

JOSÉ SIQUEIRA DE ASSIS

CICLO DO ÁCIDO GLIOXILICO EM PICNOPORUS  
CINNABARINUS.

Tese de Mestrado apresentada ao  
Departamento de Bioquímica da  
Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

- 1973 -

## CONTEÚDO

INTRODUÇÃO.....	- 1
MATERIAIS E MÉTODOS.....	- 10
RESULTADOS.....	- 15
DISCUSSÃO.....	- 31
RESUMO.....	- 34
AGRADECIMENTO.....	- 35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 36

## INTRODUÇÃO

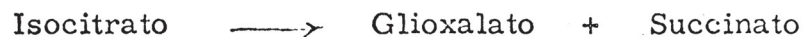
Muitos microrganismos podem obter a energia necessária para os processos biossintéticos, tendo como única fonte, compostos com dois átomos de carbono, como por exemplo acetato e etanol.

Até hoje são conhecidas duas sequências anapleróticas para o metabolismo do acetato. A primeira envolve a fixação do  $\text{CO}_2$  e parece operar somente em organismos anaeróbicos; a outra envolve duas enzimas que desviam as etapas descarboxilativas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, e se encontra amplamente distribuída entre os microrganismos (1).

A elucidação das etapas que envolvem o ciclo do ácido glioxílico, como é comumente chamada esta via, partiu de uma série de experiências e observações de diversos autores. Stephenson e Cook (2) utilizando células intactas de Escherichia coli, crescidas em acetato, observaram que as mesmas oxidavam rapidamente o acetato. Entretanto o consumo de oxigênio era de 80% do total necessário para a completa oxidação daquele substrato. Clifton (3) utilizando Escherichia coli crescida em acetato observou que o consumo de oxigênio era menor que o teórico e que parte do acetato era incorporado ao material celular. Em 1953, Campbell, Smith e Eagles (4) utilizando extratos livres de células de Pseudomonas aeruginosa, tendo citrato como substrato, não obtiveram  $\alpha$ -ceto-glutarato no líquido de fermentação. Tentando obter as 2-4 dinitrofenilhidrazonas do  $\alpha$ -ceto-glutarato e identificá-las por cromatografia, encontraram manchas que foram posteriormente identificadas como

ácido glioxílico. Os autores levantaram a hipótese de que o cisaconitato ou o isocitrato fossem os precursores do glioxalato. Logo se uma cisão destes ácidos estivesse ocorrendo, haveria formação de um mol de glioxalato e um mol de succinato. Assim foi aventada a possibilidade da existência de um desvio do ciclo dos ácidos tricarbônicos neste microrganismo, entre as etapas de cis-aconitato a succinato. A utilização de compostos radioativos veio trazer novos esclarecimentos ao assunto. Quando acetato marcado era adicionado a um meio de cultivo de um microrganismo aeróbico, era rapidamente utilizado e a radioatividade aparecia em todos os constituintes celulares. Goldschmidt, Yall e Koffler (5) fornecendo acetato radioativo as células de Penicillium Chrysogenum, encontraram que no início somente os componentes do ciclo dos ácidos tricarbônicos e os amino ácidos dele derivados diretamente, se encontravam marcados. Estes fatos sugeriram que o ciclo dos ácidos tricarbônicos era a via predominante para o metabolismo do acetato. Entretanto somente o ciclo não poderia suprir as necessidades energéticas da célula e prover os precursores dos constituintes celulares. Smith e Gunsalus (6) fracionando um extrato livre de células obtido de Pseudomonas crescidas em acetato, conseguiram obter uma enzima, que denominaram de isocitratase, que era capaz de catalizar a clivagem do isocitrato dando como produto glioxalato e succinato em quantidades equimoleculares. A enzima mostrou-se dependente de ions divalentes e grupos sulfidrilicos. Olson (7) em 1959 constatou a presença de uma isocitratase em extrato livre de células de Penicillium chrysogenum crescido em acetato e de-

monstrou a reversibilidade da reação.



A enzima foi posteriormente denominada Isocitrato liase (E. C. 4. 1. 3. 1).

Wong e Ajl (8) utilizando E. coli crescida em acetato prepararam um extrato livre de células e identificaram uma enzima que denominaram malato sintetase (E. C. 4. 1. 3. 2) e que catalisava a seguinte reação.



Estudos efetuados com Pseudomonas crescida em  $^{14}\text{C}$  acetato (9-10) confirmaram o encontrado por Goldschmidt et all (5) de que todos os intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e amino ácidos deles derivados eram os únicos produtos radioativos detectados após breve incubação. Entretanto inesperadamente encontraram que no início havia muito mais malato radioativo do que citrato e succinato, embora esta diferença não seja notada após maior tempo de incubação. Resultados semelhantes foram encontrados em E. coli (11-12), Aspergillus niger (13-14) e Saccharomyces Sp (15). Se o ciclo dos ácidos tricarboxílicos fosse a única via para o metabolismo do acetato, o citrato e o succinato seriam sempre os precursores do malato nos primeiros minutos de incubação. Kornberg e Madsen (16-17) cultivaram Pseudomonas KB1, em meio sintético contendo acetato como única fonte de carbono. As suspensões de células oxidavam rapidamente acetato e todos os componentes do ciclo de Krebs. Nos extratos livres de células quando incubados com  $^{14}\text{C}$  acetato, ATP, CoASH, glutation e glioxalato, o primeiro composto

marcado a aparecer foi o malato. Quando o isocitrato foi utilizado em lugar do glioxalato, o resultado foi semelhante, formando-se primeiramente o malato. Destas experiências os autores concluíram que a *Pseudomonas* KB1 crescida em acetato, possuía um mecanismo auxiliar que conduziria a formação do malato a partir de isocitrato, além dos sistemas enzimáticos do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Nesta via não oxidativa haveria a clivagem do isocitrato pela isocitrato liase e a condensação do glioxalato e acetil C<sub>o</sub>A, pela ação da malato sintetase. Estas reações resultariam na formação de dois ácidos dicarbóxicos com C<sub>4</sub> a partir do isocitrato e acetato. Em 1957 Kornberg e Krebs (18) utilizando extratos livres de células de *Pseudomonas* crescidas em acetato, variando o tempo de incubação e estudando a distribuição da radioatividade dos compostos formados a partir do acetato, verificaram que o acetato entrava no ciclo dos ácidos tricarbóxicos em dois pontos: no primeiro o acetato se condensava com o oxalacetato (enzima de condensação de Ochoa) e formava citrato, este a seguir era clivado formando glioxalato e succinato; no outro ponto o acetato se condensava com o glioxalato (malato sintetase) formando o malato. A esta sequência Kornberg denominou de ciclo do ácido glioxílico. A existência do ciclo do glioxalato implica no funcionamento de duas variantes do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, uma como via terminal do processo respiratório, levando o acetato a completa oxidação (CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O), fornecendo grande parte da energia aos processos endergônicos, e outra fornecendo o succinato a partir de duas moléculas de acetato, produzindo deste modo os precursores para o metabolismo celular.

O ciclo do ácido glioxílico pode também explicar a transformação direta de ácidos graxos em carboidratos. Assim Kornberg e Beevers (19) demonstraram a presença do ciclo do ácido glioxílico nas sementes de Ricinus Communis (mamona) e a transformação dos ácidos graxos (acetil CoA) em carboidratos era explicada desta maneira.

Como o ciclo do glioxalato serve para suprir os organismos crescidos em acetato, de ácidos carboxílicos com  $C_4$ , o funcionamento do mesmo não seria necessário quando os intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou compostos que lhe possam dar origem fossem formados. Mesmo quando o ciclo do glioxalato fosse necessário para a produção de um desses ácidos orgânicos, deveria existir nas células mecanismos de regulação para comandar as operações simultâneas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e do ciclo do ácido glioxílico afim de evitar um descontrole na utilização de um substrato, para suprimento de energia ou para o fornecimento de precursores do material celular (26). Em muitos organismos este controle seria exercido pela isocitrato liase. As observações de diversos autores de que a isocitrato liase era inibida não competitivamente por succinato (27-14) e oxalacetato (28) e sabendo-se ainda que a produção de succinato e malato é resultado da ação das enzimas do ciclo do ácido glioxílico, sendo o malato o precursor imediato do oxalacetato, sugeriram a existência de um mecanismo de controle do tipo "feed back" negativo.

Um segundo tipo de controle se manifesta pela regulação da formação da isocitrato liase. Smith e Gunsalus (29) foram os

primeiros a notar que esta enzima só era encontrada em quantidades abundantes quando os microrganismos eram crescidos em acetato. Isto foi confirmado em uma série de microrganismos (12-14-20-21-22-23-24-25). As experiências realizadas por Kornberg e Elsdén (26) com Pseudomonas ovalis, demonstraram que as células quando colocadas em meio contendo acetato continuavam apresentando alta atividade específica para isocitrato liase. Entretanto quando estas células eram colocadas em presença de succinato, cessava completamente a formação de isocitrato liase. Se as células crescidas em succinato fossem colocadas em meio contendo uma mistura de succinato e acetato, a isocitrato liase só começava a ser formada após todo o succinato ter sido utilizado. Assim também as células crescidas em succinato, quando transferidas para um meio contendo acetato, só começavam a crescer após um período de "lag" de duas horas quando o nível de isocitrato liase subia abruptamente. Os níveis de isocitrato liase se mantiveram constantes durante a fase logarítmica de crescimento (30). Estas observações permitiram postular a função do ciclo da glioxalato como uma sequência necessária para o crescimento em acetato. Estudos com Micrococcus denitrificans (31), mostraram que a formação da isocitrato liase era profundamente influenciada pela composição do meio de cultivo. Assim a adição de pequenas quantidades de extrato de levedura ( que contem succinato) retardaram a formação de isocitrato liase nas células crescidas em acetato. Este é um efeito semelhante ao observado por Kornberg e Elsdén (26) com a adição de succinato ao meio de cultivo. Estes fatos sugeriam que a isocitrato liase estava sujeita a repressão pelo succinato ou compostos dele derivados (32-33-34). Estes fatos leva-

ram Kornberg e Elsdén a afirmar que uma provisão ou produção de um excesso de ácidos dicarboxílicos com  $C_4$  conduzem a formação de um repressor para a isocitrato liase. Desde que o acetato não pode dar origem à formação de ácidos dicarboxílicos com  $C_4$ , na ausência de isocitrato liase, o crescimento contínuo seria acompanhado de uma baixa dos níveis intracelulares destes ácidos e em consequência uma desrepressão da enzima.

Flavel e Woodward (35) estudando as enzimas do ciclo do glioxalato em Neurospora crassa, verificaram que o adicionando aos meios de cultivo que continham acetato como fonte de carbono, intermediários do ciclo de Krebs e compostos com ele relacionados, somente o glutamato produzía repressão significativa na atividade da isocitrato liase e malato sintetase. Ashworth e Kornberg(36) sugeriram a existência de um controle fino em E. coli exercido pelos níveis de fosfoenolpiruvato nas células, que mostrou ser um inibidor não competitivo da enzima. Seus resultados indicam que o fosfoenolpiruvato impede a formação de compostos com  $C_4$  a partir de acetato, nas células ricas em enzimas do ciclo do glioxalato e isto é conseguido através da inibição da isocitrato liase. A conclusão de que o controle do ciclo do glioxalato seja feita pela isocitrato liase e não pela malato sintetase outra enzima chave do ciclo, baseia-se em trabalho feito em P. ovalis (37) que mostrou que os níveis intracelulares de isocitrato liase são profundamente afetados pela fonte de carbono utilizada para o crescimento, sem que grandes alterações sejam observadas nos níveis de malato sintetase. Resultados semelhantes aos encontrados em P. ovalis foram obtidos em M. dentrificans (24) Aspergillus niger (14) Chromatium (26) e diversos membros da família das

Athiodaceae (25). Em contraposição em Saccharomyces Sp. (20) e E. coli (12-38) foram encontradas grandes variações nos níveis de malato sintetase sugerindo a existência de uma indução sequencial da malato sintetase, nestes últimos microrganismos pelo glioxalato formado pela ação da isocitrato liase. Estes fatos vem em apoio ao encontrado em E. coli, de que a formação da isocitrato liase precede a formação da malato sintetase (38) e também de que o ciclo do glioxalato seja controlado pela ação da isocitrato liase.

Armitt, Roberts e Kornberg (39) (40) estudaram a variação da atividade da isocitrato liase e malato sintetase numa amostra selvagem de Aspergillus nidulans, em presença de diferentes fontes de carbono. Observaram entre outras coisas que a presença de uma mistura de acetato e glutamato não afetava a atividade específica da isocitrato liase em relação às células crescidas somente em acetato. Investigaram também os níveis destas duas enzimas em mutantes isocitrato liase negativas e malato sintetase negativas. As mutantes malato sintetase negativas apresentavam níveis normais de isocitrato liase, quando crescidas em uma mistura de sacarose e acetato. Da mesma forma as mutantes isocitrato liase negativas apresentavam níveis normais de malato sintetase. Esta última observação contraria a hipótese de uma indução sequencial da malato sintetase pelo menos neste microrganismo. Em suma, podemos concluir que o ciclo do glioxalato foi amplamente estudado em bactérias e fungos imperfeitos. Em fungos superiores, esta via tem sido pouco estudada. Casselton, Fawole e Casselton (41) determinaram a atividade da isocitrato liase em extratos livres de célula de um basidiomiceto, Coprinus lagopus em diferentes fases de desenvolvimento,

utilizando acetato, glicose e asparagina como fontes de carbono. Posteriormente O<sup>s</sup> Sullivan e Casselton (42) estudaram a localização subcelular das enzimas do ciclo do glioxalato no mesmo Basidiomiceto.

Entre a classe dos Basidiomicetos, encontramos diversos fungos apodrecedores da madeira, pertencentes a família das Polyporaceae. Nestes microrganismos nada se conhece a respeito do ciclo do ácido glioxílico. Entre estes basidiomicetos encontra-se Picnóporus cinnabarinus. Uma amostra desta espécie isolada no Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas, foi capaz de crescer em meio sintético, contendo acetato como fonte de carbono. O presente trabalho visa esclarecer o funcionamento desta via quando o fungo é crescido em diferentes fontes de carbono. Deste modo maiores esclarecimentos poderão advir, no que concerne a fisiologia e morfogênese destes microrganismos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

1- Microrganismo: A amostra de Picnoporus cinnabarinus foi isolada e classificada no Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná.

2- Condições de cultivo: A cultura foi mantida em agar-Sabouraud glicose. O meio líquido de cultivo apresentava a seguinte composição:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anidro 0,9 g%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anidro 0,8 g%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,2 g%,  $\text{MgSO}_4$  0,02g%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,1g%,  $\text{MnSO}_4$  0,001g%,  $\text{CuSO}_4$  0,002g%, hidrolisado de caseína, 1g%, extrato de malte 0,1g%, glicose, acetato, ou etanol 1g%. A glicose e o extrato de malte quando utilizados foram esterelizados separadamente. O etanol absoluto foi acrescentado após esterelização. Nas experiências em que foi medida a atividade de malato sintetase, o hidrolisado de caseína foi suprimido do meio de cultivo. O meio foi ajustado a pH 6,0. A seguir foi distribuído em frascos erlenmeyers de 2.000 ml de capacidade, contendo 500 ml de meio líquido em cada um. Foi então esterelizado durante 30 minutos em autoclave a uma atmosfera de pressão.

A amostra foi inoculada a partir da cultura estoque em Sabouraud, em meio contendo glicose, etanol ou acetato como fonte de carbono. E, seguida os frascos foram colocados em um agitador rotativo a 100 rotações por minuto à temperatura de 28°C. O micélio foi coletado após 72 horas, por filtração em gase, sendo lavado várias vezes com água destilada. O material coletado foi distribuído em diversas porções, enroladas em papel estanhado e estocadas a

-20°C. Este material foi usado no preparo dos extratos livres de células.

3- Curvas de crescimento: Para a realização das curvas de crescimento nas diversas fontes de carbono, foi preparado o inóculo a partir da cultura estoque em Sabouraud, utilizando glicose, acetato ou etanol como fonte de carbono. Para dar uniformidade ao inóculo foram colocadas pérolas de vidro aos frascos de cultivo. Após 12 horas de crescimento obtinha-se uma suspensão uniforme da qual 1 ml era assepticamente transferido para frascos de 500ml de capacidade contendo 100 ml do meio líquido. Os frascos eram mantidos em agitação constante a 28°C. As diversas amostras foram coletadas nos diferentes tempos por filtração em papel de filtro previamente seco e pesado e a seguir levadas a estufa a 100°C até peso constante.

O peso seco das diversas amostras foi assim calculado para a determinação da curva de crescimento.

4- Medida de Consumo de Oxigênio: O consumo de oxigênio por células intactas de Picnóporus cinnabarinus, em meio contendo D-glicose, acetato de sódio ou etanol, como fonte de carbono, foi medido manometricamente em aparelho de Warburg. D-glicose e acetato de sódio foram os substratos empregados. As células coletadas foram lavadas tres vezes com água destilada e suspensas em tampão fosfato 0,1M pH 5,6 e deixadas em jejum com aeração durante 14 horas. A seguir o material foi novamente filtrado e suspenso no mesmo tampão fosfato, na proporção de 1g (peso úmido) para 25 ml, sendo a suspensão utilizada em seguida. O sistema de incubação continha 2,5 ml da suspensão de células e 10  $\mu$ moles de

substrato. O sistema foi incubado a 28°C em condições aeróbicas e com agitação constante de 90 oscilações por minuto. O CO<sub>2</sub> liberado foi retido em 0,15 ml de KOH a 15g%. O coeficiente respiratório (QO<sub>2</sub>) foi definido como µl de oxigênio consumidos por mg de células (peso seco) por hora.

5- Extrato livre de células: Os extratos livres de células foram preparados por dois processos:

a) 3 a 4 g de células congeladas foram colocadas em um gral de porcelana e trituradas com dois volumes de areia do mar, previamente lavada e calcinada. A massa obtida foi suspensa com três volumes de tampão Tris HCl pH 7,8, se a enzima a ser estudada era a isocitrato liase e pH 7,9 se a atividade a ser medida era a da malato sintetase.

b) 2 a 3 g do micélio foram suspensas em cinco volumes de tampão Tris HCl pH 7,8 ou 7,9 conforme a enzima a ser analisada; a suspensão foi a seguir submetida a tratamento em ultra som por dois minutos em um Biosonik-Ultrasonic-Prove Bronwil modelo BPII a frequência de 20 Keps. As suspensões obtidas pelos dois métodos foram centrifugadas a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos em centrífuga refrigerada 0-4°C (modelo PR 2) e os sobrenadantes foram utilizados como fonte de enzima.

#### 6- Medida das atividades enzimáticas.

6.1 - Isocitrato liase. A isocitrato liase foi determinada pelo método de Daron e Gunsalus (43) usando D-L isocitrato como substrato e medindo o glioxalato acumulado. O sistema de incubação foi o seguinte: 10 moles de tampão Tris HCl 3 µmoles de Mg Cl<sub>2</sub>; 2 µmoles de cisteína HCl; 7,5 µmoles de D-L isocitrato; enzima 50 a 100 µg e água para perfazer um volume de 1,9 ml.

A atividade específica foi expressa como:  $\mu$ moles de glioxalato por mg de proteínas por hora nas condições de ensaio.

6.2 - Malato sintetase. A atividade de malato sintetase foi ensaiada medindo a liberação de coenzima A<sup>-</sup>SH, quando os extratos eram incubados com acetil-coenzima A e glioxalato, segundo Orston e Orston (44) modificando o volume e o tempo de incubação. A composição do sistema era a seguinte: tampão Tris HCl pH 7,9, 50

$\mu$  moles, Mg Cl<sub>2</sub> 5  $\mu$  moles, acetil-coenzima A 0,2  $\mu$  moles, glioxalato de sódio 0,5  $\mu$  moles, enzima 50 a 200  $\mu$ g. Volume final de incubação 0,5 ml. A mistura foi incubada a 30°C durante dois minutos e a reação interrompida pela adição de 1 ml de ureia 6N e 0,5  $\mu$ mol de ácido 2-nitrobenzóico (5,5'Ditiobis). Após dez minutos, a absorção a 412 m $\mu$  foi determinada em espectrofotometro Beckman modelo DU2. A atividade específica foi definida como moles de grupamentos SH formados por mg de proteína por hora, nas condições de ensaio.

#### 7- Identificação dos produtos das reações.

7. 1 - Identificação do glioxalato. Para a identificação do glioxalato formado pela ação da isocitrato liase foi utilizada a técnica de Daron e Gunsalus (43). O sistema de incubação tinha a seguinte composição: Tampão Tris HCl 10  $\mu$ moles, MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ moles, cisteína HCl 2  $\mu$ moles, D-L-isocitrato de sódio 7,5  $\mu$ moles, extrato livre de células 0,04 ml, (120  $\mu$ g de proteína) água para perfazer o volume de 1,9 ml. Um padrão de glioxalato foi tratado da mesma maneira. Os espectros da 2-4 fenilhidrazona formada, no ensaio e no padrão, foram determinados em espectrofotometro Beckman, modelo DB com registrador acoplado.

7.2 - Identificação do malato. Para identificação do malato pela ação da malato sintetase, foi usada a técnica descrita por Warner et alli (45). O sistema de incubação continha: 50  $\mu$ moles de Tris HCl pH 7,9, 10 moles de  $MgCl_2$ , 0,2  $\mu$ moles de glioxalato de sódio, 0,2  $\mu$ Ci de glioxalato de sódio -  $1-C_{14}$ , 0,5  $\mu$ moles de acetil CoA, 0,1 ml de extrato livre de células (1 mg de proteína) água para perfazer 0,56 ml. Paralelamente foram efetuados dois controles, um com enzima fervida e outro com enzima dialisada durante seis horas em tampão Tris HCl 0,01M pH 7,9. As aliquotas retiradas após a incubação foram acrescentados 50  $\mu$ moles de ácido málico como carreador. O ácido orgânico formado pela ação da enzima foi localizado por comparação, com um padrão de ácido málico, corrido no mesmo cromatograma e revelado com anilina, xilose em metanol (46). As amostras radioativas foram detectadas em contador de cintilação líquida Beckam model LS-133.

8 - Determinação de proteínas: As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry et alli (47).

9 - Reagentes: D-L isocitrato sal trissódico, ácido glioxílico sal sódico, S-acetil coenzima A sal sódico, albumina bovina cristalina e ácido málico, eram produtos fornecidos pela Sigma Chemical Company, ácido 2-nitrobenzoico fornecido pela Calbiochem, glioxalato de sódio  $1-C_{14}$ , produto da Amersham Searle, Tris (hidroximetil) amino-metano, 2-4 dinitrofenil-hidrazina, e os sais minerais usados para o meio de cultivo, eram produtos Merck. Extrato de malte e hidrolisado de caseína fornecidos pela Difca.

## RESULTADOS

Curvas de crescimento: O fungo Picroporus cinnabarinus foi crescido em meio contendo glicose, etanol ou acetato como fonte de carbono. Os gráficos das figuras I, II e III relacionam o peso seco dos micélios com o tempo de crescimento. Os resultados mostram que o crescimento variou em ordem decrescente quando a fonte de carbono era glicose, acetato ou etanol. A fase exponencial do crescimento se situa entre 24 e 128 horas para as células crescidas em glicose e 48 a 150 horas para as células crescidas em acetato e etanol. O período de lag observado, quando as células eram crescidas em etanol e em acetato pode ser explicado como sendo o tempo necessário para a indução das enzimas do ciclo do glioxalato.

Utilização da glicose e do acetato: As experiências realizadas para medir o consumo de oxigênio em respirômetro de Warburg, estão evidenciadas nas figuras IV, V, VI e na tabela I. Pode-se observar que as células crescidas em glicose utilizaram melhor a glicose que o acetato. Para as crescidas em acetato, a oxidação deste foi maior que a da glicose. Quando as células foram crescidas em etanol, o consumo de oxigênio foi maior para a glicose do que para o acetato.

Atividades enzimáticas: As atividades da isocitrato liase e malato sintetase variaram de acordo com a fonte de carbono utilizada para o crescimento como mostra a tabela II. A presença de hidrolisado de caseína no meio de cultivo, ocasionou a repressão

da atividade da malato sintetase. Para a medida da atividade daquela enzima, foi necessário suprimir o hidrolisado de caseína do meio de cultivo.

Os dados da tabela II demonstram ainda o aumento da atividade tanto da isocitrato liase como da malato sintetase quando o fungo era crescido em acetato. Houve também um ligeiro aumento da atividade enzimática quando o microrganismo era crescido em etanol. O crescimento em glicose resultou na repressão da atividade das duas enzimas.

Influência da concentração de enzima sobre a velocidade da reação. A influência da concentração de enzima sobre a velocidade da reação está evidenciada nas figuras VII e VIII. Os dados mostram que existe proporcionalidade entre a velocidade da reação e a concentração de enzima, para a isocitrato liase até a concentração de 120  $\mu\text{g}$  de proteínas e para a malato sintetase até a concentração de 0,2  $\mu\text{g}$  nas condições dos ensaios.

Identificação dos produtos das reações. O glioxalato formado pela ação da isocitrato liase foi identificado por comparação com o espectro das 2-4 fenil-hidrazonas preparadas a partir de um padrão de glioxalato de sódio. Os dados da figura IX mostram a identidade dos espectros, sugerindo ser o ácido glioxílico o produto da reação.

A formação do malato pela ação da malato sintetase foi comprovada utilizando glioxalato  $-1\text{-C}_{14}$  como substrato. O produto radioativo apresentou a mesma mobilidade cromatográfica do padrão de ácido málico. Os resultados da incorporação do glioxalato em malato encontram-se na tabela III.

Efeito do  $Mg^{++}$  sobre a atividade da isocitrato liase. O gráfico da figura XI demonstra a ativação da isocitrato liase pelo magnésio. Houve aumento da atividade enzimática até a concentração de  $6 \times 10^{-4} M$ .

Efeito dos grupamentos SH sobre a atividade da isocitrato liase. A atividade da isocitrato liase demonstrou ser totalmente dependente da presença de grupamentos SH. Na ausência de cisteína HCl a atividade foi reduzida em 83%. Por outro lado o p. cloromercúrio benzoato de sódio na concentração final de  $10^{-5} M$  provocou uma inibição de 97% na atividade enzimática.

T A B E L A I

Utilização da glicose, acetato e etanol pelo Picnoporus cinnabarinus

Meio de crescimento	Glicose		Acetato		Etanol
	Glicose	Acetato	Glicose	Acetato	
Substrato					
QO <sub>2</sub> por hora	1,0	0,53	0,66	1,56	1,1
					0,73

Sistema de incubação: 2,5 ml de suspensão de células em tampão fosfato  
 0,1 M pH 5,6, 10 µmoles de substrato, 0,15 ml de  
 KOH 5g%.

T A B E L A II

Atividade da isocitrato liase e malato sintetase no Picnoporus cinnabarinus, em diferentes fontes de carbono.

Fontes de carbono	Isocitrato liase Atividade específica	Malato sintetase Atividade específica
Acetato	16,1	3,7
Etanol	1,0	2,0
Glicose	0,1	1,0

Atividade específica da isocitrato liase =  $\mu$ moles de glioxalato/mg proteína/hora.

Atividade específica da malato sintetase =  $\mu$ moles grup. SH/mg proteína / hora.

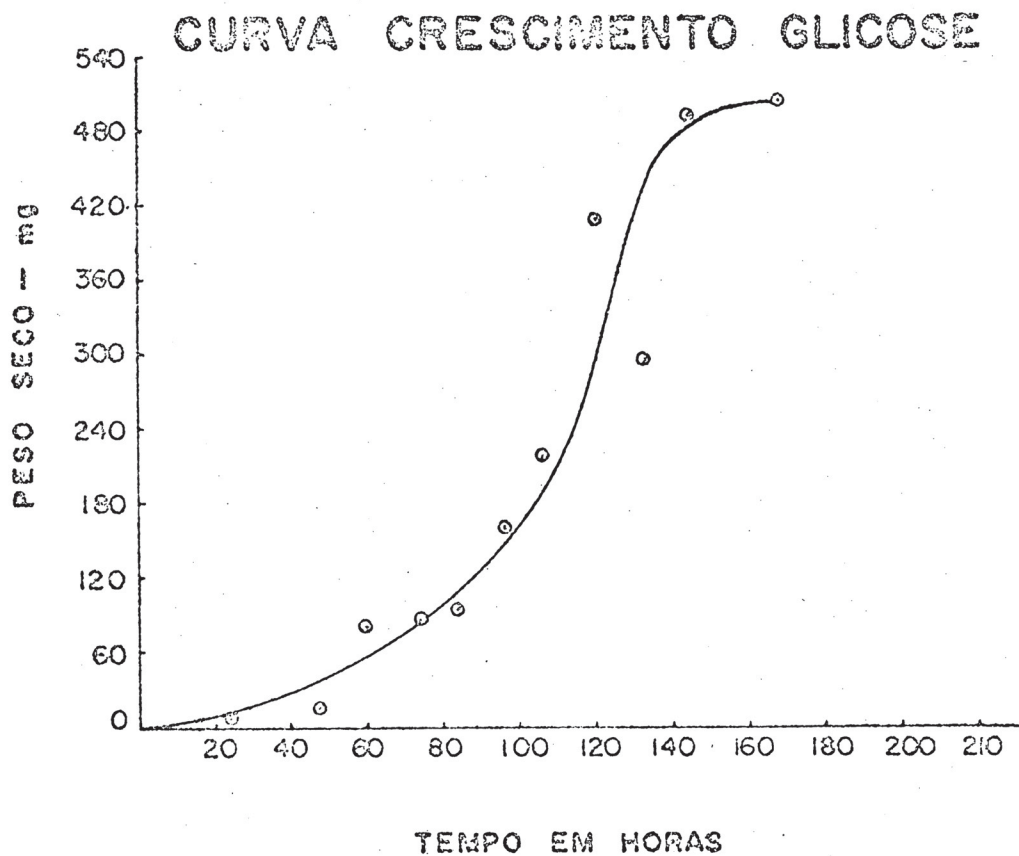
TABELA III

Incorporação do glioxalato em malato, pela malato sintetase de Picnoporus cinnabarinus.

Sistema enzimático	c.p.m.
Branco S/acetil CoA-enzima fervida	1.365
Branco S/acetil CoA-enzima dialisada	1.491
Sistema completo	6.754

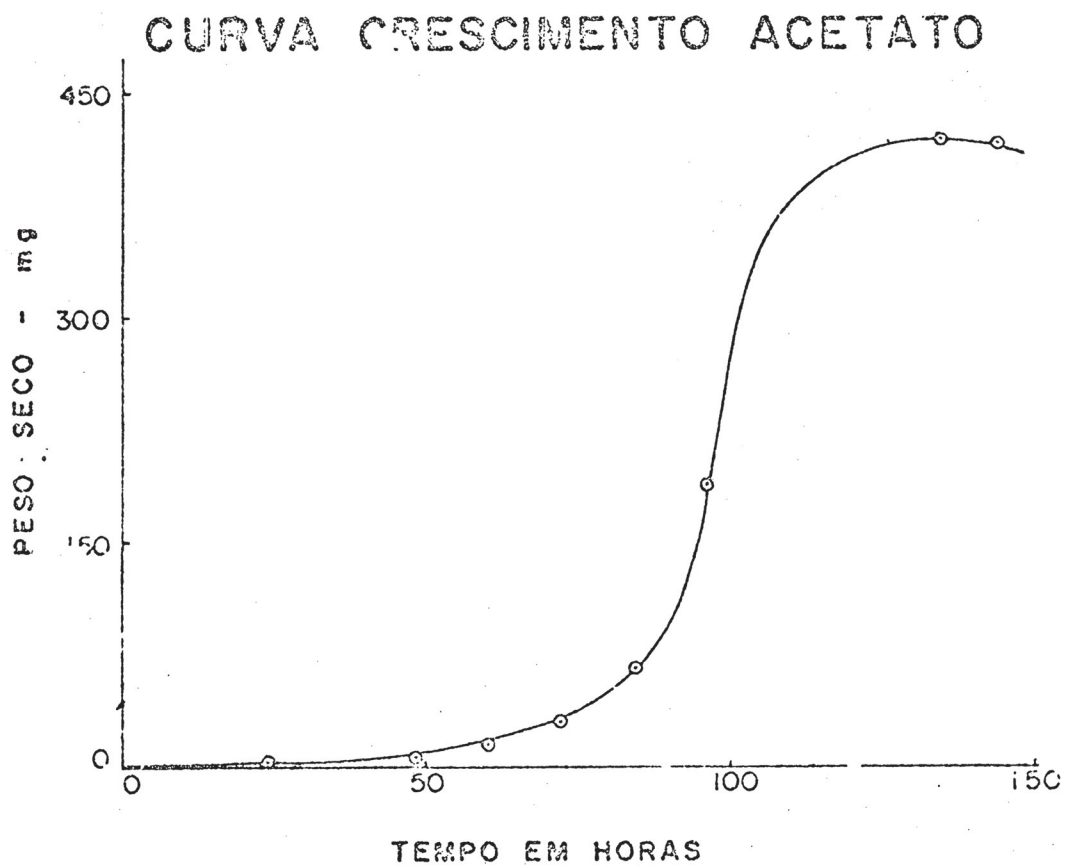
Sistema de incubação: 50  $\mu$ moles de Tris HCl pH 7,9, 10  $\mu$ moles de Mg Cl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ moles de glioxalato de sódio, 0,2  $\mu$ Ci glioxalato-1-C<sub>14</sub>, acetil CoA 0,5  $\mu$ moles; volume final 0,56 ml.

FIGURA I



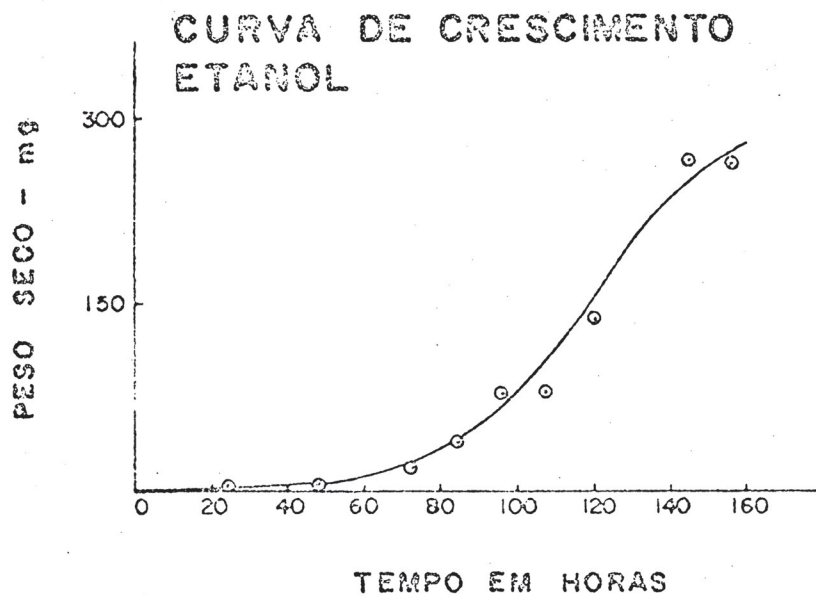
Sistema: 1 ml de inóculo em 100 ml do meio líquido +  
glicose, incubados a 28<sup>o</sup>C, com agitações/minuto.

FIGURA II



Sistema: 1 ml de inóculo em 100 ml do meio líquido +  
acetato. incubados a 28<sup>o</sup>C, 100 agitações/minuto.

FIGURA III



Sistema: 1 ml de inóculo em 100 ml do meio líquido +  
etanol, incubados a 28<sup>o</sup>C, 100 agitações/minuto.

FIGURA IV

Oxidação da glicose e acetato por células de P. cinnabarinus crescidas em glicose.

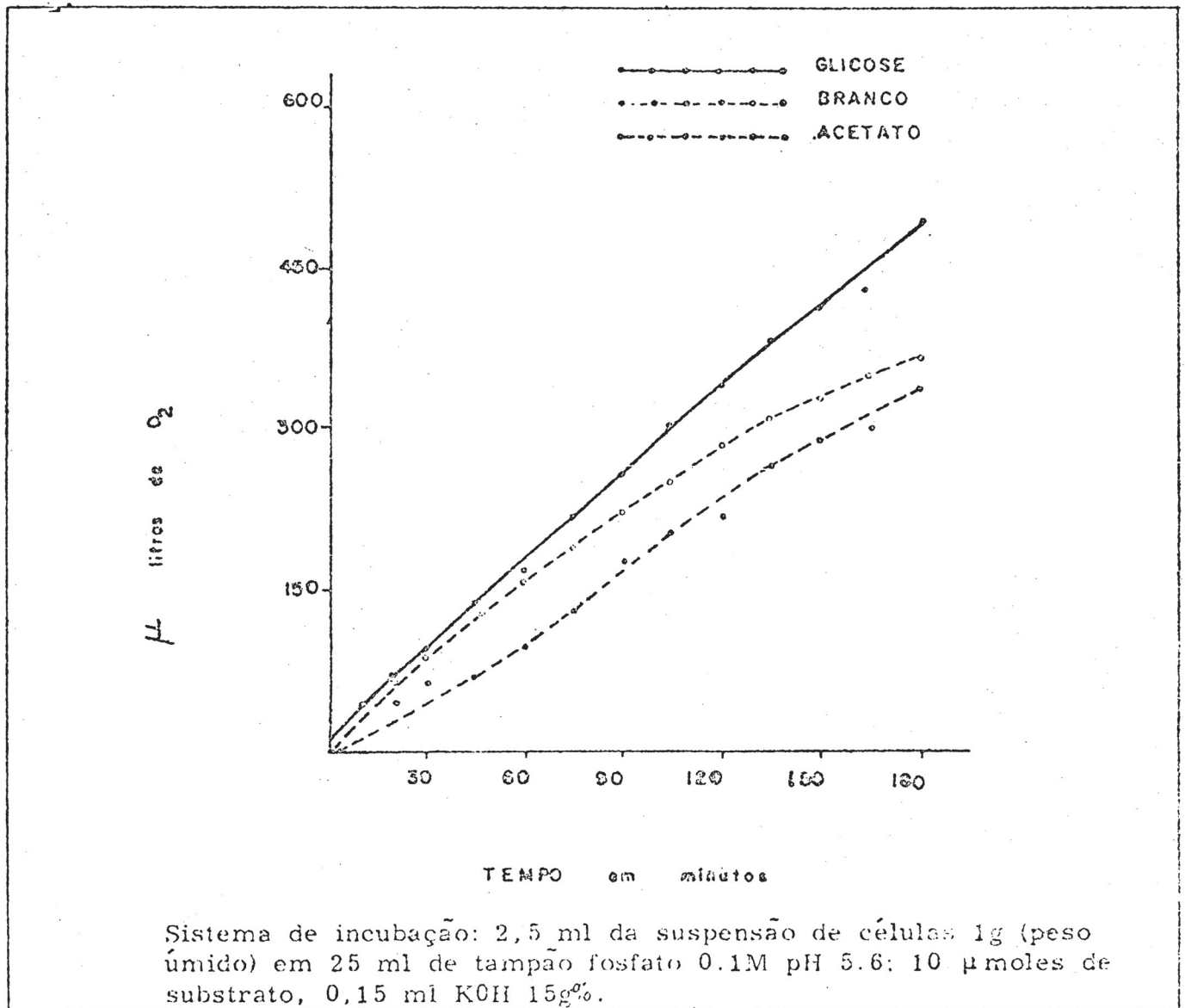


FIGURA V

Oxidação da glicose e acetato por células de P. cinnabarinus, crescidas em acetato.

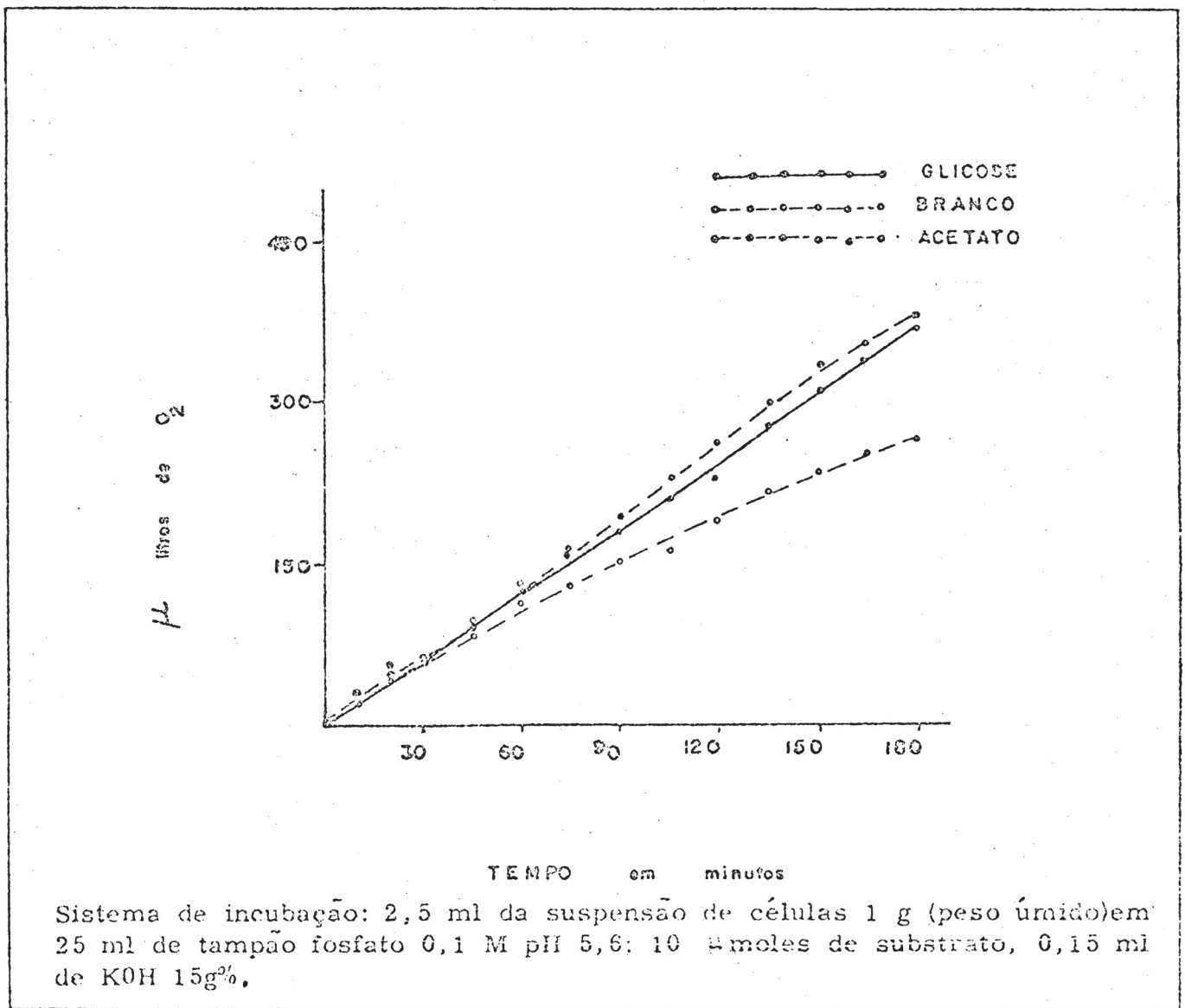
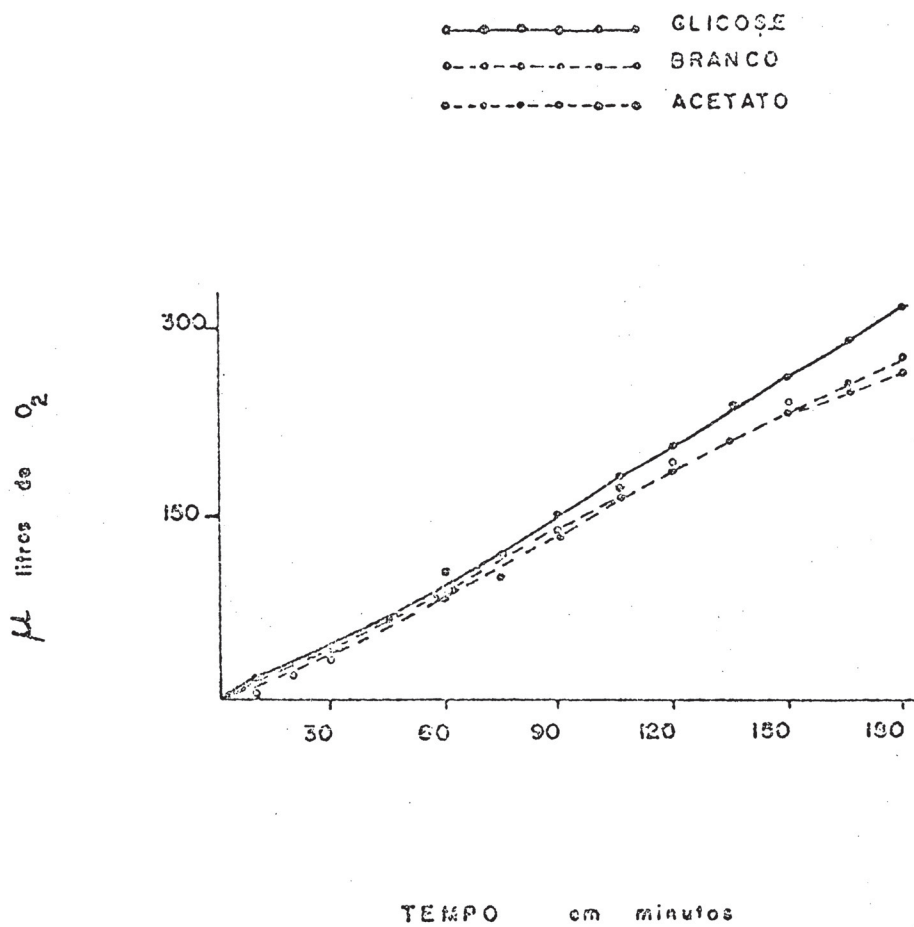


FIGURA VI

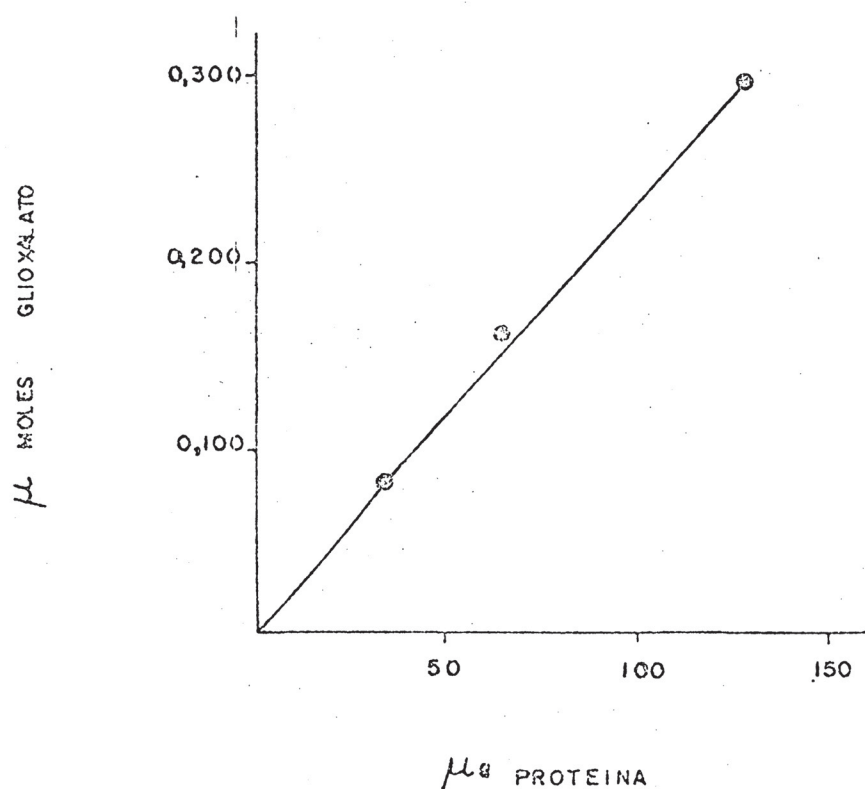
Oxidação da glicose e acetato por células de P. cinnabarinus,  
crescidas em etanol.



Sistema de incubação: 2,5 ml da suspensão de células 1g (peso úmido) em 25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 5,6; 10 µmoles de substrato, 0,15 ml KOH 15g%.

FIGURA VII

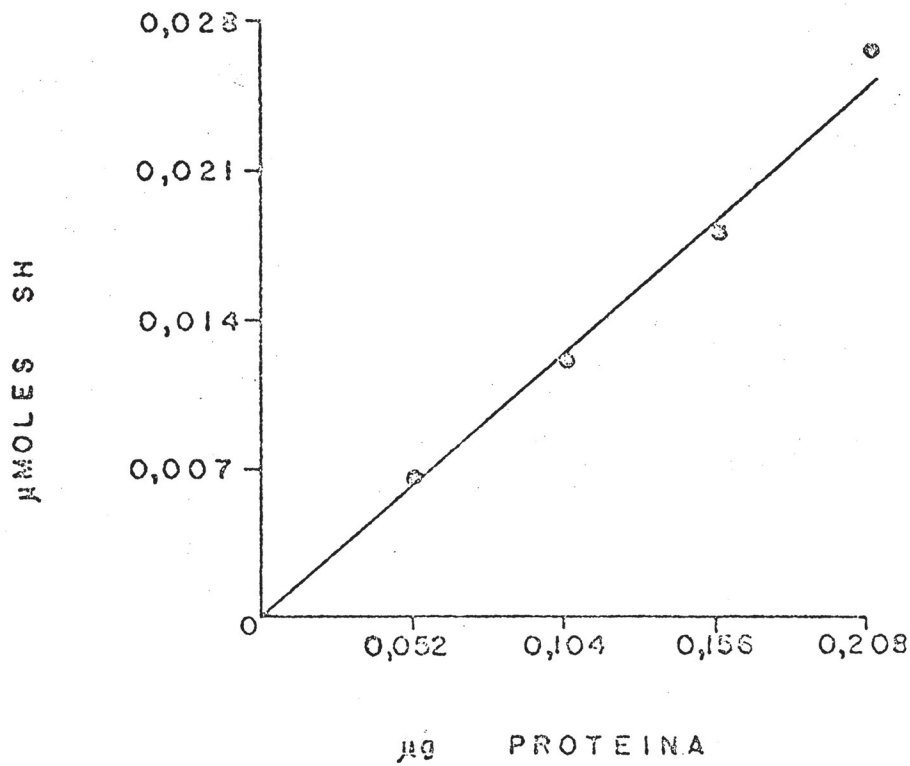
Influência da concentração de isocitrato liase, sobre a velocidade da reação.



Sistema de incubação: 10 μmoles tampão Tris HCl pg 7,8,3 μmoles, de Mg Cl<sub>2</sub>; 2 μmoles de cisteína HCl; 7,5 μmoles D-I. isocitrato. enzima. Volume final 1,9 ml.

FIGURA VIII

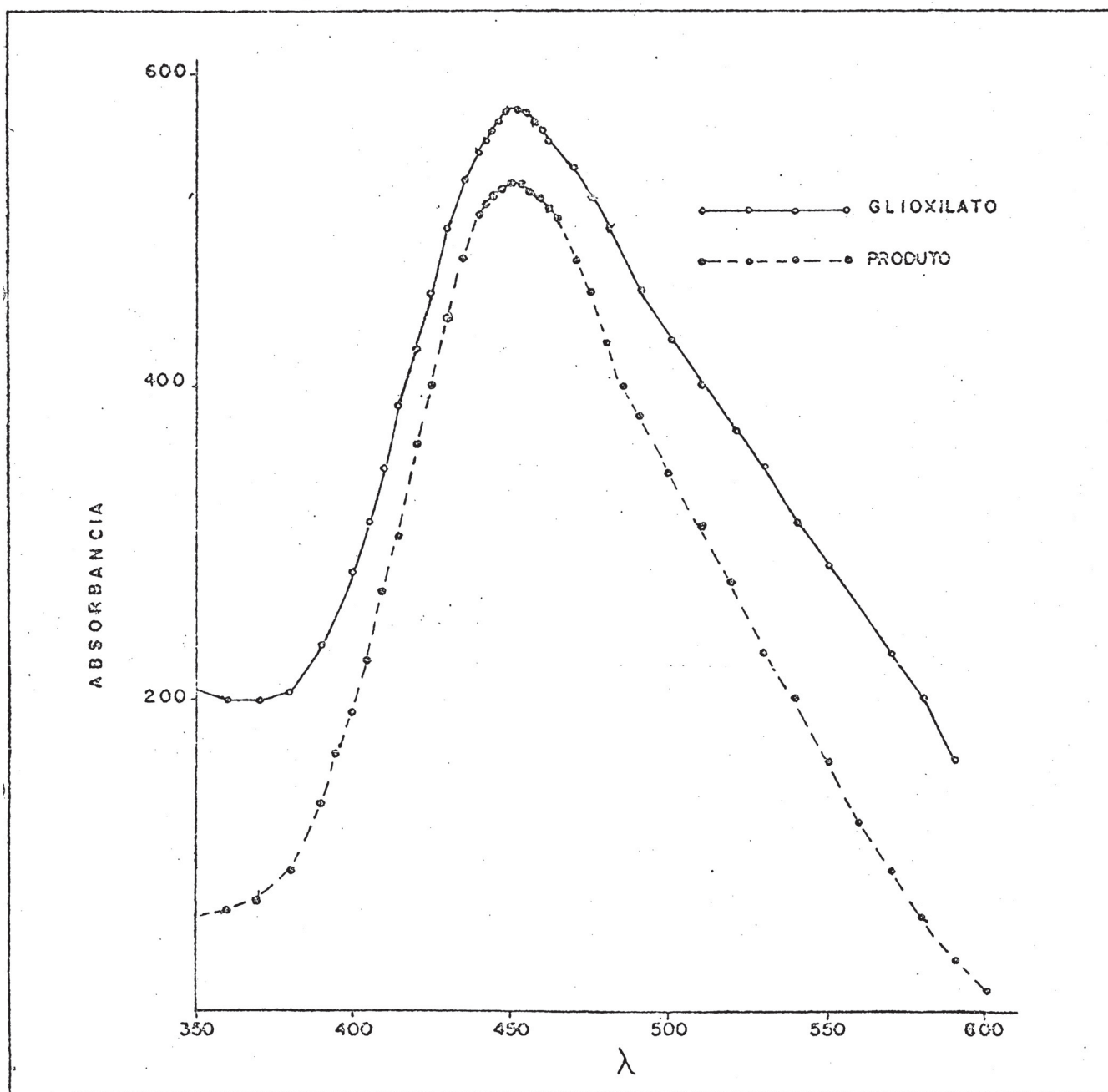
Influência da concentração de malato sintetase sobre a velocidade da reação.



stema de incubação: tampão Tris HCl pH 7,9, 50 μmoles, Mg Cl<sub>2</sub> 5 μmoles acetil CoA' 0,2 μmoles, glioxalato de sódio 0,5 μmoles, enzima. Volume final 0,56 ml.

FIGURA IX-

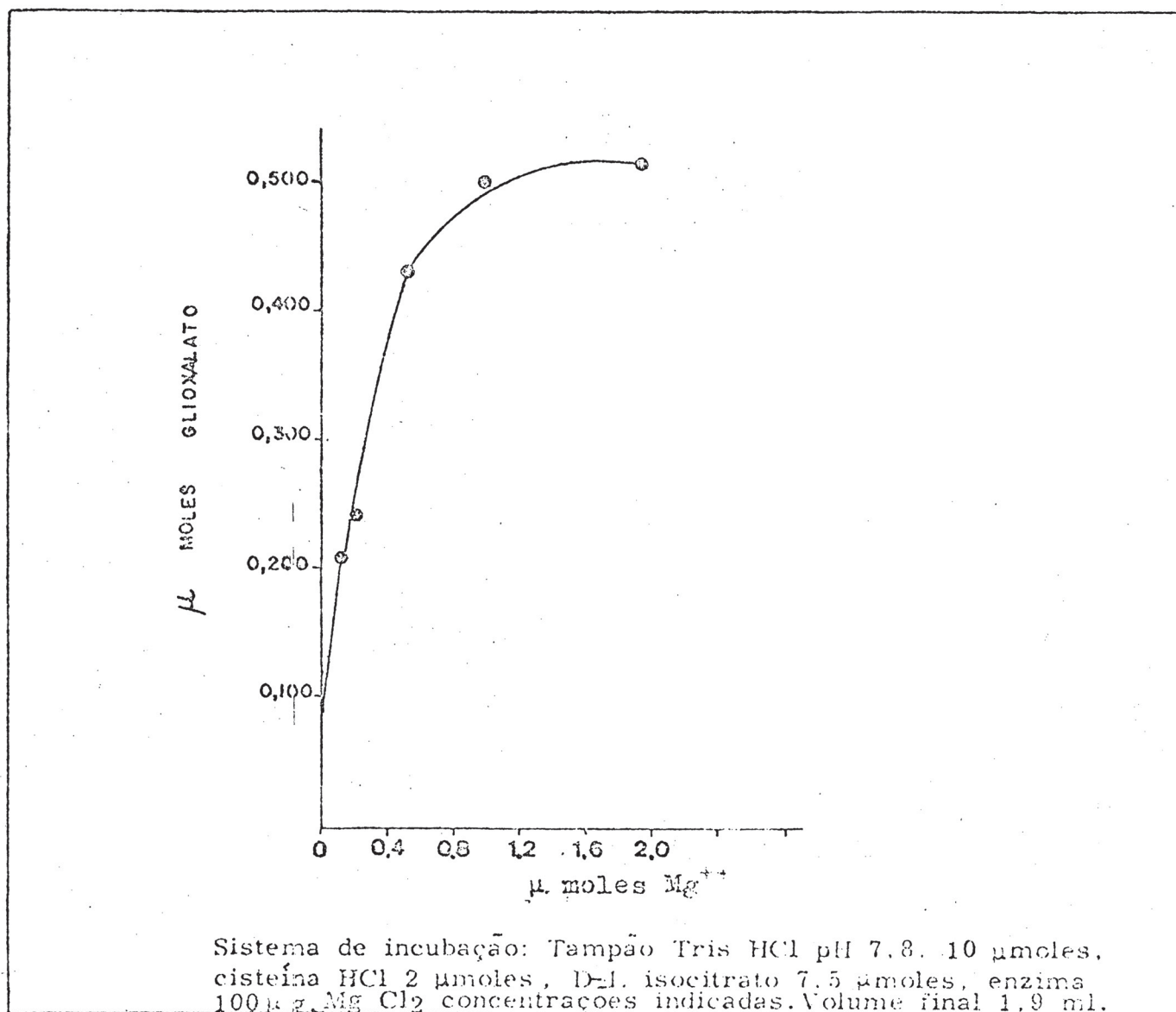
Caracterização do produto da reação da isocitrato liase.



Sistema de incubação: Tampão Tris HCl pH 7,8 10 μmoles, MgCl<sub>2</sub> 2 μmoles, cisteína HCl 2 μmoles, D-L isocitrato 7.5 μmoles, enzima 0,04 ml (120 μg). Volume final 1,9 ml.

FIGURA X

Efeito do  $Mg^{++}$  sobre a atividade da isocitrato liase.



## DISCUSSÃO

As experiências realizadas com células intactas e extratos livres de células de Picnóporus cinnabarinus demonstraram ser o ciclo do ácido glioxílico operante neste microrganismo, conforme ficou demonstrado pelos resultados das figuras IV, V e VI e pelas tabelas I e II. Os extratos livres de células apresentaram atividade para as duas enzimas chave do ciclo do glioxalato, isocitrato liase e malato sintetase (Tabela II). Ficou igualmente demonstrado que a atividade de isocitrato liase aumentava cerca de 160 vezes quando o acetato era usado como fonte de carbono para o crescimento, em relação a mesma concentração de glicose. Quando as células eram crescidas em etanol, o aumento da atividade da isocitrato liase em relação, às células crescidas em glicose foi de cerca de 10 vezes. Estes dados estão de acordo com o que foi observado primeiramente por Smith e Gunsalus (29) e posteriormente confirmado em uma série de microrganismos (12-14-20-21-22-23-24-25). O aumento da atividade específica da malato sintetase, quando o fungo era crescido em acetato, foi de 3,5 vezes em relação à das células crescidas em glicose. Quando crescidas em etanol o aumento foi de duas vezes em relação a glicose. Estes dados estão de acordo com o que foi observado por Armitt et al em Aspergillus nidulans (40). Flavel e Woodward (35) encontraram que em Neurospora, a isocitrato liase e a malato sintetase se encontravam reprimidas quando, se acrescentava glutamato ao meio de cultivo. Concluíram que esta repressão era devido a capacidade do glutamato ser catabolizado da mesma maneira

ra que outros intermediários do ciclo de Krebs.

O meio de cultivo utilizado para o crescimento do Picnoporus cinnabarinus apresenta em sua composição hidrolisado de caseína. Sabe-se que o mesmo é rico em glutamato e em succinato. Sabendo-se que tanto o glutamato como o succinato e outros intermediários do ciclo de Krebs reprimiam a atividade das enzimas do ciclo do ácido glicólico (27-14-28), foi testado o efeito do hidrolisado de caseína presente no meio de cultivo sobre a atividade destas enzimas. No que concerne a isocitrato liase não foi observada repressão. Isto vem confirmar o que já havia sido observado por Armitt et al (40) em Aspergillus nidulans, onde o acréscimo de glutamato ao meio de cultivo que continha acetato não reprimiu a atividade da isocitrato liase. A presença de hidrolisado de caseína no meio de cultivo teve entretanto papel importante na atividade da malato sintetase. As primeiras tentativas para a medida desta enzima foram infrutíferas, mesmo utilizando-se métodos extremamente sensíveis com glicoxalato  $C_{14}$ . A retirada do hidrolisado de caseína do meio de cultivo resultou entretanto na desrepressão da malato sintetase que pode ser então determinada. Estes resultados sugerem que a repressão da enzima tenha sido causada por glutamato, succinato ou outro amino ácido ou intermediário do ciclo de Krebs, presente no hidrolisado de caseína e que estaria sendo usado como intermediário da síntese de material celular o que tornaria desnecessário o funcionamento da via anaplerótica. Como entretanto a isocitrato liase continuava ativa mesmo em presença do hidrolisado de caseína é de se esperar que o glicoxalato formado pela ação

desta enzima, tenha sido utilizado de outro modo, que não via malato sintetase. Sabe-se que em um fungo imperfeito Blastocladiella emersoni, Mc Curdy e Cantino (48) encontraram uma glicina-alamina transaminase que atuava paralelamente com a isocitrato liase, utilizando assim o glioxalato formado pela ação desta última enzima. Esta possibilidade deverá ser investigada no Picnoporus cinnabarinus. Desde que foi possível detectar atividade de isocitrato liase em condições em que a malato sintetase se achava quase completamente reprimida, pode-se supor que neste fungo a exemplo do que acontece com o Aspergillus nidulans (40) não exista a chamada indução sequencial da malato sintetase como parece ocorrer em E. coli ( ). Entretanto este fato só poderá ser totalmente esclarecido utilizando-se mutantes, para malato sintetase e isocitrato liase a exemplo do que foi realizado com o Aspergillus nidulans (39-40).

A dependência de magnésio para a atividade da isocitrato liase confirma o que foi encontrado tanto em bactérias como em leveduras (6-7-49) da mesma forma que a necessidade de cisteína ou glutation, demonstrando ser esta enzima SH dependente.

Do presente trabalho infere-se a importância do ciclo do ácido glioxílico neste basidiomiceto. A grande variação na disponibilidade de nutrientes, associada a necessidade de adaptação do microrganismo as condições ecológicas deverão influenciar profundamente na fisiologia e morfogênese deste fungo.

## R E S U M O

As enzimas isocitrato liase (E.C. 4.1.3.1.) e malato sintetase (E.C. 4.1.3.2.) enzimas chave do ciclo do ácido glicólico são ativas no extrato livre de células de Picnóporus cinnabarinus.

Estudou-se a variação de concentração das enzimas, quando o fungo era crescido em glicose, acetato e etanol como fonte de carbono. Observou-se que a atividade da isocitratase aumentou 160 vezes quando o fungo era crescido em acetato, não se observando alteração significativa na atividade da malato sintetase.

## AGRADECIMENTO

Queremos externar nesta oportunidade a nossa sincera e profunda gratidão a Professora Dra. DÉA AMARAL FERREIRA DO AMARAL do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná que com grande dedicação, orientou a todas as fases da sua elaboração.

Ao Professor Dr. Ayrton Roberto de Oliveira, Chefe do Departamento Bio-médico da Universidade Federal de Santa Catarina, cujo apoio nos permitiu realizar o curso de Mestrado em Bioquímica.

À todos integrantes do Departamento de Bioquímica, pelo apoio e colaboração que sempre recebemos.

À Universidade Federal do Paraná e à Universidade Federal de Santa Catarina que nos proporcionou os meios materiais necessários a execução do nosso objetivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- H.L. Kornberg. Anaplerotic sequences and their role in metabolism. In: Essays in Biochemistry, V 2, London, Academic, 1966 p. 1-31.
- 2- Stephenson, M. Cook, R.P., Biochem. J. 22 1368 (1928).
- 3- Clifton, C.E. Microbial assimilation. In: Advances in Enzymol. 6 269-307. New York Interscience 1946.
- 4- Campbell, J.J.R., Smith, R.A. and Eagles, B.A., Biochem et Biophys. Acta., 11 594 (1953).
- 5- Goldschmidt, E.P. Jall I and Koffler, H., J. Bacteriol., 72, 436 (1956).
- 6- Smith, R.A. and Gunsalus I. C.J. Amer. Chem. Soc. 76 5002 (1954).
- 7- Olson, J.A., J. Biol. Chem. 234 5 (1959).
- 8- Wong, D.T.O. and Ajl S.J.J. Amer. Chem. Soc., 78 3, 230 (1956).
- 9- Kornberg, H.L. Biochem. J. 66 13P (1957).
- 10- Kornberg, H.L. Biochem. J. 68 535 (1958).
- 11- Kornberg, H.L., Phizackerley P.J.R., and Sadler, J.R. Biochem. J. 72 32P (1959).
- 12- Kornberg, H.L., Phizackerley, P.J.R. and Sadler, J.R., Biochem. J. 77, 438 (1960).
- 13- Kornberg, H.L. and Collins, J.F., Biochem J. 68, 3P(1958).
- 14- Collins J.F. and Kornberg, H.L. Biochem. J., 77, 430 (1960).
- 15- Barnett, J.A. and Kornberg, H.L. J. Gen. Microbiol. 23, 65 (1960).
- 16- Kornberg, H.L. and Madsen N.B. Biochem et Biophys. Acta. 24 651 (1957).

- 17- Kornberg, H.L. and Madsen N.B. *Biochem. J.* 68; 549 (1958).
- 18- Kornberg, H.L. and Krebs H.A. *Nature* 179; 988 (1957).
- 19- Kornberg, H.L. and Beevers H. *Nature* 180; 35 (1957).
- 20- Barnett, J. A. and Kornberg H.L. *J. Gen. Microbiol.*, 23 65 (1960).
- 21- Calley, A.G. Dagley S. Dodgsen B. *Biochem. J.* 69, 173 (1958).
- 22- Kornberg, H.L. and Lund P. *Biochem. J.* 72; 33P (1959).
- 23- Rieves, H.C. and Ajl S.J., *J. Bacteriol.* 79; 341 (1960).
- 24- Kornberg, H.L. Collins, J.F. and Bigley, D. *Biochem et Biophys. Acta.* 39; 9 (1960).
- 25- Kornberg, H.L. and Lascelles, J. *J. Gen. Microbiol.* 23, 511 (1960).
- 26- Kornberg, H.L. and Elsdén S.R. The metabolism of 2-carbon compounds by Microorganisms. In: *Advances in Enzymology* 23 401-467. New York Interscience (1961).
- 27- Smith, R.A. and Gunsalus I. C. *J. Biol. Chem.*, 229, 305 (1957).
- 28- Umbarger, H.E. *Federation. Proc.* 52 (1960).
- 29- Smith, R.A. and Gunsalus I.C. *Nature*, 175, 774 (1955).
- 30- Kornberg, H.L., Gotto, A.M. and Lund P. *Nature*, 182, 1430 (1958).
- 31- Gilvarg, C. and Davis, B.D., *J. Biol. Chem.* 222, 307 (1956).
- 32- Pardee, A.B.: In Kornberg, H.L. and Elsdén. The metabolism of 2-carbon compounds by microorganisms: In *Advances in Enzymology*, 23 401-467. New York Interscience (1961).

33. Vogel, H.J. In Kornberg H.L. and Elsdon. The metabolism 2-carbon compounds by microorganisms: In Advances in Enzymology, 23 401-467. New York Interscience (1961).
34. Szilard L. Proc. Nat. Acad. Sci. US 46 277 (1960).
35. Flavel, R.B., and Woodward D.O. J. Bacteriol, 105, 200(1971).
36. Ashworth, J.M. and Kornberg H.L. Biochem. et Biophys. Acta. 73, 519, (1963).
37. Kornberg, H.L. and Lund P. Biochem. J. 72: 33 P (1959).
38. Reeves, H.C. and Ajl S.J., J. Bacteriol. 79: 341, (1960).
39. Armit S. Roberts, C.F. and Kornberg H.L. Febs Letters 7, 231, (1970).
40. Armit, S. Robbersts. C.F. and Kornberg H.L. Febs Letters 12, 276, (1971).
41. Casselton P.J., Fawole M.O., Casselton, L.A. Can. J. of Microbiol. 15; 637, (1969).
42. O'Sullivan J. and Casselton P.J., J. of Gen. Microbiol. 75, 333, (1973).
43. Daron H.H. and Gunsalus I.C. Citratase and Isocitratase: In: Methods in Enzymology, 5 628. New York Academic, 1962.
44. Orston L.N. and Orston, M.K. J. Bacteriol. 98, 1098, (1969).
45. Wegener, S.W., Reeves H.C. and Ajl S.J. Anal. Biochem. 11: 111, (1965).
46. Nordmann J. and Nordmann R. In Ivor Smith. Chromatographic and Eletrophoretic Techniques. Vol. I p. 279, London, William Heinemann Medical Book (1960).
47. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.

48. Mc Curdy, H. D. Jr and Cantino E. C. *Plant. Physiol.* 35,  
463-476 (1960).
49. Smith R. A. and Gunsalus I. C. *J. Biol. Chem.* 229, 305(1957).