

ESTUDO DE ALGUMAS PROPRIEDADES DA L-LACTATO DESIDROGENASE DE POLYPORUS CIRCINATUS Fr.

Tese apresentada ao Instituto de Bioquímica
da Universidade Federal do Paraná para a
obtenção do título de Mestre em Bioquímica

CURITIBA - PARANÁ 1971

ÍNDICE DO CONTEÚDO

ÍNDICE	2
INTRODUÇÃO	3
MATERIAIS E MÉTODOS	13
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	43
SUMÁRIO	44
AGRADECIMENTOS	45
OFERECIMENTO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

INTRODUÇÃO

Em 1926 MEYERHOF et al. (1) mostraram que as leveduras podiam oxidar o ácido láctico na ausência de coenzimas e BERNHEIN (2), mais tarde, extraiu do pó cetônico de leveduras uma fração ativa capaz de reduzir o azul de metileno em presença de lactato e na ausência de coenzimas.

HARDEN et al. (3) comprovaram a independência de coenzimas para a atividade enzimática.

BOYLAND et al. (4) e ADLER et al. (5), estudaram comparativamente as Lactato desidrogenases de músculo e de levedura e concluíram que as duas eram diferentes quanto ao pH ótimo e a necessidade de coenzimas.

OGSTON et al. (6) observaram que o consumo de oxigênio pelas leveduras, tendo o lactato como substrato, era proporcional a concentração de citocromo.

DIXON et al. (7) obtiveram uma preparação enzimática de leveduras capaz de oxidar o lactato reduzindo o citocromo c. Após a purificação, a enzima continuava a catalizar a redução do azul de metileno, mas perdia a capacidade de reduzir o citocromo c. Os autores sugerem a presença de um transportador de hidrogênio que atuaria entre a Desidrogenase e o citocromo c, o qual seria removido da preparação durante os processos de purificação.

BACH et alii. (8) verificaram que a enzima de leveduras apresentava o mesmo espectro de citocromo b_2 anteriormente descrito (9). Os autores admitem que a enzima e o citocromo b_2 constituam a mesma entidade química. A enzima se apresentava instável, mas o lactato e o sulfato de amônio provocavam certa estabilidade da atividade enzimática. Em trabalho posterior BACH et alii. (10) observaram que na presença de lactato a enzima podia ser aquecida a 53°C sem perda de atividade, que o

pH ótimo era da ordem de 5.2 e reafirmam o observado anteriormente de que a Lactato desidrogenase purificada não era capaz de reduzir o citocromo c.

APPLEBY et al. (11) observaram uma relação entre a atividade enzimática e a concentração de citocromo b_2 em leveduras. A enzima cristalina continuava a reduzir o citocromo c, além do ferricianeto e do azul de metileno, ao contrário do observado por DIXON et al. (7). A enzima desnaturada liberou um componente com características de compostos flavínicos, o qual foi subsequentemente caracterizado como FMN. Os autores discutem a possibilidade de ser uma única proteína com dois grupos prostéticos, os quais teriam diferentes funções e que o grupo prostético flavínico seria o aceitador direto de hidrogênios do lactato.

YAMAMURA et alii. (12) descreveram a presença de oxidases do ácido láctico em Mycobacterium tuberculosis. A enzima reagiu diretamente com o oxigênio molecular sem a medição de transportadores de hidrogênios.

Em 1953 SZULMAJSTER et alii. (13) descreveram uma Lactato desidrogenase particulada em Escherichia coli que não apresentava espectro de citocromo b_2 . A enzima era inespecífica quanto aos enantiomorfos do ácido láctico.

BOERI et alii. (14) purificaram a Lactato desidrogenase de leveduras como BACH et alii. (10) e obtiveram resultados semelhantes aos de APPLEBY et al. (11) com relação a redução do citocromo c e dos aceitadores artificiais de elétrons. A enzima mostrou-se específica para o L-Lactato e o K_m foi da ordem de $3.5 \times 10^{-4} M$ e apresentou uma relação de um grupo flavínico para cada grupo heme. Em trabalho posterior (15) os autores conseguiram reverter a reação usando $FMNH_2$ e demonstraram que haviam oito átomos de ferro por mol de enzima.

YAMASHITA et alii. (16) isolaram o citocromo b_2 de leveduras sem atividade desidrogenásica da própria enzima purificada segundo BACH et alii. (10). A adição de citocromo b_2 por êles isolado, bem como de FMN e FAD a uma solução de enzima desnatu

rada, não foi capaz de restaurar a atividade da Lactato desidrogenase.

NYGAARD (17) mostrou que a Lactato desidrogenase citocromo b_2 de leveduras, quando purificada é extremamente lábil e que era inativada pelo congelamento e degelo.

APPLEBY et al. (18 e 19) observaram que a enzima perdia sua atividade facilmente em presença de oxigênio. A velocidade relativa para os aceitadores de eletrons mantinham constantes durante a purificação, sendo o ferricianeto o mais eficiente. A enzima não reduziu 2,6-diclorofenolindofenol- A oxidação da enzima por H_2O_2 e íon cúprico em condições anaeróbicas causou a dissociação do grupo prostético flavínico.

NYGAARD (20) usando coluna de DEAE-Celulose separou dois tipos de Flavoproteínas com diferentes espectros de absorção, ambas liberaram a FMN após a desnaturação.

CURDEL et alii. (21) observaram que a D-lactato desidrogenase de leveduras era inibida por EDTA e que a inibição podia ser revertida pela adição de altas concentrações de $Zn(II)$ ou pela remoção do EDTA.

LABEYRIE et alii. (22) trabalhando com leveduras crescidas em aerobiose e anaerobiose, verificaram que elas produzem Lactato desidrogenases com diferentes estereoespecificidades. A produzida anaerobicamente se distinguia da aeróbica por suas propriedades fisico-químicas e cinéticas e por não reduzir o citocromo c . A anaeróbica era específica para o D(-) lactato e a aeróbica (citocromo b_2) para o L-Lactato.

HAUGAARD (23) reestudando o problema das enzimas de E. coli (13) demonstrou que as mesmas oxidavam lactato na relação de um mol de lactato para meio mol de oxigênio e classificou as enzimas como oxidases do ácido láctico, portanto distintas das enzimas de leveduras.

Em 1959 De LEY et al. (24) crescendo Aerobacter peroxidans em meio contendo DL-lactato, encontraram uma enzima

solúvel capaz de oxidar lactato e encontraram a mesma relação lactato oxigênio observada por HAUGAARD (23).

SNOSWELL (25) verificou a presença de uma L-lactato desidrogenase NAD independente em Lactobacillus arabinosus. A cromatografia em DEAE-Celulose revelou a presença de duas enzimas: a D e a L-lactato desidrogenase. As duas tinham por aceitador de eletrons o 2,6-diclorofenolindofenol.

SNOSWELL (26) purificou duas Lactato desidrogenases estereoespecificamente diferentes de Lactobacillus arabinosus; em ambos os casos o aceitador de eletrons foi o 2,6-diclorofenolindofenol, não utilizando o oxigênio como tal. Ambas eram inibidas competitivamente por oxalato, cujos K_i eram da ordem de $2.0 \times 10^{-4}M$ e $1.1 \times 10^{-5}M$ para a L-e a D-lactato desidrogenases respectivamente. A enzima tem FMN como grupo prostético e era inibida por 1,10 fenantrolina.

NYGAARD (27) trabalhando com leveduras aeróbicas, separou por cromatografia em coluna de DEAE-Celulose três frações com atividade enzimática. As frações I e II eram específicas para o L-lactato e a III para o D-lactato. A enzima tipo II utilizava o citocromo c ferricianeto e o 2,6 diclorofenolindofenol como aceptadores de eletrons na relação 1,0:1,7:1,0 e a enzima tipo III na relação 15:1,2:1,0. As enzimas eram extremamente sensíveis a sais e entre elas, a D-enzima era a mais sensível. A relação entre a D e a L-lactato desidrogenase nas preparações iniciais era 1:2 (28). Observou que as enzimas estavam particuladas, fato este anteriormente observado por NOSSAL (29).

BOERI et alii. (30) demonstraram que a desidrogenase anaeróbica não era específica para o D-lactato, mas sim para D-hidroxi-ácidos. A enzima requeria $Zn(II)$ para sua atividade.

SINGER et alii. (31) estudando o problema da multiplicidade da Lactato desidrogenase em leveduras, conforme as condições de cultivo demonstraram que a D-lactato desidrogenase ferricianeto dependente predomina nas células crescidas em anaerobiose, enquanto que a L-lactato desidrogenase citocromo c re

ductase aumenta com a adaptação à aerobiose.

APPLEBY et al. (32) observaram que a enzima era homogênea em ultracentrifugação e ARMSTRONG et alii (33) verificaram que a enzima era inativada pelo oxigênio e mostrava-se heterogênea em ultracentrifugação e o sobrenadante apresentava fluorescência característica de flavina. O efeito do oxigênio não era observado quando a enzima era previamente tratada com p-cloromercuribenzoato.

MOLINARI et al. (34) trabalhando com Propionibacterium pentosaceum, isolaram e purificaram uma Lactato desidrogenase independente de coenzimas. A enzima mostrou-se específica para o D-lactato. Dos inúmeros aceitadores artificiais de elétrons por eles utilizados, o mais eficiente foi a fenazina-meta-sulfato. O pH ótimo para a oxidação do lactato foi determinado como sendo da ordem de 7.7 a 30°C. A enzima era inibida por oxalato, p-cloromercuribenzoato e quinacrina.

NYGAARD (35) observou que a D-enzima anaeróbica de leveduras tinha sua atividade diminuída quando as leveduras eram crescidas sob condições de anaerobiose, ao passo que a D e a L-lactato desidrogenases citocromo c redutase tinham suas atividades aumentadas; observou ainda (36) que a D enzima aeróbica não reduzia o 2,6-diclorofenolindofenol e era estável a estocagem, enquanto que a L-lactato desidrogenase citocromo c redutase era lábil e funcionava com todos aceitadores de elétrons. Estudando as propriedades da D-lactato desidrogenase citocromo c redutase, verificou que a mesma era específica para o citocromo c e era inibida por sulfato de protamina. Aumentando-se a concentração de sulfato de protamina a enzima perdia a capacidade de reduzir o citocromo c e adquiria a de reduzir o ferricianeto (37). A constante de inibição foi de $1.10^{-10}M$ para o sulfato de protamina (38). A enzima foi purificada e mostrou-se específica para o citocromo c e apresentou FAD como grupo prostético (39).

Em 1961 YAMADA et alii. (40), descreveram a presença de L-lactato desidrogenase NAD-independente em Piricularia oryzae, sem no entanto, conseguir purificá-la devido a sua instabilidade.

O 2,6-diclorofenolindofenol foi o único aceitador de eletrons. Na mesma preparação enzimática, foi observada a presença da D-lactato desidrogenase NAD-dependente.

KAUFMANN et al. (41) verificaram que o Leuconostoc mesenteroides era capaz de sintetizar Lactato desidrogenase independente de coenzimas quando este microrganismo era crescido em meio contendo DL-lactato como fonte de carbono. O aceitador de eletrons foi o 2,6-diclorofenolindofenol e a atividade não era inibida por atebrina, mas sim por oxalato.

IWATSUBO et al. (42) estudaram a D-lactato desidrogenase de leveduras crescidas anaerobicamente e observaram que a mesma possuia FAD como grupo prostético e que a enzima era protegida por lactato.

GREGOLIN et al. (43 e 44) estudando a D-lactato desidrogenase citocromo c redutase particulada de leveduras aeróbicas, observaram que a enzima contém Zn(II) e FAD como grupos prostéticos na relação 3:1. O aceitador de eletrons preferencial foi a fenazina-meta-sulfato.

SOMLO (45) demonstrou duas formas de L-lactato desidrogenase em leveduras aeróbicas, uma particulada e outra solúvel; a enzima particulada após a solubilização comportava-se de maneira idêntica à solúvel frente ao imunesoro para L-lactato desidrogenase citocromo c redutase.

PASCAL et al. (46) verificaram que a L-lactato desidrogenase somente aparecia em culturas aeróbicas de Aerobacter aerogenes, tendo DL-lactato como fonte de carbono. Dos estudos realizados os autores sugeriram que a L-lactato desidrogenase deste microrganismo seria induzível.

MORTON et al. (47) dissociaram a L-lactato desidrogenase (citocromo b_2) de leveduras em apoenzima e seus grupos prostéticos e verificaram que a atividade enzimática era parcialmente restaurada pela adição de FMN e protoheme.

ARMSTRONG et alii. (48 e 49) estudaram comparativamente as propriedades físico-químicas de duas formas de L-lactato desidrogenases de leveduras aeróbicas, distintas apenas pelo tipo

de DNA ligado e demonstraram que a enzima tipo I apresentava um peso molecular de 183.000 e dois grupos heme e dois flavínicos. Estudando a velocidade de redução dos corantes pela L-lactato desidrogenase (citocromo b_2) MORTON et al (50) admitem a existência de uma semiquinona intermediária na redução da flavina pelo lactato.

LABEYRIE (51) estudou a enzima cristalina de levedura por digestão triptica e obteve uma fração hemoprotéica que apresentava um peso molecular de 11-12.000, contendo um único heme com as mesmas características espectrais da enzima original. A enzima, portanto, seria formada de um dímero com duas unidades idênticas.

SOMLO et al. (52) estudaram comparativamente as formas da enzima de leveduras: a "fisiológica" e a "cristalizada" e observaram que as propriedades cinéticas são distintas, e que a "cristalizada" se comportava como a enzima reconstituída da apoenzima mais os coenzimas.

WALKER et al. (53) descreveram uma preparação de membranas de Pseudomonas natriegens capaz de oxidar D e L-lactato sem a participação de coenzimas piridínicos. As atividades eram inibidas por N-Óxido-2-n-heptil-4-hidroxiquinolina, cianeto e azida sódica.

BAUDRAS (54 e 55) verificou que a reativação da apoenzima da L-lactato desidrogenase de leveduras era obtida somente por FMN; determinou o K_m para a enzima nativa e a enzima reconstituída e observou que o K_m para a última era cinco vezes maior. Constatou ainda, que o grupo FMN era essencial para atividade enzimática.

IWATSUBO et al. (56) mostraram por outro lado, que a dissociação do complexo flavohemoprotéico da L-lactato desidrogenase de leveduras reconstituído era mais sensível aos sais que a enzima nativa.

PASCAL et al (57) reestudando as lactato desidrogenases de Aerobacter aerogenes, verificaram que ambas as enzimas tinham por aceitador de eletrons o 2,6 diclorofenolindofenol e a fe

nazina-meta-sulfato e que para cada mol de lactato oxidado era consumido meio mol de oxigênio. Ambas as enzimas eram inibidas por oxalato e observaram ainda que a biossíntese da L-lactato desidrogenase era reprimida por glicose enquanto a D-enzima não o era. Os mesmos autores (58) estudaram a produção de D e L-lactato desidrogenases independentes de coenzimas piridínicos em Micrococcus denitrificans e constataram que as referidas enzimas estavam presentes nêstes microrganismos crescidos em aerobiose, bem como quando crescidos em anaerobiose e que a enzima apresentava características distintas das enzimas de Aerobacter aerogenes (57), não necessitando de oxigênio para sua biossíntese e inibida por oxalato.

SOMLO (59) notou que leveduras crescidas aerôbicamente em meio contendo D-lactato sintetizavam maior quantidade de D e L-lactato desidrogenase citocromo c redutase e que a indução não era estereoespecífica. A glicose reprimiu muito mais a biossíntese da L-enzima do que a D.

HIROMI et al. (60) submeteram a L-lactato desidrogenase (citocromo b_2) de leveduras à análise espectrofotométrica e a ressonância eletromagnética e verificaram que a enzima era capaz de receber um número máximo de três eletrons e que apenas 20% da flavina presente era transformada em semiquinona.

NICHOLLS et alii. (61) estudaram a distribuição intracelular da L-lactato desidrogenase (citocromo b_2) de leveduras e observaram que 30 a 40% da atividade do sobrenadante de $144.000 \times g$ permaneciam na fração particulada. A enzima particulada solubilizada e a enzima da fração solúvel apresentaram a mesma mobilidade eletroforética. A enzima se tornava heterogênea pela estocagem. A enzima cristalizada segundo APPLEBY et al. (11) apresentava as mesmas características da enzima estocada.

WITTENBERGER et al. (62) observaram em Butyribacterium rettgeri, crescido em meio contendo lactato, a presença de D e L-lactato desidrogenases, algumas NAD e outras 2,6-diclorofenolindo fenol dependentes. Ambos os tipos de enzimas eram solúveis e as mesmas foram separadas por cromatografia em coluna de DEAE

Celulose. A Lactato desidrogenase NAD-independente utilizou D e L-lactato como substrato e como aceitadores de eletrons o ferricianeto e o 2,6-diclorofenolindofenol.

PAJOT et alii. (63) estudaram o comportamento da L-lactato de₂sidrogenase (citocromo b₂) de leveduras, frente ao p-cloro₂mercuribenzosulfonato e verificaram a perda da atividade enzi₂mática e a dissociação do grupo prostético FMN em presença do inibidor. Constataram que a enzima possui seis grupos tióis por heme e em presença de reagentes mercurial, o FMN se disso₂ciava.

JURTSUK et al. (64) estudando a oxidação do D-lactato por Azobacter vinelandii, verificaram a utilização de um mol de lactato requeria meio mol de Oxigênio em uma reação semelhan₂te às descritas para a Escherichia coli(23) e Aerobacter ae₂rogenes (57). A L-lactato desidrogenase (citocromo b₂)EC.1.1.2.3. teve sua conformação estudada espectrofluoromêtricamente, dispersão ótica rotatória e dicroísmo circular, assim como as interações entre grupos (65 e 66) sendo observado que há uma interação entre o heme e o FMN responsável pela atividade catalítica da enzima.

Como se pode observar desde sua descoberta até o presente, as Lactato desidrogenases de leveduras coenzimas piridínicas in₂dependentes com atividade de citocromo c redutase, foram pro₂fundamente estudadas. Já as enzimas de bactérias que não pos₂suem atividade de citocromo c redutase, foram estudadas em me₂nor grau e entre elas predominam as Lactato-oxidases. Apenas uma comunicação trata das atividades de L-lactato desidrogena₂se NAD-independente em fungos (40), sem no entanto, terem si₂do feitas a purificação e o estudo cinético da mesma. No meta₂bolismo aeróbico da glicose pelo Polyporus circinatus Fr, fun₂go apodrecedor de madeira foi observada uma pequena produção de lactato. Pesquisando-se a via metabólica de utilização de lactato, verificou-se a presença de D e L-lactato desidrogena₂se independentes de nucleotídeos piridínicos como coenzimas.

As enzimas se encontram presentes, em concentração dosáveis, sômente quando o fungo era crescido em meio contendo DL-lacta₂

to como única fonte de carbono e energia. Como o teor da D-enzima, nos extratos iniciais, correspondia a 25% da atividade da L-enzima, o presente trabalho foi levado a efeito com a finalidade de estudar algumas características da L-lactato desidrogenase de Polyporus circinatus Fr.

MATERIAIS E MÉTODOS

I - MATERIAIS

I.1 DROGAS:

Citocromo c (Sigma Chemical Company)
Carboximetil-Celulose, Powder CM-70 (Whatman)
Dietilaminoetil-Celulose (Bio-Rad Laboratories)
D(-) lactato de lítio com 5% do L isômero (Sigma Chemical Company)
DL-lactato de lítio (Sigma Chemical Company)
2,6-Diclorofenolindofenol (E.Merck AG. Darmstadt)
1,10-Fenantrolina (Sigma Chemical Company)
8 - Hidroxiquinolina (Mallinckrodt)
L(+) lactato de zinco (Pfanstiehl Laboratories, inc.)
Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio (Sigma Chemical Company).
Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio-Fosfato (Sigma Chemical Company)
Piruvato de sódio (Nutritional Biochemical Corporation)
p-Hidroximercuribenzoato de sódio (Sigma Chemical Company)
Sulfato de protamina (Nutritional Biochemical Corporation)
As demais substâncias utilizadas neste trabalho, foram adquiridas de diversas fontes e salvo alguma referência em contrário, traziam a designação de quimicamente puras.

I.2 AMOSTRAS DE MICROORGANISMOS:

As amostras de Polyporus circinatus Fr nos foi gentilmente cedidas pela Profa.Dra. GLACI TEREZINHA ZANCAN.As amostras foram cultivadas em meio sólido Sabouraud, incubadas a 28°C por 24 horas e a seguir estocadas em geladeira a 5°C, sendo feitas transferências mensais.

II - MÉTODOS

II.1 PREPARO DE POLYPORUS CIRCINATUS Fr. EM GRANDE ESCALA:

No preparo do "inóculo inicial", o meio de cultura líquido utilizado foi aquele proposto por MARKUS et alli. (67). Uma amostra dos micélios desenvolvidos em Sabouraud foi transferida para um frasco com 250ml do meio líquido, contendo glicose a 1% e incubado a 28°C por 48 horas sob agitação em agitador rotatório com 100 rpm. Os micélios assim obtidos, constituem o que denominamos "inóculo inicial". A partir dêste, repicou-se em frascos contendo 300ml de meio adicionados de DL-lactato de sódio, de modo que sua concentração seja de 1g% incubados a 28°C por 24 horas sob agitação. Os micélios foram, então, colhidos por filtração em gaze, lavados algumas vezes com água destilada e finalmente com tampão Tris/HCl 0,05M pH 7.0. Após a remoção do líquido de lavagem por compressão, foram pesados e guardados em refrigerador a -20°C. Obteve-se assim, rendimento de aproximadamente 1,5 gramas de micélios por frasco.

II.2 PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS:

Cêrca de 20 gramas (3 gramas em pêso sêco) dos micélios congelados foram trituradas em geral juntamente com 5 gramas de areia do mar prêviamente tratada. O macerado foi suspenso em 60ml de tampão Tris/HCl 0,1M pH 7.0, contendo DL-lactato de sódio a 0,002M. A areia, fragmentos celulares e células intactas foram removidos por centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada (International Portable Refrigerated Centrifuge, Model-PR2). O sobrenadante assim obtido é referido como extrato livre de células e, contém aproximadamente 10mg de proteínas por ml. Este método de preparo do extrato livre de células dá um rendimento de 15 a 20% do pêso sêco original das células em proteínas solúveis.

A atividade da L-lactato desidrogenase NAD-independente foi medida pela redução do 2,6-diclorofenolindofenol a 600 milimicra com o auxílio de um espectrofotômetro Beckman, modelo DU. Durante as etapas de purificação da enzima foram empregados o D e o L-lactato de sódio como substrato e durante os estudos cinéticos apenas o L-lactato de sódio.

a) Sistema de reação

O sistema de reação foi montado em cubeta de sílica de 1cm de caminho ótico com os seguintes reagentes: 2,09ml de água destilada; 0,3ml de tampão Tris/HCl 0,1M pH 6.7; 0,5ml de lactato de sódio 0,2M e 0,1ml de 2,6-diclorofenolindofenol 0,002M. A reação iniciou-se pela adição de 0,01ml da preparação enzimática (Volume final de 3,0ml) e os decréscimos de absorvância medidos a 600 milimicra em intervalos de um minuto durante 3 minutos. A calibração do zero do aparelho foi feita com uma cubeta contendo 3,0ml de água destilada. Utilizou-se, ainda, duas cubetas controles; em uma delas contendo todos os reagentes menos a solução com atividade enzimática e na outra todos os reagentes menos o substrato. Em ambos os casos a redução do corante não foi verificada. A atividade enzimática foi proporcional para as diferentes concentrações de enzima e a velocidade permaneceu linear durante os dois primeiros minutos. O coeficiente de extinção molar do 2,6-diclorofenolindofenol foi tomado como $19,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ em pH 6.7 e a 600 milimicra (68). O piruvato formado foi calculado em função dos micromoles de corante reduzido.

b) Unidade de enzima e Atividade específica

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 0,1 micromol de lactato em um minuto em condições padrões. A atividade

de específica foi expressa pela razão entre as unidades de enzimas por ml da solução enzimática e as miligramas de proteínas por ml da mesma solução.

II.4 PREPARAÇÕES:

O DL e o D-lactato de lítio, bem como o L(+) lactato de zinco foram convertidos em sais de sódio pelo tratamento com resina trocadora de cátions Dowex 50 x 8 sob a forma H^+ . A percentagem de contaminação do D(-) lactato de lítio pelo L isômero foi confirmada pela polarimetria em polarímetro digital Perkin-Elmer modelo 141.

A DEAE-Celulose e a CM-Celulose foram preparadas de acordo com o método de PETERSON et al. (69).

II.5 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE INCUBAÇÃO

O sistema de reação foi montado em cubeta de sílica com 1cm de caminho ótico com os seguintes reagentes: 2,58ml de água destilada; 0,3ml de tampão Tris/HCl 0,1M pH 6.7; 1ml 2,6-diclorofenolindofenol 0,002M e 0,01ml da solução enzimática. Esta mistura foi incubada em banho-maria, sua temperatura controlada com um termômetro. Uma vez atingida a temperatura desejada, a reação iniciou-se pela adição de 0,01ml de L(+) lactato de sódio 1M e os decréscimos de absorbância foram medidos a 600 milimicra em intervalos de um minuto, durante três minutos. Imediatamente após esse tempo, as temperaturas das misturas incubadas foram novamente medidas. Nas determinações cujas temperaturas foram superiores a 30°C, observou-se uma queda de 1°C durante o tempo de medida dos decréscimos de absorbância.

II.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

A dosagem de proteínas para a determinação da atividade específica foi realizada pelo método proposto por LOWRY et alii. (70). E, a dosagem de proteínas nas frações e luídas das colunas de DEAE-Celulose e CM-Celulose, segundo o método de WARBURG et al. (71).

A dosagem de cloretos nos eluatos foi realizada segundo o método proposto por SCHALES et al. (72).

A identificação do piruvato como produto da reação catalisada pela enzima, foi feita de acôrdo com a técnica de FRIEDEMANN et al. (73).

II.7 ELETROFORESE EM PAPEL

A análise eletroforética da enzima foi feita de acôrdo com a técnica proposta por SNOSWELL (26). Aproximadamente 30 micrôlitros da solução contendo a enzima purificada foram aplicados em papel Whatman nº1 (10 x 28cm) e subseqüentemente colocado em um dispositivo semelhante ao de MARKHAN et al. (74), acoplado a uma fonte de corrente contínua. O papel contendo a amostra foi submetido a uma diferença de potencial da ordem de 1.000 Volts durante 10 horas; usou-se tampão Tris/HCl 0,05M pH 7.8. A enzima foi localizada espraçando o papel com uma mistura de 2,6-diclorofenolindofenol 0,004M; DL-lactato de sôdio 0,5M e tampão Tris/HCl 0,1M pH 6.7. A enzima revelou-se em uma banda clara sôbre um fundo azul intenso. O mesmo eletroforograma sob a ação de solução acetônica de ninhidrina a 2mg% e aquecimento revelou uma única banda de coloração violeta intensa, cuja posição coincidiu com a anterior.

II.8 ANÁLISE DOS GRUPOS PROSTÉTICOS.

A enzima com 27 vêzes de purificação, após desnaturação pelo calor, foi submetida a análise cromatográfica segundo a técnica de CRAMMER (75) e a análise espectrofotométrica em espectrofotômetro Beckman modelo DB, segundo BACH et alii. (8).

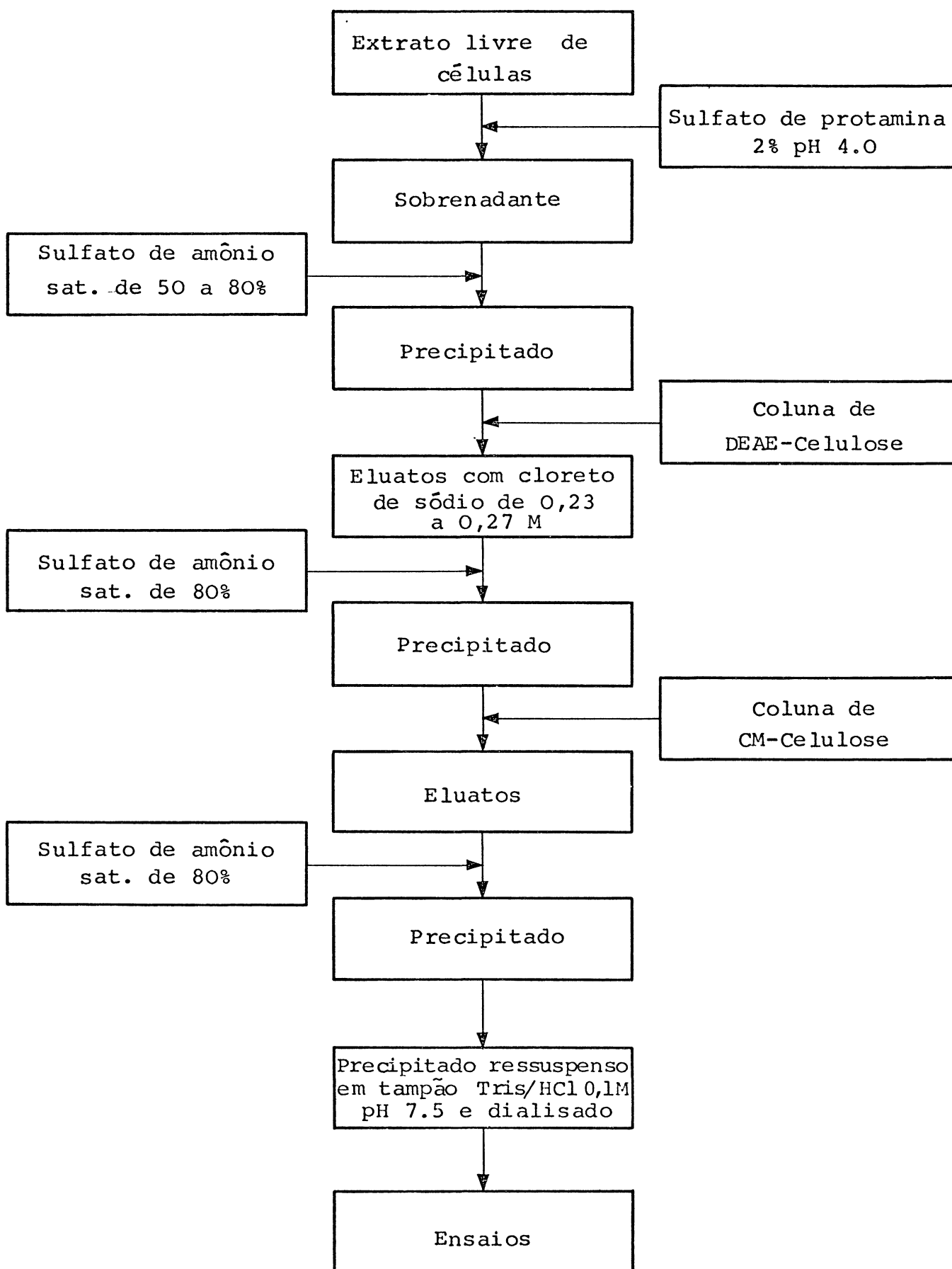
II.9 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

Tôdas operações descritas foram realizadas à temperatura de 4°C. O extrato livre de células foi adicionado de sulfato de protamina a 2% pH 4.0, com agitação de modo que sua concentração final fôsse aproximadamente de 0,25 mg por mg de proteínas.

Após a adição do volume adequado de sulfato de protamina em porções de 0,5 ml, a solução foi mantida em repouso por 5 minutos e o precipitado removido por centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos. O pH foi corrigido para 7.0 a 7.5 com hidróxido de sódio 0,1M. O sobrenadante assim obtido, foi submetido ao fracionamento com sulfato de amônio à saturação de 0 a 50%, sendo o pH mantido constante dentro do mesmo intervalo. Após uma hora de repouso, o precipitado foi removido por centrifugação a 15.000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante obtido na etapa anterior, adicionou-se mais sulfato de amônio até a saturação de 80%, levando-se em conta os cuidados anteriores. O precipitado contendo a enzima foi colhido por centrifugação a 15.000 rpm por 15 minutos e ressuspenso em 7,0 ml de tampão Tris/HCl 0,1M pH 7.5, contendo DL-lactato de sódio 0,004M. A solução concentrada de proteínas foi dialisada por 4 horas contra tampão Tris/HCl 0,01M pH 7.5, contendo DL-lactato de sódio 0,002M e sulfato de sódio 0,05M. O dialisado foi cromatografado em uma coluna de DEAE-Celulose de 30cm de altura por 1,5cm de diâmetro, prêviamente equilibrada com tampão

Tris/HCl, 0,1M pH 7.5, contendo DL-lactato de sódio 0,002M. Esta coluna foi adaptada a um coletor automático refrigerado de frações da BUCHLER INSTRUMENTS:

Coletou-se assim frações de 4ml com um fluxo de 0,3ml por minuto, aplicando-se um gradiente linear de eluição com cloreto de sódio de 0 a 0,5M, em solução tampão Tris/HCl 0,1M pH 7.5, contendo DL-lactato de sódio 0,002M. O volume total de eluato foi de 160 ml. As frações que exibiram maior atividade enzimática foram reunidas e concentradas pela adição de sulfato de amônio até a saturação de 80%. Uma hora após, o precipitado foi recuperado por centrifugação a 15.000 rpm por 15 minutos e ressuspenso em 1,5 ml de tampão Tris/HCl 0,1M pH 7.5, contendo DL-lactato de sódio 0,002 M e diasado por 4 horas nas mesmas condições anteriores. O dialisado foi aplicado em uma coluna de CM-Celulose de 30cm de altura por 1cm de diâmetro, previamente equilibrada com tampão Tris/HCl 0,1M pH 6.0, contendo DL-lactato de sódio 0,002M. A eluição foi realizada com tampão Tris/HCl 0,1M pH 7.5, contendo DL-lactato de sódio 0,002M com um fluxo de 0,35ml por minuto e coletou-se frações de 4,5ml em coletor refrigerado. As frações mais ativas foram reunidas e concentradas pela adição de sulfato de amônio até a saturação de 80%. O precipitado foi recuperado como das vezes anteriores e ressuspenso em 1 ml de tampão Tris/HCl 0,1M pH 7.5 e dialisado contra tampão Tris/HCl 0,01M pH 7.5, contendo sulfato de sódio a 0,05M por 4 horas. O volume de eluente empregado foi de 50 ml. A marcha sistemática de purificação da enzima está ilustrada na figura nº 1.



RESULTADOS

1. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

O extrato livre de células tendo sido submetido aos tratamentos com sulfato de protamina e sulfato de amônio, após a diálise, foi aplicado em Coluna de DEAE-Celulose e a enzima foi eluída com cloreto de sódio 0,23 a 0,27 M em tampão Tris/HCl 0,1M pH 7.5. A figura nº 2 ilustra a separação cromatográfica da L-lactato desidrogenase NAD-independente em coluna de DEAE-Celulose. As frações mais ativas foram reunidas, concentradas com sulfato de amônio a saturação de 80%, dialisadas e aplicadas em coluna de CM-Celulose e a enzima eluída com tampão Tris/HCl 0,1M pH 7.5. As frações mais ativas foram reunidas, concentradas com sulfato de amônio a saturação de 80% e dialisadas. O protocolo de purificação está sumarizado na Tabela I. Os dados indicam que a enzima foi purificada 27,53 vezes e o rendimento de 33%.

TABELA I

FRAÇÃO	V.TOTAL (ml)	UNID. ml	UNID. TOTAIS	mg DE PROT. (ml)	ATIVID. ESPEC.	REND. (%)	PURIFIC.
Ext.Livre de cêls.	72	5,82	419,04	9,5	0,612	-	-
Sulfato de prota mina 2% pH 4.0	73	5,82	424,86	6,0	0,970	-	1,58
Sulfato de amônio 50 a 80%	7,5	48,00	360,00	11,5	4,173	86	6,81
Coluna de DEAE-Celu lose	2,2	68,40	150,48	7,6	9,000	36	14,70
Coluna de CM-Celu- lose	1,5	92,70	139,05	5,5	16,854	33	27,53

2. ESTEREOESPECIFICIDADE

Os dados da Tabela II mostram a elevada especificidade da enzima pelo L(+) lactato.

TABELA II

FRAÇÃO	UNIDADES/ml (L-LACTATO)	UNIDADES/ml (D-LACTATO)	RELAÇÃO L:D
Ext.Livre de Células	5,82	1,45	4:1
Sulfato de prota <u>mina</u> 2% pH 4.0	5,82	1,45	4:1
Sulfato de amônio sat. de 50 a 80%	48,00	4,80	10:1
Coluna de DEAE-Celulose	68,40	6,84	10:1
Coluna de CM-Ce-lulose	92,70	9,27	10:1
<u>Sistema de incubação:</u> 30 μ moles de tampão Tris/HCl pH 6.7; 99 μ moles de lactato (L ou D-lactato); 0,12 μ moles de 2,6-diclorofenolindofenol e 0,01 ml da preparação en <u>zimática</u> . Volume final 3,0 ml.			

3. ACEITADORES DE ELETRONS

A enzima não reduziu NAD, NADP, citocromo c e nem ferricianeto na presença de L-lactato de sódio; observações realizadas a 340, 550 e a 420 milimicra, respectivamente. A enzima reduziu o azul de metileno em presença de L-lactato de sódio, sob condições anaeróbicas. A leitura foi realizada a 600 milimicra, observando-se que êste corante possui apenas 45% da eficiência eletrons-aceitadora do 2,6-diclorofenolindofenol, sob as mesmas condições. A Tabela III mostra as velocidades máximas relativas com os diferentes eletrons-aceitadores, expressas em percentagens.

TABELA III

ELETRONS-ACEITADORES	E _O a pH 7.0	V.MÁX. RELATIVA(%)	CONC. (μ moles) NO SIST.DE INCUBAÇÃO
NAD	- 0,320	zero	0,90
NADP	- 0,320	zero	0,90
Azul de metileno	+ 0,011	45	1,50
2,6-Diclorofenol indofenol	+ 0,217	100	0,12
Citocromo c	+ 0,270	zero	1,50
Ferricianeto de potássio	+ 0,360	zero	1,50
Sistema de incubação: 30 μ moles de tampão Tris/HCl pH 6.7 a 8.0; 99 μ moles de L-lactato de sódio e 8 μg de proteí nas. Volume final 3,0 ml.			

4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA

A figura nº 3 indica que a velocidade aumenta proporcionalmente com a concentração de enzima. As reações foram observadas a temperatura de 26°C.

5. EFEITO DO pH

Com o intuito de verificar o comportamento da enzima em diferentes pH utilizou-se tampão citrato 0,1M de pH 3.0 a 5.0; tampão Tris/HCl 0,1M de pH 5.5 a 9.0 e tampão Glicina/NaOH 0,1M de pH 9.0 a 10. Observou-se que o pH ótimo para sua atividade é da ordem de 6.7, como indica a figura nº 4.

6. EFEITO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

A figura nº 5 ilustra o efeito da temperatura sobre a velocidade de reação. Observou-se um ótimo de atividade a temperatura de 26°C.

7. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO

A figura nº 6 ilustra o efeito do tempo de incubação sobre a velocidade de reação a temperatura de 26°C.

8. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN

A figura nº 7 ilustra o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de reação. A constante de MICHAELIS-MENTEN foi calculada pelo método de LINEWEAVER-BURK, modificado por DIXON (76). A figura nº 8 foi traçada com os mesmos dados da figura nº 7. A constante K_m , calculada por este método é da ordem de $5,88 \times 10^{-4} M$.

9. EFEITOS DE AGENTES QUELANTES E DE INIBIDORES

A pré-incubação da enzima eluída da coluna de DEAE-Celulose com EDTA 0,05M ou com 8-hidroxiquinolina 0,01M, por três minutos não afetou a velocidade da reação. Ao passo que, a 1,10-fenantrolina a concentração de 0,005M reduziu 60% da velocidade da reação sob as mesmas condições anteriores. Com a finalidade de verificar se a enzima era ou não dependente de grupos sulfidrilas (-SH), analisou-se seu comportamento frente ao p-hidroximercuribenzoato de sódio. Após a pré-incubação da enzima com o sal em questão, em concentração de $10^{-4} M$ por três minutos a velocidade da reação foi reduzida a 50%.

10. EFEITO INIBIDOR DO OXALATO

O oxalato de sódio na concentração de $10^{-4} M$ e a $2 \times 10^{-4} M$ atua como poderoso inibidor competitivo da enzima. A constante de inibição foi calculada empregando-se o método de LINEWEAVER-BURK (77) e a relação algébrica de MASSEY (78). A constante K_i assim calculada é da ordem de $1,495 \times 10^{-4} M$. A figura nº 9 ilustra este estudo de inibição.

11. PRODUTO DE REAÇÃO

O piruvato foi identificado como produto da reação catalisada pela enzima, pelo espectro de absorção do derivado da 2,4-dinitrofenilhidrazina do produto e comparado com o do 2,4-dinitrofenilhidrazona ácido pirúvico padrão. A figura nº 10 ilustra os espectros de absorção dos dois derivados e sugerem que se tratam da mesma substância em concentrações diferentes.

12. MOBILIDADE ELETROFORÉTICA

Após 10 horas de eletroforese a 1000 Volts de d.d.p. e 12 mA, usando-se tampão Tris/HCl 0,05M pH 7.8, a enzima moveu-se em direção ao ânodo a 12 cm da origem. A figura nº 11 ilustra o que foi mencionado.

13. NATUREZA DOS GRUPOS PROSTÉTICOS

A preparação de enzima com 27 vezes de purificação foi utilizada para identificação de seus grupos prostéticos. A preparação enzimática apresentou-se colorida de róseo e contém citocromo na forma de citocromo b_2 . A redução da enzima foi feita com ditionite. A figura nº 12 mostra o espectro da enzima reduzida com ditionite. O cromatograma da figura nº 13 sugere que a enzima possui FMN em sua estrutura.

14. ESTABILIDADE DA ENZIMA

Para se conhecer o tempo de conservação da enzima, determinou-se sua atividade em intervalos de tempo de 24 horas. Estas determinações foram realizadas com duas porções de uma mesma preparação, isto é, uma delas foi adicionada de lactato de sódio 0,001M e a outra sem lactato. A figura nº 14 ilustra os resultados obtidos. A porção sem lactato de sódio, manteve 40% de sua atividade após 120 horas a 0°C e a porção contendo lactato de sódio atingiu essa percentagem de atividade após 288 horas a mesma temperatura.

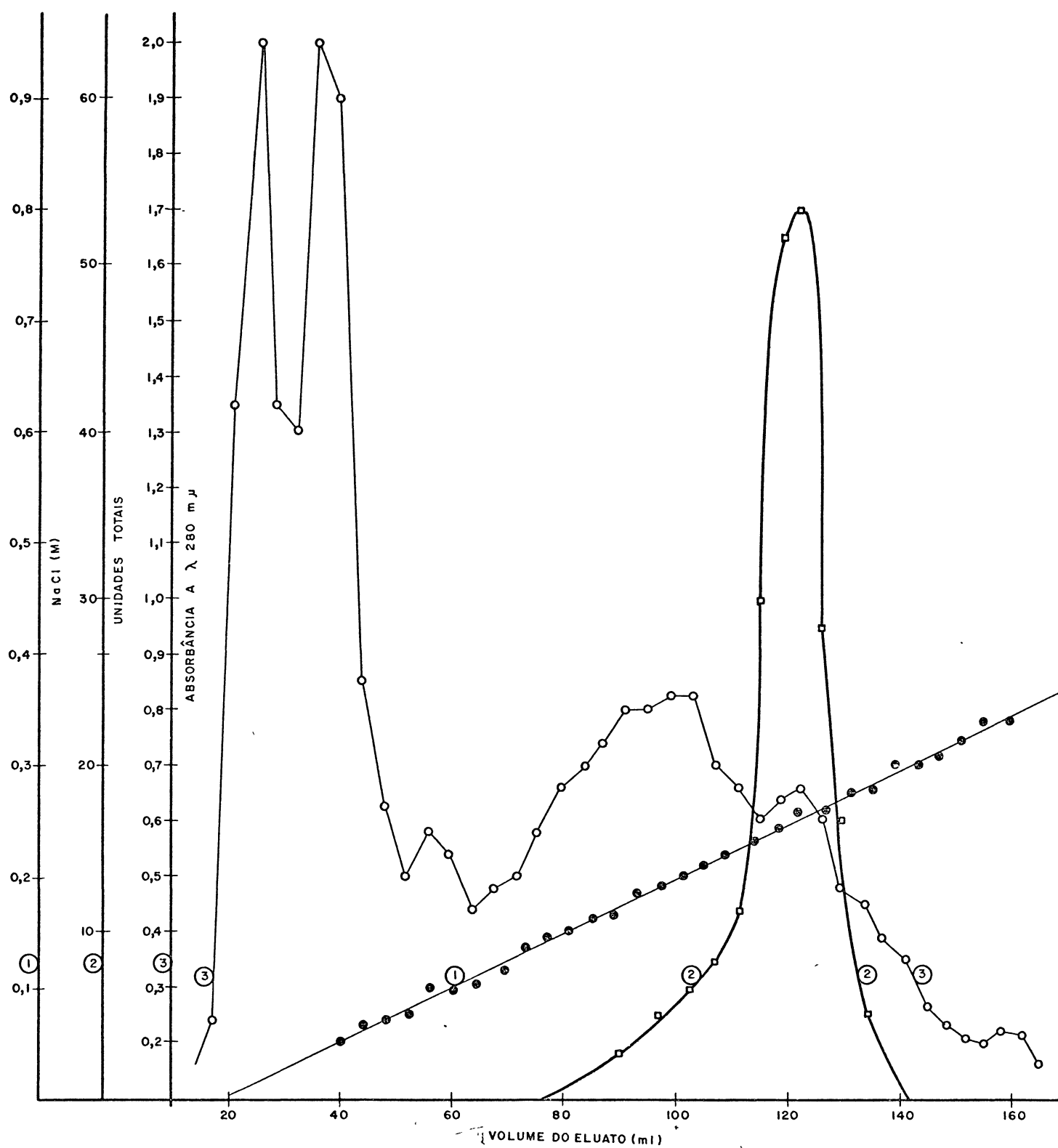


Fig.2 Purificação da L-lactato desidrogenase de Polyporus circinatus Fr. por cromatografia em coluna de DEAE-Celulose. O gráfico ilustra a proteína dosada a 280 m μ (o-o-o), a atividade da enzima (□-□-□) e a concentração molar de cloreto de sódio no eluato (●-●-●).

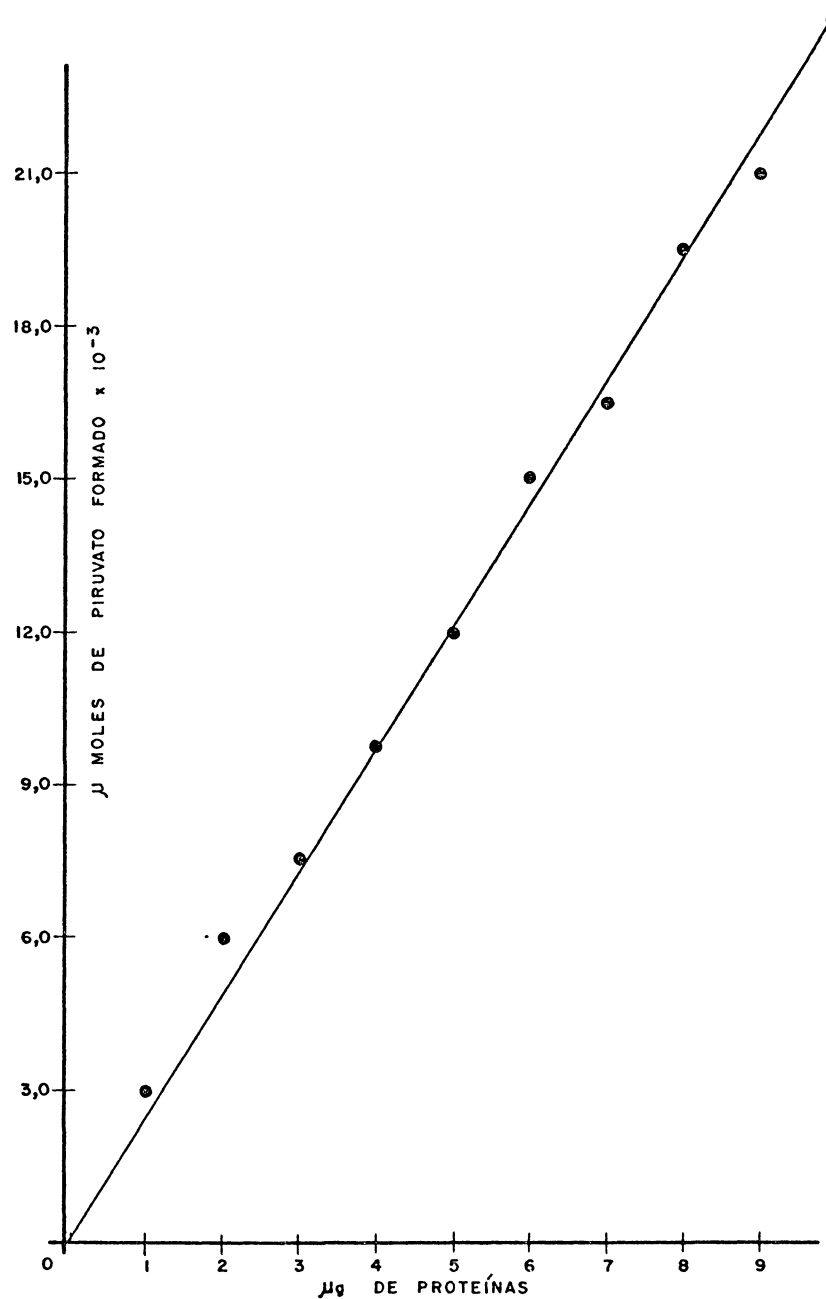


Fig.3 Efeito da concentração de enzima na velocidade de reação.

Sistema de incubação: 30μ moles de tampão Tris/HCl pH 6.7; 99μ moles de L(+) lactato de sódio, $0,12\mu$ moles de 2,6 - dicloro fenolindofenol e quantidades variáveis de enzima.

Volume final 3,0 ml.

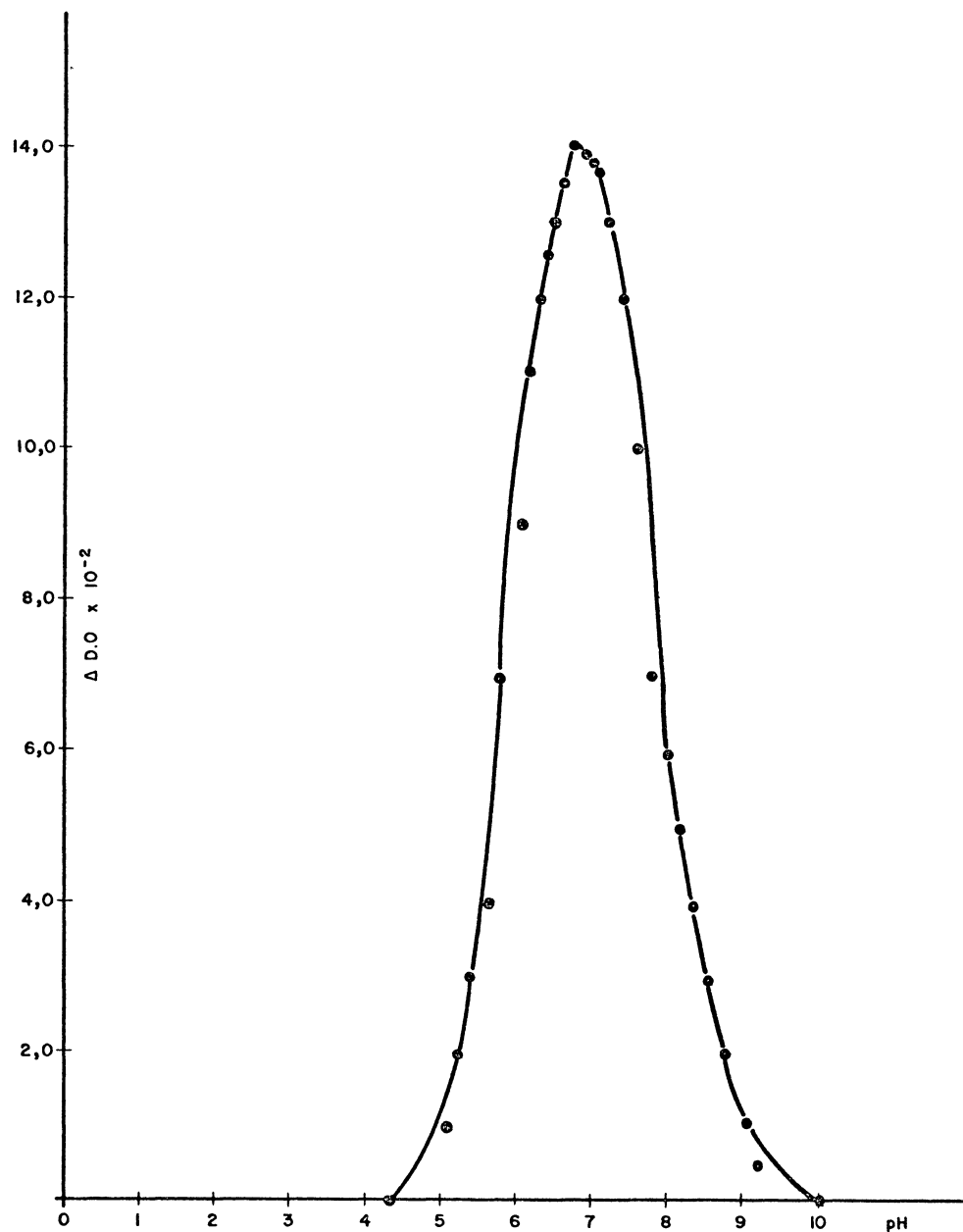


Fig.4 Efeito do pH sôbre a atividade da enzima.
Sistema de incubação: 30 μ moles de tampão
 Tris/HCl pH 6.7; 99 μ moles de L(+) lacta
 to de sódio; 0,12 μ moles de 2,6-diclorofe
 nolindofenol e 8 μ g de proteínas.
 Volume final 3,0 ml

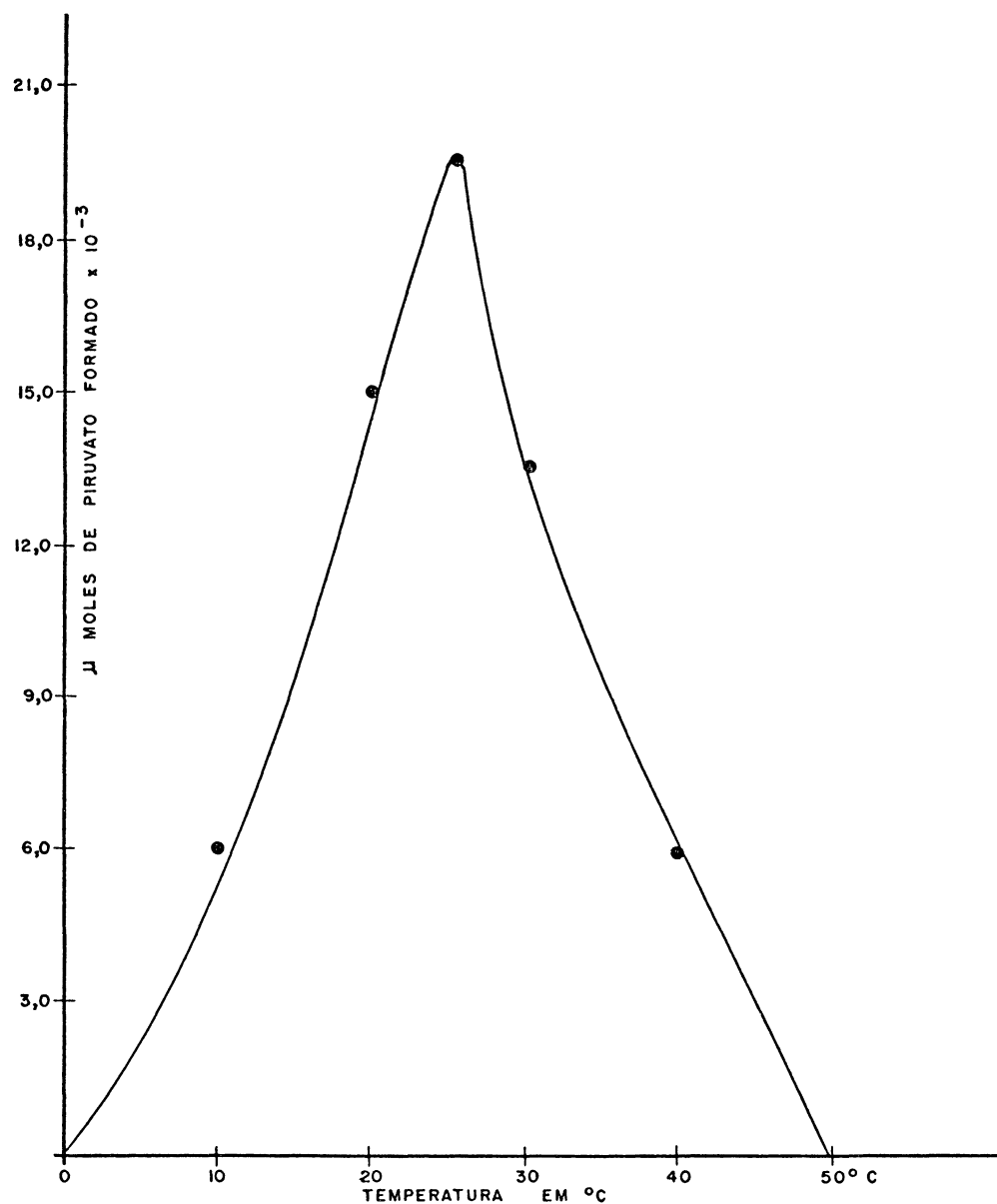


Fig. 5 Efeito da temperatura de incubação.

Sistema de incubação: 30 μ moles de tampão Tris(HCl pH 6.7; 99 μ moles de L(+) lactato de sódio; 0,12 μ moles de 2,6-diclorofeno - lindofenol e 10 μ g de proteínas.

Volume final 3,0 ml

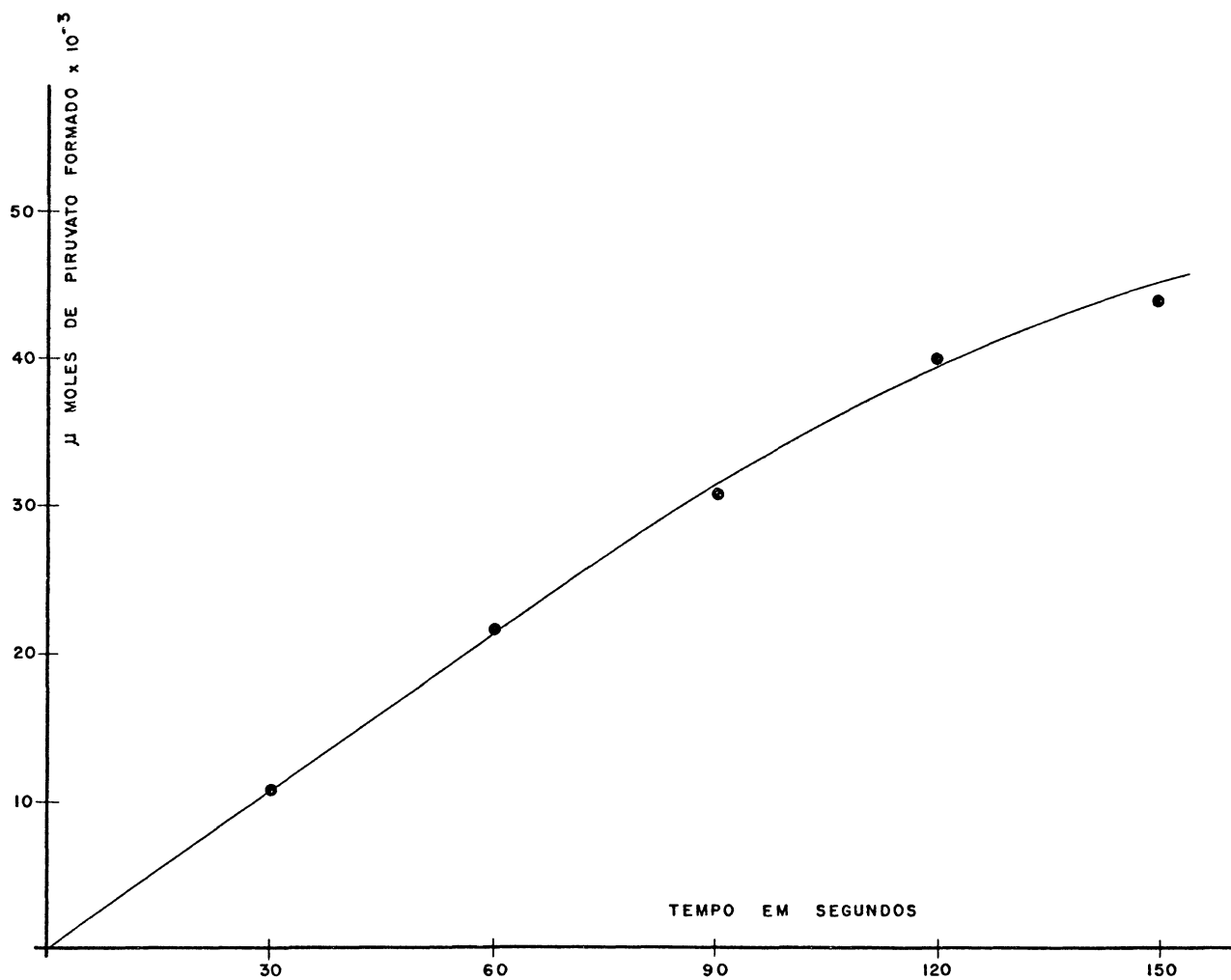


Fig.6 Efeito do tempo de incubação.

Sistema de incubação: 30 μ moles de tampão Tris/HCl pH 6.7; 99 μ moles de L(+)lactato de sódio; 0,12 μ moles de 2,6-diclorofenolindofenol e 8 μ g de proteínas.

Volume final 3,0 ml.

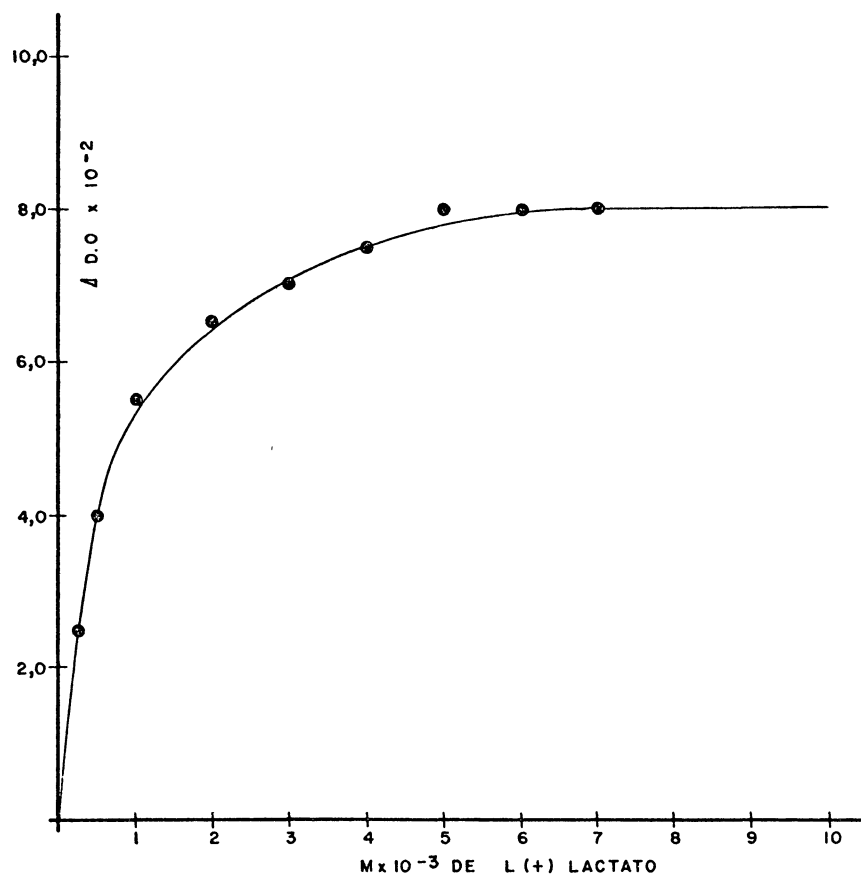


Fig.7 Efeito da concentração de substrato.

Sistema de incubação: 30 μ moles de tampão Tris/HCl pH 6.7; 0,12 μ moles de 2,6-dicloro fenolindofenol; 10 μ g de proteínas e quantidades variáveis de L(+)lactato de sódio. Volume final 3,0 ml.

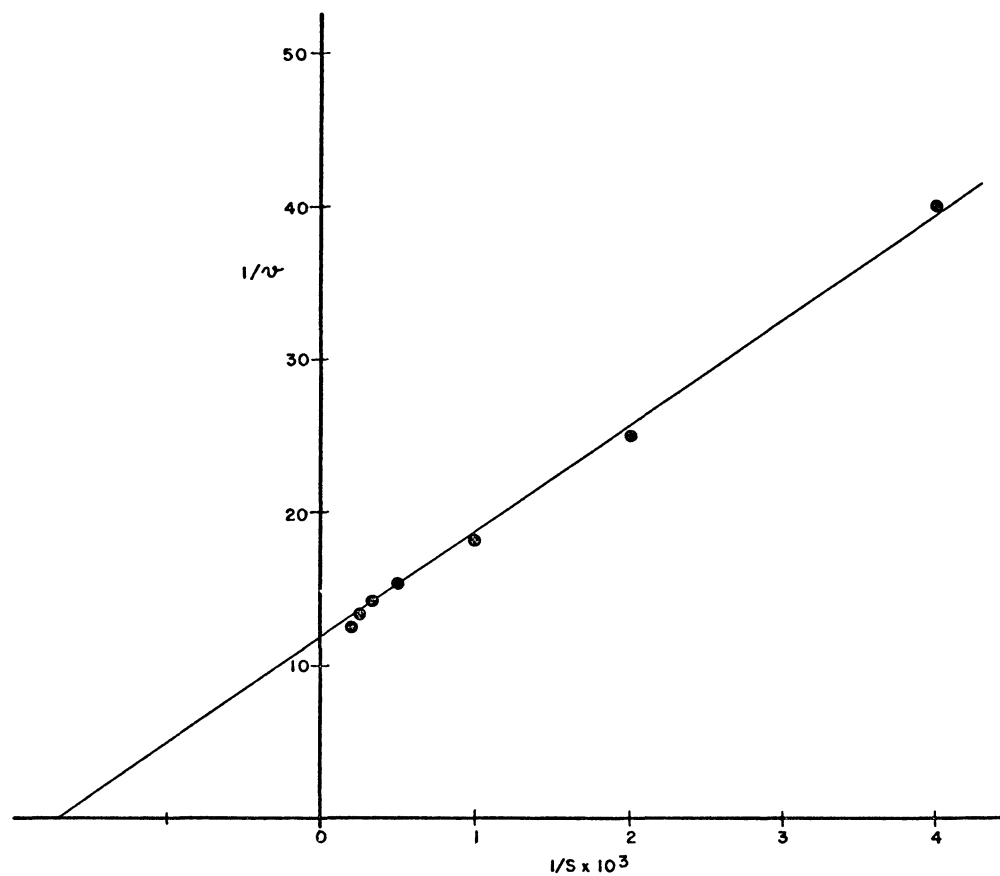


Fig. 8 Determinação da constante de MICHAELIS-MENTEN.

Sistema de incubação: 30 μ moles de tampão Tris/HCl pH 6.7; 0,12 μ moles de 2,6-diclorofenolindofenol; 10 μ g de proteínas e quantidades variáveis de L(+)lactato de sódio.

Volume final 3,0 ml.

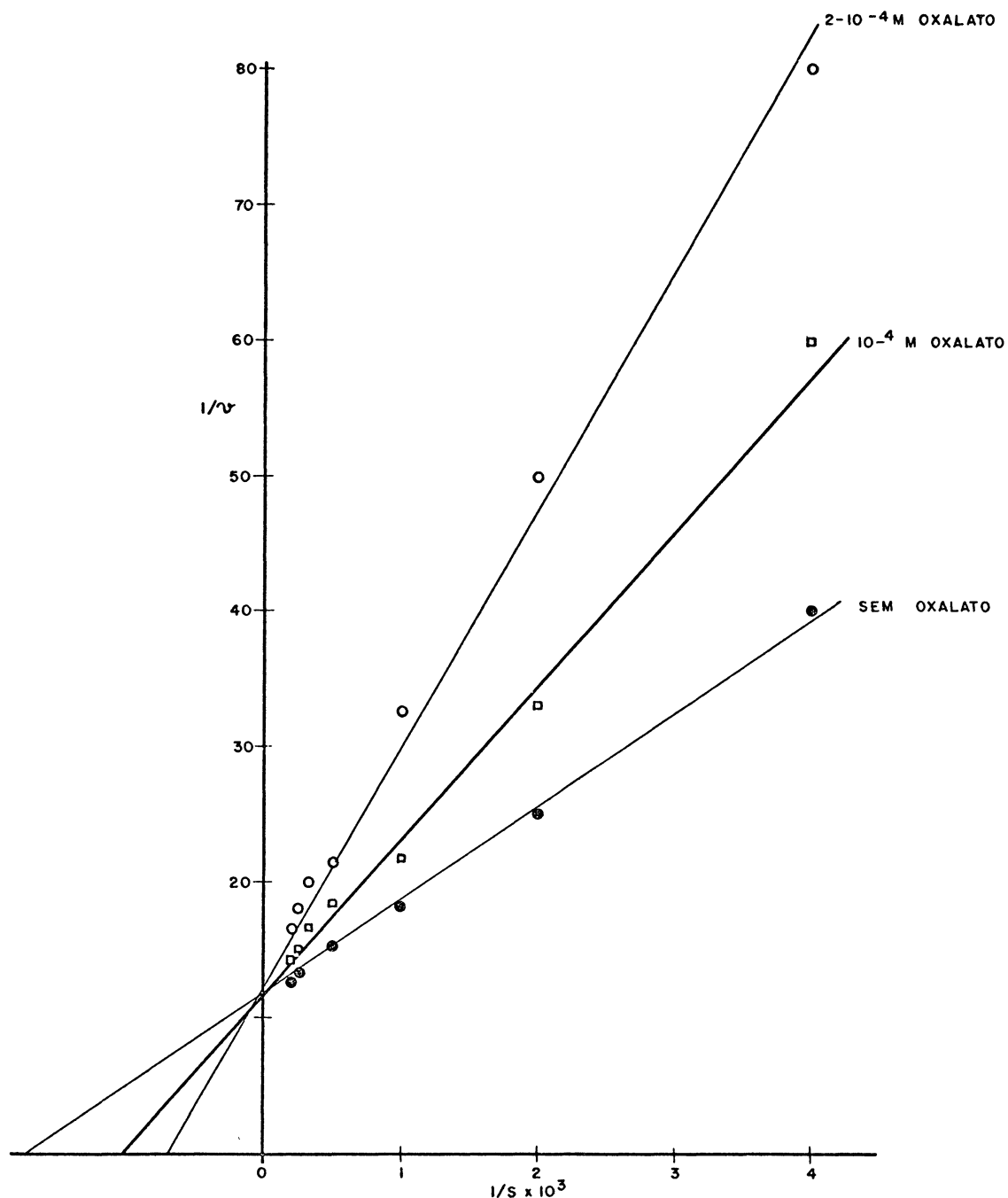


Fig.9 Efeito inibidor do oxalato.

Sistema de incubação: 30μ moles de tampão Tris/HCl pH 6.7; $0,12 \mu$ moles de 2,6-diclorofenolindofenol; $10 \mu\text{g}$ de proteínas e quantidades variáveis de L(+)lactato de sódio. Oxalato em concentrações indicadas na figura. Volume final 3,0 ml.

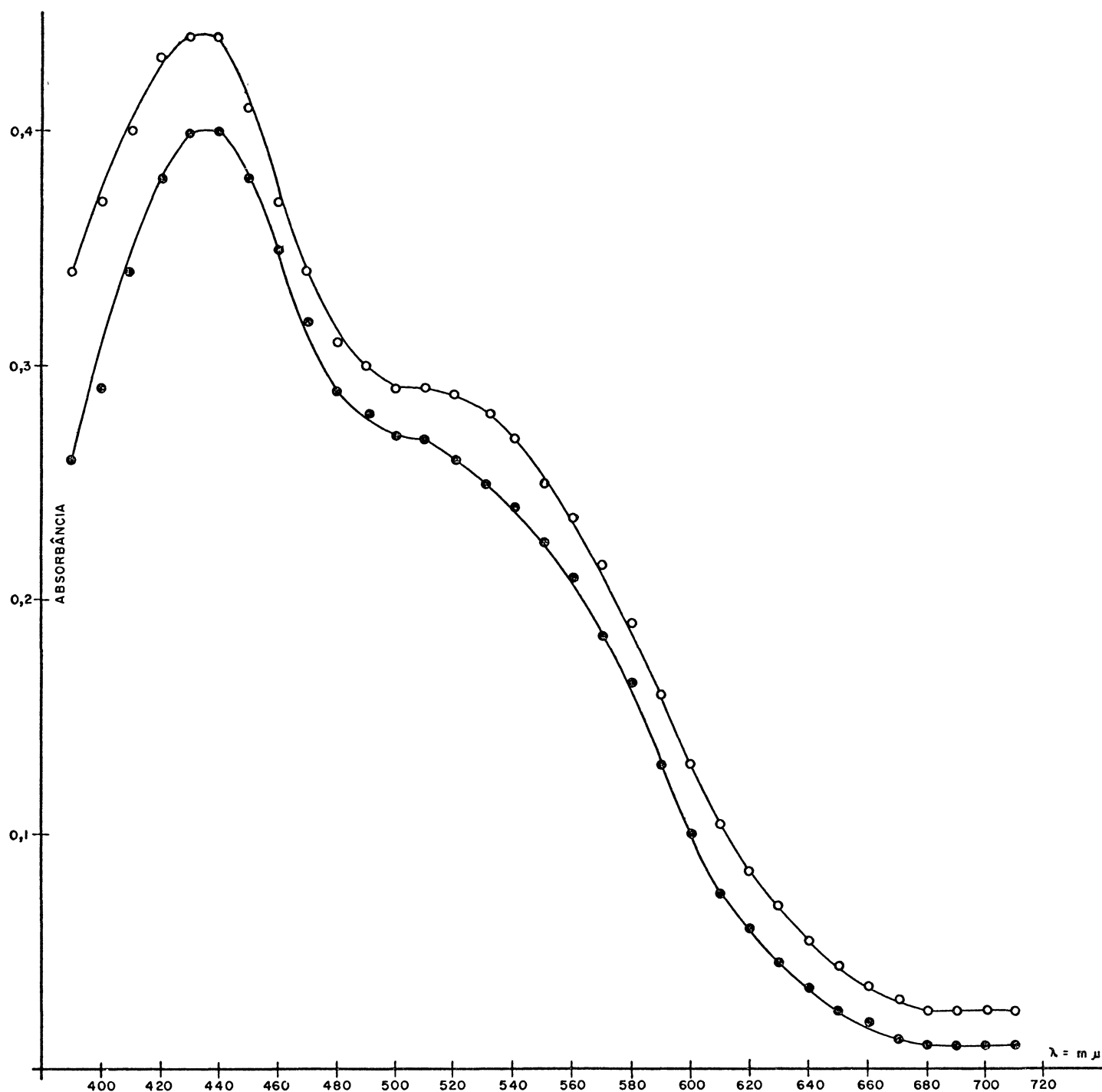


Fig.10 Identificação do produto de reação. O gráfico ilustra o espectro de absorção da 2,4dinitrofenilhidrazona do ácido pirúvico padrão (●-●-●) e do 2,4dinitrofenilhidrazona derivado do produto de reação (o-o-o).

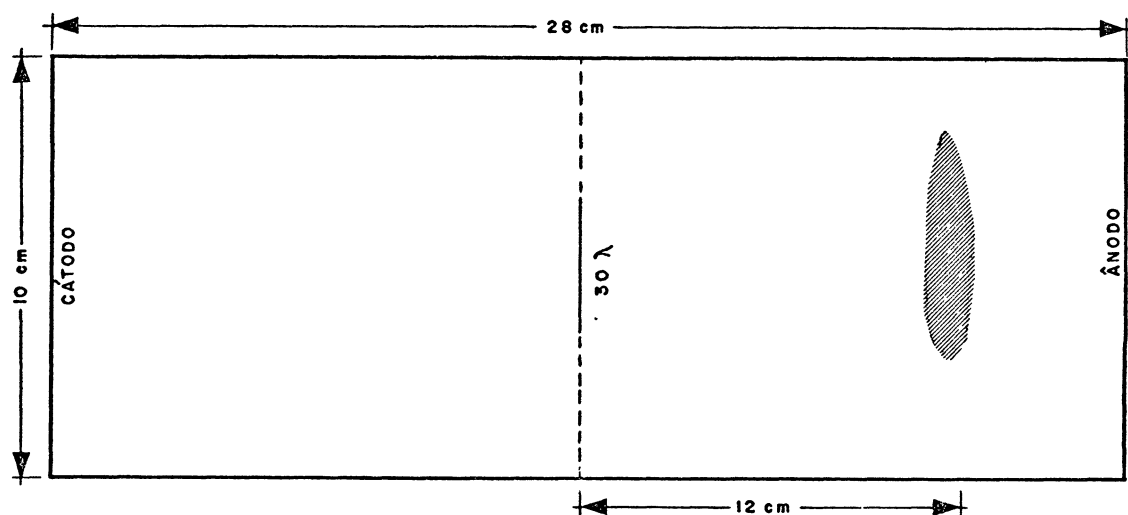
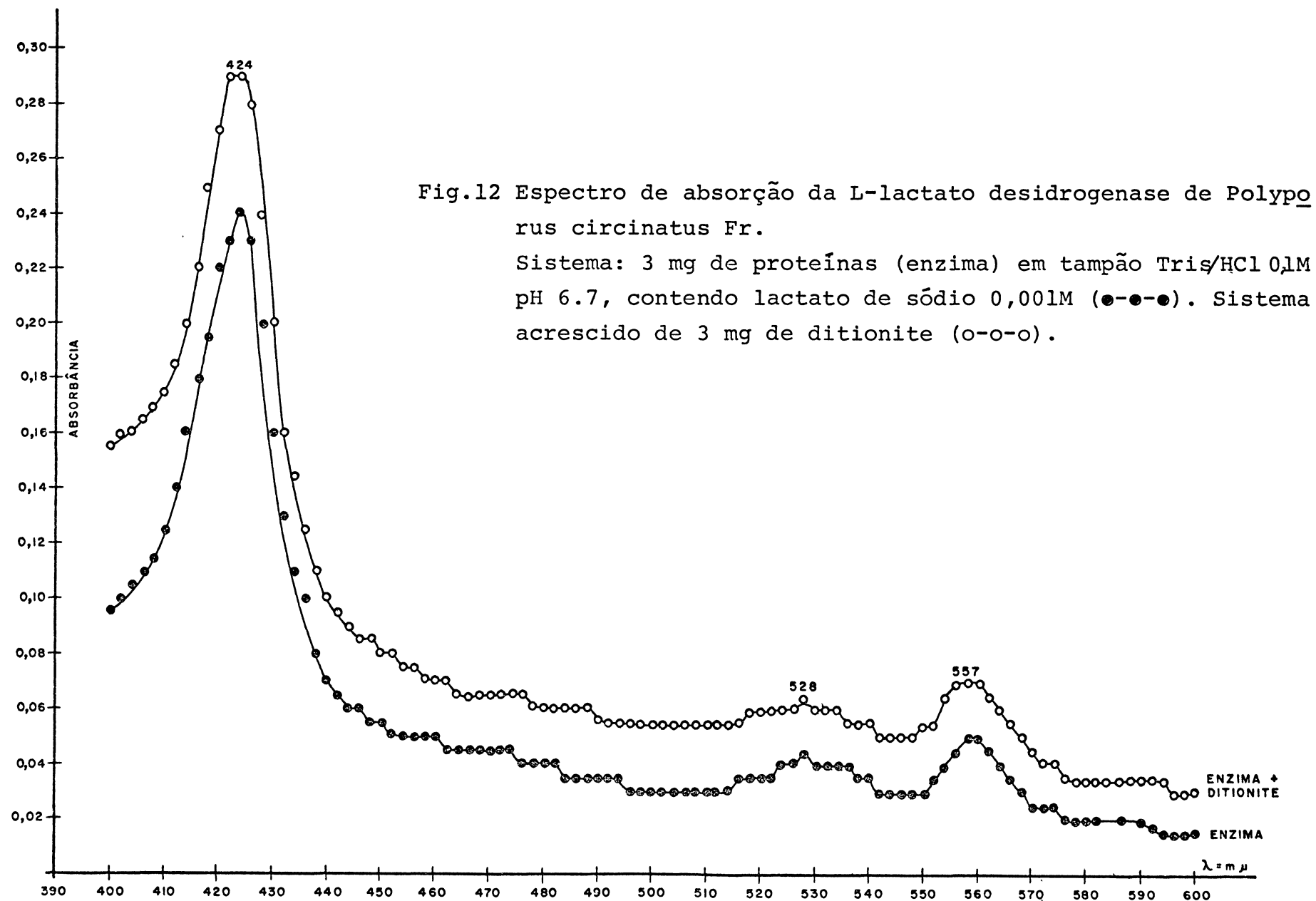


Fig. 11 Mobilidade eletroforética da L-lactato desidrogenase de Polyporus circinatus Fr.

Diferença de potencial, 1.000 VOLTS; corrente elétrica 12 mA.

Tampão Tris/HCl 0,05 M pH 7.8.



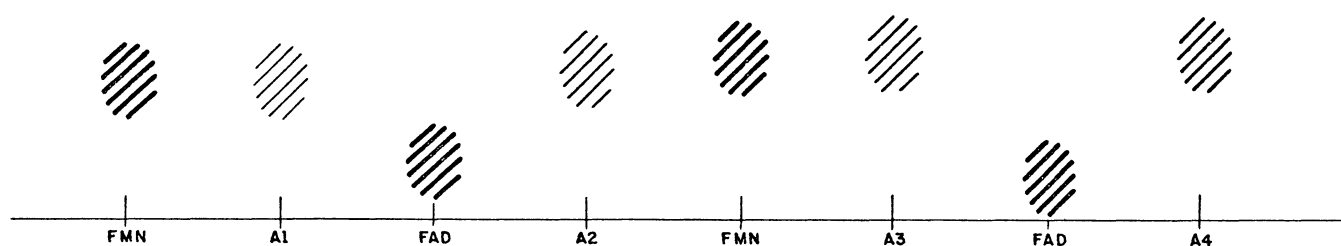


Fig. 13 Identificação do grupo prostético da enzima por cromatografia em papel.

Sistema: 6 mg de proteínas desnaturada. Sobrenadante concentrado a 0,5 ml. Solvente: n-Butanol, Ácido acético glacial e água (4:1:5). Papel Whatman nº 1. Visualização: U.V.

Legenda: FMN - Flavinamononucleotídio

FAD - Flavinadinucleotídio

A₁ - 20 µl do sobrenadante concentrado

A₂ - 40 µl do sobrenadante concentrado

A₃ - 60 µl do sobrenadante concentrado

A₄ - 80 µl do sobrenadante concentrado

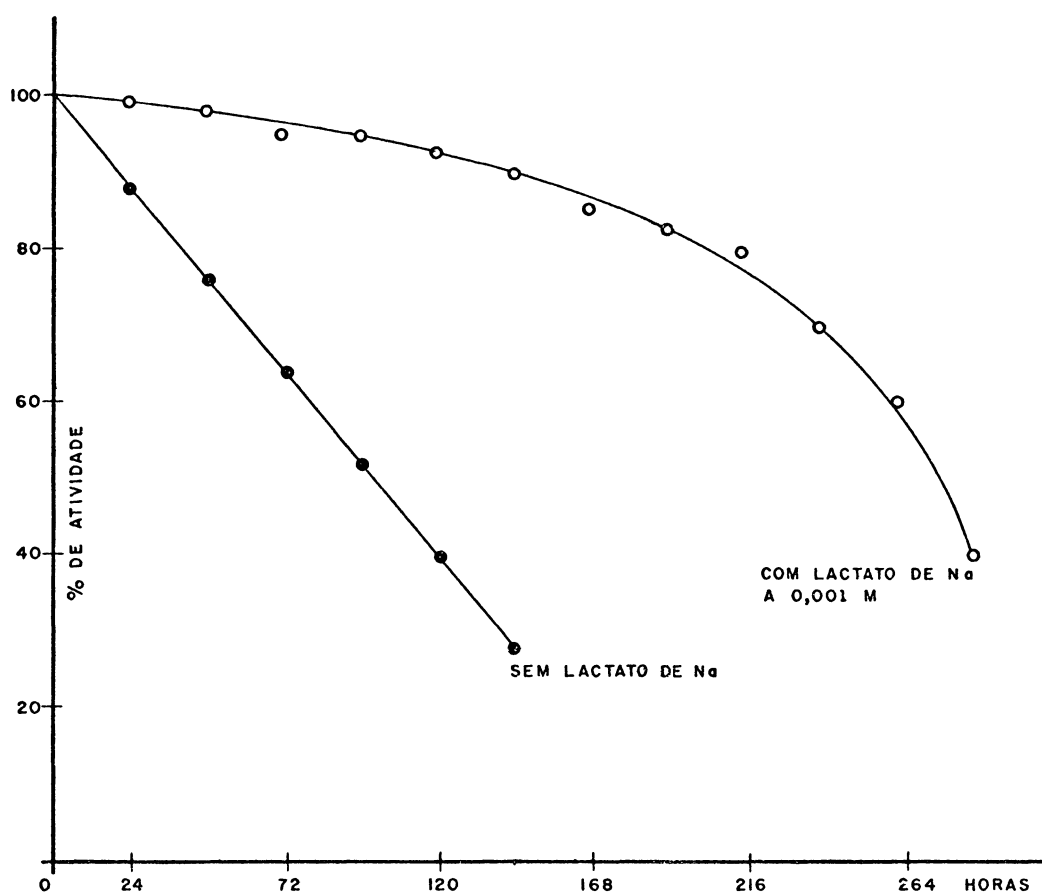


Fig.14 Estabilidade da enzima a temperatura de 0°C.

Sistema de incubação: 30 μ moles de tampão Tris/HCl pH 6.7; 99 μ moles de L(+)lactato de sódio ; 0,12 μ moles de 2,6-diclorofenolindofenol e 10 μ g de proteínas.

Volume final 3,0 ml.

DISCUSSÃO

Em extratos livres de células de Polyporus circinatus Fr, foi constatada a presença de Lactato desidrogenase independente de coenzima nucleotídeo piridínicos. A enzima somente apareceu em concentrações dosáveis, quando o referido fungo era crescido em meio contendo DL-lactato como única fonte de carbono e energia, sendo que em meio contendo glicose seus extratos exibiam atividades de Lactato desidrogenase extremamente pequenas ou então não as exibiam. Com relação a esta observação, o fungo parece comportar-se de maneira análoga ao Butyribacterium rettgeri (62). O fato dêle não biossintetizar o Lactato desidrogenase em questão quando crescido em meio contendo glicose como fonte de carbono, talvez possa ser explicado pela ação repressora deste carboidrato sobre a biossíntese desta enzima, como foi verificado por SOMLO (59) em leveduras crescidas aerôbicamente. O fracionamento do extrato de Polyporus circinatus Fr, preparado em sacarose 0,25M demonstrou que a enzima se encontrava no sobrenadante de 100.000 x g como observado para a L-lactato desidrogenase em levedura (61). Os dados da Tabela II mostram que há uma pequena atividade para o D-lactato que corresponde a 25% da atividade com o L-lactato. A atividade diminui para 10% após a precipitação com sulfato de amônio o que poderia indicar que nesta fase houve separação das duas enzimas. Os 10% de atividade mantiveram-se constantes após as passagens por colunas de DEAE-Celulose e CM-Celulose, o que pode ser explicado pela contaminação do D-lactato por 5% do L isômero. Analisando-se os dados da Tabela III, pode-se verificar que a enzima estudada no presente trabalho utilizou quase que exclusivamente o 2,6-diclorofenolindofenol como aceitador de elétrons. Sua capacidade de reduzir este aceitador assemelha-se às de D e L-lactato desidrogenases NAD-independente de bactérias (41, 26 e 62) e as L-lactato desidrogenases de leveduras (27 e 28) e de Piricularia oryzae (40). Por outro lado sua incapacidade de reduzir NAD, NADP, citocromoc ou ferricioneto, sugere um comportamento semelhante as Lactato desidrogenases de Leuconostoc mesenteroides (41), Lactobacillus arabinosus (25 e 26) e Butyribacterium rettgeri (62) as

quais não tem citocromo b_2 ligado e nem atividade de citocromo c redutases.

A enzima apresentou grande instabilidade durante as etapas iniciais de purificação, fato também observado por YAMADA et alii. (40) em Piricularia oryzae. A atividade enzimática foi preservada durante o processo de diálise, pela adição de sulfato de sódio 0,05M e de DL-Lactato 0,002M ao líquido dialisante de maneira semelhante ao observado anteriormente (10, 26 e 62) para outras Lactato desidrogenases. A enzima, purificada 27 vezes, foi particularmente preservada por lactato como se pode observar na figura nº 14. A enzima mostrou-se muito sensível ao congelamento e ao degelo mesmo em presença de substrato, fato anteriormente constatado com enzima de levedura (17). Uma vez purificada, a enzima exibe coloração rósea acentuada, é relativamente estável e por ocasião da desnaturação toma a coloração castanha, analogamente ao que foi verificado com a enzima de leveduras (18 e 19) que tem citocromo b_2 ligado. Os dados das figuras nº 4 e 5, indicam respectivamente que o pH ótimo para a atividade da enzima em estudo é de 6.7 e a temperatura ótima de 26°C comportando-se portanto, de maneira semelhante a enzima de levedura do tipo II de NYGAARD (27) e totalmente diferente da enzima de Piricularia oryzae que tem pH ótimo igual a 8.0 (40).

A constante de MICHAELIS-MENTEN (figura nº 8) determinada para o L (+) lactato foi de $5,88 \times 10^{-4}M$, de mesma ordem de grandeza da enzima de leveduras (14 e 36) o que demonstra grande afinidade da enzima pelo seu substrato. A L-lactato desidrogenase do fungo não foi inibida por sulfato de protamina, a atividade para o D-lactato não se alterou após a etapa de purificação em que o sulfato de protamina foi o agente precipitante, fato este totalmente contrário ao observado com a D-lactato desidrogenase de leveduras (37, 39 e 38). A pré-incubação da enzima com EDTA ou 8-hidroxiquinolina não afetou a velocidade de redução do 2,6-diclorofenolindofenol, mas foi afetada de 60% com 1,10 fenantrolina 0,005M, sugerindo a presença de zinco na molécula da enzima, como no caso das D-lactato desidrogenase de leveduras (21, 30, 43, 44 e 42) e da L-lactato desidrogenase de Lactobacillus arabinosus (26). Por outro lado, a variação de força

iônica e as variações nos sistemas tampões não provocaram alterações na atividade enzimática como se poderia prever dos dados com enzimas de leveduras (15, 28, 37, 39, 38 e 59). Pela análise da figura nº 9 podemos verificar que a enzima sofreu inibição competitiva por oxalato e a constante de inibição calculada é semelhante à obtida por SNOSWELL (26), para a enzima de Lactobacillus arabinosus.

Embora a purificação da enzima seja relativamente baixa, na análise eletroforética em papel, ela comportou-se como se fôsse uma proteína homogênea (figura nº 11). Esta enzima mostrou um espectro de absorção (figura nº 12) semelhante ao descrito para o citocromo b_2 (9) e ao observado por diversos autores (14, 15 e 20) para a L-lactato desidrogenase citocromo c redutase de leveduras. O espectro de absorção da enzima mostra que a mesma já se encontrava parcialmente reduzida pelo lactato utilizado para a preservação de sua atividade durante a purificação. O cromatograma da figura nº 13 sugere a presença de FMN na molécula da L-lactato desidrogenase de Polyporus circinatus Fr. A L-lactato desidrogenase de levedura tem FMN como um dos grupos prostéticos (11, 14 e 15) enquanto a D-lactato desidrogenase citocromo c redutase apresenta FAD (39, 42, 43 e 44). Os dados obtidos sugerem a presença de FMN, citocromo b_2 como grupos prostéticos, entretanto, para que se possa realmente afirmar a existência destes grupos prostéticos a enzima deverá ser submetida a diferentes métodos a fim de testar a sua homogeneidade.

Analisando-se comparativamente as diferentes enzimas estudadas, verifica-se que em leveduras crescidas sob condições aeróbicas existem: a) L-lactato desidrogenase que possui FMN e citocromo b_2 como grupos prostéticos e tem atividade de citocromo c redutase (EC. 1.1.2.3); b) D-lactato desidrogenase que possui FAD e Zn (II) como grupos prostéticos e tem atividade de citocromo c redutase (EC. 1.1.2.4). Nas leveduras crescidas sob anaerobiose existe a D-lactato desidrogenase que tem FAD e Zn (II) como grupos prostéticos e não tem atividade de citocromo c redutase (EC. 1.1.99.6). Em bactérias existem: a) L-lactato oxidase (EC. 1.1.3.2 - Lactato: O_2 óxido redutase) intimamente associada à partículas, tendo flavina como grupo prostético; b) D e L-

-lactato desidrogenase (EC. 1.1.99) que tem FMN e Zn (II) na sua estrutura, não possuem atividade de citocromo c redutase e o oxigênio molecular não serve como aceitador de eletrons.

A enzima de Polyporus circinatus Fr parece ser totalmente diferente das enzimas estudadas, pois é L-lactato desidrogenase, parece ter FMN e citocromo b_2 como grupos prostéticos, requer zinco para sua atividade, não tem atividade de citocromo c redutase e o lactato não é oxidado tendo o oxigênio molecular como a aceitador de eletrons.

CONCLUSÕES

1. Os extratos de Polyporus circinatus Fr crescidos em meio contendo DL-lactato como única fonte de carbono e energia, apresentam alta atividade de L (+) lactato desidrogenase independente de coenzimas.
2. A enzima com 27 vezes de purificação apresenta pH ótimo 6.7, temperatura ótima de 26°C, Km para o L-lactato $5,88 \times 10^{-4}M$ e Ki para o oxalato de $1,495 \times 10^{-4}M$, espectro característico de citocromo b_2 , FMN e utiliza 2,6-diclorofenolindofenol como aceitador de eletrons.

SUMÁRIO

Uma L (+) lactato desidrogenase independente de nucleotí_ídios necotinamídicos, capaz de oxidar o L (+) lactato, foi constatada em extratos de uma amostra de Polyporus circinatus Fr, o qual foi adaptado em meio contendo DL-lactato co_omo única fonte de carbono e energia. A enzima foi purifica_ada 27,53 vezes por precipitação com sulfato de protamina se_eguida por fracionamentos com sulfato de amônio, cromatogra_afia em colunas de DEAE-Celulose e CM-Celulose. Com a enzima purificada, estudou-se algumas de suas características ciné_eticas e fisicoquímicas, as quais se encontram relatadas no presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

É com emoção e júbilo que expresso meus eternos agradecimentos.

À Profa. Dra. GLACI TEREZINHA ZANCAN, Professôra Titular da Cadeira de Bioquímica da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, orientadora desta Tese, com quem tivemos a honra de iniciar nossa formação científica e que, com apôio e dedicação acompanhou o seu desenvolvimento em tôdas etapas e detalhes. Nossa eterna gratidão pela formação científica e pelo mérito que esta Tese possa ter.

Aos componentes do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelos estímulos, amizade e receptividade que temos recebido.

Ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico (BNDE), Fundo Técnico Científico (FUNTEC) e a Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas Bôlsas de Estudos concedidas, permitindo-nos concluir o Curso de Pós-graduação, bem como a elaboração dêste trabalho de Tese.

À direção da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, por nos consentir à conclusão do Curso de Pós-graduação.

OFERECIMENTOS

À DEUS sob forma de oração; à minha
espôsa e aos meus pais, aos quais
jamais serei o suficientemente grato
pelos incentivos e compreensão,
dedico êste trabalho com amor e carinho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - MEYERHOF, O. & LOHMANN, K. Biochem. Z. 171:421, 1926. In: MORTON, R.K. & SHEPLEY, K. Biochem. Z., 338:137, 1963.
- 2 - BERNHEIN, F. Biochem.J., 22:1179, 1928.
- 3 - HARDEN, A. & MACFARLANE, M.G. Biochem.J., 25:818, 1931.
- 4 - BOYLAND, E. & BOYLAND, M.E. Biochem.J., 28:1417, 1934.
- 5 - ADLER, E. & MICHAELIS, M. Z.Physiol.Chem., 235:154, 1935. In: BOYER, P.D. et alii. eds. The enzymes, v.7 New York and London, Academic press, 1963. p.557.
- 6 - OGSTON, F.J. & GREEN, D.E. Biochem.J., 29:1983, 1935.
- 7 - DIXON, M. & ZERFAS, L.G. Nature, 143:557, 1939.
- 8 - BACH, S.J.; DIXON, M.; ZERFAS, L.G. Nature, 149:48, 1942.
- 9 - BACH, S.J.; DIXON, M.; KEILIN, D. Nature, 149:21, 1942.
- 10 - BACH, S.J.; DIXON, M.; ZERFAS L.G. Biochem. J., 40:229, 1946.
- 11 - APPLEBY, C.A. & MORTON, R.K. Nature, 173:749, 1954.
- 12 - YAMAMURA, Y.; KUSUNOSE, M.; KUSUNOSE, E.J. Biochem., 39:227, 1952.
- 13 - SZULMAJSTER, J.; GRUNBERG-MANAGO, M.; DELAVIER-KLUTCHKO, C. Bull.Soc. Chim. Biol., 35:1381, 1953.
- 14 - BOERI, E.; CUTULO, E.; LUZZATI, M.; TOSI, L. Arch. Biochem. Biophys., 56:487, 1955.
- 15 - BOERI, E. & TOSI, L. Arch.Biochem.Biophys., 60:463, 1956.
- 16 - YAMASHITA, J.; HIGASHI, T.; YAMANAKA, T., NOZAKI, M. MIZUSHI MA, H.; MATSUBARA, H.; HORIO, T.; OKUNUKI, K. Nature, 179: 959, 1957.
- 17 - NYGAARD, A.P. Biochim. Biophys. Acta, 33:517, 1959.
- 18 - APPLEBY, C.A. & MORTON, R.K. Biochem. J., 71:492, 1959.
- 19 - APPLEBY, C.A. & MORTON, R.K. Biochem. J., 73:539, 1959.

- 20 - NYGAARD, A.P. Biochim.Biophys. Acta, 35:212, 1959.
- 21 - CURDEL, A.; NASLIN, L.; LABEYRIE, F. Compt.Rend.Acad.Sci., 249:1959, 1959. In: BOYER, P.D. et alii. eds.The enzymes, v. 7. New York and London, Academic press, 1963.p. 558.
- 22 - LABEYRIE, F.; SLONIMSKI, P.P.; NASLIN, L. Biochim.Biophys. Acta, 34:262, 1959.
- 23 - HAUGAARD, N. Biochim.Biophys. Acta, 31:66, 1959.
- 24 - DE LEY, J. & SCHEL, J. Biochim.Biophys.Acta, 35:154,1959.
- 25 - SNOSWELL, A.M. Biochim.Biophys.Acta, 35:574, 1959.
- 26 - SNOSWELL, A.M. Biochim.Biophys.Acta, 77:7, 1963.
- 27 - NYGAARD, A.P. Biochim.Biophys. Acta, 40:85, 1960.
- 28 - NYGAARD, A.P. Acta Chem. Scand., 14:229, 1960.
- 29 - NOSSAL. P.N.; KEECH, D.B.; MORTON, D.J. Biochim. Biophys. Acta, 22:412, 1956.
- 30 - BOERI, E.; CREMONA, T.; SINGER, T.P. Biochem.Biophys.Res. Comms., 2:298, 1960.
- 31 - SINGER, T.P.; KEARNEY, E.B.; GREGOLIN, C.; BOERI, E.; RIPP, M. Biochem.Biophys.Res.Comms., 3:428, 1960.
- 32 - APPLEBY, C.A. & MORTON, R.K. Biochem.J., 75:258, 1960.
- 33 - ARMSTRONG, J.McD.; COATES, J.H.; MORTON, R.K. Nature, 186:1033, 1960.
- 34 - MOLINARI, R. & LARA, F.J.S. Biochem. J., 75:57, 1960.
- 35 - NYGAARD, A.P. Arch.Biochem.Biophys., 86:317, 1960.
- 36 - NYGAARD, A.P. Arch.Biochem.Biophys., 88:178, 1960.
- 37 - NYGAARD, A.P. Acta Chem.Scand., 15:1627, 1961.
- 38 - NYGAARD, A.P. J. Biol. Chem. 236:2779, 1961.
- 39 - NYGAARD, A.P. J.Biol. Chem., 236:920, 1961.
- 40 - YAMADA, K.; YAMADA, H.; TAKESUE, Y.; TANAKA, S. J.Biochem., 50:72, 1961.

- 41 - KAUFMANN, E. & DIKSTEIN, S. Nature, 190:346, 1961.
- 42 - IWATSUBO, M. & LABEYRIE, F. Biochim.Biophys.Acta. 59:614, 1962.
- 43 - GREGOLIN, C. & SINGER, T.P. Biochim.Biophys.Acta. 57:410, 1962.
- 44 - GREGOLIN, C. & SINGER, T.P. Biochim.Biophys.Acta, 67:201, 1962.
- 45 - SOMLO, M. Biochim.Biophys,Acta 65:333, 1962.
- 46 - PASCAL, M.C. & PICHINOTY, F. Biochim.Biophys,Acta, 77:507, 1963.
- 47 - MORTON, R.K. & SHEPLEY, K. Biochem.Z., 338:122, 1963.
- 48 - ARMSTRONG, J.McD.; COATES, J.H.; MORTON, R.K. Biochem. J., 86:137, 1963.
- 49 - ARMSTRONG, J.McD.; COATES, J.H.; MORTON, R.K. Biochem. J., 88:266, 1963.
- 50 - MORTON, R.K. & STURTEVANT, J.M. J.Biol.Chem., 239:1614, 1964.
- 51 - LABEYRIE, F. & SLONIMSKI, P.P. Bull. Soc. Chim. Biol., 46:1793. 1964.
- 52 - SOMLO, M. & SLONIMSKI, P.P. In: LABEYRIE, F. & SLONIMSKI, P. Bull. Soc. Chim. Biol., 46:1811, 1964.
- 53 - WALKER, H. & EAGON, R.G. J. Bacteriol., 88:25, 1964.
- 54 - BAUDRAS, A. Bull.Soc. Chim. Biol., 47:1143, 1965.
- 55 - BAUDRAS, A. Bull. Soc. Chim. Biol. 47:1177, 1965.
- 56 - IWATSUBO, M. & DI FRANCO, A. Bull. Soc. Chim. Biol, 47::891, 1965.
- 57 - PASCAL, M.C. & PICHINOTY, F. Biochim. Biophys. Acta. 105:54, 1965.
- 58 - PASCAL, M.C.; PICHINOTY, F.; BRUNO, V. Biochim. Biophys. Acta. 99:543, 1965.

- 59 - SOMLO, M. Biochim. Biophys. Acta. 97:183, 1965.
- 60 - HIROMI, K. & STURTEVANT, J.M. J. Biol. Chem., 240:4662, 1966.
- 61 - NICHOLLS, R.G.; ATKINSON, M.R.; BURGOYNE, L.A.; SYMONS, R. H. Biochim. Biophys. Acta. 122:14, 1966.
- 62 - WITTENBERGER, C.L. & HAAF, A.S. Biochim. Biophys. Acta. 122:393, 1966.
- 63 - PAJOT, P.; PELL, K.S.; STURTEVANT, J.M. J. Biol. Chem., 242:3555, 1967.
- 64 - JURTSCHUK, P. & HARPER, L. J. Bacteriol., 96:678, 1968.
- 65 - IWATSUBO, M. & DI FRANCO, A. Bull. Soc. Chim. Biol., 47:891, 1965.
- 66 - IWATSUBO, M. & DI FRANCO, A. In: OKUNUKI, K. et alii., eds. Structure and function of cytochromes. Tokyo, University of Tokyo press; Baltimore, University Park press, 1968.p.613.
- 67 - MARKUS, Z.; MILLER, G.; AVIGARD, G. Appl. Microb. 13:686, 1965.
- 68 - ARMSTRONG, J. McD. Biochim. Biophys. Acta, 86:194, 1964.
- 69 - PETERSON, E.A. & SOBER, H.A. J. Amer. Chem. Soc., 78:751, 1956.
- 70 - LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. J. Biol. Chem., 193:265, 1951.
- 71 - WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Biochem. Z., 310:384, 1942.
- 72 - SCHALES, O. & SCHALES, S. J. Biol. Chem., 140:879, 1941.
- 73 - FRIEDEMANN, T.E. & HAUGEN, G.E. J. Biol. Chem., 147:415, 1943.
- 74 - MARKHAN, R. & SMITH, J.D. Biochem J., 52:552, 1952.
- 75 - CRAMMER, J. L. Nature, 161:349, 1948.
- 76 - DIXON, M. Biochem. J., 55:170, 1955.

- 77 - LINEWEAVER, H. & BURK, D. J. Amer. Chem. Soc., 56:658,
1934.
- 78 - MASSEY, V. Biochem.J., 55:173, 1953.