

ESTUDO PRELIMINAR SOBRE A OXIDAÇÃO DE L-MALATO
POR ENZIMA MICELAR DE *Streptomyces aureofaciens*

Alirio de Carvalho, Cecília Lauce e Rubens Molinari,
Departamento de Química da Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Araraquara, C. P. 174, 14.800
Araraquara, São Paulo, Brasil.

SUMÁRIO

Em micélio de *Streptomyces aureofaciens* foi detectada a presença de oxidase(s) de L-malato produtora(s) de cetoácido(s). Trata-se de sistema enzimático contendo pelo menos duas atividades específicas para NAD (dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) e uma delas com pH ótimo 7,0.

SUMMARY

Oxidase(s) of L-malato producer(s) of keto acid(s) were detected in mycelium of *Streptomyces aureofaciens*. It appears to be an enzyme system involving at least two activities specific for NAD (nicotinamide adenine dinucleotide), and one of them has an optimum pH of 7.0.

INTRODUÇÃO

As atividades enzimáticas frente a L-malato têm sido estudadas praticamente em toda a escala biológica (1). No que se refere aos microrganismos, estudos foram feitos em fungos (2,3), levedos (4, 5) e bactérias (6, 7), entre outros.

Foram encontradas enzimas de transformação de L-malato em oxaloacetato (desidrogenases málicas típicas) e de descarboxilação de L-malato a piruvato (enzimas málicas ou desidrogenases málicas descarboxilantes).

Em *S. aureofaciens* enzimas destes tipos foram encontradas e algumas propriedades estudadas, como descrito nos trabalhos de Tintorova e colab. (8) e de Jechova e colab. (9).

O presente trabalho descreve as experiências iniciais que nos permitiram detectar a presença de, pelo menos, duas atividades em extrato micelar de *S. aureofaciens*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Dosagem da desidrogenase málica

A atividade enzimática foi medida através da transformação do L-malato em cetoácido, seguida da determinação deste pela formação da sua 2,4-dinitrofenilhidrazona, segundo o processo a seguir.

A um tubo cônico de centrifuga foram adicionados: 200 μ moles de tampão de fosfato de potássio a pH 7,0, 50 μ moles de L-malato de potássio, 50 μ g de NAD, 1,0 ml da preparação enzimática a dosar e água suficiente para 3,0 ml. Após equilíbrio térmico a mistura foi incubada a 35°C durante 10 minutos, contados após a adição da enzima. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 ml de ácido tricloroacético a 30%. O cetoácido formado pela ação da enzima sobre o L-malato foi medido pelo método de Kachmar & Boyer (10), modificado por Robinson e colab. (11). Tubos controles ("brancos") foram preparados omitindo-se L-malato, NAD e enzima. A atividade foi expressa pela diferença entre a leitura a 435 nm do tubo reação e seus controles e expressa pela notação ΔE_{435} .

Microorganismo, meio de crescimento, técnica de fermentação e avaliação do crescimento

O microorganismo utilizado neste trabalho foi o *Streptomyces aureofaciens*, linhagem NRRL-B-1286.

A técnica de crescimento foi basicamente a empregada por Molinari (12), sendo que a linhagem do microorganismo foi substituída pela acima indicada e o meio básico (quimicamente definido) foi enriquecido em fosfato, cuja concentração final passou a ser 0,00750M e o teor de carbonato de cálcio foi reduzido a 2,0 g/l.

Preparação dos extratos micelares

O micélio foi coletado por centrifugação e lavado três vezes com sulfato de magnésio 0,005 M. Em seguida foi suspenso em tampão fos-

fato de potássio 0,10 M pH 7,0, homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e o micélio foi congelado em camada fina em geral de porcelana previamente resfriado a 20°C abaixo de zero. A seguir o micélio congelado foi moído até se obter pasta homogênea e novamente congelado e triturado 5 vezes e depois suspenso no tampão indicado (36,0 mg de micélio seco por mililitro de tampão) e centrifugado a 12000 x g durante 30 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante foi utilizado para os estudos, enquanto o resíduo foi abandonado.

Fracionamento salino do extrato micelar

O fracionamento salino foi realizado pela adição lenta de sulfato de amônio sólido ao extrato em um becker mantido em banho de gelo e sob agitação constante. Após a adição do sal continuou-se a agitação por 10 minutos e centrifugou-se durante 15 minutos a 12000 x g a 5°C. O precipitado foi suspenso em 20 mililitros de tampão fosfato de potássio 0,10 M pH 7,0. O sobrenadante foi utilizado para novo corte com maior concentração do sal e assim sucessivamente, conforme será descrito na parte experimental.

Demais determinações, operações e materiais

Os reagentes e compostos químicos empregados foram, sempre que possível, de grau analítico e de boa procedência.

A água empregada, tanto nas fermentações como nas dosagens, foi água bidestilada em aparelho de cobre estanhado e desionizada por resinas trocadoras de íons ("Amberlite" IRC-50 e "Amberlite" IR 400, produzidas por Rohm & Haas Co., Philadelphia, USA).

A determinação das absorvâncias foi feita em espectrofotômetro de quartzo de Marca ZEISS (Carl Zeiss, Alemanha), modelo PMQ-II.

As medidas de pH foram feitas com aparelho METROHM (Metrohm AG, Suíça), modelo E-322.

A homogeneização do micélio (ruptura dos agregados micelares) foi feita em homogeneizador de vidro com êmbolo de "teflon" (semelhante aos descritos por Brendler (13)).

RESULTADOS

Seleção do meio de cultivo

Os meios descritos na Tabela I foram ensaiados, em experiências de 40 horas de crescimento, como meios de crescimento adequados ao acúmulo da enzima pelo microorganismo.

TABELA I

Meios de cultura utilizados para o crescimento

| Componentes | MEIOS | | | | | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Sacarose (g/l) | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 25,0 | 25,0 |
| L-leucina (M) | — | 0,050 | — | — | — | — | — | — |
| L-glutamato de sódio (M) | — | — | 0,050 | — | — | — | — | — |
| Hidrolisado de caseína | — | — | — | — | — | — | — | — |
| "Difco" (g/l) | — | — | — | 5,0 | — | 5,0 | 5,0 | — |
| Extrato de levedo | — | — | — | — | — | — | — | — |
| "Difco" (g/l) | — | — | — | — | 5,0 | 5,0 | 5,0 | — |
| L-malato de potássio (M) | — | — | — | — | — | — | 0,10 | 0,10 |

Todos os meios contém ainda sulfato de amônio 0,030 M; K_2HPO_4 0,00750 M; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,20 g/l; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,010 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,010 g/l; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,010 g/l; $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,0050 g/l e $CaCO_3$ 2,0 g/l.

A Tabela II mostra o crescimento do microrganismo nos meios da Tabela anterior, bem como os resultados obtidos com os respectivos extratos micelares.

TABELA II

| Meios | Crescimento do microrganismo e atividade nos extratos | |
|-------|---|--|
| | Concentração micelar (mg/ml) | Atividade dos extratos (ΔE_{435} /ml) com NAD sem NAD |
| 1 | 5,4 | 0,268 0,108 |
| 2 | 5,5 | 0,355 0,153 |
| 3 | 8,0 | 0,732 0,313 |
| 4 | 7,8 | 0,582 0,215 |
| 5 | 7,4 | 0,534 0,190 |
| 6 | 9,8 | 0,572 0,263 |
| 7 | 10,8 | 0,678 0,223 |
| 8 | 5,6 | 0,768 0,274 |

A Tabela II mostra que o meio 3 pode ser escolhido como um dos mais adequados porquanto o micélio dele derivado é bastante rico em atividade, é um meio bastante satisfatório ao crescimento e é quimicamente definido.

A mesma tabela mostra que, mesmo na ausência de coenzima (NAD) exógeno, o micélio contém enzima capaz de produzir cetoácido na presença de L-malato. Esta atividade, entretanto, é aumentada de 2,2 a 3,0 vezes pela adição de NAD na quantidade descrita no método.

Fracionamento salino

O extrato micelar (meio com glutamato) foi fracionado com sulfato de amônio e a atividade enzimática medida nas diferentes frações obtidas, conforme indicado na Tabela III.

TABELA III

Atividade enzimática nas frações

| Fração | Coenzima | Atividade total ΔE_{435} |
|---------|----------|----------------------------------|
| 0 — 15 | NAD | 2,08 |
| 15 — 30 | — | 0,48 |
| 30 — 60 | NAD | 6,40 |
| 60 — 90 | — | 0,92 |
| | NAD | 14,20 |
| | — | 2,60 |
| | NAD | 0,72 |
| | — | 0,23 |

A Tabela III mostra que o sistema enzimático que transforma L-malato em cetoácido, na presença de NAD, ao ser fracionado com sulfato de amônio concentra-se nos cortes de 15 a 60% de saturação.

A Tabela IV contém dados do refracionamento com sulfato de amônio das frações 15 — 30 e 30 — 60% de saturação, reunidas.

A Tabela indicada sugere que o sistema enzimático em estudo é complexo, pois há, pelo menos, 2 frações distintas onde as atividades se concentram: 15 — 20 e 30 — 40% de saturação.

Atividade frente a NADP

A Tabela V mostra que as frações 15 — 20 e 30 — 40% de saturação são praticamente inativas na oxidação de L-malato catalizada pelo coenzima NADP.

TABELA IV

| Atividade enzimática nas novas frações | | Atividade total ΔE_{435} |
|--|----------|-------------------------------------|
| Fração | Coenzima | |
| 15 — 20 | NAD | 4,72 |
| | — | 1,00 |
| 20 — 30 | NAD | 3,64 |
| | — | 0,56 |
| 30 — 40 | NAD | 5,93 |
| | — | 0,64 |
| 40 — 50 | NAD | 2,40 |
| | — | 0,16 |
| 50 — 60 | NAD | 0,68 |
| | — | 0,12 |

TABELA V

| Atividade enzimática frente a NADP | | Atividade total ΔE_{435} |
|------------------------------------|----------|-------------------------------------|
| Fração | Coenzima | |
| 15 — 20 | NADP | 1,28 |
| | — | 1,20 |
| 30 — 40 | NADP | 1,52 |
| | — | 1,15 |

Algumas características da fração 30 — 40% de saturação.
Influência do pH.

A Figura 1 mostra o efeito da variação de pH na atividade enzimática da fração acima.

Observa-se que a atividade é maior no intervalo 6,33 — 7,38, estando por volta de 7 o pH ótimo.

Efeito da concentração do coenzima

Os resultados estão indicados na Figura 2, onde se observa que, nas condições de trabalho, bastam 80 μ g de NAD para saturar-se a enzima.

Nas condições de dosagem (50 μ g) a enzima está 95% saturada.

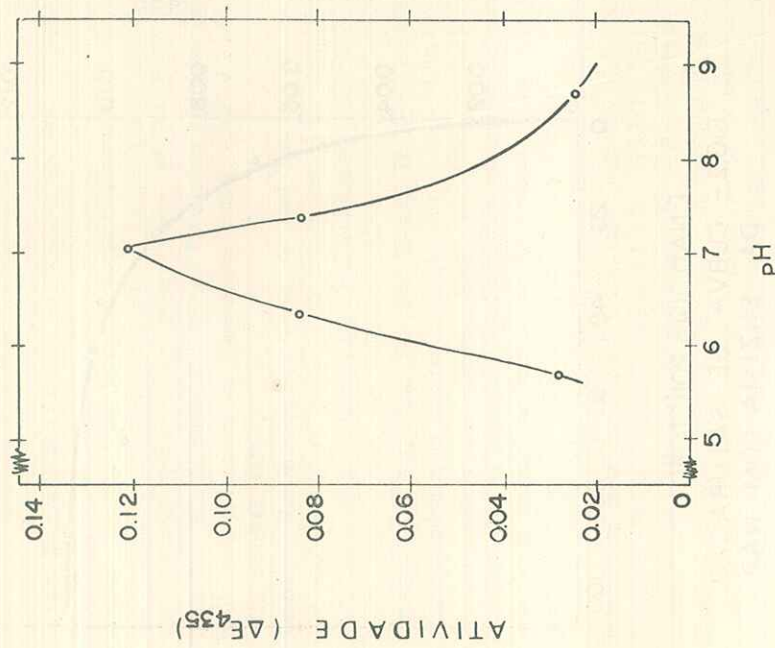


FIG. 1 - INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

DISCUSSÃO

A atividade enzimática detectada no micélio do *S. aureofaciens* sugere a presença de oxidase(s) de L-malato produtora(s) de cetoácido. Como foi mostrado na Tabela IV, trata-se de sistema enzimático constituído de pelo menos duas atividades, ambas solúveis.

Nossos dados, no entanto, são preliminares não possibilitando a identificação do cetoácido formado, o qual poderia ser oxaloacetato (desidrogenase málica típica) ou piruvato (desidrogenase málica des-carboxilante).

Tinterova e colab. (8) também isolaram, conforme foi visto na introdução, duas desidrogenases málicas (isoenzimas) de *S. aureofa-*

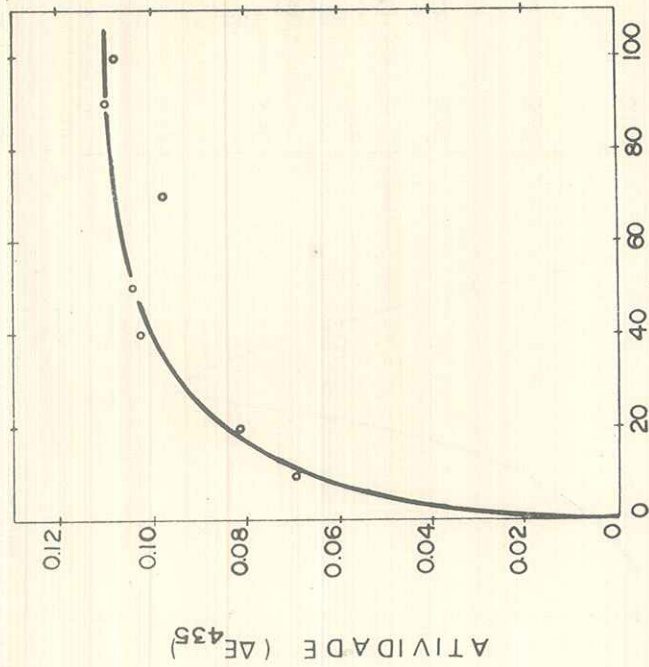


FIG.2 - CURVA DE SATURAÇÃO DA ENZIMA COM NAD

ciens. Contudo, pelo menos uma das atividades ora detectadas parece ser diferente das duas citadas, uma vez que diferem no pH ótimo. Enquanto as enzimas estudadas pelo grupo tcheco apresentam maior atividade a pH 8,2 e 9, respectivamente, a enzima agora estudada apresenta maior atividade a pH 7,0.

AGRADECIMENTO

À Laborerápica-Bristol S.A., Indústria Química e Farmacêutica, através de sua Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, pelas facilidades concedidas na realização das experiências iniciais deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- 1 — Dixon, M. & Webb, E. C. — Enzymes (Second Edition). Londres, Longmans Green and Co. Ltd., 1964.
- 2 — Demina, A. S.; Yakovleva, V. I. and Kretovich, V. L. — Malate dehydrogenase of *Aspergillus niger*. Dokl. Akad. Nauk SSSR 167 (3): 687-690 (1966), *apud* Chem. Abstr. 65: 961e (1966).
- 3 — Zink, M. W. & Shaw, D. A. — Regulation of malic isozymes and malic dehydrogenases in *Neurospora crassa*. Can. J. Microbiol. 14 (8): 907-912 (1968).
- 4 — Leskovac, V.; Bancak, A.; Trivic, S. and Turcanji, A. — Comparative enzymology of malate dehydrogenases. VI. Regulation of the biosynthesis of yeast isoenzymes. Mikrobiologija 9 (2): 237-242 (1972), *apud* Chem. Abstr. 82: 120583g (1975).
- 5 — Duntze, W.; Atzpodien, W. and Holzer, H. — Glucose-dependent enzyme activities in different yeast species. Arch. Mikrobiol. 58 (3): 296-301 (1967), *apud* Chem. Abstr. 68: 1090v (1968).
- 6 — Fortnagel, P. & Lopes, J. — Regulation of malate dehydrogenase in sporulation mutants of *Bacillus subtilis* blocked in the citric acid cycle. Biochim. Biophys. Acta 237 (2): 320-328 (1971).
- 7 — Murai, T.; Tokushige, M.; Nagai, J. and Katsuki, H. — Physiological functions of NAD- and NADP-linked malic enzymes in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 (4): 875-881 (1971).
- 8 — Tinterova, M.; Hostalek, Z. and Vanek, Z. — Regulation of the biosynthesis of secondary metabolites. VI. Characteristics of the malate dehydrogenase (MDH) isoenzymes in *Streptomyces aureofaciens*. Folia Microbiol. (Prague) 14 (2): 135-140 (1969), *apud* Chem. Abstr. 71: 27546k (1969).
- 9 — Jechova, V.; Hostalek, Z. and Vanek, Z. — Regulation of the biosynthesis of secondary metabolites. V. Decarboxylating malate dehydrogenase (DMD) in *Streptomyces aureofaciens*. Folia Microbiol. (Prague) 14 (2): 128-134 (1969), *apud* Chem. Abstr. 71: 28027d (1969).
- 10 — Kachmar, J. F. & Boyer, P. D. — Kinetic analysis of enzyme reactions. II. The potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphofrase. J. Biol. Chem. 200: 669-682 (1953).
- 11 — Robinson, J. C.; Keay, L.; Molinari, R. and Sizer, I. W. — L-α Hydroxy Acid Oxidases of Hog Renal Cortex. J. Biol. Chem. 237 (6): 2001-2010 (1962).
- 12 — Molinari, R. — Estudos sobre a produção de tetraciclina em meios quimicamente definidos. Tese de Livre Docência apresentada à F. F. C. L. de Araraquara, 1967.
- 13 — Brendler, H. — A simple, inexpensive microhomogenizer. Science 114: 61-62 (1951).