

## Influencia de la esporulación sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus oryzae* (Ahlburg)

T. Muño y J. A. Cebrián

Cátedra de Bioquímica  
Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Facultad de Veterinaria  
Zaragoza

(Recibido el 29 de octubre de 1979)

T. MUIÑO and J. A. CEBRIAN. *Influence of the Sporulation on Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity from Aspergillus oryzae (Ahlburg)*. Rev. esp. Fisiol., 36, 193-198. 1980.

Both the specific and the total activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.49) of mycelium of *Aspergillus oryzae* decline progressively from day 6th of incubation, when the period of sporulation begins. Total cellular protein decreases parallelly. Cycloheximide stops protein synthesis but not the inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Inhibitors of proteolytic enzymes do not prevent the loss of enzyme activity when added to the cultures. Experiments show no inhibitors of the enzyme to be present in late-stage cells. The enzyme is not excreted into the culture medium.

La desaparición de actividades enzimáticas es un hecho común durante la morfogénesis de diversos microorganismos (1, 2, 10, 13, 15). Estos sistemas microbianos ofrecen un medio de estudio, muy conveniente, de la regulación de la función enzimática por degradación o inactivación específica (4, 14, 18), ya que sufren cambios dependientes del tiempo y pueden, en determinadas condiciones, formar esporas que son muy distintas en cuanto a morfología y actividad metabólica de la célula vegetativa normal.

ORLOWSKY y GOLDMAN (12) observan que la actividad específica de la G6PDH de *Bacillus cereus* varía desde valores má-

ximos a mínimos durante el desarrollo y germinación de las esporas, disminuyendo paralelamente el funcionamiento de la ruta de las pentosas, llegando incluso a anularse al finalizar la primera división celular (11).

Las oscilaciones de los niveles enzimáticos encontradas al estudiar el metabolismo de los *Aspergillus* se ven afectadas por diferentes factores, unos ambientales, otros morfológicos; así, NG *et al.* (9), al estudiar los niveles de algunas enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ciclo del glioxilato en *A. niger*, encuentran que éstos no son constantes, sino que están modificados por cambios nutriciona-

les y por diferentes estados morfológicos del hongo. En general, observan que todas las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos están reprimidas durante la formación de conidios y conidióforos y, en cambio, muestran su máximo de actividad durante la formación de vesículas y fiálides.

En el presente trabajo se estudia la pérdida de actividad que experimenta la G6PDH de *A. oryzae* en relación con el tiempo de incubación, y se examinan algunos mecanismos del proceso de inactivación *in vivo*.

### Material y métodos

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

**Cultivo del *A. oryzae*.** La cepa de *A. oryzae* utilizada procede de la colección de cultivos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Salamanca. El medio de cultivo empleado es el descrito por MULDER (8) para *A. niger* a pH 2,5-3,0 al que se añade ribosa a la concentración del 6% (P/V) (7). Los cultivos se realizan en frascos de Roux (7).

**Preparación de extractos enzimáticos.** Los micelios se homogeneizan empleando como líquido extractivo tampón imidazol-CIH 0,05 M, conteniendo mercaptoetanol 10 mM a pH 6,5 en la proporción 1/2 (P/V) (7).

**Determinaciones analíticas.** La actividad de la G6PDH (E.C. 1.1.1.49) se determina midiendo la velocidad de reducción del NADP<sup>+</sup> por aumento de la densidad óptica a 340 nm en espectrofotómetro Beckman DB-GT. La mezcla de

reacción está compuesta por: tampón tris-CIH 66 mM, pH 8,5; Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM; NADP<sup>+</sup> 0,3 mM, glucosa-6-fosfato 3 mM y extracto enzimático en cantidad suficiente para producir un aumento mínimo de 0,005 unidades de densidad óptica por minuto. En la cubeta de referencia se sustituye el sustrato glucídico por igual volumen de agua destilada.

Las proteínas se determinan por el método descrito por LOWRY *et al.* (5).

### Resultados

**Actividad de G6PDH en función del tiempo de incubación.** Con objeto de comprobar si la actividad de la G6DPH permanece constante durante el periodo de incubación, o si varía en relación con el tiempo de desarrollo del hongo, se realizaron cultivos de *A. oryzae* utilizando ribosa como única fuente de carbono, y recogiendo los micelios diariamente desde el 4.º hasta el 10.º día de incubación. Los resultados obtenidos (tabla I) indican que la actividad enzimática aumenta en los primeros días del desarrollo, hasta llegar al 6.º día en el que alcanza su valor máximo. A partir de este momento, en que empieza la fase de esporulación, la actividad disminuye considerablemente hasta alcanzar un 30% de su valor al 10.º día.

Tabla I. Actividad de G6PDH en micelios de *A. oryzae* en función del tiempo de incubación.

Días	Proteínas (mg/ml)	A. enzimática (mUI/ml)	A. específica (mUI/mg)	Actividad %
4	7,2 ± 0,2	1.440 ± 86	200 ± 12	65
5	8 ± 0,1	2.069 ± 80	258 ± 10	84
6	8,5 ± 0,3	2.618 ± 76	308 ± 9	100
7	8 ± 0,08	1.748 ± 80	218 ± 10	71
8	7,5 ± 0,2	1.039 ± 45	138 ± 8	45
9	5,5 ± 0,1	627 ± 33	114 ± 6	37
10	4 ± 0,1	394 ± 24	98 ± 6	32

*Concentración de proteínas en relación con el tiempo de incubación.* Se determinó la concentración de proteínas en extractos procedentes de micelios con diferentes períodos de incubación, encontrando que aumenta en relación con el tiempo de incubación hasta el 6.º día, a partir del cual disminuye (tabla I).

*Estabilidad de la G6PDH.* La G6PDH mantiene su actividad en extractos acelulares de micelios de *A. oryzae* en todos los períodos de incubación estudiados. Extractos mantenidos a 0° C conservan su actividad durante semanas, mientras que a 4° C exhiben el 90 % de su actividad después de 3 días.

*Efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas.* Se realizaron cultivos del hongo recogiendo parte del micelio al 4.º día de desarrollo y adicionando cicloheximida al 0,015 % (P/V) al frasco de Roux que contiene el resto del micelio; se mantiene en estufa hasta el 10.º día, recogiendo diariamente muestras del micelio y determinando en ellas actividad de G6PDH. Los valores obtenidos (tabla II) expresan que la cicloheximida no ejerce ningún efecto

Tabla II. Efecto de la cicloheximida sobre la actividad de la G6PDH de micelios de *A. oryzae*.

La concentración de cicloheximida fue 0,015 % (P/V) y se adicionó al cuarto día de incubación. Se considera el 100 % el valor correspondiente al sexto día de desarrollo normal del hongo.

Días incubación	Proteínas (mg/ml)	A. específica (mUI/mg)	Actividad %
4	7,2 ± 0,2	200 ± 12	65
5	7,2 ± 0,2	200 ± 12	65
6	7,1 ± 0,3	198 ± 11	64
7	6,9 ± 0,1	138 ± 7	45
8	6,0 ± 0,2	123 ± 10	40
9	5,5 ± 0,2	107,8 ± 5	35
10	4,2 ± 0,4	92,4 ± 5	30

Tabla III. Efecto del ácido  $\epsilon$ -aminocaproico sobre la actividad de la G6PDH de micelios de *A. oryzae*.

Se adicionó ácido  $\epsilon$ -aminocaproico al 0,01 % (P/V) al sexto día de incubación. Se considera el 100 % de actividad la correspondiente al sexto día de desarrollo normal del hongo.

Días incubación	Proteínas (mg/ml)	A. específica (mUI/mg)	Actividad %
7	7,6 ± 0,3	212 ± 11	69
8	7,5 ± 0,1	154 ± 9	50
9	6 ± 0,2	117 ± 10	38
10	6 ± 0,3	113,5 ± 9	37

sobre la inactivación de la G6PDH. Estos resultados parecen indicar que la síntesis de proteínas no es necesaria para que la G6PDH se inactive.

*Efecto de inhibidores de proteasas.* Se adicionó un inhibidor de proteasas (ácido  $\epsilon$ -aminocaproico) al 0,01 % (P/V) al medio de cultivo de *A. oryzae* al 6.º día de desarrollo, con objeto de comprobar si la pérdida de actividad observada a partir de este momento es debida a la digestión intracelular de la molécula enzimática por proteasas. Como se observa en la tabla III el ácido aminocaproico no impide la pérdida de actividad de la G6PDH.

*Actividad de G6PDH en el medio de cultivo de A. oryzae.* Se determinó la actividad de la G6PDH en el medio de cultivo de *A. oryzae* con objeto de comprobar si la pérdida de actividad observada es debida a la excreción de la enzima desde las células. En ningún caso se detectó actividad de G6PDH. Dada la posibilidad de que la G6PDH excretada fuera inactivada en el medio de cultivo, se adicionó extracto enzimático procedente de micelios con seis días de incubación al medio de cultivo, determinando actividad de G6PDH. Los resultados obtenidos indican que la enzima no se inactiva.

### Discusión

El funcionamiento de la ruta de las pentosas fosfato disminuye progresivamente, llegando incluso a anularse en el proceso de germinación y desarrollo de las esporas bacterianas (3). La primera enzima de la ruta, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ofrece la oportunidad de examinar la inactivación de una enzima específica durante una secuencia de cambios morfológicos.

Diversas experiencias demuestran que la pérdida de actividad específica es debida a una verdadera pérdida de actividad enzimática y no como consecuencia de la dilución de la enzima por acúmulo de otras proteínas. La actividad enzimática total disminuye con la actividad específica, disminuyendo al mismo tiempo la cantidad de proteínas. Por otra parte, si la pérdida de actividad fuera debida a dilución por aumento de proteínas, la cicloheximida debería prevenir la inactivación y, sin embargo, no ocurre así.

El hecho de que la enzima es estable en extractos acelulares parece indicar que la inactivación durante la morfogénesis es un proceso que tiene lugar en la célula viva. Uno de los posibles mecanismos de inactivación podría ser la degradación proteolítica de la enzima, pero los resultados obtenidos sugieren que la inactivación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa no es causada por enzimas proteolíticas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el inhibidor debe penetrar en la célula hasta el sitio de proteólisis y actuar sobre la proteasa adecuada.

Se han investigado asimismo otros mecanismos posibles de inactivación. La excreción de enzimas activas desde la célula es un factor importante en la regulación de actividades enzimáticas intracelulares durante el desarrollo de *Dyctiostelium discoideum* (17), *Polysphondylium pallidum* (10) y *Myxococcus xanthus* (16). La pérdida de actividad de la G6PDH no es debida a su excreción por la célula,

ya que en el medio de cultivo no se detectó nunca actividad. La posibilidad de la existencia de un inhibidor enzimático soluble que se acumule en la célula durante la morfogénesis queda también descartada a no ser que se trate de un inhibidor fuertemente unido y presente en cantidades estequiométricas.

Los resultados de MANDELSTAN (6) indican que la esporulación es un proceso secuencial, correspondiéndose cada estadio con la síntesis de un RNAm específico. En estas condiciones, en las cuales se requiere mucha más ribosa-5-fosfato que NADPH, la mayoría de la G6P se metaboliza por la vía glucolítica. Al disminuir el funcionamiento de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas, parece lógico pensar que las enzimas implicadas pierdan su actividad. La actividad de la G6PDH, primera enzima de la ruta, sería en este caso muy baja.

### Resumen

La actividad específica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49) de micelios de *Aspergillus oryzae* disminuye progresivamente a partir del sexto día de incubación, en el que empieza la fase de esporulación, hasta alcanzar un 30 % de su valor al décimo día.

La pérdida de actividad no es consecuencia de la dilución de la enzima por acúmulo de otras proteínas, ya que la concentración de proteínas totales disminuye paralelamente a la actividad específica. La cicloheximida detiene la síntesis de proteínas pero no impide la inactivación de la enzima. La degradación proteolítica tampoco parece ser la causa de la inactivación de la G6PDH, ya que en presencia de inhibidores de proteasa la pérdida de actividad no se modifica.

Las experiencias realizadas demuestran que la enzima no se excreta al medio de cultivo y que la pérdida de actividad no es debida a algún inhibidor acumulado en la célula durante la morfogénesis.

### Bibliografía

1. BERNLOHR, R. W. and GRAY, B. H.: En «Spores», IV (Campbell, L. L., ed.). Amer-

- ican Soc. Microbiol., Bethesda, Md. 1969, pp. 186-195.
2. DEUTSCHER, M. P. and KORNBERG, A.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 4653-4660, 1968.
3. GOLDMAN, M. and BLUMENTHAL, H. J.: *J. Bacteriol.*, **87**, 377-386, 1964.
4. LEITZMANN, C. and BERNLOHR, R. W.: *Biochem. Biophys. Acta*, **151**, 461-472, 1968.
5. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
6. MANDELSTAN, J.: *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **25**, 1-26, 1971.
7. MUIÑO BLANCO, T. y PÉREZ MARTOS, A.: *An. Fac. Veter. Zaragoza*, **10**, 69-77, 1975.
8. MULDER, E. G.: *Antoine van Leewenhock*, **6**, 99-109, 1939-40.
9. NG, A. M. L., SMITH, J. E. and MCINTOS, A. F.: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **61**, 13-20, 1973.
10. O'DAY, D. H.: *J. Bacteriol.*, **113**, 192-197, 1973.
11. ORLOWSKY, M. and GOLDMAN, M.: *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1689-1693, 1974.
12. ORLOWSKY, M. and GOLDMAN, M.: *Biochem. J.*, **148**, 259-268, 1975.
13. ORLOWSKY, M., MARTIN, P., WHITE, D. and WONG, M. C.-W.: *J. Bacteriol.*, **111**, 784-790, 1972.
14. ORLOWSKY, M. and WHITE, D.: *J. Bacteriol.*, **118**, 96-102, 1974.
15. ROSENBERG, E., FILER, D., ZAFRITI, D. and KINDLER, S. H.: *J. Bacteriol.*, **115**, 29-34, 1973.
16. SUDO, S. Z., WEISBERG, D. and DWORKIN, M.: *Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*, **G28**, 30, 1972.
17. SUSSMAN, M. and LOVGREN, N.: *Exp. Cell. Res.*, **38**, 97-105, 1965.
18. WAINDLE, L. M. and SWITZER, R. L.: *J. Bacteriol.*, **114**, 517-527, 1973.

