

Determinación del tipo de Aldolasa de *Aspergillus oryzae*

por J. A. CEBRIAN, T. MUIÑO y M. L. PELEATO

Departamento de Bioquímica. Facultad de Veterinaria. ZARAGOZA

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. ZARAGOZA

Recibido el 25-III-83

ABSTRACT

J. A. CEBRIAN, T. MUIÑO y M. L. PELEATO. 1983. Determination of fructose 1, 6-biphosphate aldolase class from *Aspergillus oryzae*. *An Aula Dei* 16 (3-4): 194-201.

Specific activity and class of fructose-1, 6-biphosphate aldolase from mycelium of *Aspergillus oryzae* grown on different carbon sources, were determined.

The enzyme was inhibited by EDTA 10 mM being this inhibition stronger to mycelium grown on ribose than those grown on glucose. This fact, in addition to the effect of cations and pH lets us to conclude the aldolase from *A. oryzae* is of Class II.

INTRODUCCION

WARBURG Y CHRISTIAN (1943) observaron la existencia de dos tipos diferentes de aldolasas. La aldolasa de levadura requería la presencia de un ión metálico para ser activa, mientras que la procedente de músculo no era inhibida por la acción de agentes quelantes. Estudios posteriores confirmaron estas diferencias entre aldolasas procedentes de animales ó plantas superiores y las procedentes de hongos y bacterias. RUTTER (1964) las clasificó en dos clases llamadas I y II, respectivamente.

Recientemente FISCHER *et al.* (1982) han puesto de manifiesto la existencia de aldolasa clase I en varios tipos de bacterias, así como presencia de ambas en diversas especies de estafilococos, demostrando que la razón entre las clases I y II depende de las condiciones de cultivo.

En el presente trabajo se estudia la posibilidad de que en *A. oryzae* coexistan ambos tipos de aldolasas. La determinación de la clase de aldolasa se realiza en micelios del hongo desarrollado en diferentes condiciones nutricionales.

MATERIAL Y METODOS

—MATERIAL BIOLÓGICO.

La cepa de *Aspergillus oryzae* procede de la colección de cultivos del departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Salamanca.

El cultivo del hongo, así como la obtención de los micelios se ha descrito previamente por MUIÑO y CEBRIAN (1980).

La preparación de los extractos se ha hecho como describen CEBRIAN *et al.* (1981).

—REACTIVOS.

Enzimas auxiliares, coenzimas y sustratos son de SIGMA CHEMICAL Co. Los restantes reactivos proceden de diversas firmas comerciales (MERCK, PROBUS) siendo en su totalidad de calidad análisis.

—TECNICAS ANALITICAS.

Para determinar la actividad de la aldolasa se ha seguido el método descrito por HANKINSON y COVE (1975). La clase de aldolasa se ha determinado por el método descrito recientemente por FISCHER *et al.* (1982) para bacterias. Las proteínas se han cuantificado por el método de LOWRY *et al.* (1959).

RESULTADOS

Se ha determinado el efecto de la incubación con EDTA 10 mM, a diferentes tiempos, sobre la actividad de la aldolasa procedente de micelios desarrollados sobre glucosa y ribosa como fuente de carbono; en la figura 1 se expresa la inhibición ejercida por dicho agente quelante sobre la aldolasa, observándose que dicha inhibición es mucho mayor y más rápida sobre la aldolasa procedente de micelios desarrollados en ribosa, ya que se alcanza el 88% de inhibición a los 2,5 minutos y el 100% a los 5 minutos, para la enzima procedente de micelios desarrollados sobre glucosa la inhibición es menor, observándose un 57% a los 2,5 minutos pero no se llega nunca a alcanzar una inhibición total en tiempos considerablemente largos, manteniéndose constante en un 97%.

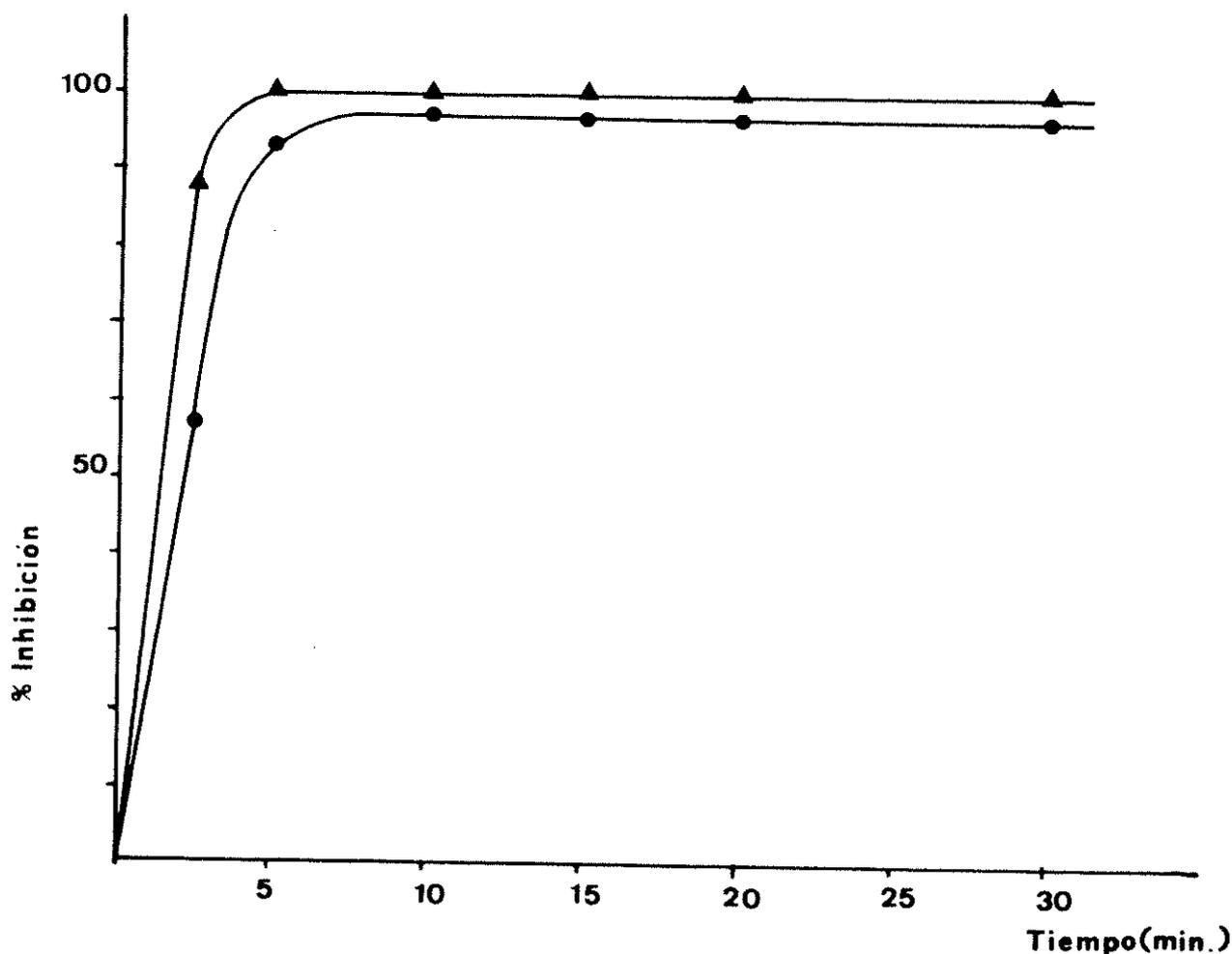


FIG. 1. -- Efecto del EDTA sobre la aldolasa de *Aspergillus oryzae*.

- ▲ — desarrollado sobre ribosa
- ● — desarrollado sobre glucosa

Se ha investigado asimismo el efecto de diversos iones metálicos sobre la actividad de la aldolasa. El magnesio no afecta su actividad a concentraciones comprendidas entre 50 μ M y 50 mM. El manganeso inhibe por completo la actividad de la aldolasa a concentraciones de 10mM. El potasio se comporta como un activador de esta enzima ya que a una concentración 10mM se observa una actividad del 180%. Calcio, sodio, amonio y zinc no alteran la actividad de la aldolasa de *Aspergillus oryzae*.

El perfil de la curva de actividad de la aldolasa a diferentes valores de pH, figura 2, muestra que la máxima actividad se encuentra en un margen muy estrecho de pH, disminuyendo ostensiblemente por encima y por debajo de él, obteniéndose el máximo de actividad a pH 7,5. El perfil de la curva de estabilidad al pH (figura 3) muestra que la aldolasa de *A. oryzae* mantiene su actividad en un intervalo de pH más amplio.

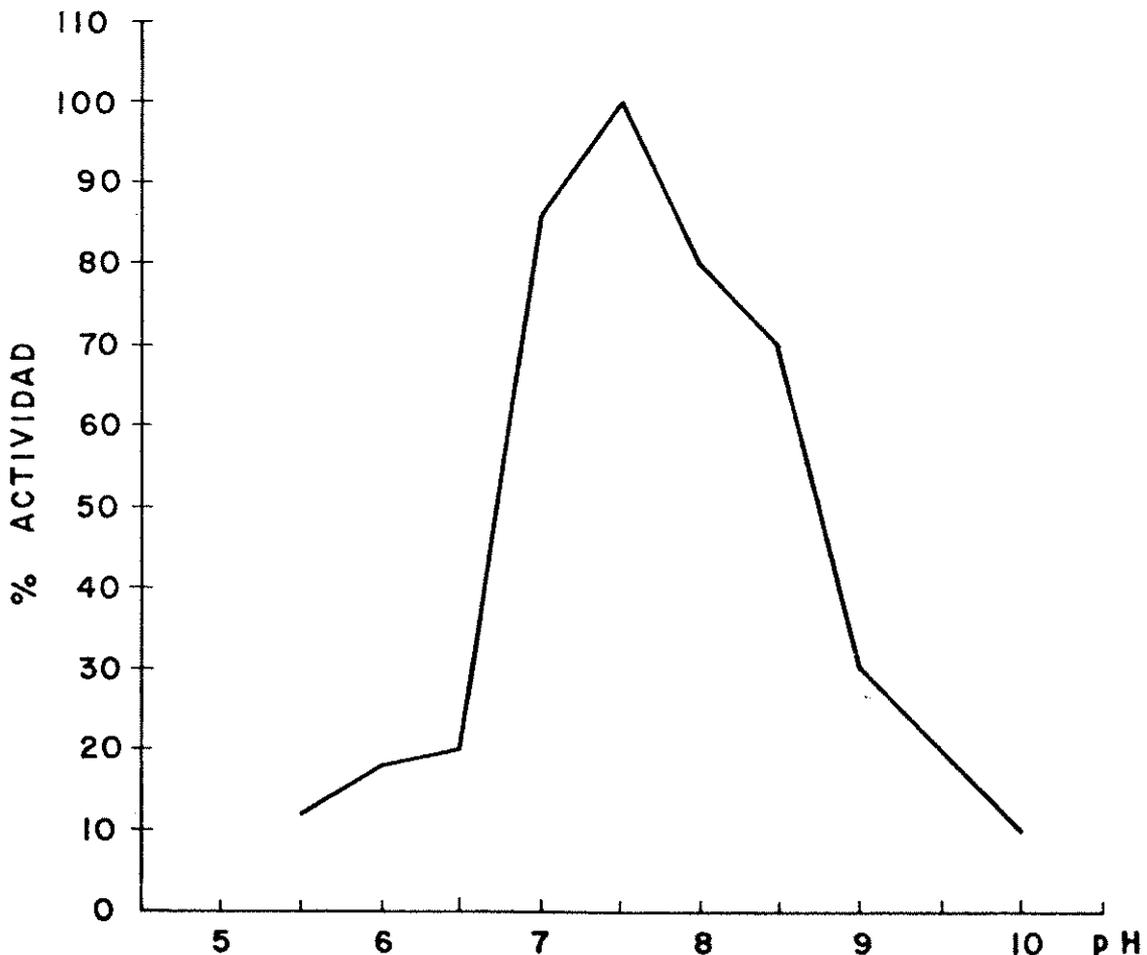


FIG. 2. — Influencia del pH sobre la actividad de la aldolasa de *A. oryzae*.

La actividad específica de la aldolasa es mayor en extractos crudos de *A. oryzae* procedentes de micelios desarrollados sobre glucosa, que en los procedentes de micelios desarrollados sobre ribosa, obteniéndose respectivamente unos valores de 635 y 290 (mUI/mg).

Efectores nucleotídicos como el ATP y AMP ejercen una ligera inhibición sobre la aldolasa, siendo necesarias altas concentraciones para obtener una inhibición significativa. El ADP no ejerce ningún tipo de acción.

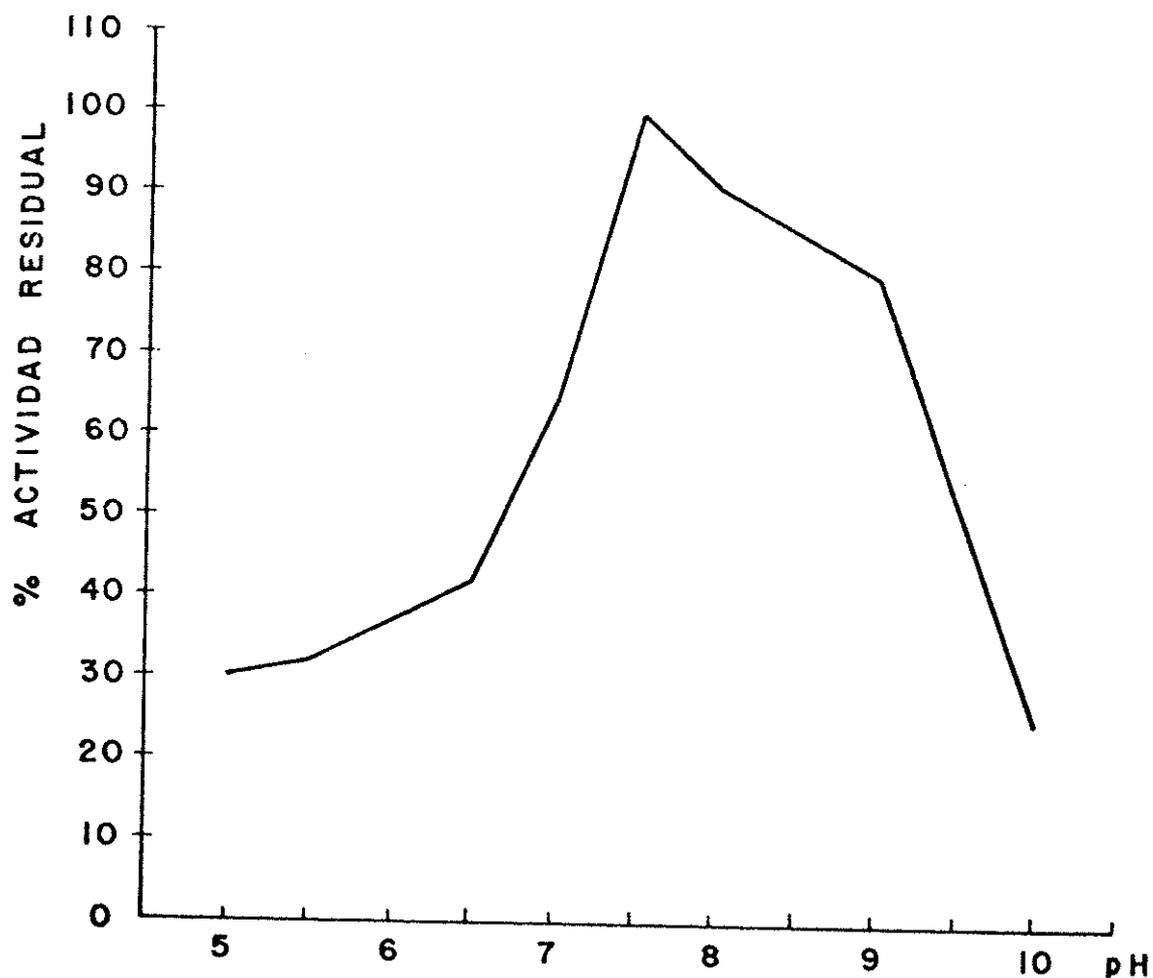


FIG. 3. — Influencia del pH sobre la estabilidad de la aldolasa de *A. oryzae*.

DISCUSION

Como se observa en el presente trabajo, la presencia de EDTA en el medio de incubación produce una rápida inhibición de la aldolasa de *A. oryzae* desarrollado sobre ribosa, alcanzándose un 100% de inhibición a los 5' de incubación con EDTA 10mM; este comportamiento es

específico de las aldolasas de la Clase II, lo que induce a pensar que ese tipo es el existente en *A. oryzae*. No obstante, la también rápida inhibición ejercida sobre la aldolasa de extracto procedentes de micelios desarrollado sobre glucosa, donde se alcanza un 97% de inhibición a los 5' se ve acompañada por un mantenimiento de actividad, incluso durante prolongados periodos de incubación con EDTA 10mM; este hecho podría sugerir la existencia de una pequeña porción de aldolasa Clase I cuando *A. oryzae* se desarrolla sobre glucosa. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por FISCHER *et al.* (1982) al comprobar, en varios estafilococos, que varía la razón entre ambos tipos de aldolasa en función de la fuente de carbono utilizada.

KOBES *et al.* (1969) en estudios sobre la aldolasa de levadura, describen la estricta dependencia de Zn para la actividad de la misma, a la vez que señalan como una de las características de la Clase II el requerimiento de iones metálicos para su funcionamiento. Los resultados obtenidos indican que la aldolasa de *A. oryzae* es de Clase II y, aunque no se observa efecto del Zn, no se puede descartar su requerimiento ya que este ión se encuentra en el medio de cultivo. El Mn, descrito por MILDVAN *et al.* (1971) como necesario para la enzima de levadura, se comporta como un fuerte inhibidor de la aldolasa de *A. oryzae*.

La activación que ejerce el K es congruente con la dependencia de iones metálicos que presentan las aldolasas de Clase II ya que su adición a la mezcla de reacción, incrementa considerablemente la actividad de la aldolasa, lo que vendría a apoyar la consideración de que la aldolasa de *Aspergillus oryzae* es de Clase II.

La actividad específica de la aldolasa en extractos de micelios desarrollados sobre glucosa es aproximadamente el doble de la obtenida en extractos de micelios desarrollados sobre ribosa; esta diferencia podría ser debida a la activación que la ribosa ejerce sobre la ruta de las pentosas fosfato en *A. oryzae* (MUIÑO *et al.* 1983) lo que implicaría un detrimento del flujo carbonado por la vía glucolítica, con la consiguiente disminución de actividad de las enzimas implicadas, en dichas condiciones nutricionales.

El pH óptimo de las aldolasas de Clase I presenta generalmente márgenes más amplios (6,5-8,5) que en las aldolasas de Clase II (7,0-7,5). El estrecho margen de pH obtenido en la aldolasa de *A. oryzae* corresponde al de las aldolasas Clase II, corroborando los resultados obtenidos en la cinética de inhibición por EDTA.

KASPRAZAK y KOCHMAN (1981) han descrito la inhibición ejercida por nucleótidos sobre la aldolasa Clase I de hígado de conejo; los resultados obtenidos en *A. oryzae* pudieran deberse más a una acción

sobre la aldolasa Clase II que a una acción sobre una pequeña cantidad de aldolasa Clase I existente en determinadas condiciones nutricionales.

RESUMEN

Se ha determinado la actividad específica y el tipo de aldolasa en micelios de *Aspergillus oryzae* desarrollados sobre diferentes fuentes carbonadas. El EDTA se comporta como un potente inhibidor de esta enzima, siendo esta inhibición más fuerte y más rápida cuando el hongo se desarrolla sobre ribosa. Este hecho junto con el requerimiento de iones metálicos y el efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima, permiten concluir que la aldolasa de *A. oryzae* es de Clase II.

REFERENCIAS

- CEBRIAN PEREZ, J.A., MUIÑO BLANCO, T. y PELEATO SANCHEZ, M. L.
1981 Fructosa difosfato aldolasa de *Aspergillus oryzae* desarrollado sobre ribosa. *An. Fac. Veter. Zaragoza*, 16, 53-58.
- FISCHER, S., LUCZAK, H. y SCHLEIFER, K.H.
1982 Improved methods for the detection of class I and class II fructose 1,6-biphosphate aldolases in bacteria. *FEMS. Microbiol. Let.* 15, 103-108.
- HANKINSON, O. y COVE, D.J.
1975 Regulation of manitol-1-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Can. J. Microbiol.* 21, 99-101.
- KASPRAZAK, A.A., y KOCHMAN, M.
1981 Characterization of nucleotide-binding site of rabbit lever fructose-1,6-biphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* 256, 6127-6133.
- KOBES, R.D., SIMPSON, R.T., VALLE, B. L. y RUTTER, W.J.
1969 A functional role of metal ions in a class II aldolase. *Biochem.* 8, 585-588.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUCH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.I.
1951 Proteins measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MILDVAN, A.S., KOBES, R.D. y RUTTER, W.J.
1971 Magnetic resonance studies on the role the divalent cation in the mechanism of yeast aldolase. *Biochem.* 10, 1191-1204.

MUÑO BLANCO, T. y CEBRIAN PEREZ, J.A.

1980 Influencia de la esporulación sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus oryzae*. *Rev. Esp. Fisiol.* 36, 193-198.

MUÑO BLANCO, T., CEBRIAN PEREZ, J.A. y PEREZ MARTOS, A.

1983 Regulation of the pentose phosphate cycle in *Aspergillus oryzae*. I. Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Arch. Microbiol.* 136, 39-41.

ROBES, R.D., SIMPSON, R.T., VALLEE, B.L. y RUTTER, W.J.

1969 A functional role of metal ions in a class II aldolase. *Biochem.* 8, 585-588.

RUTTER, W.J.

1964 Evolutions of aldolase. *Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 23, 1248-1257.

WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.

1943 Isolierung und kristallisation des Gärungsferments zymohexase. *Biochem. Z.* 314, 149-176.