

6-Fosfogluconato deshidrogenasa de *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) II. Separación y estudio de isoenzimas

J. A. Cebrián, T. Muño y A. Pérez

Cátedra de Bioquímica
Facultad de Veterinaria
Zaragoza

(Recibido el 22 de enero de 1981)

J. A. CEBRIAN, T. MUIÑO and A. PEREZ. 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from *Aspergillus oryzae* (Ahlburg). II. Isolation and Study of Isoenzymes. Rev. esp. Fisiol., 37, 421-428, 1981.

Through ammonium sulphate fractionation followed by ion-exchange chromatography, two forms of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-phosphogluconate: NADP⁺ oxidoreductase E.C. 1.1.1.44) were isolated from mycelium of *Aspergillus oryzae*.

The K_m values for 6PG were the same, but the K_m for NADP⁺ was smaller for isoenzyme I. The V_{mx} values were also different, with greater activity for isoenzyme II. The optimum pH for isoenzyme I was 7.5, whereas the isoenzyme II had two maximum peaks, at pH 7.5 and 9. Isoenzyme II was the more resistant to thermal inactivation.

Inhibition by NADPH was competitive with respect to NADP⁺, with a K_i value similar for both isoenzymes. The GSSG inhibits isoenzyme I and activates isoenzyme II.

The apparent molecular weights determined by gel filtration were 79,000 ± 2,000 daltons for isoenzyme I and 112,000 ± 2,000 daltons for isoenzyme II.

En micelios de *Aspergillus oryzae* las dos deshidrogenasas de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato presentan alta actividad, variable en relación con la fuente de carbono utilizada por el hongo para su crecimiento. Este cambio de actividad se corresponde con la aparición de una nueva forma isoenzi-

mática de G6PDH cuando el hongo se desarrolla sobre ribosa (11).

La actividad de la 6PGDH también se incrementa cuando el hongo utiliza ribosa para su desarrollo, aunque en este caso el aumento de actividad es menor que el observado para la G6PDH. Con el fin de comprobar si este aumento de actividad se debe únicamente a la variación del nivel intracelular de la enzima o a la inducción de una nueva molécula enzimática, se purificó la 6PGDH de micelios de *A. oryzae*.

La 6PGDH (E.C. 1.1.1.49) ha sido pu-

Abreviaturas:

G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

6PGDH: 6-Fosfogluconato deshidrogenasa.

GSSG: Glutation oxidado.

rificada a partir de diversos microorganismos como *E. coli* (9), *Candida utilis* (14), *Bacillus stearothermophilus* (10), y de otra serie de organismos como hígado de rata (15), eritrocitos humanos (13) y hojas de espinaca (18), en la cual se han descrito dos isoenzimas de 6PGDH con diferentes propiedades físico-químicas.

En el presente trabajo se describe la separación y algunas propiedades de las isoenzimas de la 6PGDH de *A. oryzae* desarrollado sobre ribosa como única fuente de carbono.

Material y métodos

Reactivos. Los productos químicos utilizados procedían de diferentes firmas comerciales, Merck, BDH, Probus y similares, siendo todos de calidad de análisis. Coenzimas y sustratos procedían de Sigma Chemical Company.

Material biológico. La cepa de *Aspergillus oryzae* utilizada, así como los medios de cultivo, han sido descritos anteriormente (10, 12).

Preparación de extractos enzimáticos. Los micelios se homogeneizan empleando como líquido extractivo solución tampón imidazol-ClH 0,05 M a pH 7,5, conteniendo β -mercaptoetanol 10 mM y ácido ϵ -aminocaproico 1 mM. Las proteínas de los extractos crudos se valoran por el método descrito por LOWRY *et al.* (8), y en las fracciones purificadas según la fórmula propuesta por WARBURG y CHRISTIAN (20).

Determinación de la actividad enzimática. La actividad de la 6PGDH se determina espectrofotométricamente como se describe en un trabajo anterior (3).

Cinética enzimática. Las constantes de Michaelis aparentes para el sustrato y el coenzima, y las constantes de inhibición para el NADPH se determinan entre unos

límites de 0,2 a 2 mM de 6PG y 60 a 300 μ M de NADP⁺. Los resultados se expresan gráficamente por el método de LINEWEAVER-BURK (7).

El pH de máxima actividad se determina midiendo la actividad de la 6PGDH en un margen de pH de 5 a 10, con una diferencia de 0,5 unidades de pH entre dos ensayos consecutivos, manteniendo constantes en todas las determinaciones la concentración de sustrato, coenzima y extracto enzimático. Las soluciones tampón empleadas son: tampón acetato-NaOH 0,2 M (pH 5 y 5,5); tampón citrato-NaOH 0,2 M (pH 6); tampón imidazol-ClH 0,2 M (pH 6,5, 7 y 7,5); tampón tris-ClH 0,2 M (pH 8 y 8,5); tampón glicina-NaOH 0,2 M (pH 9, 9,5 y 10).

Para la inactivación térmica las preparaciones enzimáticas se diluyen con el tampón de máxima estabilidad (3) hasta alcanzar una concentración final de proteínas iguales en todos los casos. Volúmenes iguales de dichos extractos se incuban a distintas temperaturas entre 10 y 60° C, manteniendo constante el tiempo de incubación durante 5 minutos (inactivación a tiempo constante), o bien manteniendo la temperatura a 30° C y variando el tiempo de incubación entre 10 y 60 minutos (inactivación a temperatura constante). Se escogió la temperatura de 30° C por ser a la cual el comportamiento térmico de ambas isoenzimas empieza a diferenciarse.

Después de la incubación se determina la actividad de 6PGDH en cada caso.

Separación de isoenzimas. El extracto procedente de 30 g de micelios de *A. oryzae* desarrollado sobre ribosa como única fuente de carbono, se somete a precipitación fraccionada con SO₄(NH₄)₂ entre el 30 y el 80 % (4). El precipitado obtenido se redisuelve en 4 ml de tampón cítrico-citrato NaOH 0,05 M pH 6, y se dializa frente al mismo tampón durante 20 horas a la temperatura de 0-2° C.

La cromatografía se realiza en colum-

na de CM-Sephadex C-50 (2,5 × 80 cm), estabilizada con tampón cítrico-citrato NaOH 0,05 M pH 6, conteniendo β-mercaptoetanol 5 mM y ácido ε-aminocaproico 1 mM. La isoenzima I no se retiene en la columna, y la isoenzima II se eluye aplicando un gradiente lineal de ClNa entre 0 y 0,8 M, recogiendo fracciones de 5 ml cada 20 minutos.

Las masas moleculares se determinan por el método de ANDREWS (1).

Resultados y discusión

Separación de isoenzimas. En la figura 1 se observa el diagrama de elución correspondiente a las dos formas isoenzimáticas de la 6PGDH de micelios de *A. oryzae* desarrollado sobre ribosa como única fuente de carbono. La isoenzima I no es retenida en CM-Sephadex, mientras que la isoenzima II eluye a una concentración aproximada de ClNa 0,45 M.

El proceso global realizado en la separación de las dos formas isoenzimáticas se expresa en la tabla I.

Constantes cinéticas. Se ha estudiado la influencia de concentraciones crecientes de sustrato y coenzima sobre la velocidad de reacción de las dos isoenzimas

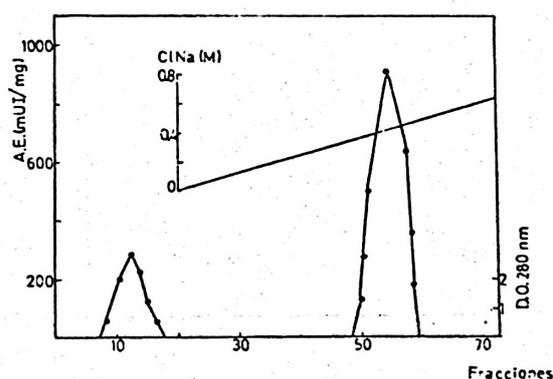


Fig. 1. Diagrama de elución de isoenzimas de la 6PGDH de *A. oryzae* desarrollado sobre ribosa.

Tabla I. Separación de isoenzimas de 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *A. oryzae* desarrollado sobre ribosa.

Etapa	Volumen (ml)	Proteínas totales (mg)	Actividad enzimática (mUI/ml)	Actividad específica (mUI/mg)
Extracto crudo	63	504	1.296	162
Sobrenad. 30 % sat. SO ₄ (NH ₄) ₂	63	334	1.245	235
Pp. 80 % sat. SO ₄ (NH ₄) ₂	19	164	3.680	428
1.º pico CM-Sephadex	35	24,5	126	180
2.º pico CM-Sephadex	48	38	340	425

de la 6PGDH. Los valores de las K_m aparentes y $V_{m\max}$ se determinan por el método de LINEWEAVER-BURK y los resultados obtenidos (tabla II) expresan que los valores de K_m aparentes respecto al 6PG son prácticamente iguales; sin embargo, las K_m aparentes respecto a NADP⁺ presentan diferencias que podrían permitir que la eficacia catalítica de las dos formas isoenzimáticas esté supeditada a las variaciones de la concentración de NADP⁺. Los valores de $V_{m\max}$ son también diferentes, presentando la isoenzima II mayor actividad que la I.

Efecto del pH. El perfil de la curva de actividad al pH de las dos formas isoenzimáticas es diferente (fig. 2). El co-

Tabla II. Constantes cinéticas de las isoenzimas de la 6PGDH de *A. oryzae*.

Constantes cinéticas	Isoenzima I	Isoenzima II
K_m (6PG) mM	0,1	0,14
K_m (NADP ⁺) μM	48	75
$V_{m\max}$ (mUI/mg)	180	425
K_i (NADPH) μM	53	80
K_i (NADPH) / K_m (NADP ⁺)	1,1	1

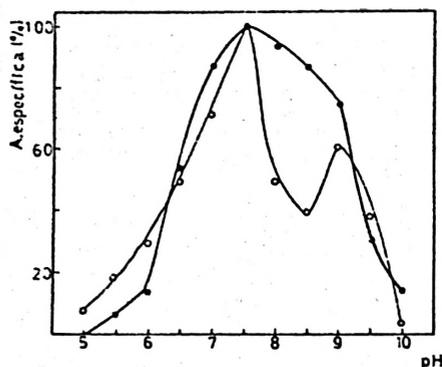


Fig. 2. Efecto del pH sobre la actividad de las isoenzimas de la 6PGDH de *A. oryzae*.
●---● Isoenzima I; ○---○ Isoenzima II.

respondiente a la isoenzima I difiere también del obtenido para extractos crudos (3), ya que presenta un solo pico de máxima actividad a pH 7,5, mientras que la isoenzima II presenta dos máximos de actividad a pH 7,5 y 9, que se corresponde con el perfil de extractos crudos y también es semejante al descrito por ZAHHER *et al.* (21) para la 6PGDH de la fracción mitocondrial de hígado de rata.

Efecto de la temperatura. La isoenzima II es la más resistente a la inactivación térmica, ya que conserva el 50 % de su actividad después de 5 min de incubación a 50° C, y el 50 % al cabo de 40 min de incubación a 30° C. La isoenzima I está completamente inactivada después de 5 min a 50° C y después de 40 min a 30° C (figs. 3 y 4).

Inhibición por NADPH. Se determinó el efecto del NADPH sobre la actividad de las dos isoenzimas de la 6PGDH, encontrando que, en ambos casos, el NADPH es un inhibidor competitivo respecto al NADP⁺ (fig. 5, a, b), obteniendo unos valores medios de $K_i = 53 \pm 8 \mu\text{M}$ para la isoenzima I y $K_i = 64 \pm 10 \mu\text{M}$ para la isoenzima II. El valor de K_i (NADPH)/ K_m (NADP⁺) = 1 es igual para

ambas isoenzimas, y también concuerda con el obtenido en extractos crudos de *A. oryzae* (2) y en hígado de rata en ayuno (17).

Efecto del GSSG. EGGLESTON y KREBS (5) describen el GSSG como el único constituyente celular de todos los probados, capaz de revertir la inhibición causada por el NADPH sobre la G6PDH, aunque el efecto del GSSG aislado es inhibitorio. Resultados similares han sido descritos

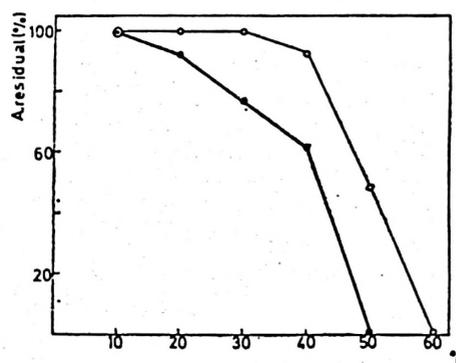


Fig. 3. Inactivación térmica de las isoenzimas de la 6PGDH de *A. oryzae*, manteniendo constante el tiempo de incubación a 5 minutos.
●---● Isoenzima I; ○---○ Isoenzima II.

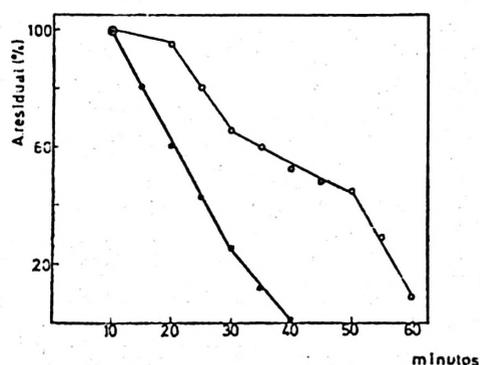


Fig. 4. Inactivación térmica de las isoenzimas de la 6PGDH de *A. oryzae*, manteniendo constante la temperatura a 30° C.
●---● Isoenzima I; ○---○ Isoenzima II.

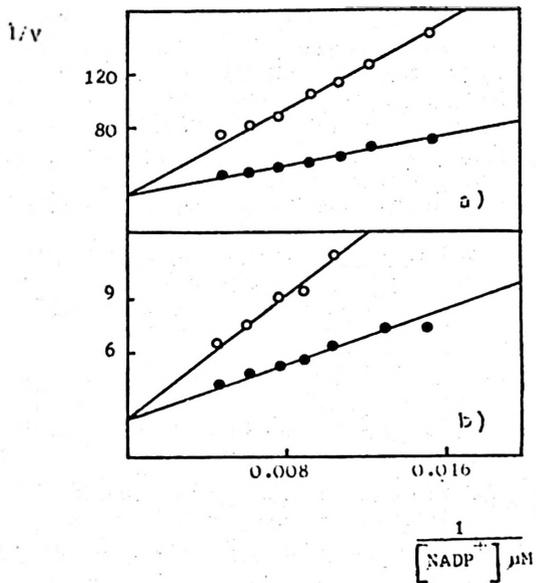


Fig. 5. Inhibición de las isoenzimas de la 6PGDH de *A. oryzae* por NADPH a diferentes concentraciones de NADP⁺. a) Isoenzima I; b) Isoenzima II; O---O NADPH 0,1 mM.

en hepatopáncreas de mejillón, tanto para la G6PDH como para la 6PGDH (16). Sin embargo, este efecto reversionador del GSSG sobre la inhibición del NADPH no ha podido ser confirmado en hígado de rata (6).

En *Aspergillus oryzae* el GSSG actúa de modo distinto, ya que activa a ambas deshidrogenasas (2), siendo un efector más potente de la 6PGDH que de la G6PDH.

A diferencia de lo que ocurre en extractos crudos, el GSSG sobre las isoenzimas de la 6PGDH se comporta como un inhibidor de la isoenzima I (fig. 6), siendo esta inhibición de tipo no competitivo respecto al NADP⁺, y con un valor de $K_i = 64 \pm 8 \mu\text{M}$ (4 determinaciones). El efecto del GSSG sobre la isoenzima II

Tabla III. Efecto del GSSG 90 μM sobre la actividad de la isoenzima II de la 6PGDH a diferentes concentraciones de NADP⁺. Valores medios ± E.S. de 4 determinaciones.

NADP ⁺ μM	% Activación
90	8 ± 0,2
120	7,5 ± 0,15
150	6,5 ± 0,22
180	6 ± 0,12
210	5 ± 0,2
240	4,5 ± 0,16
300	3 ± 0,15

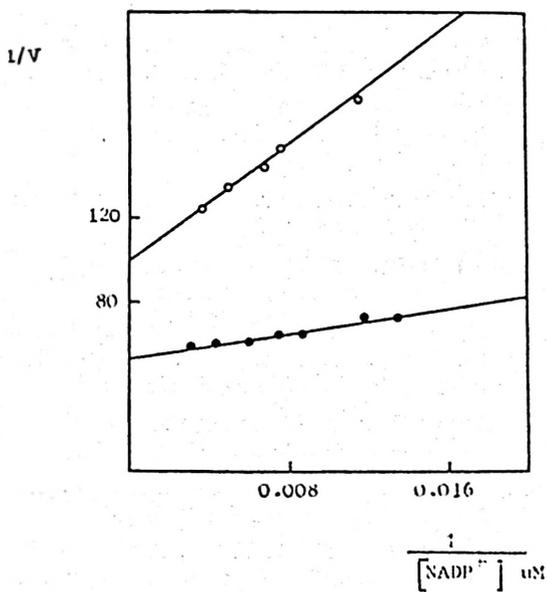


Fig. 6. Efecto del GSSG sobre la actividad de la isoenzima I de la 6PGDH a diferentes concentraciones de NADP⁺. O---O GSSG 90 μM.

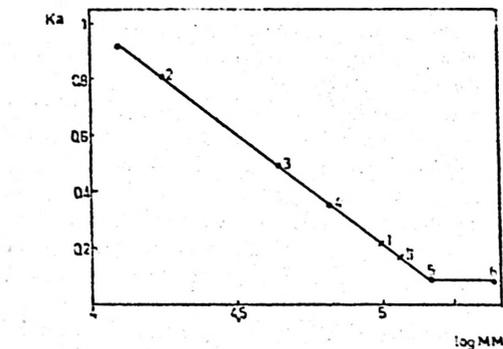


Fig. 7. Determinación de la masa molecular de las isoenzimas de la 6PGDH de *A. oryzae*.

concuera con el observado en extractos crudos, aunque la activación producida es mucho menor, llegando a ser de un 8 % para una concentración de NADP^+ 90 μM (tabla III). La concentración de GSSG empleada (90 μM) está dentro del valor encontrado para la concentración de equilibrio de *A. oryzae* (2).

Los resultados de EGGLESTON y KREBS en hígado de rata (5) sugieren que para la acción del GSSG es necesaria la presencia de un cofactor, el cual se pierde por diálisis y purificación. Nuestros resultados podrían indicar la existencia de un cofactor en *A. oryzae* que colaborando con GSSG actuara como regulador de las enzimas de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato.

Masas moleculares. Se determinaron las masas moleculares de las dos formas isoenzimáticas de la 6PGDH utilizando técnicas de filtración en gel de Sephadex (fig. 7), resultando un valor de 97.000 ± 2.000 daltones para la isoenzima I y 112.000 ± 2.000 daltones para la isoenzima II.

Resumen

Mediante precipitación fraccionada con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, seguida de cromatografía de intercambio iónico sobre CM-Sephadex se han separado dos formas isoenzimáticas de la 6PGDH de micelios de *Aspergillus oryzae* desarrollado sobre ribosa como única fuente de carbono. La isoenzima I no se adhiere a la columna y la isoenzima II eluye a una concentración aproximada de ClNa 0,4 M.

Los valores de K_m aparentes respecto al 6PG son iguales para ambas isoenzimas, mientras que la K_m aparente respecto al NADP^+ de la isoenzima I es menor que la correspondiente a la isoenzima II. Los valores de V_{mx} son también diferentes, siendo la isoenzima II la de mayor actividad. La curva de actividad al pH de la isoenzima I presenta un solo máximo de actividad a pH 7,5 a diferencia de la isoenzima II que presenta dos máximos a pH 7,5 y 9. El comportamiento térmico de las dos formas isoenzimáticas es también diferente,

siendo la isoenzima II la más resistente a la inactivación térmica.

El NADPH inhibe a las dos formas isoenzimáticas de forma competitiva respecto al NADP^+ , y con un valor de K_i semejante para ambas. El GSSG inhibe a la isoenzima I y activa ligeramente a la isoenzima II.

Se han determinado las masas moleculares de las dos isoenzimas, encontrando los siguientes valores: 97.000 ± 2.000 daltones para la isoenzima I y 112.000 ± 2.000 daltones para la II.

Bibliografía

1. ANDREWS, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222-233, 1964.
2. CEBRIÁN PÉREZ, J. A.: Tesis Doctoral, Universidad de Santiago, 1980.
3. CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. MUIÑO-BLANCO, T. y PÉREZ-MARTOS, A.: *An. Fac. Veter. Zaragoza*, **14**, 91-98, 1980.
4. DIXON, M.: *Biochem. J.*, **54**, 457-465, 1953.
5. EGGLESTON, L. V. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, **138**, 425-435, 1974.
6. GONZÁLEZ, A. M. y LAGUNAS, R.: *Mol. Cell. Biochem.*, **17**, 147-149, 1977.
7. LINEWEAVER, H. y BURK, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658-666, 1934.
8. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. I.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
9. MC NAIR SCOTT, D. B. y COHEN, S. S.: *Biochem. J.*, **55**, 23-32, 1953.
10. MUIÑO-BLANCO, T. y CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.: *Rev. esp. Fisiol.*, **36**, 193-198, 1980.
11. MUIÑO-BLANCO, T., GARCÍA-GIMENO, M. A., CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. y PÉREZ-MARTOS, A.: *Abst. XVII Reunión SEB*, 153, 1978.
12. MUIÑO-BLANCO, T. y PÉREZ-MARTOS, A.: *An. Fac. Veter. Zaragoza*, **10**, 69-77, 1975.
13. PEARSE, B. M. F. y ROSEMEYER, M. A.: *Eur. J. Biochem.*, **42**, 213-223, 1974.
14. PONTREMOLI, S., DE FLORA, A., GRAZI, E., MANGIAROTTI, G., BONSIGNORE, A. y HORRECKER, B. L.: *J. Biol. Chem.*, **236**, 2975-2980, 1961.
15. PROCSAL, D. y HOLTEN, D.: *Biochem.*, **11**, 1310-1315, 1972.

16. RODRÍGUEZ-SEGADE, S., FREIRE, M. y CARRIÓN, A.: *Biochem. J.*, 170, 577-582, 1978.
17. SAPAG-HAGAR, M., LAGUNAS, R. y SOLS, A.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 50, 179-185, 1973.
18. SCHNARRENBERGER, C., OESER, A. y TOLBERT, N. E.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 154, 438-448, 1973.
19. VERONES, F. M., BOCCU, E., FONTANA, A., BENASSI, C. A. y SCOFFONE, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 334, 31-44, 1974.
20. WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.: *Biochem.*, 310, 384-421, 1941.
21. ZAHEER, N., TEWARI, K. K. y KRISHNAN, P. S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 120, 22-27, 1967.

