REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA, 36, 389-394. 1980

Isoenzimas de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus oryzae* (Ahlburg)

J. A. Cebrián-Pérez, M. A. García-Gimeno y T. Muiño-Blanco

Cátedra de Bioquímica
Departamento de Ciencias Fisiológicas
Facultad de Veterinaria
Zaragoza

(Recibido el 19 de octubre de 1979)

J. A. CEBRIAN-PEREZ, M. A. GARCIA-GIMENO y T. MUIÑO-BLANCO. *Isoenzymes of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from* Aspergillus oryzae *(Ahlburg)*. Rev. esp. Fisiol., 36, 389-394. 1980.

Two forms (I and II) of Glucose-6-phosphate dehydrogenase (D-Glucose-6-phosphate: $NADP^+$ oxidoreductase E.C. 1.1.1.49) were isolated from mycelium of *Aspergillus oryzae* grown on glucose as sole carbon source, through ammonium sulfate fractionation, followed by ion-exchange chromatography.

The K_m values for both G6P and $NADP^+$ were very similar, but the V_{max} was nearly twofold for form II. The two isoenzymes were inhibited by NADPH competitively with $NADH^+$, and the K_i value was minimal for isoenzymatic form I. The ratio K_i/K_m was 2.5 for isoenzyme I and 7.5 for isoenzyme II.

The two isoenzymatic forms were inhibited by energetic metabolites (ATP, ADP and PEP), the greater effect was caused by ATP.

La G6PDH ha sido purificada a partir de diversos microorganismos como *E. coli* (24), *Saccharomyces carlsbergensis* (14, 31), *Candida utilis* (8, 10) y *Penicillium dupontii* (5). La existencia de múltiples formas de la G6PDH fue reconocida por primera vez por TSAO en tejidos de rata (27). Desde entonces, numerosos autores han descrito la existencia de diversas formas isoenzimáticas de la G6PDH de distintas fuentes (3, 8, 10, 30, 31).

En micelios de *A. oryzae* la G6PDH presenta alta actividad, variable en relación con la fuente de carbono utilizada por el hongo para su crecimiento. Cuando el hongo se desarrolla sobre ribosa la actividad enzimática es aproximadamente tres veces superior que cuando lo hace sobre glucosa. Este aumento de actividad se corresponde con la aparición de una nueva forma isoenzimática (17) que no se encuentra cuando el hongo se desarrolla sobre otras fuentes de carbono.

En el presente trabajo se describe la separación y algunas propiedades de las formas isoenzimáticas de la G6PDH de *A. oryzae* desarrollado sobre glucosa.

Abreviaturas:
G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
ATP: Adenosín-5'-trifosfato.
ADP: Adenosín-5-difosfato.
PEP: Fosfo-enol-piruvato.

Material y métodos

Reactivos. La G6P y todos los nucleótidos han sido suministrados por Sigma. Los productos químicos utilizados procedían de diferentes firmas comerciales (Merck, BDH, Serva y similares), siendo todos de calidad de análisis.

Cultivo de A. oryzae. Se ha utilizado una capa de *Aspergillus oryzae* procedente de la colección de cultivos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Salamanca. El medio de cultivo empleado ha sido el descrito por MULDER (19) para *A. niger* a pH 2,5-3,0, al que se añade glucosa a la concentración del 6 % (p/v) (16).

Los cultivos se realizan en frascos de Roux siguiendo la metódica descrita en un trabajo anterior (16). Los extractos enzimáticos se realizan, empleando como líquido extractivo tampón imidazol ClH 0,05 M conteniendo mercaptoetanol 10 mM a pH 6,5 (16). Las proteínas de los extractos crudos se valoran por el método de LOWRY *et al.* (15) y en las fracciones purificadas según la fórmula descrita por WARBURG y CHRISTIAN (29).

Determinación de la actividad enzimática. La actividad de la G6PDH (E.C. 1.1.1. 49) se determina midiendo la velocidad de reducción de $NADP^+$ por aumento de la densidad óptica a 340 nm en espectrofotómetro Beckman DB-GT. La mezcla de reacción está compuesta por tampón tris-ClH 66 mM, pH 8,5; Cl_2Mg 10 mM; $NADP^+$ 0,3 mM, glucosa-6-fosfato 3 mM y extracto enzimático en cantidad suficiente para producir un aumento mínimo de 0,05 unidades de densidad óptica por minuto. En la cubeta de referencia se sustituye el substrato glucídico por igual volumen de agua destilada.

Separación de isoenzimas. El extracto procedente de 30 g de micelios de *A. oryzae* desarrollado sobre glucosa se somete a precipitación fraccionada con $SO_4(NH_4)_2$ entre el 30 % y el 85 % de saturación (7). El precipitado obtenido se redisuelve en 4 ml de tampón imidazol-ClH 0,05 M a pH 6,5 y se dializa frente al mismo tampón durante 20 horas.

La cromatografía se realiza en columna de CM-Sephadex C-50 (2,5 cm × 40 centímetros), estabilizada con tampón imidazol-ClH 0,05 M conteniendo mercaptoetanol 5 mM a pH 6,5. La isoenzima I se eluyen con el mismo tampón, mientras que para la elución de la isoenzima II se aplica un gradiente lineal de ClNa entre 0 y 0,5 M, recogiendo fracciones de 8 ml cada 20 minutos.

Electroforesis sobre geles de poliacrilamida. Se realiza según la técnica descrita por DAVIS (6) empleando geles de acrilamida (7 % p/v) polimerizados a la luz ultravioleta. La G6PDH se revela por el método de BREWER y ASHWORTH (4).

Resultados y discusión

A partir de micelios de *A. oryzae* desarrollado sobre glucosa como única fuente de carbono, se han separado dos formas isoenzimáticas de la G6PDH, mediante precipitación fraccionada con sulfato amónico seguida de cromatografía de intercambio iónico sobre CM-Sephadex. La

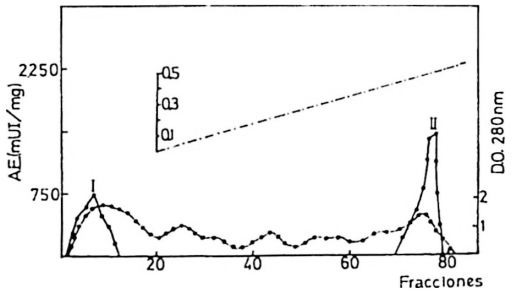

Fig. 1. *Diagrama de elución de isoenzimas de la G6PDH de* A. oryzae *desarrollado sobre glucosa.*

Tabla I. *Separación de isoenzimas de la G6PDH de* A. oryzae *desarrollado sobre glucosa.*

Fracción	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Act. enzimática (mU.I./ml)	Act. específica (mU.I./mg)
Homogeneizado crudo	50	250	510	102
Sobrenadante 30 % $SO_4(NH_4)_2$	49	220	478	106
Dializado [Pp. 85 % $SO_4(NH_4)_2$]	6,5	107	3.138	190
1.er Pico	48	72	630	420
2.° Pico	40	14	329	1.096

isoenzima I no es retenida en CM-Sephadex, mientras que la isoenzima II eluye de este cambiador a un gradiente aproximado de ClNa 0,45 M (fig. 1).

La tabla I expresa los resultados obtenidos en los distintos pasos realizados en el proceso de separación de las dos isoenzimas. En electroforesis en gel de poliacrilamida las dos isoenzimas presentan distinto desarrollo, coincidiendo cada una de ellas con una de las bandas presentes en el extracto crudo (fig. 2).

Constantes cinéticas. Se estudia la influencia de concentraciones crecientes de substrato y coenzima sobre la velocidad de reacción de las dos formas isoenzimáticas de la G6PDH entre los límites de 0,3-3 mM y de 60-300 μM respectivamente. Los valores de las K_m aparentes y V_{mx} se determinan por el método de Lineweaver-Burk. Los resultados obtenidos (tabla II) expresan que los valores de K_m aparentes son semejantes para las dos isoenzimas, mientras que la V_{mx} es aproximadamente dos veces superior para la isoenzima II. Estos valores son semejantes a los obtenidos para la enzima de otros orígenes (25).

Tabla II. *Constantes cinéticas de las isoenzimas de la G6PDH de* A. oryzae *desarrollado sobre glucosa*

Constantes cinéticas	Isoenzima I	Isoenzima II
K_m (G6P) mM	0,28	0,4
K_m ($NADP^+$) μM	30	20
V_{mx} (mUI/mg)	250	530
K_i (NADPH) μM	75	150
K_i (NADPH)/Km ($NADP^+$)	2,5	7,5

Inhibición por NADPH. La inhibición de la G6PDH fue descrita en primer lugar por NEGELEIN y HAAS (20) para la enzima de levadura y confirmada posteriormente para la enzima de otros orígenes por diversos autores (2, 9, 11, 23).

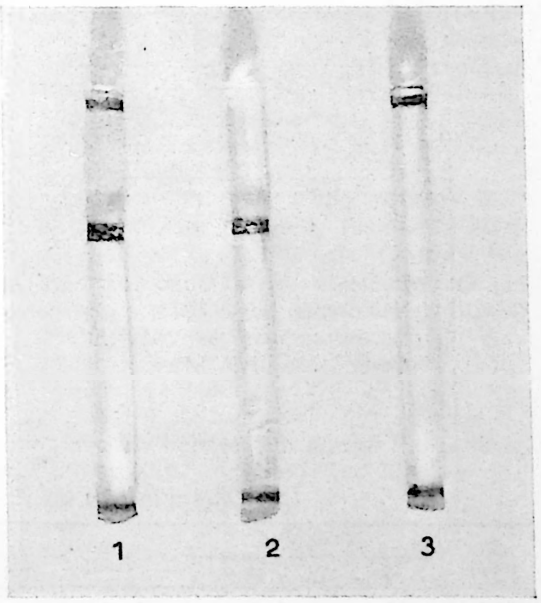

Fig. 2. *Electroforesis sobre geles de poliacrilamida de la G6PDH de* A. oryzae *desarrollada sobre glucosa.*
1. Extracto crudo; 2. Isoenzima I; 3. Isoenzima II.

El valor de K_i (NADPH)/K_m (NADP+) = 2,3 descrito por EGGLESTON y KREBS en hígado de rata también concuerda con el obtenido para extractos crudos de *A. oryzae* (18).

Se determinó el efecto del NADPH respecto al NADP+ sobre la actividad de las dos isoenzimas por medio de la recta de regresión del NADP+ en ausencia y presencia de NADPH 0,1 mM, observándose que en ambos casos el NADPH inhibe competitivamente respecto al NADP+ (figuras 3 y 4). Los valores de K_i son diferentes para las dos isoenzimas, siendo menor el valor correspondiente a la isoenzima I. El valor de K_i (NADPH)/K_m (NADP+) = 2,5 para la isoenzima I está de acuerdo con el obtenido en hígado de rata (9) y en extractos crudos de *A. oryzae* (18).

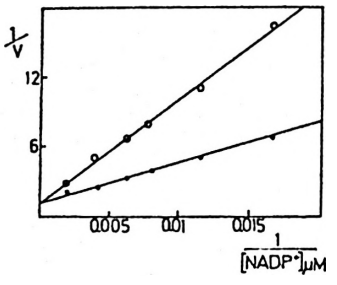

Fig. 3. *Inhibición de la isoenzima I de la G6PDH de* A. oryzae *por NADPH a diferentes concentraciones de NADP+.*
O—O NADPH 0,1 mM.

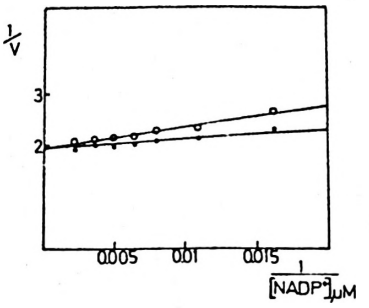

Fig. 4. *Inhibición de la isoenzima II de la G6PDH de* A. oryzae *por NADPH a diferentes concentraciones de NADP+.*
O—O NADPH 0,1 mM.

Acción de metabolitos energéticos sobre la actividad enzimática. La ruta de Entner-Doudoroff es una vía comúnmente utilizada por muchos microorganismos para la obtención de poder reductor y energía. En ciertos grupos de bacterias, como las *Pseudomonadaceas*, esta ruta constituye la vía principal de degradación de glucosa (12, 28), que les permite oxidarla directamente a ácido glucónico sin la formación de hexosas fosfato (26). Parece lógico, por tanto, que los metabolitos energéticos controlen de forma retroactiva la velocidad de dicha ruta.

En el presente trabajo se investigan los efectos de ATP, ADP y PEP sobre la actividad de las dos formas isoenzimáticas de G6PDH obtenidas a partir de micelios de *A. oryzae* desarrollado sobre glucosa, encontrando que los tres metabo-

Tabla III. *Acción de metabolitos energéticos sobre la actividad de las isoenzimas de la G6PDH de* A. oryzae.
Valores medios ± E.S. de cinco determinaciones.

ATP (mM)	Inhibición %		ADP (mM)	Inhibición %		PEP (mM)	Inhibición %	
	I	II		I	II		I	II
1	15 ±0,23	20±0,3	1	7±0,14	3 ±0,3	1	6±0,15	5±0,23
2	17 ±0,19	30±0,15	2	11±0,2	11,5±0,29	2	8±0,19	8±0,40
3	19,5±0,2	42±0,21	3	11±0,25	22,5±0,1	3	10±0,24	12±0,20
4	22 ±0,3	45±0,7	4	17±0,21	35 ±0,16	4	11±0,20	15±0,16
5	23 ±0,24	47±0,26	5	19±0,9	43 ±0,2	5	15±0,21	20±0,26

litos inhiben ambas isoenzimas, siendo mayor el efecto producido por el ATP (tabla III). Estos resultados concuerdan con los hallados por OLIVE *et al.* (21) para la G6PDH de *S. carlsbergensis*, quienes describen a los nucleótidos ATP, ADP y AMP como inhibidores competitivos de la G6PDH respecto a la G6P. Resultados semejantes han sido descritos también por otros autores (1, 13, 22) que encuentran que el ATP es un inhibidor de la G6PDH más efectivo que el ADP, y sugieren que éste puede ser un mecanismo de control de la oxidación de la G6P para mantener así la G6P necesaria para la síntesis de glucógeno.

Resumen

A partir de micelios de *A. oryzae* desarrollado sobre glucosa como única fuente de carbono, se han separado dos formas isoenzimáticas de G6PDH en las condiciones experimentales ensayadas. La isoenzima I no se adhiere a la columna, mientras que para la elución de la isoenzima II fue necesario aplicar una concentración aproximada de ClNa 0,45 M. En electroforesis en gel de poliacrilamida presentan distinto desarrollo, coincidiendo cada una de ellas con una de las bandas presentes en el extracto crudo.

Se han determinado las constantes cinéticas aparentes de las dos isoenzimas encontrando que las K_m son muy semejantes para las dos, mientras que la V_{mx} de la isoenzima II es dos veces superior a la obtenida para la I. El NADPH inhibe competitivamente a las dos formas isoenzimáticas respecto al $NADP^+$ (la razón K_i/K_m para la isoenzima I es 2,5 y para la II 7,5). ATP, ADP y PEP también inhiben ambas formas isoenzimáticas, siendo el ATP el que produce mayor efecto inhibidor.

Bibliografía

1. AVIGAD, G.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **56**, 1543-1547, 1966.
2. BONSIGNORE, A. and DE FLORA, A.: En «Current topics in cellular Regulation» (Horecker, B. L. and Stadman, E. R., eds.), Vol. VI, Academic Press, Nueva York, 1972, pp. 21-56.
3. BONSIGNORE, A., LORENZONI, I., CANCEDDA, R., NICOLINI, A., DAMIANI, G. and DE FLORA, A.: *Ital. J. Biochem.*, **19**, 165-177, 1970.
4. BREWER, J. M. and ASHWORTH, R. B.: *J. Chem. Educ.*, **46**, 41-45, 1969.
5. BROAD, T. E. and SHEPHERD, M. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 407-414, 1970.
6. DAVIS, B. J.: *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, **121**, 404-427, 1964.
7. DIXON, M.: *Biochem. J.*, **54**, 457-465, 1953.
8. DOMAGK, G. F., DOMSCHKE, W. and ENGEL, H. J.: *Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1242-1249, 1969.
9. EGGLESTON, L. V. and KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, **138**, 425-435, 1974.
10. ENGEL, H. J., DOMSCHKE, W., ALBERTI, M. and DOMACK, G. F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 509-516, 1969.
11. GLOCK, G. E. and MCLEAN, P.: *Biochem. J.*, **56**, 171-175, 1954.
12. HAMILTON, W. A. and DAWES, E. A.: *Biochem. J.*, **76**, 70-76, 1960.
13. HORNE, R. N., ANDERSON, W. B. and NOROLIE, R. E.: *Biochemistry*, **9**, 610-616, 1970.
14. KUBY, S. A. and NOLTMANN, E. A.: En «Methods in Enzymology» (S. I. Colowich y N. O. Kaplan, eds.), IX, Academic Press, Nueva York, 1966, pp. 116-121.
15. LOWRY, O. H., ROSEBROUCH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. I.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
16. MUIÑO-BLANCO, T. y PÉREZ MARTOS, A.: *An. Fac. Vet. Zaragoza*, **10**, 69-77, 1975.
17. MUIÑO-BLANCO, T., GARCÍA GIMENO, M. A., CEBRIÁN PÉREZ, J. A. y PÉREZ MARTOS, A.: *Abst. XVII Reunión de la SEB*, 153, 1978.
18. MUIÑO-BLANCO, T.: Tesis Doctoral, Universidad de Santiago, 1979.
19. MULDER, E. G.: *Antonie van Leewenhock*, **6**, 99-109, 1939-40.
20. NEGELEIN, E. and HASS, E.: *Biochem. Z.*, 282, 206-220, 1935.
21. OLIVE, C., GEROCH, M. E. and LEVY, H. R.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 2047-2057, 1971.
22. PASSONEAU, J. V., SCHULZ, D. W. and LOWRY, O. H.: *Fed. Proc.*, **25**, 219-227, 1966.
23. RACKER, E.: En «Methods in Enzymology» (S. I. Colowich y N. O. Kaplan, eds.), Vol. IX, Academic Press, Nueva York, 1955, pp. 722-725.

24. SANWAL, B. D.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1626-1631, 1970.
25. SCHNARRENBERGER, C., OESER, A. and TOLBERT, N. E.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 438-448, 1973.
26. STOKES, F. N. and CAMPBELL, J. J. R.: *Arch. Biochem.*, **30**, 121-125, 1953.
27. TSAO, M. U.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **90**, 234-237, 1960.
28. WANG, C. H., STERN, I. J. and GILMOUR, C. M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **81**, 489-492, 1959.
29. WARBURG, O. and CHRISTIAN, W.: *Biochem.*, **310**, 384-421, 1941.
30. YOSHIDA, A.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 4966-4976, 1966.
31. YUE, R. H., NOLTMANN, E. A. and KUBY, S. A.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 1353-1364, 1969.