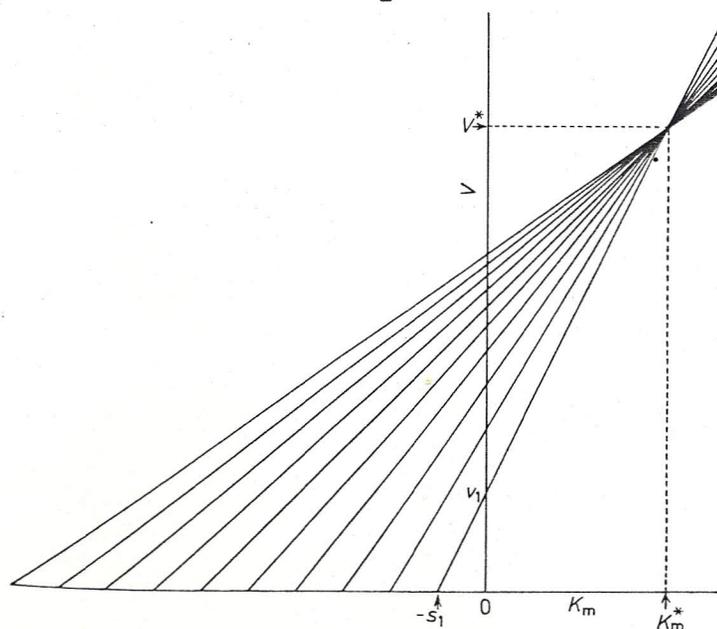


Fig. 6.5 - " Direct linear plot ". Cada linha representa uma observação, e é traçada a partir da abcissa na origem, $K_m = -S_i$ e da ordenada na origem $V_{m\acute{a}x} = v_i$. As coordenadas do ponto de intersecção dão os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ que satisfazem às observações (Cornish-Bowden, 1979).

É muito simples demonstrar que a equação de Michaelis-Menten é obedecida (Dixon e Webb, 1979). Consideremos a equação de Michaelis - Menten na forma $v/S = V_{m\acute{a}x}/(K_m + S)$. Pela figura 6.5 pode ver-se que os triângulos formados entre os pontos S_i e o eixo dos $V_{m\acute{a}x}$ são semelhantes aos triângulos formados entre os pontos S_i e a linha tracejada cuja abcissa é K_m^* . Para os primeiros, a razão altura/base é dada por v/S e para os segundos é $V_{m\acute{a}x}/(K_m + S)$, o que está de acordo com a equação de Michaelis-Menten.

Contudo, na prática, como as observações estão sujeitas a erro, não há um único ponto, comum à intersecção de todas as rectas - o gráfico que normalmente se obtém está representado na figura 6.6. Neste caso, cada intersecção fornece uma estimativa inicial de K_m e de $V_{m\acute{a}x}$. Estas estimativas são marcadas em ambos os eixos coordenados. As melhores estimativas a tomar para K_m e $V_{m\acute{a}x}$ serão, como adiante será discutido, as medianas das respectivas estimativas iniciais.

Generalizando os cálculos anteriores para n observações (S_i, v_i) com $i = 1, 2, \dots, n$, são obtidas n rectas que se intersectam em $1/1.2.n$. $(n-1)$ pontos, excepto para o caso raro em que algumas rectas sejam paralelas. Então, o método "direct linear plot" é usado para encontrar as in-

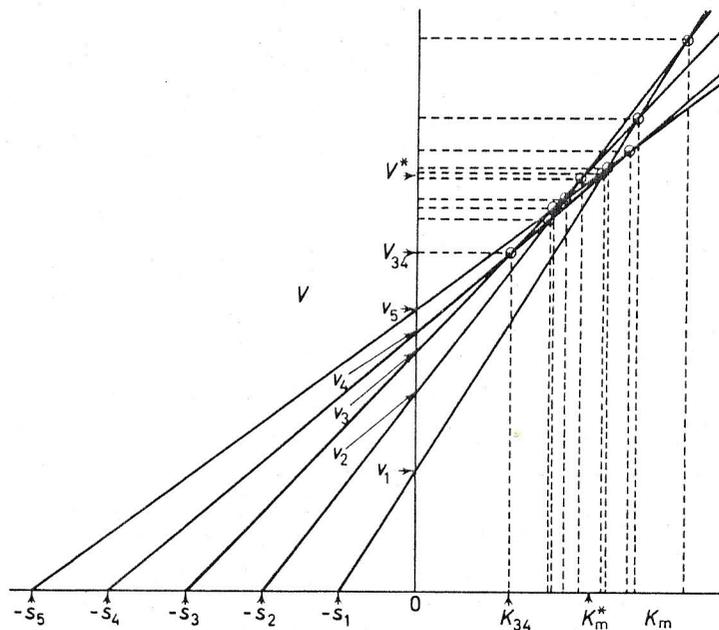


Fig. 6.6 - " Direct linear plot ". As linhas são traçadas como indicado na figura 6.5 e cada intersecção (círculos) fornece uma estimativa $K_{i,j}$ do K_m e uma estimativa $V_{m\acute{a}x\ i,j}$ de $V_{m\acute{a}x}$. Estas estimativas estão marcadas nos eixos coordenados . A melhor estimativa de K_m (K_m^*) obtem-se tomando a mediana dos $K_{i,j}$ e a de $V_{m\acute{a}x}$ ($V_{m\acute{a}x}^*$) obtem-se tomando a mediana dos $V_{m\acute{a}x\ i,j}$ (Cornish-Bowden, 1979).

tersecções das n rectas; isto corresponde a resolver os $1/2.n.(n-1)$ sistemas de equações:

$$\begin{cases} V_{m\acute{a}x} = v_i + v_i/S_i \cdot K_m \\ V_{m\acute{a}x} = v_j + v_j/S_j \cdot K_m \end{cases} \quad \text{com } 1 \leq i < j \leq n$$

As soluções correspondem às $1/2.n.(n-1)$ estimativas iniciais de K_m e $V_{m\acute{a}x}$:

$$K_{m\ i,j} = \frac{v_j - v_i}{\frac{v_i}{S_i} - \frac{v_j}{S_j}}$$

$$V_{m\acute{a}x\ i,j} = \frac{\frac{S_i}{v_i} - \frac{S_j}{v_j}}{\frac{S_i}{S_j} - \frac{S_j}{S_i}}$$

Cornish-Bowden e Ersenthal (1974) concluíram que as melhores estimativas dos parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$ são dadas por:

$$K_m^* = \text{mediana dos valores de } K_{m_{i,j}}$$

$$V_{m\acute{a}x}^* = \text{mediana dos valores de } V_{m\acute{a}x_{i,j}}$$

Este método foi intitulado de "direct linear plot" porque representa cada observação por uma recta e porque fornece directamente os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , isto é, a representação gráfica é linear e a sua leitura directa.

Como adiante discutido, uma das vantagens deste método é a simplicidade e a rapidez, podendo ser obtidas as estimativas K_m^* e $V_{m\acute{a}x}^*$ directamente do gráfico. Contudo, como o número de intersecções obtidas a partir de n observações (S_i, v_i) é dado por $1/2.n.(n-1)$, é fácil de ver que o método gráfico se complica muitíssimo quando o número de observações vai aumentando; com efeito, para 10 observações, é necessário traçar 10 rectas e determinar as coordenadas dos seus 45 pontos de intersecção (para 16 observações serão 120). Isto torna limitativa a utilização do método porque além de o tornar muito trabalhoso, é praticamente impossível, para as dimensões normais do papel correntemente utilizado, a determinação gráfica das coordenadas de centenas de pontos de intersecção. Além disso, o ponto de intersecção de duas rectas define-se mais facilmente se elas se intersectarem com ângulos próximos de 90° , criando-se situações ambíguas quando os ângulos de intersecção são muito agudos. Com um número grande de rectas, por mais bem espaçadas que estejam os valores de S_i e v_i , as rectas intersectar-se-ão com ângulos muito agudos, o que torna pouco precisa a estimativa dos parâmetros.

Todos estes inconvenientes foram por nós ultrapassados, para o que foi contruído um programa em BASIC, o qual calcula directamente os valores de K_m^* e $V_{m\acute{a}x}^*$ pelo método "direct linear plot", restringindo o trabalho de todo o cálculo à introdução dos n pares de valores (S_i, v_i) no terminal. Este programa está apresentado na página 53.

No caso real em que as observações estão sujeitas a erro, pode perguntar-se se todas as intersecções devem ter o mesmo peso, uma vez que elas podem não ser igualmente precisas. Eisenthal e Cornish-Bowden (1974) referem que se obtêm excelentes resultados na prática sem a utilização de pesos apropriados porque o análogo não-paramétrico da média aritmética, is

to é, a mediana não é muito afectada pela introdução de pesos apropriados (ao contrário do que sucede com a média), já que uma mediana "não pesada" é normalmente uma boa aproximação de uma mediana correctamente "pesada" (Bowley, 1928). Mas há ainda outras razões pelas quais se utiliza a mediana em vez da média ou doutra medida de localização: as estimativas iniciais $K_{m,i,j}$ e $V_{máx,i,j}$ são, por necessidade de construção do método, desde logo colocadas por ordem crescente (ver figura 6.6), de tal modo que não é necessário qualquer cálculo para a determinação da mediana; além disso, a mediana é insensível a valores extremos (isto é, observações aberrantes), os quais ocorrem inevitavelmente no "direct linear plot" já que algumas rectas são quase paralelas.

Markus *et al.* (1976) fazem uma síntese das vantagens e inconvenientes do "direct linear plot":

Vantagens: a intersecção das rectas dá directamente o valor dos parâmetros K_m e $V_{máx}$, os quais são lidos directamente no gráfico, sem necessidade de cálculo; é muito simples de construir, porque consiste apenas de linhas rectas e não necessita de cálculos ou tabelas matemáticas; não são necessárias transformações; fornece indicações claras e precisas acerca da qualidade das observações, identificando observações aberrantes; fornece indicação visual da precisão das constantes estimadas; muito insensível a valores aberrantes; requer poucos pressupostos acerca da natureza do erro experimental - não necessitando dos vários pressupostos estatísticos implícitos no método dos mínimos quadrados nem da utilização de pesos apropriados; estatisticamente, é mais preciso que os 3 métodos anteriormente referidos (Atkins e Nimmo, 1975); pode ser usado durante a execução de uma experiência, dando indicações do sucesso da experiência e, eventualmente, da necessidade de alterar a experiência; pode ser usado, de um modo simples e rápido, para simular resultados; permite um fácil diagnóstico do tipo de inibição (Eisenthal e Cornish-Bowden, 1974).

Desvantagens: permite apenas a representação de um número reduzido de observações em cada gráfico, inconveniente este que pode ser ultrapassado pela utilização de um computador. Em determinadas condições (ver adiante) é menos preciso que o ajustamento directo da hipérbole rectangular aos pontos experimentais, pelo método dos mínimos quadrados; não é adequado para a utilização de repetições (várias medições de v para um dado valor de S), o que é frequente acontecer na prática (Porter e Trager, 1977); os efeitos de desvios sistemáticos não estão bem estudados; não fornece informação analítica simples acerca da precisão das estimativas dos parâmetros K_m e $V_{máx}$.

5 - Ajustamento directo de uma hipérbole rectangular aos pontos experimentais, pelo método dos mínimos quadrados

A equação de Michaelis-Menten tal como usualmente escrita está incompleta, já que ignora o efeito do erro experimental. Por isso, é mais correcto escrevê-la sob a forma:

$$v_i = \frac{V_{\max} \cdot S_i}{K_m + S_i} (1 + e_i)$$

com $i = 1, 2, \dots, n$, em que e_i mede o desvio relativo do valor observado v_i do valor calculado $V_{\max} \cdot S_i / (K_m + S_i)$. O erro $(1 + e_i)$ aparece na equação como um factor e não como um erro aditivo, pois tal parece corresponder a uma situação mais exacta (Cornish-Bowden, 1979).

Quando a equação de Michaelis-Menten é expressa sob esta forma, é fácil concluir porque é que as transformações lineares atrás referidas originam resultados pouco precisos.

Pondo a expressão de cima em função de e_i virá:

$$e_i = \frac{K_m \cdot v_i}{V_{\max} \cdot S_i} + \frac{v_i}{V_{\max}} - 1$$

Interessa-nos pois obter a equação da hipérbole rectangular que faça e_i o mínimo possível - basta para isso aplicar o método dos mínimos quadrados.

Comece-se por calcular a soma dos quadrados dos desvios (SSE):

$$SSE = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{K_m \cdot v_i}{V_{\max} \cdot S_i} + \frac{v_i}{V_{\max}} - 1 \right)^2$$

Note-se que aqui seria mais correcto fazer

$$SSE = \sum_{i=1}^n w_i e_i^2,$$

sendo w_i um peso apropriado a atribuir a cada observação. Contudo, o que se faz normalmente é assumir que $w_i = 1$ para todas as observações, pressuposto este que implica que os erros em todas as velocidades iniciais medidas têm a mesma variância - o que não acontece na prática.

Para simplificar a expressão anterior, faça-se a seguinte substi-

.50.

tuição (Cornish-Bowden, 1979): $a = Km/Vm\acute{a}x$ e $b = 1/Vm\acute{a}x$; a express\~{a}o que d\~{a} SSE ficar\~{a}:

$$SSE = \sum_{i=1}^n \left(\frac{a v_i}{S_i} + b v_i - 1 \right)^2$$

Calculem-se os valores de $a^* = a$ e $b^* = b$ que minimizam SSE, isto \~{e}, resolva-se o seguinte sistema de equa\~{c}o\~{e}s:

$$\begin{cases} \frac{\partial SSE}{\partial a} = \sum_{i=1}^n \left[2 \frac{v_i}{S_i} \left(\frac{a^* v_i}{S_i} + b^* v_i - 1 \right) \right] = 0 \\ \frac{\partial SSE}{\partial b} = \sum_{i=1}^n \left[2 v_i \left(\frac{a^* v_i}{S_i} + b^* v_i - 1 \right) \right] = 0 \end{cases}$$

Por substitui\~{c}o\~{e}, obt\~{e}m-se os valores de a^* e b^* que satisfazem este sistema de duas equa\~{c}o\~{e}s:

$$a^* = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{v_i}{S_i} \cdot \sum_{i=1}^n v_i^2 - \sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i} \cdot \sum_{i=1}^n v_i}{\sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i^2} \cdot \sum_{i=1}^n v_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i} \right)^2}$$

$$b^* = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i^2} \cdot \sum_{i=1}^n v_i - \sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{v_i}{S_i}}{\sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i^2} \cdot \sum_{i=1}^n v_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i} \right)^2}$$

Voltando a substituir os valores de a e b (sabendo que $a^* = Km^*/Vm\acute{a}x^*$ e que $b^* = 1/Vm\acute{a}x^*$, sendo Km^* e $Vm\acute{a}x^*$ os valores de Km e $Vm\acute{a}x$ respectivamente que minimizam SSE), obt\~{e}m-se finalmente as express\~{o}es que nos d\~{a}o os valores de Km e $Vm\acute{a}x$ por este m\~{e}todo, a partir das n observa\~{c}o\~{e}s (S_i, v_i) :

$$Km^* = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{v_i}{S_i} \cdot \sum_{i=1}^n v_i^2 - \sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i} \cdot \sum_{i=1}^n v_i}{\sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i^2} \cdot \sum_{i=1}^n v_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i} \right)^2}$$

$$V_{\text{máx}}^* = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i^2} \cdot \sum_{i=1}^n v_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i} \right)^2}{\sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i^2} \cdot \sum_{i=1}^n v_i - \sum_{i=1}^n \frac{v_i^2}{S_i} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{v_i}{S_i}}$$

Sabendo-se da estatística clássica que: variação total = variação explicada pela regressão + variação não explicada pela regressão, é possível definir um coeficiente de determinação não linear (r^2), tal que $-\infty \leq r^2 \leq 1$ (*), que nos dê a percentagem da variação total que é explicada pela regressão, isto é, que nos dê um modo de medir a precisão com que a hipérbole se ajusta aos pontos experimentais.

Para tal, parta-se da seguinte relação muito conhecida:

$$(v_i - \bar{v}) = (v_i - v_e) + (v_e - \bar{v})$$

sendo v_i os valores observados experimentalmente da velocidade inicial

v_e os correspondentes valores estimados, isto é, os valores de v que satisfazem a equação da hipérbole de regressão, para os mesmos S_i

\bar{v} a média aritmética de todos os v_i

Elevando ao quadrado e passando a somatório ambos os membros da equação anterior obtém-se:

$$\sum_{i=1}^n (v_i - \bar{v})^2 = \sum_{i=1}^n (v_i - v_e)^2 + \sum_{i=1}^n (v_e - \bar{v})^2 + 2 \sum_{i=1}^n (v_i - v_e) \cdot (v_e - \bar{v})$$

No caso de regressão simples aplicada a uma hipérbole, a última parcela do 2º membro desta equação não é nula (como acontece na regressão linear, por exemplo), de modo que o coeficiente de determinação (r^2) por nós definido é dado por:

(*) Notar que um valor negativo de r^2 aparece apenas quando a curva ajustada explicar menos o comportamento dos pontos do que a recta $v = \bar{v}$, isto é, quando:

$$\sum_{i=1}^n (v_i - v_e)^2 > \sum_{i=1}^n (v_i - \bar{v})^2$$

$$r^2 = 1 - \frac{\text{variação não explicada pela regressão}}{\text{variação total}}$$

$$r^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (v_i - v_e)^2}{\sum_{i=1}^n (v_i - \bar{v})^2}$$

Todos estes cálculos estatísticos são relativamente trabalhosos e tanto mais quanto maior o valor de n . Foi por isso construído um programa em BASIC (ver página 54) o qual, uma vez introduzidos os n pares de valores (S_i, v_i), calcula directamente os valores de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e r^2 relativos à hipérbole rectangular ajustada, pelo método dos mínimos quadrados, aos pontos experimentais fornecidos.

Markus *et al.* (1976) sintetizam as principais vantagens e inconvenientes deste método:

Vantagens: é simples; separa as variáveis v e S ; menor restrição na escolha das variáveis controladas do que em métodos lineares - nestes há tendência para restringir os dados para regiões onde se verifica a relação linear; em geral, as estimativas dos parâmetros são mais precisas que nos métodos lineares; não são necessárias transformações de variáveis e, consequentemente, transformações das suas variâncias.

Desvantagens: gráfico não linear; dificuldade no traçado preciso das assíptotas; dificuldade em detectar desvios do modelo; para maior rigor e rapidez requiere utilização de computador; efeitos não tomados em conta no modelo e que originam maus ajustamentos não são tão facilmente detectáveis como nos métodos lineares (por exemplo, os diferentes tipos de inibição podem ser mais facilmente reconhecidos com os métodos lineares).

Comparando estes 2 últimos métodos (dos 5 aqui apresentados são, sem dúvida, os que conduzem a estimativas mais precisas dos parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$) pode dizer-se que o ajustamento directo à hipérbole rectangular é o método geral mais conveniente mas não é necessariamente o melhor em todos os casos.

Para demonstrar que o ajustamento directo à equação de Michaelis-Menten é o melhor método, é preciso assumir que (Cornish-Bowden e Eisen-thal, 1974): os erros em v_i têm distribuição normal; os valores da variá-

lp

```

10 REM *****
20 REM *
30 REM * ESTE PROGRAMA CALCULA O VALOR DE VMAX E DE *
40 REM * *
50 REM * KM, DADOS V E S, PELO METODO DE EISENTHAL E *
60 REM * *
70 REM * CORNISH-BOWDEN. *
80 REM * *
90 REM * RICARDO FERREIRA ..... 83/03/27 *
100 REM * *
110 REM *****
120 REM
130 REM
140 REM
200 REM ENTRADA DE DADOS
210 REM
220 INPUT "QUANTOS PARES DE VALORES ( S , V ) ";A
225 LET N=1/2*A*(A-1)
230 DIM S(A),V(A),M(A,A),K(A,A),B(N),D(N)
240 FOR I=1 TO A
250 INPUT "INPUT UM PAR DE VALORES ( S , V ) ";S(I),V(I)
260 NEXT I
270 REM
280 REM CALCULO DAS ORDENADAS (M) E ABCISSAS (K) DOS PONTOS DE
290 REM INTERSECCAO DAS RECTAS.
300 REM
310 FOR I=1 TO A
320 FOR J=I+1 TO A
330 LET M(I,J)=(S(I)-S(J))/((S(I)/V(I))-(S(J)/V(J)))
340 LET K(I,J)=(V(J)-V(I))/((V(I)/S(I))-(V(J)/S(J)))
350 LPRINT "VMAX (";I;",";J;")= ";M(I,J),
360 LPRINT "KM (";I;",";J;")= ";K(I,J)
370 NEXT J
380 NEXT I
390 REM
400 REM PASSAGEM DOS VALORES DO ARRAY M(I,J) PARA O ARRAY B(C)
410 REM E DO ARRAY K(I,J) PARA O D(C)
420 REM
430 LET C=0
440 FOR I=1 TO A
450 FOR J=I+1 TO A
460 LET C=C+1
470 LET B(C)=M(I,J)
480 LET D(C)=K(I,J)
490 NEXT J
500 NEXT I
510 REM
520 REM COLOCACAO DOS VALORES DE M(I,J) OU B(C) POR ORDEM CRESCENTE
540 REM
550 LET L=N-1
560 LET W=0
570 FOR C=1 TO L
580 IF B(C) > B(C+1) THEN 600
590 GOTO 640
600 LET T=B(C)
610 LET B(C)=B(C+1)
620 LET B(C+1)=T
630 LET W=1
640 NEXT C
650 IF W <> 0 THEN 560
660 REM
670 REM CALCULO DA MEDIANA DOS VALORES DE M(I,J) OU B(C)
680 REM.....
690 LET Z=INT (N/2)
700 IF N=2*Z THEN 720
710 GOTO 750
720 REM ENTAD, N E PAR
730 LET M=(B(Z)+B(Z+1))/2
740 GOTO 770
750 REM ENTAD, N E IMPAR
760 LET M=B(Z+1)
770 LPRINT "A MEDIANA DOS VALORES DE M(I,J) E VMAX= ";M
780 REM
790 REM COLOCACAO DOS VALORES DE K(I,J) OU D(C) POR ORDEM CRESCENTE
800 REM
810 LET L=N-1
820 LET W=0
830 FOR C=1 TO L
840 IF D(C) > D(C+1) THEN 860
850 GOTO 900
860 LET T=D(C)
870 LET D(C)=D(C+1)
880 LET D(C+1)=T
890 LET W=1
900 NEXT C
910 IF W <> 0 THEN 820
920 REM
930 REM CALCULO DA MEDIANA DOS VALORES DE K(I,J) OU D(C)
940 REM
950 LET Z=INT(N/2)
960 IF N=2*Z THEN 980
970 GOTO 1010
980 REM ENTAD N E PAR
990 LET M=(D(Z)+D(Z+1))/2
1000 GOTO 1030
1010 REM ENTAD N E IMPAR
1020 LET M=D(Z+1)
1030 LPRINT "A MEDIANA DOS VALORES DE K(I,J) E KM= ";M
1040 END

```

```

10 REM *****
20 REM *
30 REM * ESTE PROGRAMA ESTIMA OS VALORES DE VMAX E KM, DADOS OS *
40 REM * *
50 REM * VALORES DE V E S, PELA APLICACAO DO METODO DOS MINIMOS *
60 REM * *
70 REM * QUADRADOS A EQUACAO DE MICHAELIS-MENTEN . *
80 REM * *
90 REM * RICARDO FERREIRA ..... 83/03/23 *
100 REM * *
110 REM *****
120 REM
130 REM
140 REM
150 INPUT "QUANTOS PARES DE VALORES ( S , V ) ";A
160 DIM B(A),C(A),D(A),E(A),F(A),G(A),H(A),S(A),V(A),J(A),L(A),M(A)
170 FOR I=1 TO A
180 INPUT "INPUT UM PAR DE VALORES ( S , V ) ";S(I),V(I)
190 LET B(I)=V(I)+B(I-1)
200 LET C(I)=V(I)^2
210 LET D(I)=C(I)+D(I-1)
220 LET E(I)=S(I)^2
230 LET F(I)=C(I)/E(I)+F(I-1)
240 LET G(I)=C(I)/S(I)+G(I-1)
250 LET H(I)=V(I)/S(I)+H(I-1)
260 NEXT I
270 LET VMAX=(F(A)*D(A)-G(A)^2)/(F(A)*B(A)-G(A)*H(A))
280 LET KM=(D(A)*H(A)-G(A)*B(A))/(F(A)*B(A)-G(A)*H(A))
290 PRINT "VMAX = ";VMAX,"KM = ";KM
300 LET X=B(A)/A
310 FOR I=1 TO A
320 LET J(I)=VMAX*S(I)/(KM+S(I))
330 LET L(I)=(V(I)-J(I))^2+L(I-1)
340 LET M(I)=(V(I)-X)^2+M(I-1)
350 NEXT I
360 LET R2=1-L(A)/M(A)
370 PRINT "COEFICIENTE DE DETERMINACAO, R2= ";R2
380 END

```

vel independente S_i são conhecidos com precisão, isto é, S_i não está sujeito a erro experimental; os pesos apropriados são conhecidos; os erros em v_i não estão correlacionados, isto é, o valor do erro num v_i em nada influencia no valor do erro em qualquer outro v_i ; pode desprezar-se o erro sistemático, isto é, a curva normal de distribuição para cada erro tem o valor médio de zero.

Na prática, não é provável que se cumpram todos estes pressupostos. Alguns deles podem aproximar-se do pretendido, mas na maior parte das experiências há muito pouca informação disponível acerca de qualquer dos pressupostos. Existem testes de normalidade, mas estes necessitam de muito mais observações do que as que são normalmente feitas em experiências de cinética enzimática. Também, como já atrás referido, raramente há informação suficiente que permita o cálculo de pesos apropriados.

O principal desvio da normalidade que parece ocorrer na prática em cinética enzimática é a grande ocorrência de observações aberrantes, isto é, observações com um erro muito maior do que o esperado a partir da distribuição da maioria dos erros. Este problema é importante porque o método dos mínimos quadrados é muito sensível às observações aberrantes e produz frequentemente situações em que é a pior observação a que mais contribui para a estimativa dos parâmetros (Cornish-Bowden e Eisenthal, 1974).

Como os métodos estatísticos clássicos (ou paramétricos) assentam largamente em pressupostos acerca da distribuição dos erros e como muitos investigadores preferem que as suas conclusões dependam o menos possível de pressupostos que não sabem se são cumpridos, tem-se tentado a utilização de métodos não-paramétricos, os quais dispensam todos os pressupostos atrás enumerados, excepto o último: em qualquer observação, o erro pode ser positivo ou negativo com igual probabilidade. Neste contexto, o "direct linear plot" é, de longe, menos dependente em pressupostos do que o método dos mínimos quadrados. Além disso, uma das características mais importantes dos métodos estatísticos não-paramétricos é a sua insensibilidade a observações aberrantes. No entanto, o "direct linear plot" é inferior ao método dos mínimos quadrados em condições ideais (pressupostos cumpridos e ausência de observações aberrantes); mas quando tais condições não se observam, pode ser muito superior.

Para finalizar, refira-se sumariamente o método de Dixon (Dixon, 1972). Trata-se de um método gráfico, aplicado após o traçado da hipérbole rectangular. Com a facilidade de utilização de computadores ou mesmo

de algumas calculadoras portáteis, não nos parece sensato traçar a hipérbole rectangular e depois aplicar-lhe um método gráfico, já que o tratamento analítico da hipérbole dará, com certeza, estimativas muito mais precisas dos seus parâmetros.

6.2 - Resultados obtidos

Determinámos os valores das constantes de Michaelis para cada um dos substratos da glutamato sintase de radículas de *Zea mays* L.. Em todos os casos, a cinética de Michaelis-Menten foi obedecida.

K_m aparente para a L-glutamina

Nas figuras 6.7 e 6.8 estão representados os gráficos e no quadro 6.1 estão indicados os métodos usados, assim como os resultados obtidos relativos à determinação do K_m aparente da glutamato sintase para a L-glutamina.

Tal como referido no sub-capítulo 6.1, um dos grandes inconvenientes do método de Lineweaver-Burk é o seguinte: ao tomar-se 1/v (variável dependente), os erros associados aos menores valores de v ficam muito amplificados; isto é ainda muitíssimo aumentado se atendermos a que é aos menores valores de v que está normalmente associado um erro maior. Na determinação do K_m aparente para a L-glutamina pelo método de Lineweaver-Burk usámos 16 pares de valores (S₁, v₁); tal como indicado no quadro 6.1, a recta de regressão a que chegámos foi:

$$1/v = 0,00946 + 0,00727 \cdot 1/S, \text{ com } r^2 = 0,98586,$$

a qual forneceu um valor de K_m = 0,769 mM. Contudo, fazendo a regressão com apenas 15 pares de valores (S₁, v₁) de modo a excluir o ponto que corresponde ao menor valor de v (aquele em que, à partida, é de esperar maior erro), isto é, o ponto (S = 0,1 mM, v = 11,72 ΔE₃₄₀.min⁻¹.mg P⁻¹.10³) chegámos a uma conclusão muito diferente, a qual confirma plenamente o acima referido;

$$\text{equação da regressão: } 1/v = 0,01046 + 0,00632 \cdot 1/S \\ \text{com } r^2 = 0,96626$$

K_m aparente para a L-glutamina: 0,605 mM

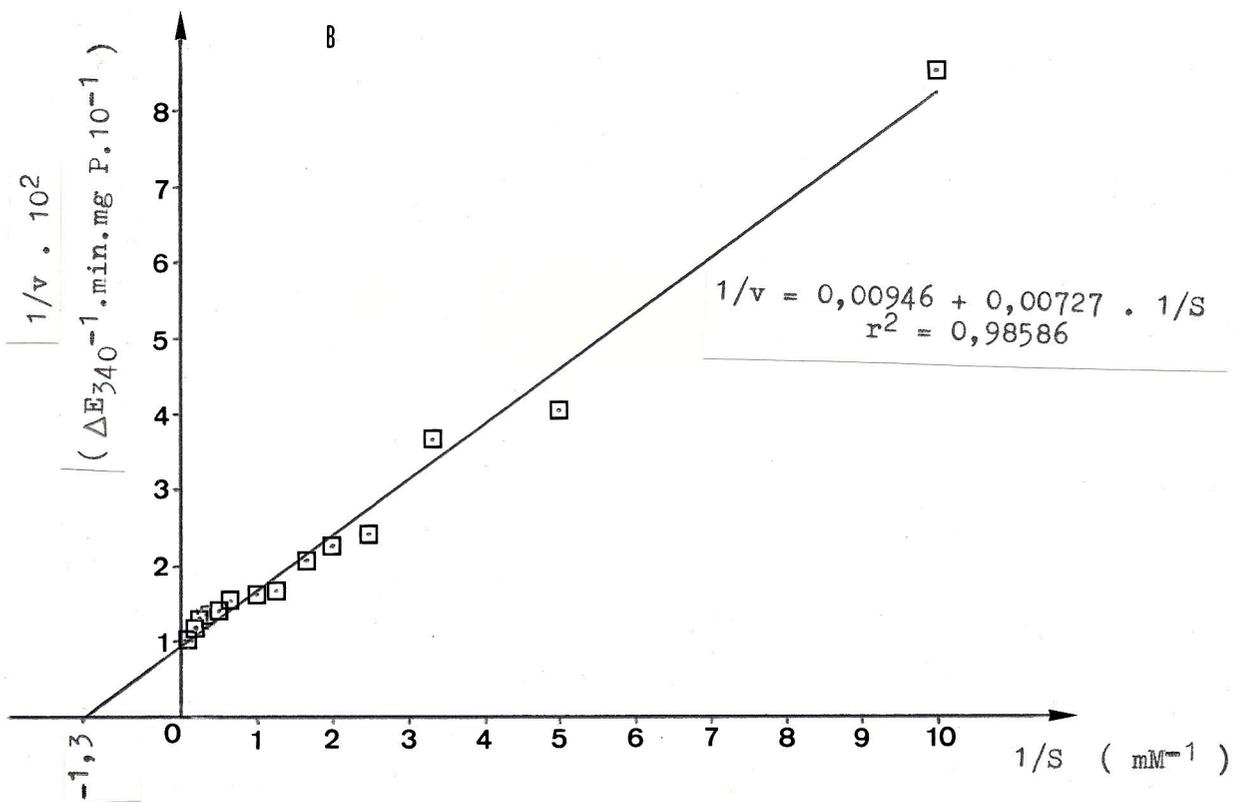
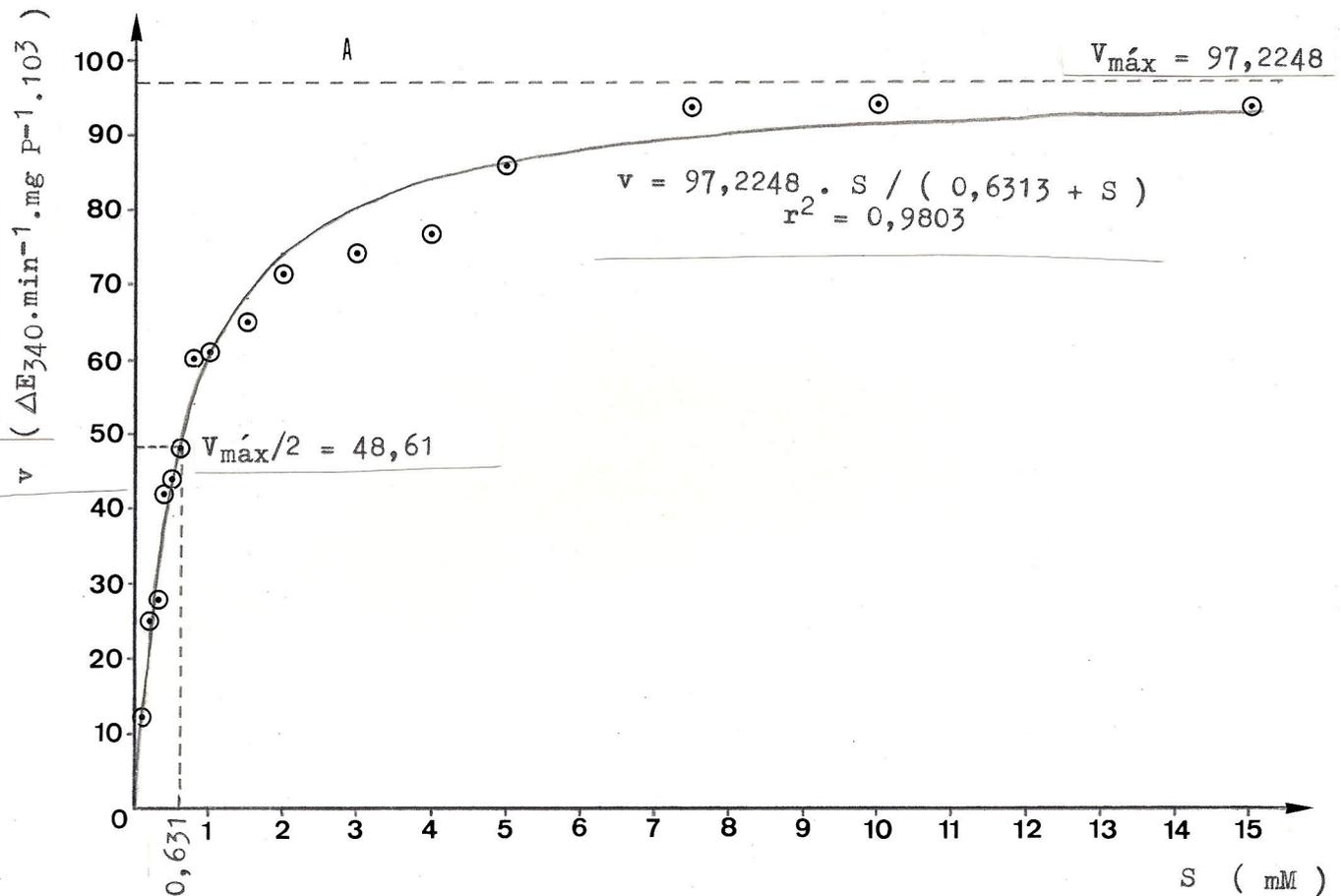


Fig. 6.7 - Determinação do K_m aparente da glutamatô sintase para a L-glutamina. A: Efeito da concentração de L-glutamina na velocidade inicial da reacção catalisada pela glutamato sintase; B: Método gráfico de Lineweaver-Burk ou "double reciprocal plot".

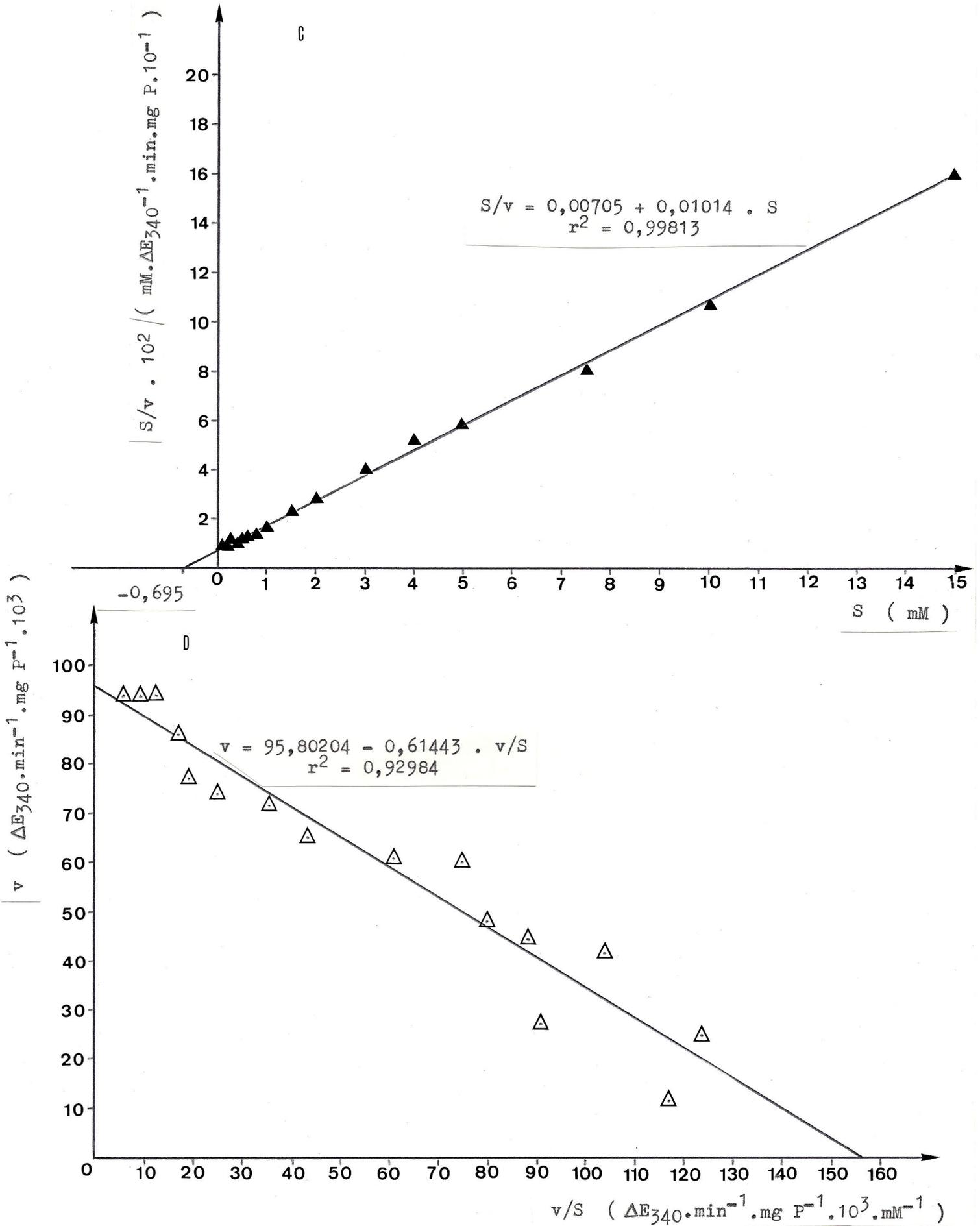


Fig. 6.8 - Determinação do Km aparente da glutamato sintase para a L-glutamina. C: Método gráfico de Hanes; D: Método gráfico de Eadie-Hofstee.

Quadro 6.1 - Valores do Km aparente da glutamato sintase para a L-glutamina

Método de cálculo	Número de observações	Equação de regressão	Valor do Km aparente (mM)	Coefficiente de determinação (r ²)
Lineweaver - Burk	16	$1/v = 0,00946 + 0,00727 \cdot 1/S$	0,769	0,986
Lineweaver - Burk	15 (ver texto)	$1/v = 0,01046 + 0,00632 \cdot 1/S$	0,605	0,966
Hanes	16	$S/v = 0,00705 + 0,01014 \cdot S$	0,695	0,998
Eadie - Hofstee	16	$v = 95,80204 - 0,61443 \cdot v/S$	0,614	0,930
"Direct linear plot"	16	—————	0,610	—
Ajustamento da hipérbole	16	$v = 97,2248 \cdot S / (0,6313 + S)$	0,631	0,980

.60.

Aliás, basta olhar para o gráfico B da figura 6.7 para constatar que, suprimindo o ponto que corresponde ao menor valor de v (portanto, maior valor de $1/v$), se obtém uma recta com uma derivada menor, a qual conduz também a um menor valor do K_m aparente para a L-glutamina.

Pode assim ver-se a enorme importância que um único ponto pode ter (e, mais grave ainda, o ponto que tem a ele associado uma maior erro) em relação à posição da recta de regressão e, conseqüentemente, ao valor do K_m .

Uma vista geral pelas figuras 6.7 e 6.8 permite-nos ainda verificar (o que está de acordo com o referido no sub-capítulo 6.1) que dos 3 métodos lineares ali representados, o que conduz à estimativa mais precisa do valor do K_m (quando comparado com os métodos mais precisos) é o de Eadie-Hofstee, sendo também aquele que origina um pior ajustamento da recta - esta situação é tão evidente que nem é necessário comparar os valores do r^2 , bastando apenas olhar para os gráficos.

Em conclusão, pode tomar-se com muita segurança o valor de 0,61 - 0,63 mM para o K_m aparente da glutamato sintase de radículas de *Zea mays* L. em relação à L-glutamina.

Km aparente para o 2-oxoglutarato

Nas figuras 6.9 e 6.10 estão representados os gráficos e no quadro 6.2 estão indicados os métodos usados, assim como os resultados obtidos relativos à determinação do K_m aparente da glutamato sintase para o 2-oxoglutarato.

As considerações feitas anteriormente em relação à L-glutamina acerca da precisão dos diferentes métodos podem ser extrapoladas para o caso do 2-oxoglutarato, como se pode ver pelas figuras 6.9 e 6.10.

Pode concluir-se que o valor do K_m aparente da glutamato sintase de radículas de *Zea mays* L. em relação ao 2-oxoglutarato é de 0,13 mM.

A glutamato sintase apresenta, pois, maior afinidade para o 2-oxoglutarato do que para a L-glutamina, como pode ser constatado pelos respectivos K_m (basta mesmo observar as hipérboles rectangulares, figuras 6.7 e 6.9).

Km aparente para o NADH

Nas figuras 6.11 e 6.12 estão representados os gráficos e no quadro 6.3 estão indicados os métodos usados, assim como os resultados obtidos

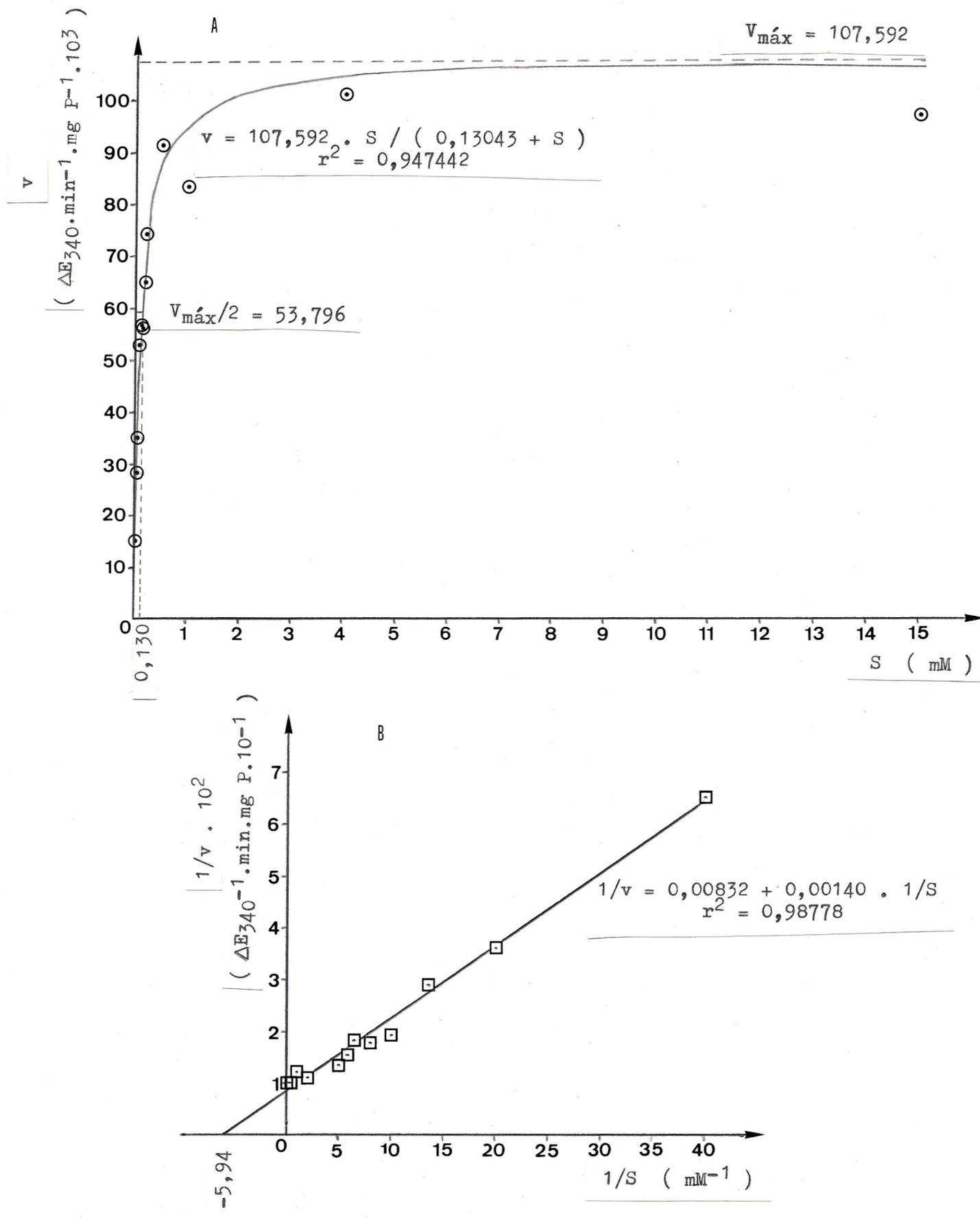


Fig. 6.9 - Determinação do Km aparente da glutamato sintase para o 2-oxoglutarato. A: Efeito da concentração de 2-oxoglutarato na velocidade inicial da reacção catalisada pela glutamato sintase; B: Método gráfico de Lineweaver-Burk ou " double reciprocal plot ".

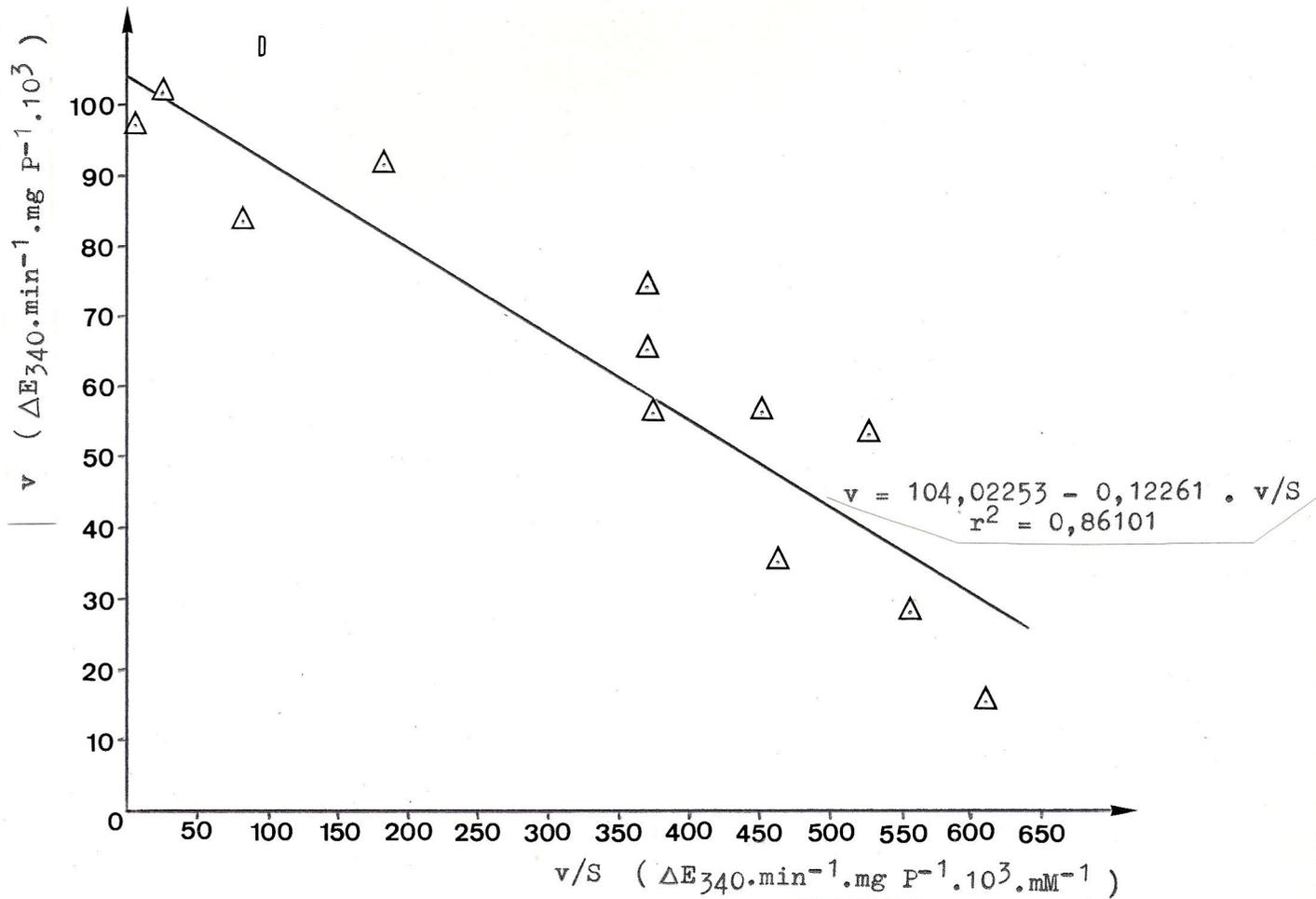
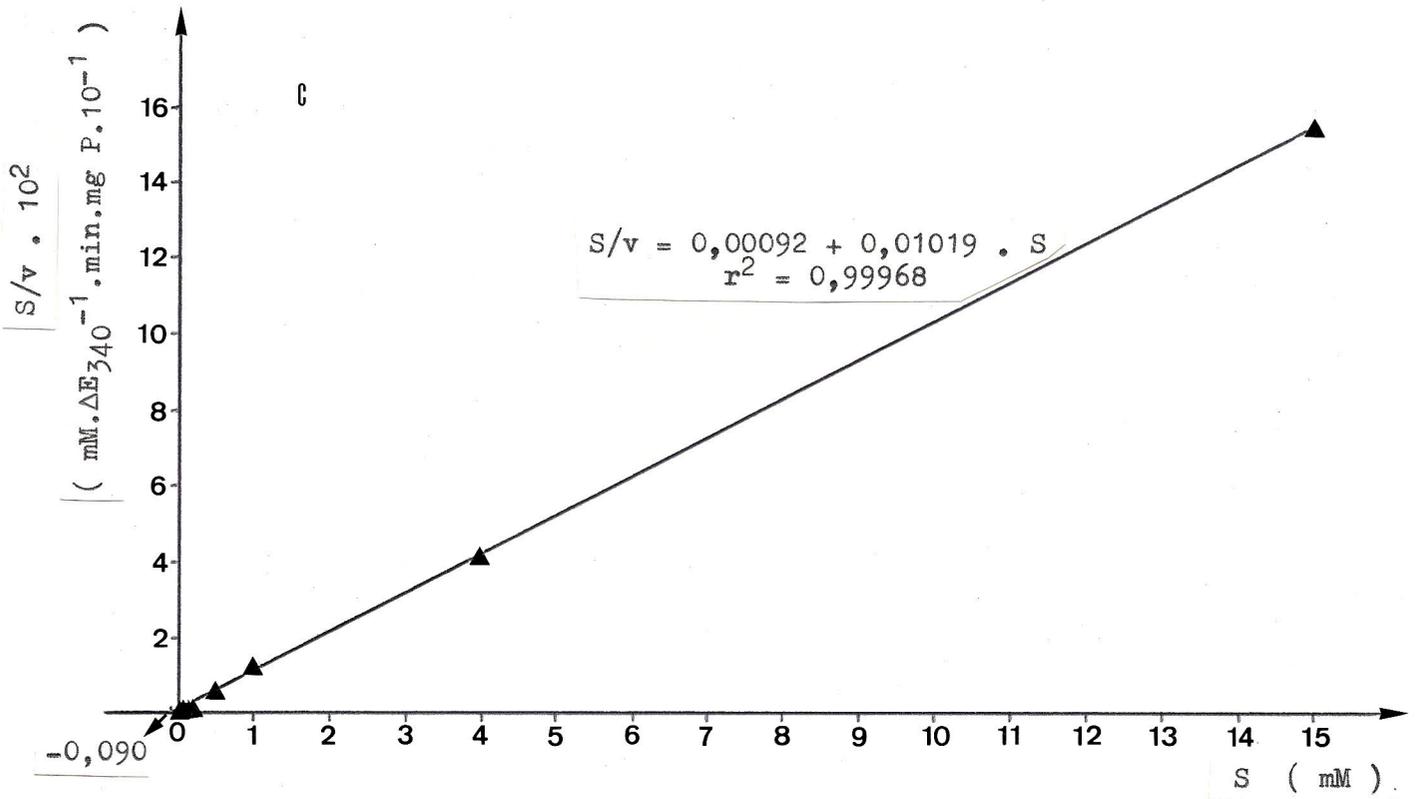


Fig. 6.10 - Determinação do K_m aparente da glutamato sintase para o 2-oxoglutarato. C : Método gráfico de Hanes ; D: Método gráfico de Eadie-Hofstee.

Quadro 6.2 - Valores do Km aparente da glutamato sintase para o 2-oxoglutarato

Método de cálculo	Número de observações	Equação de regressão	Valor do Km aparente (mM)	Coefficiente de determinação (r ²)
Lineweaver - Burk	12	$1/v = 0,00832 + 0,00140 \cdot 1/S$	0,168	0,988
Hanes	12	$S/v = 0,00092 + 0,01019 \cdot S$	0,090	0,9997
Eadie - Hofstee	12	$v = 104,02253 - 0,12261 \cdot v/S$	0,123	0,861
"Direct linear plot "	12	—————	0,131	—
Ajustamento da hipérbole	12	$v = 107,592 \cdot S / (0,13043 + S)$	0,130	0,947

.64.

dos relativamente à determinação do Km aparente da glutamato sintase para o NADH.

Ao compararmos estes resultados (quadro 6.3) com os obtidos para a L-glutamina e o 2-oxoglutarato (quadros 6.1 e 6.2), pode desde logo constatar-se que, excepto para o método de Hanes, os coeficientes de determinação obtidos para o NADH são muito inferiores - e são tão baixos a ponto de não se poder depositar confiança nos valores de Km obtidos pelos métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e ajustamento da hipérbole pelo método dos mínimos quadrados. A explicação para esta falta de correlação poderá ser devida ao facto de, ao representarmos a velocidade inicial de reacção da glutamato sintase de radículas de *Zea mays* L. em função da concentração de NADH, a curva que se obtém não é uma hipérbole quadrática (figura 6.11A), já que a velocidade inicial decresce para grandes concentrações de NADH (ver capítulo 7).

Em conclusão, e baseando-nos apenas nos métodos de Hanes e "direct linear plot" pelas razões atrás apresentadas, podemos concluir que o valor do Km aparente da glutamato sintase de radículas de *Zea mays* L. para o NADH é de 4,6 - 4,7 μ M.

6.3 - Discussão

No quadro 6.4 está representada uma revisão dos resultados publicados relativamente aos valores das constantes de Michaelis de glutamato sintase de várias origens, assim como os métodos usados na sua determinação.

Em relação aos valores por nós obtidos, eles parecem enquadrar-se bem dentro dos valores apresentados por outros autores para a glutamato sintase de plantas superiores, embora se observem diferenças notórias entre tecidos de diferentes espécies e entre diferentes órgãos da mesma espécie (quadro 6.4).

Para a totalidade dos casos conhecidos, a glutamato sintase de plantas superiores apresenta muito maior afinidade para o 2-oxoglutarato que para a L-glutamina. A razão não é conhecida, mas Boland e Benny (1977) sugeriram que esta maior afinidade poderá estar relacionada com as concentrações dos substratos *in vivo*.

Em conclusão, os valores das constantes de Michaelis da glutamato sintase de radículas de *Zea mays* por nós obtidas foram:

L- glutamina: 0,61 - 0,63 mM

2 oxoglutarato: 0,13 mM

NADH: 4,6 - 4,7 μ M

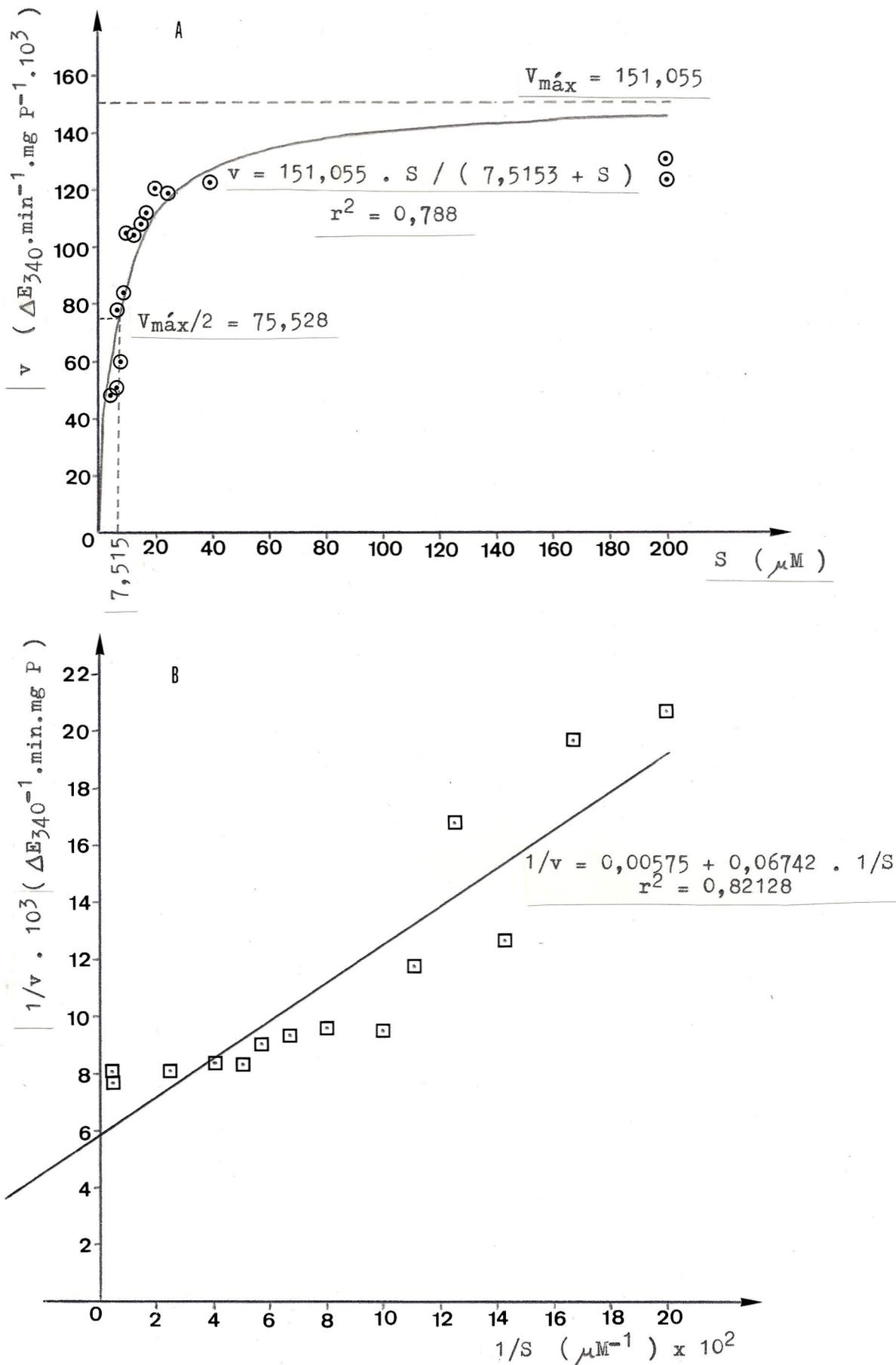


Fig. 6.11 - Determinação do K_m aparente da glutamato sintase para o NADH. A: Efeito da concentração de NADH na velocidade inicial da reacção catalisada pela glutamato sintase; B: Método gráfico de Lineweaver-Burk ou "double reciprocal plot".

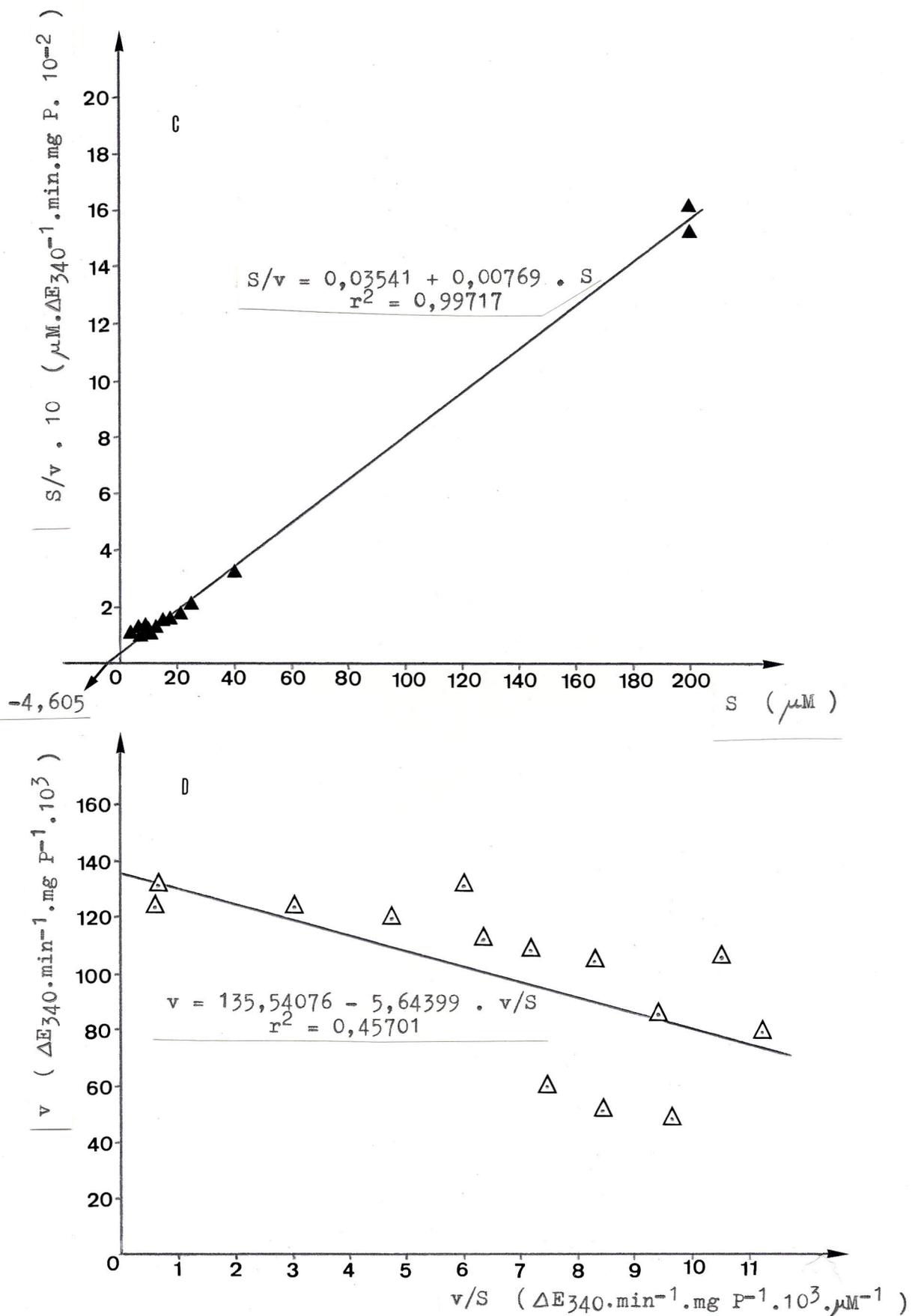


Fig. 6.12 - Determinação do Km aparente da glutamato sintase para o NADH. C: Método gráfico de Hanes; D : Método gráfico de Eadie-Hofstee.

Quadro 6.3 - Valores do Km aparente da glutamato sintase para o NADH

Método de cálculo	Número de observações	Equação de regressão	Valor do Km aparente (μM)	Coefficiente de determinação (r^2)
Lineweaver - Burk	14	$1/v = 0,00575 + 0,06742 \cdot 1/S$	11,721	0,821
Hanes	14	$S/v = 0,03541 + 0,00769 \cdot S$	4,605	0,997
Eadie - Hofstee	14	$v = 135,54076 - 5,64399 \cdot v/S$	5,644	0,457
"Direct linear plot"	14	—————	4,720	—
Ajustamento da hipérbole	14	$v = 151,055 \cdot S/(7,5153 + S)$	7,515	0,788

Quadro 6.4 - Constantes de Michaelis da glutamato sintase de várias origens

Origem	Km para a L-glutamina (mM)	Km para o 2-oxoglutarato (mM)	Km para o NADH (μ M)	Método de cálculo	Referência
<i>Pisum sativum</i> L. (raízes)	1,0	0,5	7,0	?	Mifflin e Lea (1975)
<i>Pisum sativum</i> L. (cotilédones)	1,43	0,96	13,3	Lineweaver - Burk	Beevers e Storey (1976)
<i>Lupinus angustifolius</i> L. (nódulos)	0,4	0,039	1,3	Lineweaver - Burk	Boland e Benny (1977)
<i>Zea mays</i> L. (endosperma)	1,35	0,57	7,0	Lineweaver - Burk	Sodek e Silva (1977)
<i>Vicia faba</i> L. (folhas)	0,33	0,15	-	"Direct linear plot"	Wallsgrove <i>et al.</i> (1977)
<i>Glycine max</i> (L.) Merr. (cotilédones)	1,1	0,4	8,3	Lineweaver - Burk	Storey e Reporter (1978b)
<i>Glycine max</i> (L.) Merr. (cultura de células)	0,63	0,064	9,0	Lineweaver - Burk	Chiu e Shargool (1979)
<i>Zea mays</i> L. (folhas)	1,1	0,24	-	Lineweaver - Burk	Match <i>et al.</i> (1979a)
<i>Spinacea oleracea</i> L. (folhas)	0,556	0,089	-	Lineweaver - Burk	Tamura <i>et al.</i> (1980a)
<i>Oryza sativa</i> L. (folhas)	0,27-0,57	0,33	-	Lineweaver - Burk	Suzuki e Gadal (1982)
<i>Zea mays</i> L. (raízes)	0,61-0,63	0,13	4,6-4,7	Vários - ver sub-capítulo 6.2	Presente trabalho

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, P. 1965. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, 96 : 595-606.
- ARIMA, Y. 1978. Glutamate synthase in rice root extract and the relationship among electron donors, nitrogen donors and its activity. *Plant and Cell Physiol.*, 19 : 955-961.
- ATKINS, G.L., NIMMO, I.A. 1975. A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochem. J.*, 149 : 775-777.
- BARDSLEY, W.G., CHILDS, R.E. 1975. Sigmoid curves, non-linear double-reciprocal plots and allosterism. *Biochem. J.*, 149 : 313-328.
- BEEVERS, L., STOREY, R. 1976. Glutamate synthetase in the developing cotyledons of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.*, 57 : 862-866.
- BOLAND, M.J., BENNY, A.G. 1977. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: purification and properties of NADH - dependent glutamate synthase from lupin nodules. *Eur. J. Biochem.*, 79 : 355-362.
- BOLAND, M.J., FORDYCE, A.M., GREENWOOD, R.M. 1978. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: a comparative study. *Aust. J. Plant Physiol.*, 5 : 553-559.
- BOLAND, M.J., KENNEDY, L.D. 1979. Stereospecificity and NADH-H₂O hydrogen exchange of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. *FEBS Letters*, 108 : 237-239.
- BOLAND, M.J. 1981. NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules: reaction with oxidised and reduced 3-acetylpyridine-adenine dinucleotide. *Eur. J. Biochem.*, 115 : 485-489.
- BOWLEY, A.L. 1928. *F.Y. Edgeworth's contributions to mathematical statistics*. Royal Statistical Society. London.
- BROWN, C.M., DILWORTH, M.J. 1975. Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and bacteroides. *J. Gen. Microbiol.*, 86 : 39-48.
- CHIU, J.Y., SHARGOOL, P.D. 1979. Importance of glutamate synthase in glutamate synthesis by soybean cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, 63 : 409-415.
- CORNISH-BOWDEN, A. 1979. *Fundamentals of enzyme kinetics*. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd. London.
- CORNISH-BOWDEN, A., EISENTHAL, R. 1974. Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. *Biochem. J.*, 139 : 721-730.

- CUATRECASAS, P., FUCHS, S., ANFINSEN, C.B. 1967a. Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 242 : 1541-1547.
- CUATRECASAS, P., FUCHS, S., ANFINSEN, C.B. 1967b. The binding of nucleotides and calcium to the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 242 : 3063-3067.
- DAVIES, D.D., TEIXEIRA, A.N. 1975. The synthesis of glutamate and the control of glutamate dehydrogenase in pea mitochondria. *Phytochemistry*, 14: 647-656.
- DIXON, M. 1972. The graphical determination of Km and Ki. *Biochem. J.*, 129 : 197-202.
- DIXON, M., WEBB, E.C. 1979. *Enzymes*. Longman Group Limited. London.
- DOUGALL, D.K. 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58 : 639-646.
- DOWD, J.E., RIGGS, D.S. 1965. A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. *J. Biol. Chem.*, 240 : 863-869.
- DUNN, S.D., KLUCAS, R.V. 1973. Studies on possible routes of ammonium assimilation in soybean root nodule bacteroids. *Can. J. Microbiol.*, 19 : 1493-1499.
- EADIE, G.S. 1942. The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. *J. Biol. Chem.*, 146 : 85-93.
- EARL, C.D., AUSUBEL, F.M. 1983. The genetic engineering of nitrogen fixation. *Nut. Rev.*, 41 : 1-6.
- EISENTHAL, R., CORNISH-BOWDEN, A. 1974. The direct linear plot: a new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem. J.*, 139 : 715-720.
- FERREIRA, R.B. 1981. Glutamato sintase: revisão bibliográfica e ensaios de purificação em radículas de milho (*Zea mays* L.). Relatório final do curso de Engenheiro Agrônomo. ISA. Lisboa.
- FOLKES, B.F., SIMS, A.P. 1974. The significance of amino acid inhibition of NADP-linked glutamate dehydrogenase in the physiological control of glutamate synthesis in *Candida utilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 82 : 77-95.
- FOWLER, M.W., JESSUP, W., STEPAN-SARKISSIAN, G. 1974. Glutamate synthetase type activity in higher plants. *FEBS Letters*, 46 : 340-342.
- FRIEDEN, C. 1967. Treatment of enzyme kinetic data. *J. Biol. Chem.*, 242 : 4045-4052.

- GEARY, L.E., MEISTER, A. 1977. On the mechanism of glutamine-dependent reductive amination of α -ketoglutarate catalyzed by glutamate synthase. *J. Biol. Chem.*, 252 : 3501-3508.
- GROAT, R.G., VANCE, C.P. 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfafa (*Medicago sativa* cultivar Vernal): developmental patterns and response to applied nitrogen. *Plant Physiol.*, 67 : 1198-1203.
- HALDANE, J.B.S., STERN, K.G. 1932. *Allgemeine chemie der enzyme*. Steinkopff Verlag, Dresden & Leipzig.
- HANES, C.S. 1932. Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.*, 26 : 1406-1421.
- HARTMAN, S.C. 1973. *The enzymes of glutamine metabolism*. (Prusiner, S. & Stadtman, E.R. eds.), pp. 319-330. Academic Press. New York.
- HEMILA, I.A., MANTSALA, P.I. 1978. Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.*, 173 : 45-52.
- HOFSTEE, B.H.J. 1952. Specificity of esterases. I. Identification of two pancreatic aliesterases. *J. Biol. Chem.*, 199 : 357-364.
- JOHNSON, B., BROWN, C.M. 1974. The enzymes of ammonia assimilation in *Schizosaccharomyces* spp. and in *Saccharomyces ludwigii*. *J. Gen. Microbiol.*, 85 : 169-172.
- KALCKAR, H.M. 1947. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. III. Studies of the enzymes of purine metabolism. *J. Biol. Chem.*, 167 : 461-475.
- KANG, S., TITUS, J.S. 1980. Activity profiles of enzymes involved in glutamine and glutamate metabolism in the apple during autumnal senescence. *Physiol. Plant.*, 50 : 291-297.
- KHEDOURI, E., ANDERSON, P.M., MEISTER, A. 1966. *Biochemistry*, 5 : 3552-3557.
- LEA, P.J., MIFLIN, B.J. 1974. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251 : 614-616.
- LEA, P.J., NORRIS, R.D. 1976. The use of amino acid analogues in studies on plant metabolism. *Phytochemistry*, 15:585-595.
- LEWIS, O.A.M., 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 : 596-606.
- LINEWEAVER, H., BURK, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, 56 : 658-666.

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- MANTSALA, P., ZALKIN, H. 1976a. Glutamate synthase: properties of the glutamine-dependent activity. *J. Biol. Chem.*, 251 : 3294-3299.
- MANTSALA, P., ZALKIN, H. 1976b. Properties of apoglutamate synthase and comparison with glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 251 : 3300-3305.
- MARKUS, M., HESS, B., OTTAWAY, J.H., CORNISH-BOWDEN, A. 1976. The analyses of kinetic data in biochemistry. A critical evaluation of methods. *FEBS Letters*, 63 : 225-230.
- MATOH, T., SUZUKI, F., IDA, S. 1979a. Corn leaf glutamate synthase: purification and properties of the enzyme. *Plant and Cell Physiol.*, 20 : 1329-1340.
- MATOH, T., TAKAHASHI, E., IDA, S. 1979b. Glutamate synthase in developing pea cotyledons: occurrence of NADH-dependent and ferredoxin-dependent enzymes. *Plant and Cell Physiol.*, 20 : 1455-1459.
- MATOH, T., IDA, S., TAKAHASHI, E. 1980. A rapid and sensitive assay for ferredoxin-glutamate synthase. *Bull. Res. Inst. Food Sci.*, Kyoto University, No. 43.
- MEERS, J.L., TEMPEST, D.W., BROWN, C.M. 1970. Glutamine (amide): 2-oxo glutarate amino transferase oxido-reductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 64 : 187-194.
- MEULEN, P.Y. van der, BASSHAM, J.A. 1959. Study of inhibition of azaserine and diazo-oxo-norleucine (DON) on the algae *Scenedesmus* and *Chlorella*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 81 : 2233-2239.
- MICHAELIS, L., MENTEN, M.L. 1913. *Biochem. Z.* 49 : 333-369.
- MIFLIN, B.J., LEA, P.J. 1975. Glutamine and asparagine as nitrogen donors for reductant-dependent glutamate synthesis in pea roots. *Biochem. J.*, 149 : 403-409.
- MIFLIN, B.J., LEA, P.J. 1976a. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, 15 : 873-885.
- MIFLIN, B.J., LEA, P.J. 1976b. The path of ammonia assimilation in the plant kingdom. *TIBS*, 1 : 103-106.
- MIFLIN, B.J., LEA, P.J. 1977. Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28 : 299-329.

- MIFLIN, B.J., LEA, P.J. 1980. Ammonia assimilation. *Em* The biochemistry of plants: a comprehensive treatise. P.K. Stumpf & E.E. Conn, Editors-in-chief. Volume 5: Amino acids and derivatives; B.J. Miflin Ed. Academic Press. New York.
- MILLER, R.E., STADTMAN, E.R. 1972. Glutamate synthase from *Escherichia coli*: an iron sulphide flavoprotein. *J. Biol. Chem.*, 247 : 7407-7419.
- NAGATINI, H., SHIMIZU, M., VALENTINE, R.C. 1971. The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. *Arch. Mikrobiol.*, 79 : 164-175.
- OAKS, A., JONES, K., MISRA, S. 1979. A comparison of glutamate synthase obtained from maize endosperms and roots. *Plant Physiol.*, 63 : 793-795.
- OAKS, A., STULEN, I., JONES, K., WINSPEAR, M.J., MISRA, S., BOESEL, I.L. 1980. Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. *Planta*, 148 : 477-484.
- OHYAMA, T., KUMAZAWA, K. 1980. Nitrogen assimilation in soybean (*Glycine max*) nodules: I. The role of glutamine synthetase-glutamate synthase system in the assimilation of ammonia produced by nitrogen fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 26 : 109-116.
- PINKUS, L.M., MEISTER, A. 1972. Identification of a reactive cysteine residue at the glutamine binding site of carbamyl phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.*, 247 : 6119-6127.
- PORTER, W.R., TRAGER, W.F. 1977. Improved non-parametric statistical methods for the estimation of Michaelis-Menten kinetic parameters by the direct linear plot. *Biochem. J.*, 161 : 293-302.
- RHODES, D., RENDON, G.A., STEWART, G.R. 1976. The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor*. *Planta*, 129 : 203-210.
- RHODES, D., SIMS, A.P., FOLKES, B.F. 1980. *Phytochemistry*, 19 : 357-365.
- ROBERTSON, J.G., WARBURTON, M.P., FARNDEN, K.J. 1975. Induction of glutamate synthase during nodule development in lupin. *FEBS Letters*, 55 : 33-37.
- SADLER, R., SHAW, M. 1979. Pathways of nitrogen assimilation in rust infected flax cotyledons. *Z. Pflanzenphysiol.*, 93 : 105-115.
- SAKAMATO, N., KOTRE, A.M., SAVAGEAU, M.A. 1975. *J. Bacteriol.*, 124 : 775-783.
- SEN, D., SCHULMAN, H.M. 1980. Enzymes of ammonia assimilation in the cytosol of developing soybean (*Glycine max*) root nodules. *New Phytol.*, 85 : 243-250.

- SIMS, A.P., FOLKES, B.F. 1964. A kinetic study of the assimilation of (¹⁵N)-ammonia and the synthesis of amino acids in an exponentially growing culture of *Candida utilis*. *Proc. Roy. Soc. B*, 159 : 479-502.
- SKOKUT, T.A., WOLK, C.P., THOMAS, J., MEEKS, J.C., SHAFFER, P.W. 1978. Initial organic products of assimilation of (¹³N) ammonium and (¹³N) nitrate by tobacco cells cultured on different sources of nitrogen. *Plant Physiol.*, 62 : 299-304.
- SODEK, L., SILVA, W.J. 1977. Glutamate synthase: a possible role in nitrogen metabolism of the developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, 60 : 602-605.
- SOMMERVILLE, C.R., OGREN, W.L. 1980. Inhibition of photosynthesis in *A. rabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature*, 286 : 257-259.
- STEIN, E.A., FISCHER, E.H. 1958. The resistance of α -amylases towards proteolytic attack. *J. Biol. Chem.*, 232 : 867-879.
- STEWART, G.R., RHODES, D. 1977a. Control of enzyme levels in the regulation of nitrogen assimilation. *Em Regulation of enzyme synthesis and activity*. Ed. H. Smith. Academic Press. London.
- STEWART, G.R., RHODES, D. 1977b. A comparison of the characteristics of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase from *Lemna minor* L.. *New Phytol.*, 79 : 257-268.
- STEWART, G.R., RHODES, D. 1978. Nitrogen metabolism of halophytes. III. Enzymes of ammonia assimilation. *New Phytol.*, 80 : 307-316.
- STEWART, W.D.P., ROWELL, P. 1975. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65 : 846-856.
- STOREY, R., BEEVERS, L. 1976. Glutamate synthetase activity in developing pea cotyledons. *Plant Physiol. Suppl.*, 57 : 204.
- STOREY, R., REPORTER, M. 1978. Amino acid metabolism in developing soy bean (*Glycine max*)-glutamate synthase in cotyledons. *Can. J. Bot.* 56 : 1349-1356.
- SUZUKI, A., GADAL, P. 1982. Glutamate synthase (EC.1.4.7.1) from rice (*Oryza sativa* cultivar Delta) leaves. *Plant Physiol.*, 69 : 848-852.
- TAMURA, G., KANKI, M., HIRASAWA, M., OTO, M. 1980a. The purification and properties of glutamate synthase from spinach leaves, and its dependence on ferredoxin. *Agric. Biol. Chem.*, 44 : 925-927.

- TAMURA, G., OTO, M., HIRASAWA, M., AKETAGAWA, J. 1980b. Isolation and partial characterization of homogeneous glutamate synthase from *Spinacea oleracea*. *Plant Sci. Letters*, 19 : 209-215.
- TEMPEST, D.W., MEERS, J.L., BROWN, C.M. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.*, 117 : 405-407.
- THOMAS, J., WOLK, C.P., SHAFFER, P.W., AUSTIN, S.M., GALONSKY, A. 1975. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67 : 501-507.
- TROTТА, P.P., WELLNER, V.P., PINKUS, L.M., MEISTER, A. 1973. Observations on the pH dependence of the glutaminase activity of a glutamine amidotransferase, carbamylfosfato sintetase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70 : 2717-2721.
- TROTТА, P.P., PLATZER, K.E.B., HASCHEMEYER, R.H., MEISTER, A. 1974. Glutamine-binding subunit of glutamate synthase and partial reactions catalized by this glutamine amidotransferase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71 : 4607-4611.
- TROTТА, P.P., PINKUS, L.M., MEISTER, A. 1974. Inhibition by dithiothreitol of the utilization of glutamine by carbamyl phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.*, 249 : 1915-1921.
- WALLSGROVE, R.M., HAREL, E., LEA, P.J., MIFLIN, B.J. 1977. Studies on glutamate synthase from the leaves of higher plants. *J. Exp. Bot.*, 28 : 588-596.
- WASHITANI, I., SATO, S. 1977. Studies on the function of proplastids in the metabolism of in vitro cultured tobacco cells. II. Glutamine synthetase/glutamate synthetase pathway. *Plant and Cell Physiol.*, 18 : 505-512.
- WHARTON, C.W., CORNISH-BOWDEN, A., BROCKLEHURST, K., CROOK, E.M. 1974. Kinetics of the hydrolysis of N-benzoyl-L-serine methyl ester catalysed by bromelain and by papain. *Biochem. J.*, 141 : 365-381.
- WILKINSON, G.N. 1961. Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.*, 80 : 324-332.
- WOLK, C.P., THOMAS, J., SHAFFER, P.W., AUSTIN, S.M., GALONSKY, A. 1976. The pathway of nitrogen metabolism after fixation of ^{13}N -labelled nitrogen gas by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.*, 251 : 5027-5034.
- YONEYAMA, T., KUMAZAWA, K. 1974. A kinetic study of the assimilation of ^{15}N -labelled ammonium in rice seedling roots. *Plant and Cell Physiol.*, 15 : 655-661.