

EMIKO HIRONO

VIAS DE UTILIZAÇÃO DA GLUCOSE EM
PICNOPORUS CINNABARINUS.

CURITIBA
1976

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

Tese orientada pela profa.

Dra. Dêa Amaral.

Para Hiroyuki

INDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	13
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

A via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) é a principal via oxidativa em fungos, como na maioria de outros organismos. Ela é usualmente, responsável por, no mínimo, 50 % do metabolismo da glucose; sendo que, em alguns fungos, ela é responsável por todo metabolismo da mesma. Entretanto, a via EMP pode ser de importância secundária em relação às vias Hexose - Monofosfato (HMP) e Entner-Doudoroff (ED) em alguns fungos, ou totalmente carente como no caso de Caldariomyces fumago (RAMACHANDRAN, 1963; BLUMENTHAL, 1965).

A literatura bioquímica sobre fungos contém muitos exemplos de metabolização de carboidratos que envolvem a via EMP e HMP. Embora o desenvolvimento dos seres vivos seja distinto, as vias metabólicas são bastante comuns a todos os organismos. A sequência inicial de reações que degradam carboidratos para fornecer energia é muito semelhante daquelas que levam à formação de outros compostos biologicamente importantes.

Alguns fungos apodrecedores de madeira acumulam álcool, acetaldeído, ácido acético e traços de ácido succínico como produtos de degradação de carboidratos (NORD & SCIARINI, 1946). GIBBS & GASTEL (1953) apresentaram evidências de formação de ácido láctico por Rhizopus oryzae metabolizando glucose. A formação desses produtos a partir de glucose sugere uma via EMP operativa.

Diversos trabalhos evidenciam a ocorrência das vi-

as de degradação da glucose em fungos utilizando traçadores radioativos e pesquisando a existência das enzimas que as constituem em extratos livre de células.

DeFIEBRE & KNIGHT (1953) utilizando glucose-1-¹⁴C, demonstraram que 30 % da radioatividade total adicionada aparecia como CO₂ em Penicillium chrysogenum NRRL 1951 B25. Detectaram radioatividade em compostos que tinham valores de Rf correspondentes à glucose-6-fosfato e 6-fosfogluconato. SIH & KNIGHT (1956) investigaram os sistemas enzimáticos envolvidos na degradação da glucose neste mesmo fungo e demonstraram a presença das enzimas da via EMP, exceto da fosfohexoquinase e isolaram hexose, pentose e heptose fosfatos em coluna trocadora de íons, analisando os ésteres fosfato cromatograficamente ou através do espectro de absorção dos mesmos em reações características.

NEWBURGH et alii (1955) demonstraram que Tilletia caries, um fungo manchador do trigo, possui todas as enzimas necessárias à operação das vias HMP e EMP. Os estudos radiorespirométricos (NEWBURGH, 1958) demonstraram, ainda, que existe uma diferença nas vias de degradação da glucose em esporo e micélio de T. caries.

COCHRANE (1955) evidenciou todas as enzimas necessárias à degradação da glucose através da via EMP em Streptomyces coelicolor. Entretanto, nem as células intactas, nem o extrato possuem a capacidade de metabolizar glucose sob condi-

ções de anaerobiose. Foi sugerido que esta aerobiose obrigatória resulta da incapacidade da célula ou do sistema livre de células em reoxidar a difosfopiridina nucleotídeo.

HEATH & KOFFLER (1956) utilizando células de Penicillium chrysogenum em crescimento, concluíram que cerca de 2/3 da glucose era metabolizada oxidativamente, presumivelmente via HMP. Demonstraram, também, que havia desaparecimento da pentose quando da incubação do extrato livre de células de P. chrysogenum Q176 com ribose-5-fosfato.

REED et alii (1957) realizaram estudos quantitativos das vias de degradação da glucose empregando o método radiorespirométrico de WANG et al (1958) e detectaram a via HMP e EMP acoplada ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos em Penicillium digitatum.

CLARK & WALLACE (1958) determinaram que o extrato livre de células de Pullularia pullulans apresenta atividade fosfoglucomutase, glucose-6-fosfato desidrogenase e frutose-1, 6-difosfato aldolase e oxida ribose-5-fosfato, tendo, portanto, algumas das enzimas que degradam a glucose através da via EMP, assim como através da HMP. Os estudos radiorespirométricos indicaram que as células colocadas em jejum degradavam a glucose de maneira que a maioria do CO₂ radioativo originava-se do C-1 da glucose.

McDONOUGH & MARTIN (1958) demonstraram a presença de enzimas da via HMP em preparações de extrato livre de célu-

las de Aspergillus niger, verificando que incubando-se o extrato com ribose-5-fosfato, esta decrescia acompanhada por um aumento e decréscimo sequencial de cctopentose. Observaram, ainda, que ocorria um acréscimo na concentração de heptulose e triose quando em presença de hidrazina.

McDONALD et alii (1960) estudaram o mecanismo da degradação da glucose em Claviceps purpurea e evidenciaram atividade hexoquinase, fosfohexoisomerase, glucose-6-fosfato e 6-fosfogluconato desidrogenase, fosforiboisomerase, ribulose fosfato epimerase, transcetolase e transaldolase no extrato livre de células. Utilizando experiências radiorespirométricas, estimaram que 90 % da degradação da glucose ocorre através da via EMP e 10 % pela via EMP. Quando utilizaram células colocadas em jejum obtiveram um decréscimo razoável na contribuição relativa desta última via.

MARGULIES & VISHNIAC (1961) investigaram a degradação da glucose em Rhizopus MX evidenciando atividade hexoquinase, fosfohexoisomerase, aldolase-triose fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase e desidrogenase láctica e apresentando dados de que este microrganismo forma ácido láctico e etanol pela via EMP.

CLELAND & COE (1968) determinaram a atividade específica de todas as enzimas da via EMP em extratos de Dictyostelium discoideum em diferentes fases de desenvolvimento. As atividades, em termos de micromoles de substrato ou produto/minu-

to por 100 mg de proteína solúvel a 22°C, variou de 0,4 para hexoquinase a 49 para fosfoglicerato quinase, nos primeiros estágios de desenvolvimento.

CARTER & BULL (1969) estudaram o efeito da proporção do crescimento de Aspergillus nidulans, em cultura contínua, sobre as atividades específicas de algumas enzimas associadas ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), às vias EMP e HMP.

NG et alii (1972) mediram a atividade das enzimas chave da via EMP e HMP em extrato livre de células de Aspergillus niger. Realizaram, também, estudos radiorespirométricos utilizando glucose-1-¹⁴C e glucose-6-¹⁴C. As atividades enzimáticas e os dados dos estudos radiorespirométricos demonstraram que ambas as vias estavam presentes e eram operativas em todos os estágios do desenvolvimento, embora a contribuição relativa das mesmas diferissem.

NG et alii (1974) estudaram a influência da proporção de diluição na síntese enzimática em Aspergillus niger, quando este microrganismo era crescido em cultura contínua sob condições de "steady-state". O trabalho relata a influência da diluição sobre o nível de algumas enzimas do TCA, EMP e HMP em A. niger crescido em meio contendo citrato de sódio ou glucose, em concentrações limitantes, como fonte de carbono.

Estes trabalhos demonstram que a via da Hexose-Monofosfato pode ser uma via oxidativa alternativa à de Embden - Meyerhof-Parnas em fungos. Ambas produzem gliceraldeído-3-fos-

fato e frutose-6-fosfato como intermediários comuns, que serão posteriormente oxidados.

A via HMP é comum em plantas e animais. As enzimas pertencentes a este sistema multienzimático são amplamente distribuídas em fungos. A presença dessas enzimas, entretanto, não constitui prova da ocorrência da via. Esta, como exemplificada, ocorre em numerosos fungos, sendo responsável por menos de 40% da metabolização da glucose. O nível relativamente baixo de reações desta via talvez seja devido à quantidades limitantes de NADP⁺ (EAGON, 1963). Microrganismos que utilizam a via HMP ou ED, exclusiva ou predominantemente, adquiriram sistemas enzimáticos adicionais ou modificados que sobrepõem-se aos efeitos limitantes do suprimento de NADP⁺. A via HMP constitui via oxidativa principal numa proporção de 5 para 15 fungos pesquisados (BLUMENTHAL, 1965).

Uma evidência ilustrativa da ocorrência desta via em fungos é fornecida por Penicillium chrysogenum, que oxida o C-1 da glucose mais rapidamente do que os outros carbonos. Tais dados indicam a conversão inicial da glucose em glucose-6-fosfato, 6-fosfogluconolactona, 6-fosfogluconato seguido da descarboxilação à CO₂ e ribulose-5-fosfato (DeFIEBRE, 1953). Estes resultados foram confirmados por HEATH & KOFFLER (1956) que demonstraram a participação do "Zwischenferment" e NADP⁺. Aparentemente, todos os membros do gênero Aspergillus degradam a glucose oxidando, principalmente, o C-1 (ARNSTEIN, 1953).

A via Entner-Doudoroff é, comparativamente, rara na natureza e foi detectada somente em bactérias Gram-negativas e em dois fungos (NEWSBURGH, 1958; RAMACHANDRAN, 1963).

Uma via ED modificada é a principal via oxidativa em Caldariomyces fumago, sendo HMP a de menor importância. Neste fungo, a oxidação da glucose a ácido 6-fosfogluconico via um intermediário fosforilado (glucose-6-fosfato) não é seguido, mas ocorre uma via alternada de glucose para ácido 2-cetogluconico e, então, para ácido 6-fosfogluconico através das enzimas adaptativas 2-cetogluconico quinase e 2-ceto-6-fosfogluconico redutase (RAMACHANDRAN, 1963). O metabolismo do 6-fosfogluconato prossegue para formar piruvato com o auxílio de parte das três vias normais. Portanto, Caldariomyces fumago não possui todas as enzimas de quaisquer das três vias de catabolismo da glucose, mas utiliza parte dos sistemas enzimáticos das mesmas na completa oxidação da glucose.

A única via oxidativa em esporos de Tilletia caries (NEWSBURGH, 1955) é a via Entner-Doudoroff, embora ela seja substituída pelas vias Hexose-Monofosfato e Embden-Meyerhof-Parnas no micélio.

Das considerações traçadas, podemos verificar que três são as principais vias oxidativas conhecidas como operantes em fungo, as vias EMP, HMP e ED.

Como na maioria das células, quando a via EMP e HMP estão presentes simultaneamente, a via EMP é, usualmente, a

principal. Quando ocorre da via HMP ser a via principal, a via EMP constitui a via alternativa secundária, demonstrando a importância da mesma na metabolização de carboidratos em fungos. Somente Tilletia caries, entre os fungos, parece ter a capacidade de utilizar as três vias. Contudo, como já foi citado, a via ED é encontrada como a única via operante no estágio de esporo. A presença da via ED em esporos não parece ser uma ocorrência comum desde que os esporos de Tilletia contraversa não a utilizam (NEWBURGH, 1959). Em todas as outras circunstâncias, aparentemente, a atuação simultânea das vias ED e EMP é incompatível, embora as razões deste evento sejam ainda desconhecidas.

As enzimas que compõem as vias de metabolização de carboidratos foram, desta maneira, demonstradas em fungos imperfeitos, ascomicetos e ficomicetos. Entretanto, em contraste ao metabolismo de carboidratos em células animais, leveduras e bactérias, que tem sido consideravelmente estudado, o metabolismo de carboidratos em fungos tem, comparativamente, merecido pouquíssima atenção.

Uma consideração das atividades metabólicas de Basidiomicetos superiores demonstra a versatilidade desses organismos. Embora a madeira seja destruída quando atacada pelos fungos deste tipo, é interessante notar que o metabolismo de um membro desta classe difere de outros, apesar do processo total, a destruição da madeira, ser o mesmo. Por exemplo, embora

Coniophora cerebella (BIRKINSHAW, 1940) , Merulius niveus , Merulius tremellosus, Merulius confluens, Fomes annosus (NORD, 1946) e Lentinus lepideus (NORD, 1947) sejam conhecidos como fungos capazes de causar o apodrecimento da madeira, existe alguma diferença nas atividades enzimáticas. Os produtos de degradação da glucose podem ser compostos simples como álcool, acetaldeído e ácido acético em Coniophora cerebella, M.niveus, M.tremellosus e Fomes annosus. Entretanto, estes produtos acumulam-se em concentrações diferentes e, alguns como Lentinus lepideus produzem substâncias aromáticas. A formação de metil-p-metoxicinnamato pela ação de Lentinus lepideus sobre a glucose, xilose e a madeira corroboram com o conceito de que a destruição da madeira é causada por uma hidrólise inicial da celulose pelo microrganismo.

FALCK (1927) postulou três tipos de putrefação no processo de destruição da madeira por fungos, salientando dois sub-grupos no terceiro tipo - um, no qual ocorre destruição da celulose preferencialmente à lignina; outro, no qual ambas são destruídas.

As atividades bioquímicas de fungos inferiores têm sido bastante estudadas, em comparação aos estudos realizados com Basidiomicetos superiores. Desde que a destruição da madeira e a sua prevenção são assuntos de importância econômica, a decomposição da madeira deveria ser investigada em detalhes. Pase estudar o mecanismo de ação desses Basidiomicetos, faz-se

necessário estudar o metabolismo de carboidratos e as substâncias elaboradas pelo fungo, que decompõem a madeira.

Excetuando-se os trabalhos já citados, raros são os que abordam os aspectos bioquímicos em fungos que destroem a madeira (BIRKINSHAW, 1948; STEVENS, 1951; DeBAUN, 1951).

DOWLER et alii (1963) demonstraram atividade citocromo c redutase e NADH oxidase em extratos livres de células de dez fungos representando basidiomicetos, ascomicetos, ficomicetos e fungos imperfeitos. Determinaram, ainda, atividade desidrogenásica das três principais vias metabólicas - EMP, HMP e TCA - nos extratos livres de células.

NIEDERPRUEM (1964) estudou o metabolismo aeróbico em basidiospоро de Schizophyllum commune utilizando técnicas manométricas e inibidores respiratórios. Verificou que o consumo de oxigênio era aumentado por sacarose, algumas hexoses, D-xilose, acetato e etanol, demonstrando que os basidiosporos deste fungo são capazes de uma variedade de reações aeróbicas.

NIEDERPRUEM et alii (1965) verificaram que a proporção de glucose-6-fosfato desidrogenase para 6-fosfogluconato desidrogenase varia consideravelmente durante a diferenciação celular de S. commune. Além disso, determinaram que a atividade da fosfoglucoisomerase era inibida pela 6-fosfogluconato. Os autores sugeriram que esta combinação de eventos controlariam, possivelmente, as vias alternadas de utilização de glucose durante a morfogênese. Estes mesmos autores (1965a) inves

estigaram o metabolismo de polióis em células intactas e em extrato livre de células deste mesmo microrganismo, durante seu desenvolvimento. Este trabalho evidenciou atividade xilose reductase e diversas outras enzimas do metabolismo de polióis em células intactas crescidas em glucose. Atividades enzimáticas para oxidação do manitol e xilitol, assim como para a redução da frutose, galactose e xilose foram demonstrada em micélios crescidos em glucose.

RAO et al. (1969) estudaram a ocorrência e propriedades de enzimas do metabolismo de carboidratos em Coprinus lagopus, durante a morfogênese. Verificaram a presença de enzimas da via HMP, além de poliol desidrogenase e trealase durante o seu desenvolvimento.

WANG & RAPER (1970) examinaram diversas classes de enzimas de S. commune que ocorrem em múltiplas formas moleculares ou isozimas, entre elas a lactato desidrogenase e glucose-6-fosfato desidrogenase.

Os estudos sobre Picnoporus cinnabarinus resumem-se em aspectos taxonômicos, morfológicos e fisiológicos (NOBLES, 1958; GERBER, 1968).

Este trabalho relata alguns aspectos do metabolismo da glucose neste fungo.

Para avaliar a contribuição relativa das vias catabólicas num dado organismo é essencial conhecer a natureza, a função, assim como a extensão da participação das mesmas no

quadro geral do catabolismo de carboidratos. Tal conhecimento é importante em estudos comparativos e na compreensão das relações inter-grupos. Considerando o grande número de gênero e espécies de fungos existentes, faz-se necessário métodos razoavelmente precisos para reconhecer a natureza, estimar a extensão da participação e avaliar a função das várias vias catabólicas de carboidratos.

A determinação das vias oxidativas a uantes neste homobasidiomiceto foi realizada através de ensaios enzimáticos e métodos utilizando traçadores radioativos.

I. MATERIAIS

1. DROGAS

Glucose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, frutose-1,6-difosfato, DL-gliceraldeído-3-fosfato, ácido d(+) 2-difosfoglicérico (sal de Bário), ácido 3-D-fosfoglicérico (sal de Cálcio), ácido 2,3-difosfoglicérico (sal de ciclohexilamonio), fosfoenolpiruvato, 6-fosfogluconato, ribose-5-fosfato, adenina nucleotídeos, piridina nucleotídeos, aldolase, triose fosfato isomerase, alfa-glicerolfosfato desidrogenase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, desidrogenase láctica, glucose oxidase, peroxidase e beta-feniletilamina eram produtos da Sigma Chemical Company. Foi utilizado também triose fosfato isomerase da Boehringer Mannheim Corporation. D(+) glucose e piruvato de Sódio eram produtos Merck; etileno diamino tetraacetato de Sódio da Fisher Scientific Company; beta-Mercapto etanol da Matheson Company Inc.; hidrocloreto de L-cisteína monohidratada da Mann Research Laboratories, Inc.; Cocarboxilase da Schwarz Laboratories, Inc.; Sephadex G-15 da Pharmacia Uppsala-Sweden ; PPO e POPOP da Beckman.

Os açúcares radioativos glucose-3-¹⁴C, glucose-3,4-¹⁴C e glucose-6-¹⁴C foram obtidos da New England Nuclear e glucose-1-¹⁴C foi obtido da Calbiochem.

Todas as outras substâncias utilizadas neste trabalho eram consideradas P.A.

PPO = 2,5-difeniloxazol; POPOP = 1,4-Bis 2-(Metil-5-feniloxazol) -benzeno.

2. AMOSTRA DE MICRORGANISMO.

A amostra de Picnoporus cinnabarinus foi nos cedida pela Dra. Déa Amaral.

Este fungo é um homobasidiomiceto apodrecedor de madeira, pertencente à família Polyporaceae. A amostra monocariótica foi isolada a partir dos corpos de frutificação e classificada no Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná.

II. MÉTODOS

1. CONDIÇÕES DE CULTIVO.

A cultura de Picnoporus cinnabarinus foi mantida em meio sólido Sabouraud-glucose, sendo repicado mensalmente, armazenadas a 4°C e inoculada diretamente do meio sólido para o meio líquido. O meio líquido era semelhante ao utilizado por MARKUS (1965) e adicionado de hidrolisado de caseína 1 % e D-glucose 0,5 %.

As células foram coletadas no início da fase exponencial de crescimento (ASSIS, 1974), após um período de incubação de 48 horas a 28°C em um agitador rotatório a 100 rpm. Os micélios foram filtrados em gaze e lavados com água destilada. Removida a água de lavagem por compressão, os micélios foram pesados e congelados a -20°C.

2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS.

O extrato livre de células para os ensaios de medi

da da atividade enzimática foi preparado rompendo as células congeladas com areia do mar previamente tratada, na proporção de 1:2 p/p, em um gral à temperatura de 4°C. A extração foi feita em tampão ou solução extratora gelada, adequada para cada ensaio, numa proporção de 1:4 (peso úmido de célula/volume em ml do líquido extrator), seguida de centrifugação a 7.000 x g durante 10 minutos em centrífuga refrigerada "International", modelo PR-2. O sobrenadante (extrato livre de células) foi utilizado para a realização dos ensaios enzimáticos. Entretanto, os ensaios que empregam métodos espectrofotométricos foram realizados com extratos submetidos a nova centrifugação a 113.000 x g (R_{av}) durante 2 horas em ultracentrífuga "Beckman" modelo L2-65B.

3. MEDIDAS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

As condições de medida da atividade enzimática foram estabelecidas através de testes preliminares que envolveram estabelecimento da diluição do extrato a ser utilizado, determinação da concentração dos diversos cofatores essenciais à atividade enzimática e pH. Estabelecidas as condições, foram realizados testes para verificar a influência da concentração de enzima e determinar a sua atividade específica.

3.1. Glucoquinase (E.C. 2.7.1.2)

ATP: D-glucose 6-fosfo transferase.

A atividade glucoquinase foi estimada através da

determinação da glucose residual livre com glucose oxidase, se gundo o método descrito por SOLS et alii (1958).

A extração foi feita com EDTA 0,005 M gelada.

O sistema de incubação continha: 0,2 micromol de D-glucose; 0,75 micromol de ATP; 0,75 micromol de MgCl₂; 5 micromoles de tampão fosfato pH 7,0 contendo 0,5 micromol de EDTA e quantidades variáveis de enzima num volume final de 0,1 ml. Após 10 minutos de incubação a 30°C, foram adicionados 2,0 ml do reagente para desenvolvimento de cor (HUGGETT & NIXON, 1957), seguido de agitação. Após incubação por mais 30 minutos a 30°C foi adicionado 1 gota de KOH 30 % (SOLS & De La FUENTE, 1957) que interrompe a reação e deixa a cor inalterada durante horas. A leitura (DO) foi procedida a 450 nm em espectrofotômetro "Coleman" modelo 6A contra branco sem substrato. Um tubo sem extrato livre de células serviu como padrão. Contrôles de glucose endógena foram realizados para cada concentração de enzima.

Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a fosforilação da glucose em 10 minutos a 30°C, nas condições do teste.

3.2. Fosfoglucosomerase (E.C. 5.3.1.9)

D-glucose-6-fosfato cetol-isomerase.

Foi utilizado o método colorimétrico baseado na conversão da glucose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. A frutose-6-

ATP = Adenosina-5'-trifosfato; EDTA = etileno diamino tetraacetato de Sódio.

fosfato formada foi determinada pelo método de RC³ (1934).

O extrato livre de células foi obtido empregando-se tampão TRIS/HCl 1M pH 7,0.

O sistema de incubação para o ensaio da fosfoglucose isomerase continha 4 micromoles de glucose-6-fosfato, 400 micromoles de tampão TRIS/HCl pH 7,0 e extrato livre de células em concentrações variáveis num volume final de 1, ml. O sistema foi incubado durante 5 minutos a 30°C. Após o período de incubação, a enzima foi inativada adicionando-se 3,5 ml de uma solução de HCl (5:1) e a cor foi desenvolvida com 0,5 ml do reagente Resorcinol (0,1 g de Resorcinol + 0,25 g de tiouréia em 100 ml de ácido acético glacial) e aquecido durante 10 minutos a 80°C. A leitura foi procedida a 520 nm em espectrofotômetro "Coleman" modelo 6A. Foi feito um tubo Branco sem extrato. A coloração desenvolvida no Branco corresponde à glucose-6-fosfato. Foram feitos contrôles de cada tubo teste, em que a glucose-6-fosfato foi adicionada após a inativação da enzima por HCl. A curva padrão de frutose-6-fosfato foi realizada utilizando este substrato em concentrações que variaram de 0,2 a 0,8 micromol. Cada ponto da figura 2 representa a diferença entre a média de experiências testes paralelas e a média dos contrôles respectivos.

Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima que transforma 1 micromol de glucose-6-fosfato em frutose-6-fosfato.

TRIS = Tris(hidroximetil)aminometano.

fato em frutose-6-fosfato nas condições do ensaio.

3.3. Fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11)

ATP: D-frutose-6-fosfato 1-fosfotransferase.

A atividade fosfofrutoquinase foi medida indiretamente através de ensaio espectrofotométrico, acoplando-se aldolase, triose isomerase e alfa-glicerol fosfato desidrogenase, e seguindo a oxidação do NADH a 340 nm (SOLS & SALLAS, 1966). A mistura de reação utilizada difere da original na que se refere ao substrato empregado. Foi utilizado ATP ao invés de GTP, mas em concentração suficientemente baixa para minimizar a inibição alostérica causada pelo ATP.

Para a extração da fosfofrutoquinase foi utilizado tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,25 M pH 6,5 contendo EDTA 0,001 M e MgCl_2 0,001 M. O sistema de incubação continha: 25 mi cromoles de tampão fosfato pH 6,5; 0,15 micromol de NADH; 1 mi cromol de frutose-6-fosfato; 0,1 micromol de ATP; 5 micromoles de MgCl_2 ; 5 micromoles de Dítioeritritol; 0,085 U de aldolase; 13 U de alfa-glicerolfosfato desidrogenase; 108 U de triose fosfato isomerase e extrato livre de células em concentrações variáveis, num volume final de 1,0 ml, mantidos à temperatura de 26°C. A reação foi iniciada com o extrato bruto e a leitura foi procedida a 340 nm. Foram realizados contrôles para substrato endógeno para cada concentração de enzima, para NADH oxi
NADH = Beta-Nicotinamida Adenina Dinucleotideo, forma reduzida

dase (sem frutose-6-fosfato e sem enzimas acopladas) e para ATP endógeno.

Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima que fosforila 1 micromol de frutose-6-fosfato por minuto nas condições do teste. Para cada mol de frutose-6-fosfato fosforilada, 2 moles de NADH são consumidos no sistema de ensaio utilizado.

3.4. Frutose Di-fosfato aldolase (E.C. 4.1.2.13)

D-frutose-1,6-difosfato D-gliceraldeído-3-fosfato liase.

A atividade da frutose-1,6-difosfato aldolase foi medida seguindo-se a oxidação do NADH a 340 nm, em ensaio enzimático acoplado com uma mistura de alfa-glicerolfosfato desidrogenase e triose isomerase. Neste ensaio foram incluídos íons potássio e beta-mercapto etanol, desde que são necessários para a atividade ótima da enzima (RUTTER & HUNSLEY, 1966).

A solução extratora era o próprio tampão utilizado no ensaio. O sistema de incubação continha: 50 micromoles de tampão glicilglicina (glicilglicina 0,1 M, Acetato de potássio 0,2 M, beta-mercapto etanol 5×10^{-2} M) pH 7,5; 2 micromoles de frutose-1,6-difosfato; 0,15 micromol de NADH; 13 U de alfa-glicerolfosfato desidrogenase; 108 U de triose fosfato isomerase e extrato livre de células em concentrações variáveis, num volume final de 1,0 ml, mantidos a 26°C. A reação foi iniciada com a adição do extrato bruto. Foram realizados contrôles para

substrato endógeno para cada concentração de enzima e para NADH oxidase (sem frutose-1,6-difosfato e sem enzimas acopladoras).

Uma unidade de atividade aldolásica foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 micromol de frutose-1,6-difosfato por minuto sob as condições descritas.

3.5. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (E.C. 1.2.1.12)

D-gliceraldeído-3-fosfato: NAD⁺ oxidoreductase, fosforilante.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi ensaiada medindo-se a redução do NAD⁺ a 340 nm, utilizando-se frutose-1,6-difosfato como substrato. Foram utilizadas aldolase e triose isomerase como enzimas acopladoras.

Em outro ensaio realizado para determinação da atividade gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, utilizamos D-gliceraldeído-3-fosfato, com uma mistura equimolecular de ésteres triose fosfato, preparada fazendo-se uma solução de D-gliceraldeído-3-fosfato $1,5 \times 10^{-2}$ M e dihidroxiacetona fosfato $1,5 \times 10^{-2}$ M. A dihidroxiacetona fosfato foi preparada a partir do sal de ciclohexilamonio dimetil cetal dihidroxiacetona fosfato (BALLOU, 1960).

A enzima foi extraída com EDTA 0,5 g/l (sal tetrasódico). Foi ensaiada espectrofotometricamente segundo o método

do de KREBS (1955) modificado como se segue: 21 micromoles de tampão pirofosfato pH 8,5 (pirofosfato de sódio 0,03 M, contendo cisteína 0,006 M, preparado momentos antes do uso); 0,75 micromol de NAD⁺; 15 micromoles de AsO₄; 10 micromoles de frutose-1,6-difosfato; 0,085 U de aldolase; 0,1 mg de triose isomerase, e concentrações variáveis de extrato livre de células, num volume final de 1,0 ml. O sistema acima, sem AsO₄, foi incubado durante 5 minutos a 26°C. A reação foi iniciada com AsO₄ e a redução do NAD⁺ foi medida a 340 nm. Foram realizados controles para substrato endógeno (sem frutose-1,6-difosfato) para cada concentração de enzima e para NADH oxidase (sem frutose-1,6-difosfato e sem enzimas acopladoras).

Uma unidade de atividade gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi definida como sendo a quantidade de enzima que oxida 1 micromol de gliceraldeído-3-fosfato por minuto nas condições do teste.

3.6. Triose fosfato isomerase (E.C. 5.3.1.1)

D-gliceraldeído-3-fosfato Cetol-isomerase.

A atividade da triose isomerase foi medida seguindo-se a oxidação do NADH a 340 nm, em ensaio enzimático acoplado à alfa-glicerolfosfato desidrogenase utilizando-se DL-gliceraldeído-3-fosfato como substrato.

A enzima foi extraída com tampão utilizado no tes-

NAD⁺ = Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada.

te. O sistema de incubação utilizado (BEISENHERZ, 1955) para o ensaio da triose fosfato isomerase era constituído: 40 micromoles de tampão ETA/HCl pH 7,5; 1,6 micromoles de DL-gliceraldeído-3-fosfato; 0,2 micromol de NADH; 1,47 U de alfa-glicero1 fosfato desidrogenase e extrato livre de células em concentrações variáveis, num volume final de 1,0 ml. A reação foi iniciada com a adição do extrato bruto, após o sistema de reação ter sido equilibrado à temperatura de 26°C. Os controles de substrato endógeno e NADH oxidase foram realizados como nos ensaios anteriores.

Uma unidade de atividade triose fosfato isomerase foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a transformação de gliceraldeído-3-fosfato em dihidroxiacetona fosfato por minuto nas condições do teste.

3.7. Fosfoglicero quinase (E.C. 2.7.2.3)

ATP: 3-fosfo-D-glicerato 1-fosfotransferase.

A atividade da fosfoglicero quinase foi medida seguindo-se a oxidação do NADH a 340 nm, em ensaio enzimático acoplado à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, segundo o método descrito por BUCHER (1955) modificado.

O extrato livre de células foi preparado utilizando-se tampão pirofosfato 0,03 M pH 7,0 contendo EDTA 5×10^{-4} M como líquido extrator.

A atividade fosfoglicero quinase foi ensaiada na seguinte mistura de incubação: 21 micromoles de tampão pirofosfato pH 7,0 contendo EDTA 5×10^{-4} M; 5 micromoles de ácido 3-D-fosfoglicérico; 5 micromoles de $MgSO_4$; 1 micromol de ATP; 22 micromoles de cisteína; 2,75 U de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 0,10 micromol de NADH e extrato livre de células em concentrações variáveis, num volume final de 1,0 ml. A reação foi iniciada com a adição de extrato livre de células após o sistema ter sido equilibrado à temperatura de 26°C. Foram realizados contrôles para substrato e ATP endógeno e NADH oxidase como para os ensaios anteriores.

Uma unidade de atividade fosfoglicero quinase foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 micromol de D-1,3-difosfoglicerato por minuto nas condições do teste.

3.8. Fosfoglicero mutase (E.C. 2.7.5.3)

2,3-Difosfo-D-glicerato:2-fosfo-D-glicerato fosfotransferase.

A atividade da fosfoglicero mutase foi medida seguindo-se a formação de fosfoenolpiruvato espectrofotometricamente a 240 nm, em ensaio enzimático no qual foi acoplado enolase.

O extrato livre de células foi preparado utilizando-se tampão imidazol 0,02 M pH 8,0 como líquido extrator.

Para a medida da atividade fosfoglicero mutase foi purificada enolase segundo o método descrito por WESTHEAD & Mc LAIN (1964). A enolase purificada não possuía atividade fosfoglicero mutase.

O sistema de incubação continha: 14 micromoles de tampão imidazol pH 8,0; enolase 0,2 U; 1 micromol de $MgCl_2$; 5 micromoles de ácido 3-fosfoglicérico e concentrações variáveis de extrato livre de células, num volume final de 1,0 ml. O aparelho foi calibrado com um tubo branco contendo todos os reagentes, exceto o extrato livre de células. A reação foi iniciada com ácido 3-D-fosfoglicérico. Foram realizadas leituras do tempo zero para cada concentração de enzima após a adição de ácido 3-D-fosfoglicérico. Novas leituras foram feitas depois de decorridos 30 minutos de incubação a $26^{\circ}C$. Foram realizados controles de substrato endógeno para as diversas concentrações de enzima e testadas, para as mesmas, quantidades catalíticas de ácido 2,3-difosfoglicérico (10^{-5} M).

Uma unidade de atividade fosfoglicero mutase foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 micromol de fosfoenolpiruvato por minuto sob as condições descritas.

3.9. Enolase (E.C. 4.2.1.11)

2-fosfo-D-glicerato hidro-liase.

A atividade da enolase foi medida seguindo-se a for

mação de fosfoenolpiruvato espectrofotometricamente a 240 nm , segundo o método descrito por WESTHEAD (1966).

A extração da enzima foi realizada com tampão TRIS/Acetato 0,05 M pH 7,4, contendo EDTA 2×10^{-5} M.

O sistema de incubação continha: 50 micromoles de tampão TRIS/Acetato pH 7,4; 0,01 micromol de EDTA; 2 micromoles de Acetato de Magnésio; 2 micromoles de ácido d(+) 2-fosfoglicérico e extrato livre de células em concentrações variáveis, num volume final de 1,0 ml. A reação foi iniciada com a preparação do extrato livre de células, após o sistema de incubação ter sido equilibrado à temperatura de 26°C. O aparelho foi calibrado com água destilada mais extrato para cada quantidade variável de enzima. Como controle foi determinado a medida do substrato endógeno utilizando um sistema sem ácido d(+) 2-fosfoglicérico.

Uma unidade de atividade enolase foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 micromol de fosfoenolpiruvato por minuto sob as condições descritas.

3.10. Piruvato quinase (E.C. 2.7.1.40)

ATP: piruvato 2-O-fosfotransferase.

A piruvato quinase foi ensaiada em um sistema acoplado com a reação da desidrogenase láctica, segundo o método descrito por VALENTINE & TANAKA (1966).

O extrato livre de células foi preparado utilizando-se tampão trietanolamina pH 7,5 (BEISENHERZ, 1955), como líquido extrator.

O sistema de ensaio era constituído de 20 micromoles de tampão ETA pH 7,5; 67,5 micromoles de KCl; 7,2 micromoles de MgSO_4 ; 0,4 micromol de ADP; 0,1 micromol de NADH; 1,35 micromoles de PEP; 24,45 U de desidrogenase láctica e extrato livre de células em concentrações variáveis, num volume final de 1,0 ml. O extrato bruto e todos os reagentes, exceto o PEP, foram pipetados em uma cubeta, que foi colocada na câmara do espectrofotômetro para equilibrar a temperatura (26°C). A reação foi iniciada com a adição do PEP. Foram realizados controles de substrato endógeno utilizando um sistema sem PEP e de NADH oxidase com um sistema sem a presença do substrato e sem desidrogenase láctica.

Uma unidade de atividade piruvato quinase foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa o consumo de 1 micromol de fosfoenolpiruvato por minuto sob as condições descritas.

3.11. Lactato desidrogenase (E.C. 1.1.1.27)

L-Lactato: NAD⁺ oxidoreductase.

A atividade da lactato desidrogenase foi medida seguindo-se a redução do NAD⁺ a 340 nm, utilizando piruvato como substrato, segundo o método descrito por STOLZENBACH (1966).

PEP = fosfoenolpiruvato; ADP = Adenosina-5'-difosfato.

O extrato livre de células para o ensaio da lactato desidrogenase foi preparado com tampão fosfato 0,25 M pH 7.

O sistema de incubação era constituído de 125 micromoles de tampão fosfato pH 7,0; 0,5 micromol de piruvato de sódio; 0,15 micromol de NADH e extrato livre de células em concentrações variáveis, num volume final de 1,0 ml. A reação foi iniciada com a adição de extrato bruto, após o sistema de reação ter sido equilibrado à temperatura de 26°C. Foi realizado controle de substrato endógeno para cada concentração de enzima.

Uma unidade de atividade lactato desidrogenase foi definida como sendo a quantidade de enzima que oxida 1 micromol de piruvato por minuto nas condições do ensaio.

3.12. Glucose-6-fosfato desidrogenase (E.C. 1.1.1.49)

D-glucose-6-fosfato: NADP⁺ 1-oxidoreductase.

A atividade glucose-6-fosfato desidrogenase foi medida seguindo-se a redução do NADP⁺ a 340 nm, durante a oxidação da glucose-6-fosfato, segundo o método descrito por NOLTMANN et alii (1961).

O extrato livre de células foi preparado utilizando-se tampão glicilglicina 0,1 M pH 8,0 como líquido extrator.

O sistema de incubação era constituído de 80 micromoles de tampão glicilglicina pH 8,0; 1 micromol de glucose-6-fosfato; 0,3 micromol de NADP⁺; 10 micromoles de MgSO₄ e con -

centrações variáveis de extrato bruto, num volume final de 1,0 ml. Todas as diluições de reagentes foram feitas em EDTA 0,05M gelado pH 8,0. A reação foi iniciada pela adição do extrato livre de células, após o sistema ter sido equilibrado à temperatura de 26°C. Foi realizado contrôlo para substrato endógeno para cada concentração de enzima e testes utilizando NAD⁺ em substituição a NADP⁺.

Uma unidade de atividade glucose-6-fosfato desidrogenase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 micromol de glucose-6-fosfato por minuto nas condições do ensaio.

3.13. 6-Fosfogluconato desidrogenase (E.C. 1.1.1.44)

6-fosfo-D-gluconato: NADP⁺ 2-oxidoreductase, descarboxilante.

A atividade 6-fosfogluconato desidrogenase foi estimada seguindo-se a redução do NADP⁺, durante a oxidação e descarboxilação do 6-D-fosfogluconato para ribulose-5-fosfato e CO₂ (PONTREMOLI, 1966).

O extrato livre de células foi preparado utilizando-se tampão glicilglicina 0,1 M pH 8,0 como líquido extrator.

A mistura de incubação (volume final = 1,0 ml) continha: 60 micromoles de tampão glicilglicina pH 8,0; 10 micromoles de MgSO₄; 1,5 micromoles de 6-fosfogluconato; 0,3 micro-

NADP⁺ = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma oxidada.

mol de NADP^+ e extrato livre de células em concentrações variáveis. A reação foi iniciada pela adição da preparação enzimática após o sistema ter sido equilibrado a 26°C e a leitura procedida a 340 nm. Foram realizados controles de substrato endógeno para cada concentração de enzima e testes utilizando NAD^+ em substituição a NADP^+ .

Uma unidade de atividade 6-fosfogluconato desidrogenase foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 micromol de 6-fosfogluconato por minuto nas condições do ensaio.

3.14. Transcetolase (E.C. 2.2.1.1)

Sedoheptulose-7-fosfato: D-gliceraldeído-3-fosfato gliceraldeído-transferase.

A transcetolase catalisa a formação de gliceraldeído-3-fosfato e heptulose fosfato a partir de uma mistura de xilulose-5-fosfato e ribose-5-fosfato. Na presença de triose fosfato isomerase e alfa-glicerolfosfato desidrogenase, a triose fosfato é reduzida a alfa-glicerofosfato pelo NADH , cuja oxidação foi seguida espectrofotometricamente a 340 nm (RACKER, 1955).

Para a obtenção da mistura de pentoses fosfato foram purificadas ribulose-5-fosfato epimerase e ribose-5-fosfato isomerase. Como ambas as enzimas são utilizadas no teste, não houve necessidade de purificá-las separadamente; foram, portanto, purificadas como uma mistura, a partir de baço de rato,

segundo o método descrito por NOVELLO & McLEAN (1968). A mistura de enzimas não possuía atividade transaldolase.

O extrato livre de células foi preparado utilizando-se tampão imidazol 0,02 M pH 8,0 como líquido extrator.

O sistema de incubação era constituído de 14 micromoles de tampão imidazol pH 8,0; 5 micromoles de ribose-5-fosfato; 3 micromoles de $MgCl_2$; 0,15 micromol de NADH; 0,115 micromol de Tiamina pirofosfato; 9,576 U de triose fosfato isomerase; 10 U de alfa-glicerolfosfato desidrogenase; 0,002 mg da mistura de ribose-5-fosfato isomerase e ribulose-5-fosfato epimerase, num volume final de 1,0 ml. Todos os reagentes, exceto a preparação enzimática, foram pipetados em uma cubeta e o sistema foi incubado durante 5 minutos. Após a incubação foi adicionado o extrato bruto, e o registrador foi acionado após o 2º minuto depois de iniciada a reação porque a experiência indicou que a mesma é linear após este período. Foram realizados testes para substrato endógeno, NADH oxidase, epimerase e isomerase endógena.

Uma unidade de atividade transcetolase é definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 micromol de gliceraldeído-3-fosfato por minuto nas condições do ensaio.

3.15. Evidenciação dos Produtos Intermediários das Reações não oxidativas do Ciclo das Pentoses.

Embora não tenham sido determinadas as atividades específicas, foram realizadas experiências para a evidência das atividades ribose-5-fosfato isomerase (E.C. 5.3.1.6 - D-ribose-5-fosfato Cetol-isomerase), ribulose-5-fosfato epimerase (E.C. 5.1.3.1 - D-ribulose-5-fosfato 3-epimerase) e transaldolase (E.C. 2.2.1.2 - Sedoheptulose-7-fosfato: D-gliceraldeído-3-fosfato dihidroxiacetona-transferase), através de análises semi-quantitativas dos intermediários da via.

Preparou-se um extrato livre de células a partir de 3 g de células (peso úmido). As células foram rompidas com areia do mar previamente tratada numa proporção de 1:2 (p/p) em um gral, à temperatura de 4°C. A extração foi realizada com tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 7,6, numa proporção de 1:1 (v/v), seguido de centrifugação a 7 000 x g durante 20 minutos em centrífuga "International" modelo PR-2, refrigerada. O sobrenadante (extrato livre de células) foi passado através de uma coluna de Sephadex G-15 (h = 30 cm e ϕ = 2,16 cm) equilibrada com tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 7,6 e eluído com o mesmo tampão. Todas as operações até o momento da incubação foram realizadas à temperatura de 4°C.

O sistema de incubação continha 300 micromoles de tampão TRIS/HCl pH 7,6; 100 micromoles de D-ribose-5-fosfato; 80 micromoles de MgCl₂ e extrato livre de células (18 mg de proteína), num volume total de 15 ml. Foram retiradas alíquotas de 2,0 ml aos 0, 5, 15, 30 e 60 minutos de incubação em banho-

Maria a 30°C, que foram precipitadas adicionando-se-as a 1,0ml de ácido perclórico 70 %. Após centrifugação a 7.000 x g durante 20 minutos, o sobrenadante foi neutralizado com KOH 20 %. Após nova centrifugação para retirar o KClO₄ precipitado, uma alíquota (0,05 ml) dos sobrenadantes dos diversos tempos de incubação foram testados pelos métodos de Cisteína/H₂SO₄, Cisteína/Carbazol (ASHWELL, 1957) e Orcinol (HORECKER, 1957), traçando-se o espectro de absorção de cada sistema. Foi realizado um controle na mesma proporção de reagentes, porém sem substrato.

3.16. Fosfogluconato desidratase (E.C. 4.2.1.12) - 6-fosfo-D-gluconato hidrolase.

6-fosfo-2-ceto-3-deoxi-D-gluconato aldolase (E.C. 4.1.2.14) - 6-fosfo-2-ceto-3-deoxi-D-gluconato D-gliceraldeído-3-fosfato liase.

A fosfogluconato desidratase converte o ácido 6-fosfogluconico a um ceto ácido fosforilado, que pela ação da 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolase, dará como produto ácido pirúvico e D-gliceraldeído-3-fosfato.

A presença de ambas as enzimas em extrato bruto de Picnoporus cinnabarinus foram pesquisadas pela tentativa de determinação dos ceto ácidos intermediários em sistemas de incubação contendo ácido 6-fosfogluconico, glutatona reduzida, íons Fe⁺⁺ ou Mg⁺⁺ ou Mn⁺⁺ e extrato livre de células a diferentes pH.

Após um período de incubação de 30 minutos a 30°C foi pesquisada a presença de ácido pirúvico pelos métodos de FRIEDEMANN & HAUGEN (1943) e MacGEE & DOUDOROFF (1954) para alfa-ceto ácidos totais.

4. Estudos Metabólicos por Radiorespirometria.

A proporção de produção de $^{14}\text{CO}_2$ pela oxidação da glucose marcada em distintos átomos de Carbono foi determinada pelo método descrito por ZAGALLO & WANG (1967) com algumas modificações.

Foi utilizada uma cultura de P. cinnabarinus com 48 horas de crescimento a 28°C em agitador rotatório a 100 rpm. O meio de cultura (600 ml) estava contido em frasco erlenmeyer de 2 litros de capacidade e o inóculo foi padronizado de maneira a produzir micélios homogêneos ($\pm 5,5$ g - peso úmido). Os micélios foram coletados por filtração em gaze e lavados com água destilada. Removida a água de lavagem por compressão, os micélios foram pesados (50 mg - peso úmido) e colocados em jejum por 10 horas em 2,75 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2, em frascos de 60 ml de capacidade. A quantidade de micélios para cada frasco foi escolhida de maneira que a concentração celular utilizasse uma quantidade apreciável de glucose em 4-6 horas. Esta concentração celular ótima foi determinada realizando uma experiência preliminar com glucose- $U-^{14}\text{C}$. A concentração final de glucose em todas as experiências foi de 0,2%. A-

pós as 10 horas de jejum, foi adicionado aos frascos contendo 50 mg de células, 0,25 ml de glucose (133 micromoles/ml) especificamente marcada em diferentes átomos de Carbono (D-glucose-1-¹⁴C, $5,68 \times 10^5$ cpm/ml; D-glucose-6-¹⁴C, $4,04 \times 10^5$ cpm/ml; D-glucose-3-¹⁴C, $3,6 \times 10^5$ cpm/ml; D-glucose-3,4-¹⁴C, $4,08 \times 10^5$ cpm/ml). Os frascos foram hermeticamente fechados com tampa de borracha e selo de alumínio, tendo suspenso em seu interior, um fino arame servindo de suporte a 10 pedaços de papel de filtro Whatman Nº 17 de 0,56 cm de diâmetro, que foi colocado no terço superior do frasco. Os frascos foram, então, colocados em um banho-Maria (Dubnoff Metabolic Shaker Incubator) a 28°C com agitação por períodos de tempo determinados. Ao final do tempo de incubação, foram injetados 0,2 ml de beta-feniletilamina através da tampa de borracha, embebendo cuidadosamente o suporte com papel de filtro, para absorver o CO₂ formado; 0,25 ml de ácido perclórico 70 % diretamente na mistura de incubação para interromper a reação e converter qualquer bicarbonato formado a CO₂. Os frascos foram colocados novamente no banho-Maria por 30 minutos para permitir uma absorção quantitativa de CO₂. Ao final do tempo de incubação, o suporte contendo papel de filtro e base foram colocados em 10 ml do líquido de cintilação (BRAY, 1960) e levados ao sistema de cintilação líquida "Beckman", modelo LS-133, após 7 1/2 horas, desde que há um aumento significativo no cpm durante as primeiras horas após a mistura da base com o líquido de cintilação. Os frascos

dos diferentes tempos de incubação e frascos contrôles (sem glucose marcada) foram incubados guardando-se um intervalo de tempo suficiente para se obedecer tempos exatos de incubação e contagem sem a interferência das operações realizadas. Todas as experiências foram realizadas em duplicata e os resultados obtidos representam uma média das mesmas.

Os sistemas foram depois filtrados em Millipore (25 mm = ϕ e 0,45 micron = poro - Sartorius) para recolher as células. Após terem sido lavadas exhaustivamente com água destilada, as membranas mais as células foram colocadas em 10 ml do líquido de cintilação para contagem da radioatividade incorporada.

5. Métodos Analíticos.

As atividades específicas foram calculadas dos gráficos de concentração de enzima x substrato consumido ou produto formado. Estes últimos valores foram calculados para as velocidades iniciais nos primeiros minutos da reação. Nos casos em que houve um período de "lag", foi utilizado a velocidade máxima atingida.

A atividade específica foi definida como unidades de atividade enzimática por mg de proteína. A concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY et alii (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

O coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm foi considerado como sendo igual a $6,22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (HORE -

CKER, 1948) e o coeficiente de extinção molar do PEP a 240 nm foi considerado como sendo igual a $1,73 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (WOLD & BALLOU, 1957).

As leituras a 240 nm e 340 nm foram realizadas em espectrofotômetro "Beckman", modelo DU, com registrador.

Os espectros de absorção foram traçados utilizando-se espectrofotômetro "Beckman", modelo DU e "Varian", modelo 635.

A estimativa das contribuições relativas das vias de utilização da glucose em P. cinnabarinus foi feita de acordo com o método de WANG et al. (1959).

A fração da glucose degradada pela oxidação direta, G_{IMP} , envolvendo uma clivagem C₁-C₅ foi calculada por:

$$G_{IMP} = \frac{G_1 - G_6}{G_T - G_{T'}} \text{ , onde}$$

G_1 , G_6 representam a atividade total recuperada em CO₂ metabólico de células utilizando quantidades iguais de glucose-1-¹⁴C e glucose-6-¹⁴C, respectivamente. G_T , representa a atividade total de glucose-¹⁴C administrada. $G_{T'}$, representa a atividade total incorporada à célula.

A fração de glucose degradada pela via EMP, G_{EMP} , foi calculada através de:

$$G_{EMP} = 1 - G_{IMP}$$

A estimativa das contribuições relativas das vias foi, ainda, realizada de acordo com o método de KATZ (1963), empregando-se de suas equações a seguinte:

$$\frac{G1CO_2 - G6CO_2}{1 - G6CO_2} = \frac{3 PC}{1 + 2PC}$$

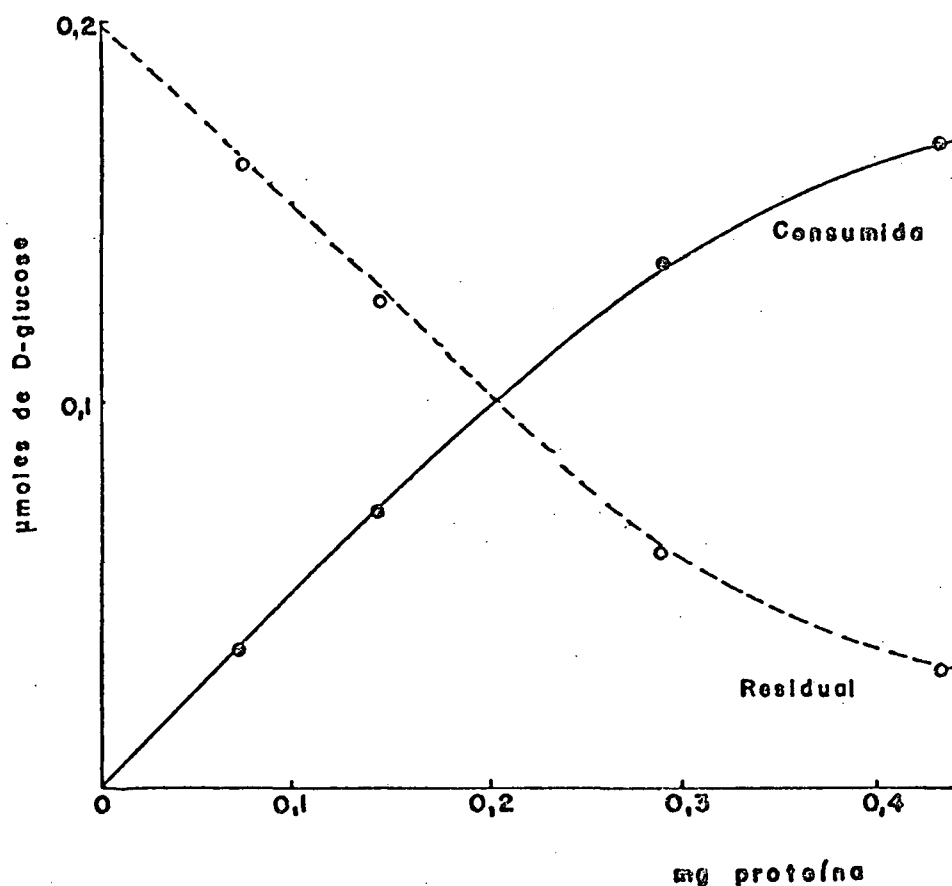
As incubações, a medida do CO₂ liberado, a radioatividade incorporada à célula foram realizadas do forme descrito anteriormente e, a glucose residual no meio foi medida pela glucose oxidase (SOLS, 1958). Os ensaios foram realizados em duplicata em 4, 8, 10 e 12 horas tendo-se o cuidado de trabalhar em condições estéreis. Aos sistemas de incubação foi adicionado 22,37 micromoles de glucose, sendo que a glucose-1-¹⁴C apresentava atividade específica de 7 216 cpm/micromol, a glucose-6-¹⁴C a atividade específica de 6 185 cpm/micromol e a glucose-3,4-¹⁴C 6 519 cpm/micromol.

I) DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS ENZIMAS QUE CONSTITUEM A VIA EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS.

Glucoquinase

A presença de glucoquinase no extrato livre de células foi detectada medindo-se a glucose residual após a fosforilação, conforme se observa na figura 1.

Figura 1

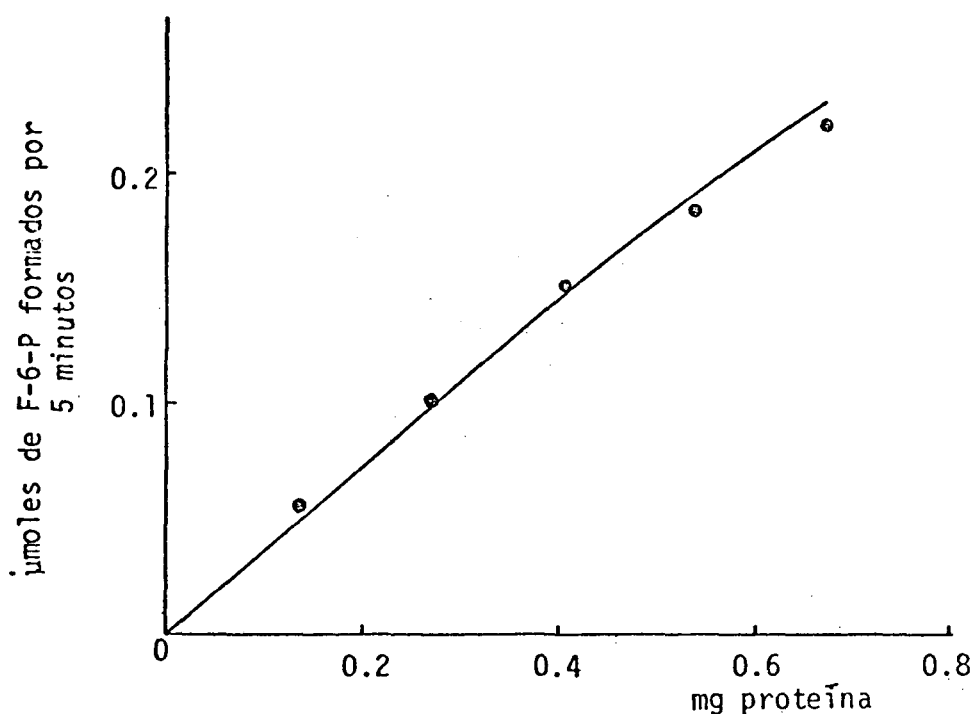


Sistema de incubação: 0,2 micromol de glucose, 0,75 micromol de $MgCl_2$; 0,2 micromol de tampão fosfato pH 7,5; 0,75 micromol de ATP e extrato livre de células em concentrações variáveis. Volume final = 1ml

Fosfoglucoisomerase

A existência de fosfoglucoisomerase foi indicada pela formação de ceto-hexose, quando o extrato livre de células foi incubado com glucose-6-fosfato na ausência de NADP⁺ (Fig.2).

Figura 2

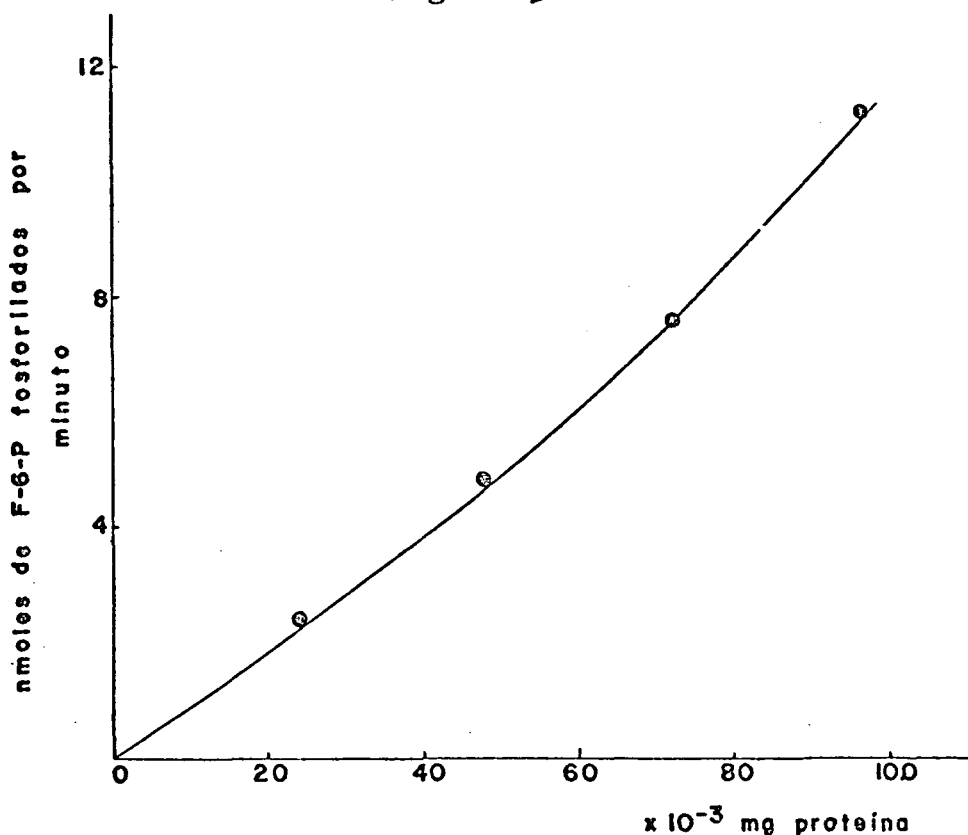


Sistema de incubação: 4 micromoles de glucose-6-fosfato; 400 micromoles de tampão TRIS/HCl pH 7 e extrato bruto nas concentrações indicadas, num volume final de 1 ml. A frutose-6-fosfato formada foi medida conforme descrito em Materiais e Métodos.

Fosfofrutoquinase

A determinação da atividade fosfofrutoquinase no extrato é de grande importância, uma vez que esta etapa é a única que efetivamente pertence somente à sequência glicolítica sendo, então, considerada uma característica da via e constituindo um ponto de controle sujeito à regulação metabólica. A fosfofrutoquinase foi detectada em extrato bruto de P.cinnabarinus, conforme mostra a figura 3.

Figura 3

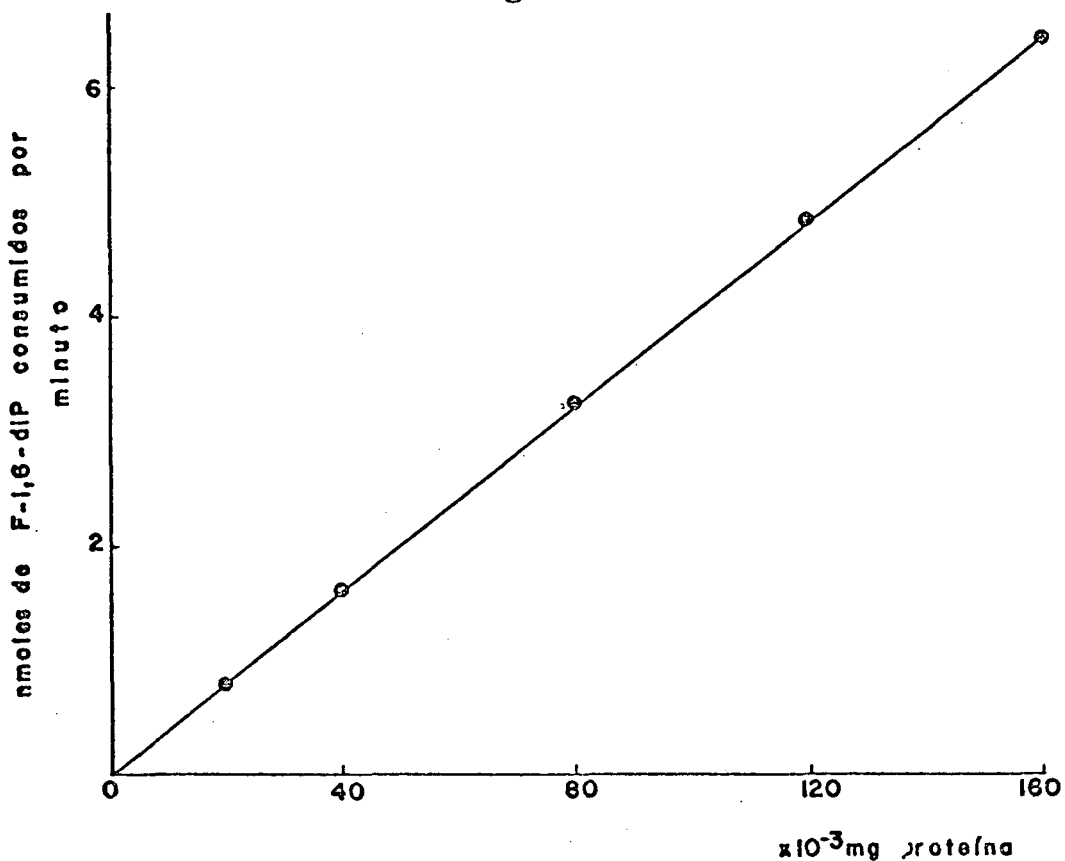


Sistema de incubação: 25 micromoles de tampão fosfato pH 6,5; 0,15 micromol de NADH; 1 micromol de frutose-6-fosfato; 0,1 micromol de ATP; 5 micromoles de MgCl₂; 5 micromoles de Ditione; 0,085 U de aldolase; 13 U de alfa-glicero-3-fosfato desidrogenase; 108 U de triose isomerase e concentrações variáveis de extrato bruto, num volume final de 1 ml.

Frutose-1,6-difosfato Aldolase

O equilíbrio da reação da aldolase favorece a formação da frutose-1,6-difosfato. Para que ocorra uma clivagem mensurável, o sistema de reação deve fornecer condições para que ocorra uma remoção eficiente das trioses formadas. Utilizando o ensaio enzimático acoplado à enzima piridina nucleotídeo dependente (alfa-glicerolfosfato desidrogenase), determinamos a atividade específica da frutose-1,6-difosfato aldolase no extrato bruto (Figura 4).

Figura 4

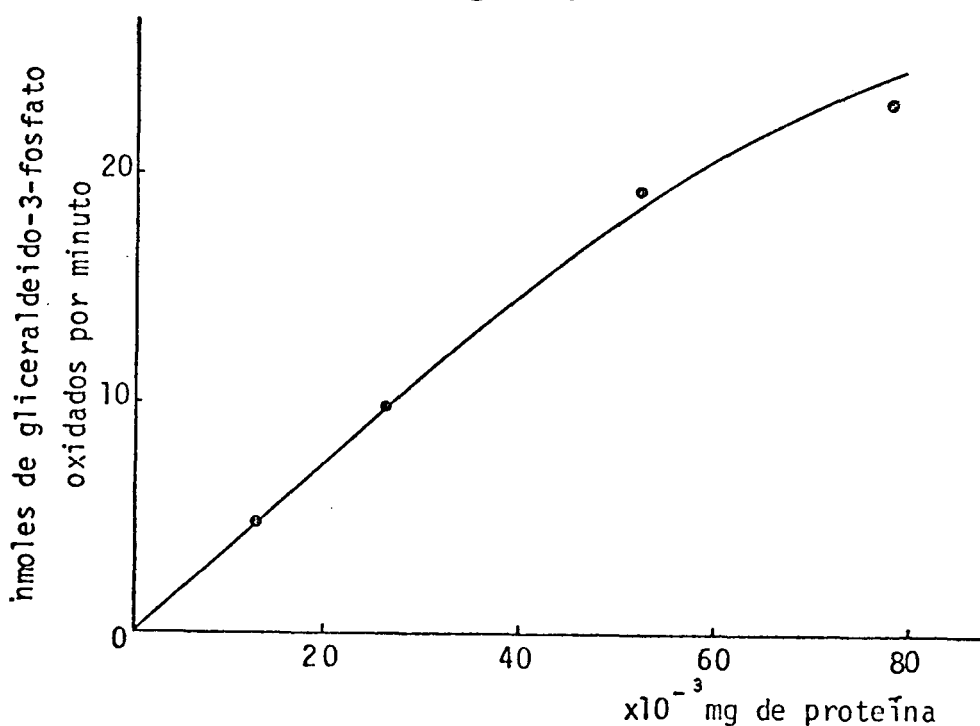


Sistema de incubação: 50 micromoles de tampão glicilglicina pH 7,5 (ver Materiais e Métodos); 2 micromoles de frutose-1,6-difosfato; 0,15 micromol de NADH; 13 U de alfa-glicerolfosfato desidrogenase; 108 U de triose fosfato isomerase e extrato bruto nas concentrações indicadas, num volume final de 1 ml.

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Para demonstrar a redução do NAD^+ durante a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato pelo extrato bruto de P. cinnabarinus, foram realizados ensaios utilizando diversos métodos. Estes métodos diferiram apenas no substrato empregado. O resultado apresentado na figura 5, foi o melhor obtido, usando frutose-1,6-difosfato como substrato e acoplado aldolase ao sistema.

Figura 5

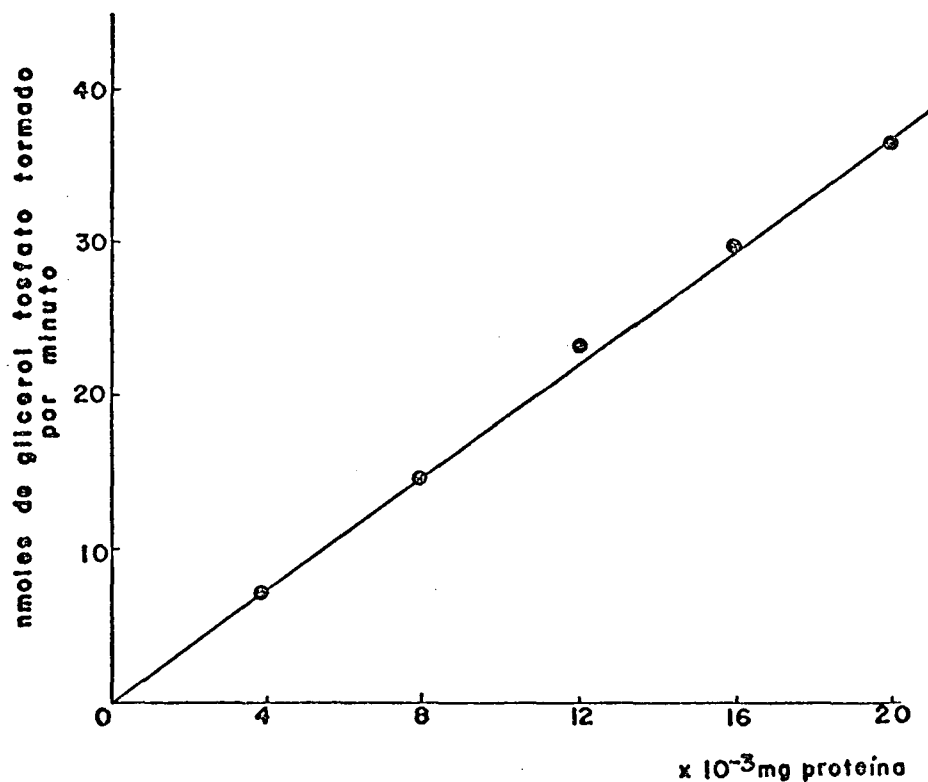


Sistema de incubação: 21 micromoles de tampão pirofosfato pH 8,5 (ver Materiais e Métodos); 0,75 micromol de NAD; 15 micromoles de AsO_4 ; 10 micromoles de frutose-1,6-difosfato; 0,085 U de aldolase; 0,1 mg de triose isomerase e extrato bruto nas concentrações indicadas, num volume final de 1 ml.

Triose fosfato isomerase

A triose fosfato isomerase, ensaiada utilizando-se D-3-gliceraldeído fosfato como substrato e acoplando alfa-glicerol fosfato ao sistema, medindo-se a oxidação do NADH, apresentou uma elevada atividade, como pode ser verificada na figura 6.

Figura 6

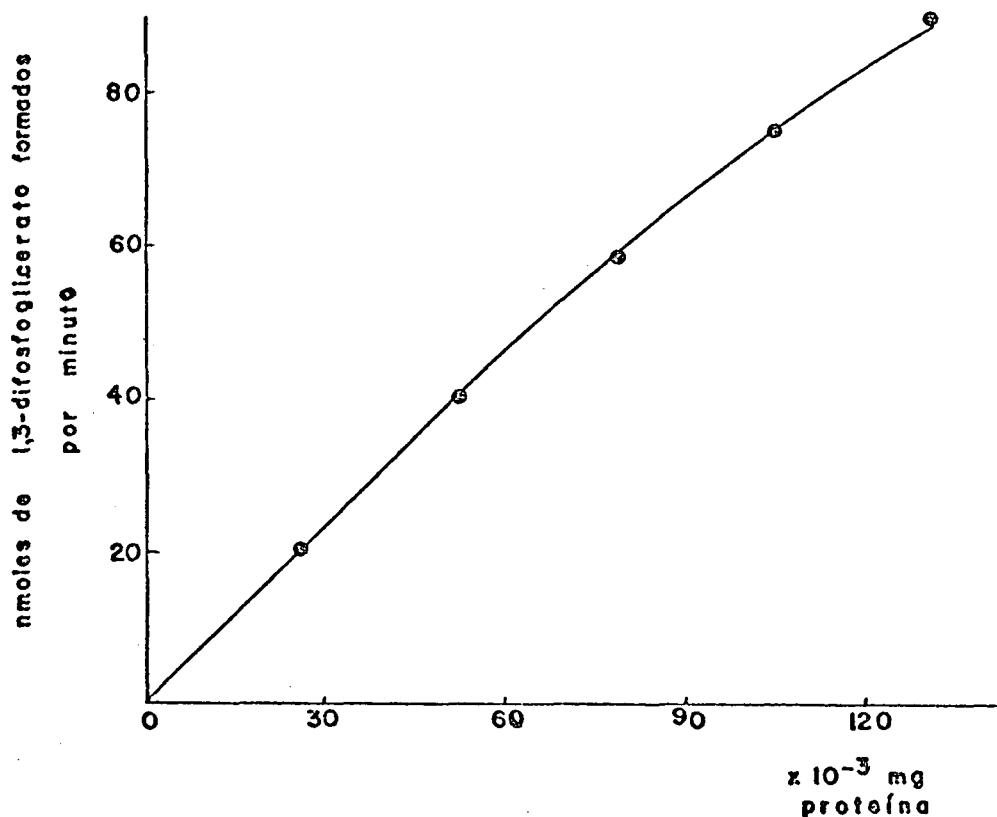


Sistema de incubação: 40 micromoles de tampão ETA/HCl pH 7,5 (ver Materiais e Métodos); 1,6 micromoles de DL-gliceraldeído-3-fosfato; 0,2 micromol de NADH; 1,47 U de alfa-glicerolfosfato desidrogenase e extrato bruto nas concentrações indicadas. Volume final = 1 ml.

3-fosfoglicerato quinase

A 3-fosfoglicerato quinase foi detectada no extrato livre de células de P.cinnabarinus, conforme os resultados apresentados na figura 7. A determinação foi realizada no sentido inverso da glicolise para evitar interferências de outras enzimas, uma vez que os ensaios foram realizados com extrato bruto.

Figura 7

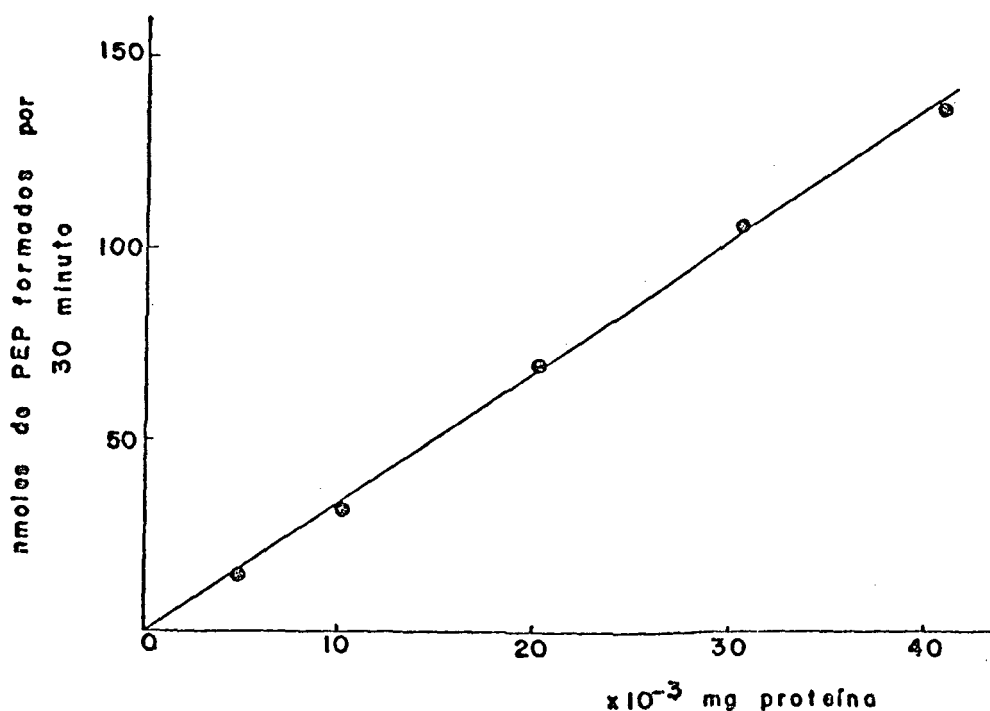


Sistema de incubação: 21 micromoles de tampão pirofosfato pH 7,0 (ver Materiais e Métodos); 5 micromoles de ácido 3-D-fosfoglicérico; 5 micromoles de MgSO₄; 1 micromol de ATP; 22 micromoles de cisteína; 2,75 U de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 0,1 micromol de NADH e concentrações variáveis de extrato bruto, num volume final de 1 ml.

Fosfoglicero mutase

A interconversão de D-3-fosfoglicerato em D-2-fosfoglicerato pelo extrato livre de células de P.cinnabarinus foi demonstrada acoplando-se enolase ao sistema e seguindo a formação de fosfoenolpiruvato espectrofotometricamente. A figura 8 apresenta uma superposição de curvas obtidas em ensaios realizados com e sem a adição de ácido 2,3-difosfoglicérico.

Figura 8

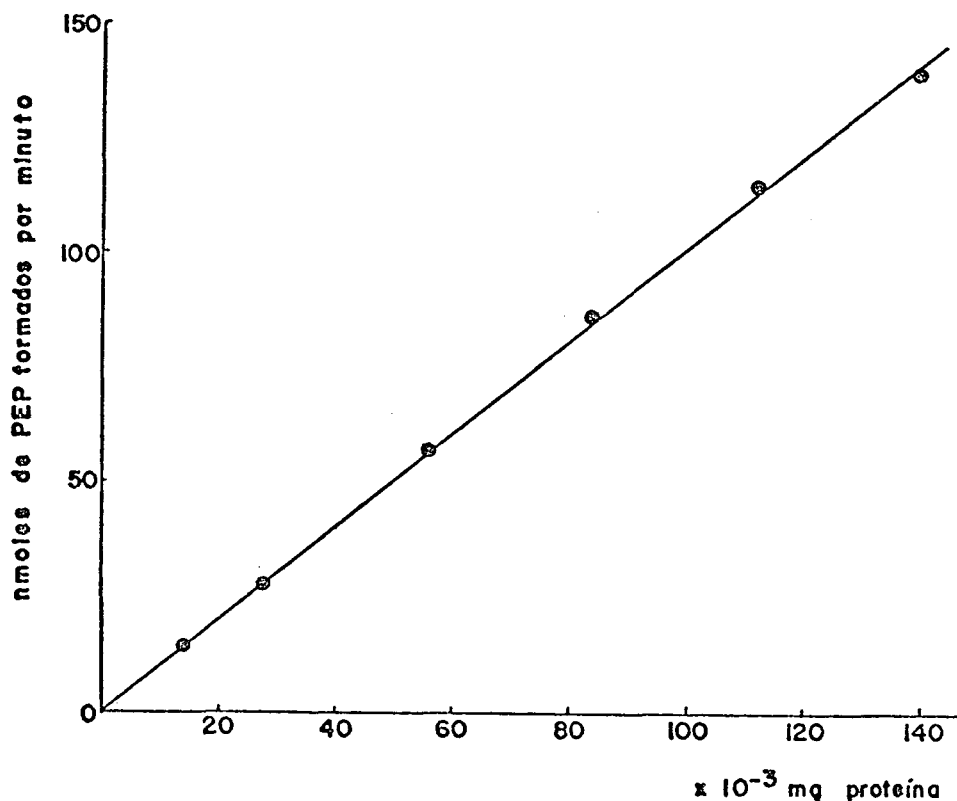


Sistema de incubação: 14 micromoles de tampão imidazol pH 8,0; enolase 0,2 U; 1 micromol de MgCl₂; 5 micromoles de ácido 3-fosfoglicérico e extrato livre de células nas concentrações indicadas. Volume final = 1 ml. • com ácido 2,3-difosfoglicérico; • sem ácido 2,3-difosfoglicérico.

Enolase

A enolase, enzima que catalisa a etapa da conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, também foi detectada no extrato livre de células de P.cinnabarinus, e os resultados encontram-se na figura 9.

Figura 9

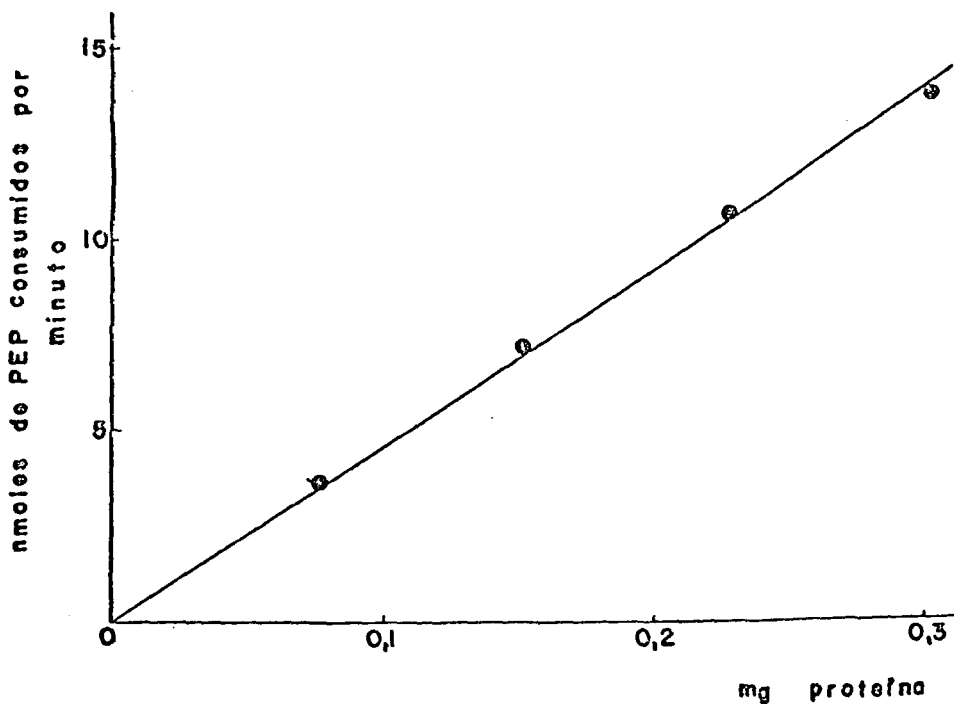


Sistema de incubação: 50 micromoles de tampão TRIS -Acetato pH 7,4; 0,01 micromol de EDTA; 2 micromoles de Acetato de Magnésio; 2 micromoles de ácido d(+) 2-fosfoglicérico e extrato bruto nas concentrações indicadas, num volume final de 1 ml.

Piruvato quinase

A transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para ADP, produzindo piruvato livre, pelo extrato livre de células de P. cinnabarinus está demonstrada na figura 10.

Figura 10

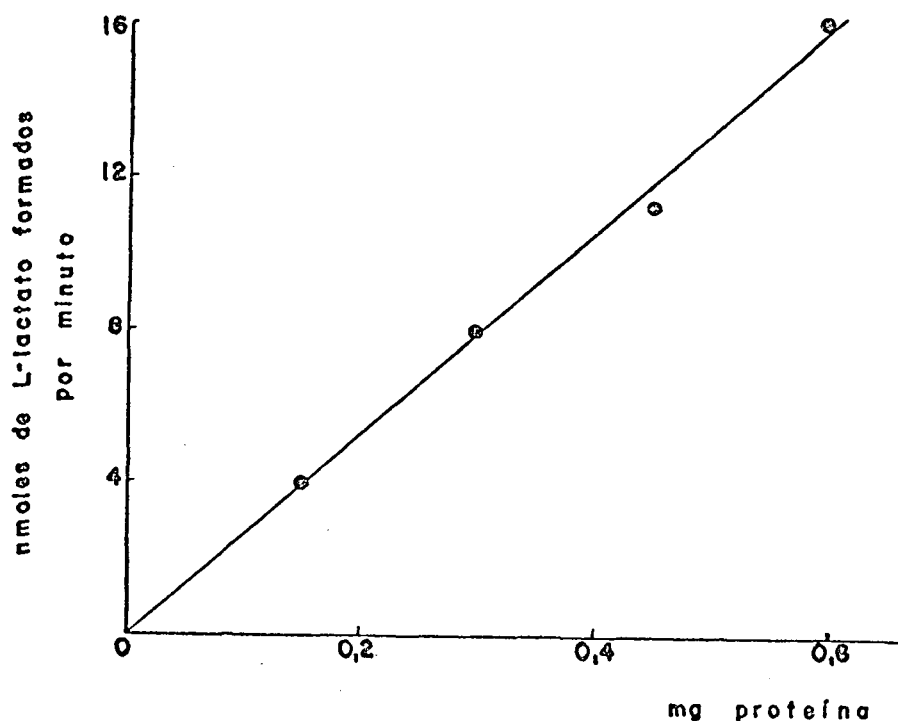


Sistema de incubação: 20 micromoles de tampão ETA pH 7,5; 67,5 micromoles de KCl; 7,2 micromoles de $MgSO_4$; 0,4 micromol de ADP; 0,1 micromol de NADH; 1,35 micromoles de PEP; 24,45 U de desidrogenase lática e extrato bruto nas concentrações indicadas, num volume final de 1 ml.

Lactato desidrogenase

A figura 11 mostra a existência da lactato desidrogenase no extrato livre de células. Com a determinação desta enzima, a última da sequência glicolítica sob condições anaeróbicas, fica demonstrada a presença de todas as enzimas que constituem a via EMP no extrato livre de células de P. cinnabarinus.

Figura 11



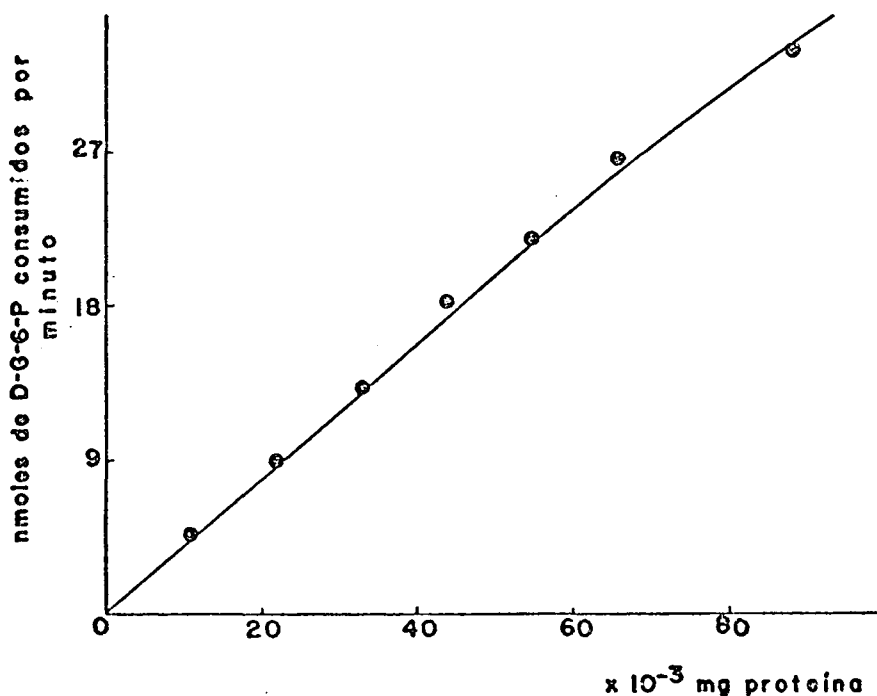
Sistema de incubação: 125 micromoles de tampão fosfato pH 7,0; 0,5 micromol de piruvato; 0,15 micromol de NADH e extrato bruto em concentrações variáveis, num volume final de 1 ml.

II) DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS QUE CONSTITUEM A VIA HEXOSE MONO-FOSFATO.

Glucose-6-fosfato desidrogenase

A figura 12 mostra a redução do NADP^+ pelo extrato durante a oxidação da glucose-6-fosfato. Observou-se que este intermediário da via HMP foi rapidamente oxidado, indicando a presença de glucose-6-fosfato desidrogenase.

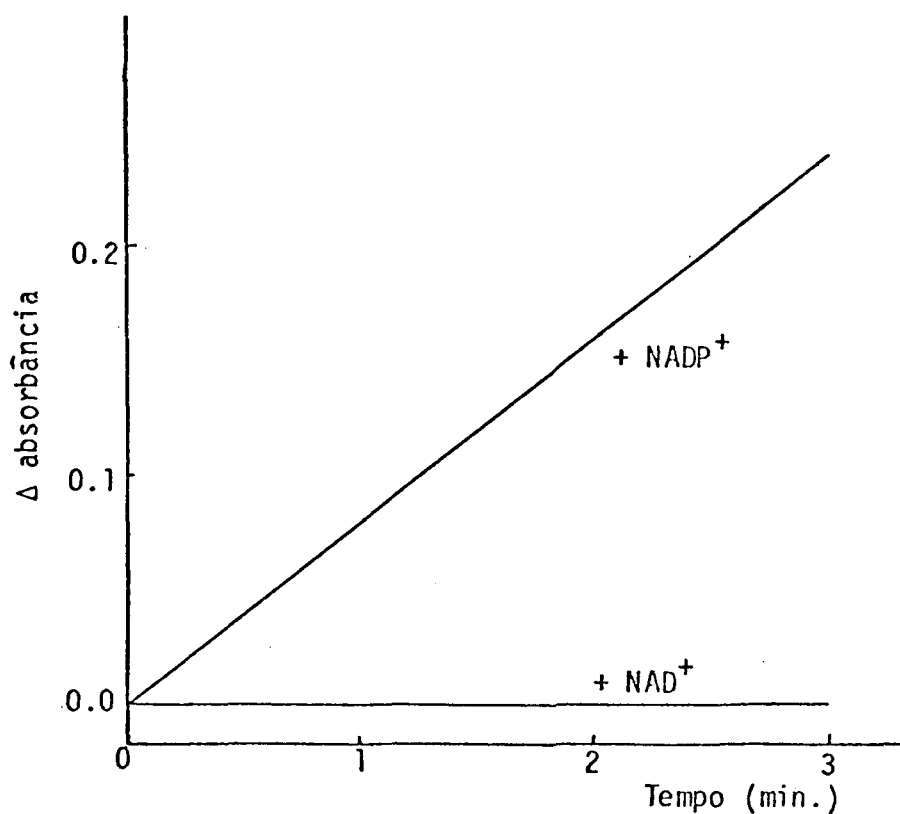
Figura 12



Sistema de incubação: 80 micromoles de tampão glicilglicina pH 8,0; 1 micromol de glucose-6-fosfato; 0,3 micromol de NADP^+ ; 10 micromoles de MgSO_4 e extrato bruto nas concentrações indicadas, num volume final de 1 ml.

A glucose-6-fosfato desidrogenase parece ser estritamente NADP^+ -dependente. Os testes realizados utilizando-se NAD^+ , demonstraram que a glucose-6-fosfato não é oxidada por esta piridina nucleotídeo, como pode ser observado na fig.13.

Figura 13

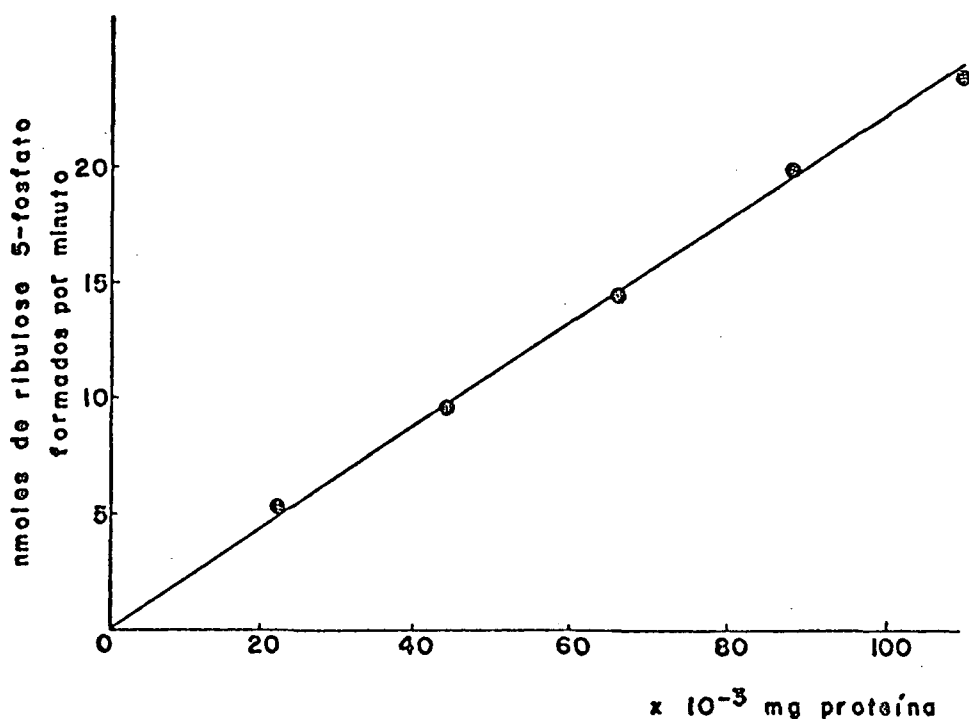


Sistema de incubação: 80 micromoles de tampão glicilglicina pH 8,0; 1 micromol de glucose-6-fosfato; 0,3 micromol de NADP^+ (ou NAD^+); 10 micromoles de MgSO_4 e extrato livre de células (0,032 mg de proteína), num volume final de 1 ml.

6-fosfogluconato desidrogenase

O 6-fosfogluconato também foi rapidamente oxidado durante a redução do NADP^+ pelo extrato, indicando a presença de 6-fosfogluconato desidrogenase bastante ativa em extrato livre de células de *P.cinnabarinus*.

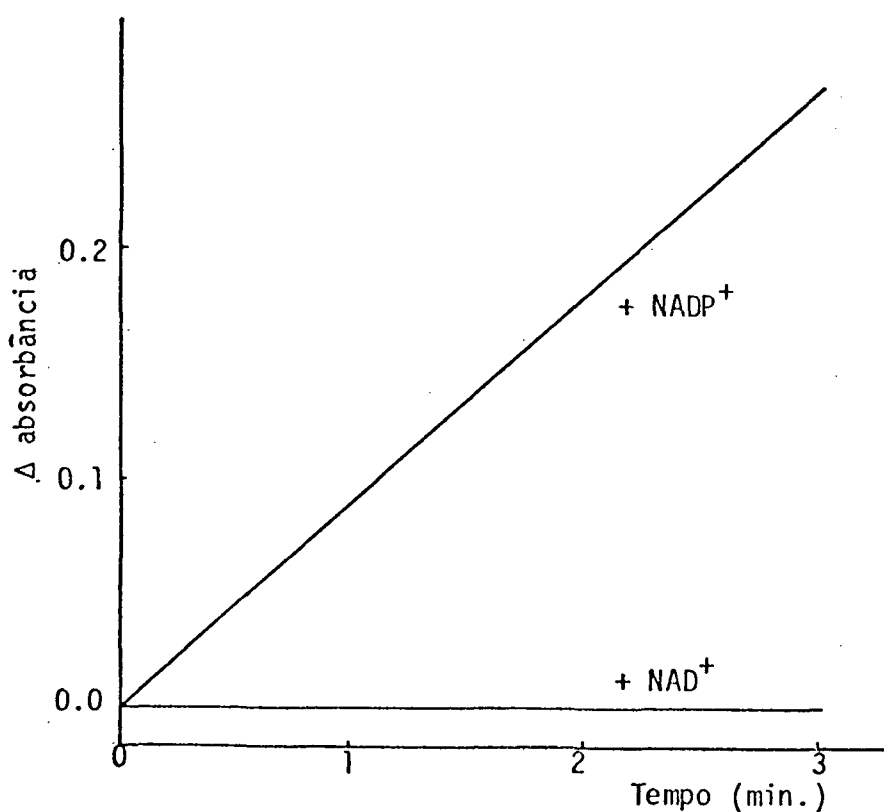
Figura 14



Sistema de incubação: 60 micromoles de tampão glicilicina pH 8,0; 10 micromoles de MgSO_4 ; 1,5 micromoles de 6-fosfogluconato; 0,3 micromol de NADP^+ e extrato bruto nas concentrações indicadas, num volume final de 1 ml.

A 6-fosfogluconato desidrogenase parece, também, ser estritamente NADP^+ -dependente. Os testes realizados utilizando-se NAD^+ , demonstram que o 6-fosfogluconato não é oxidado pelo extrato livre de células, como pode ser observado na figura 15.

Figura 15

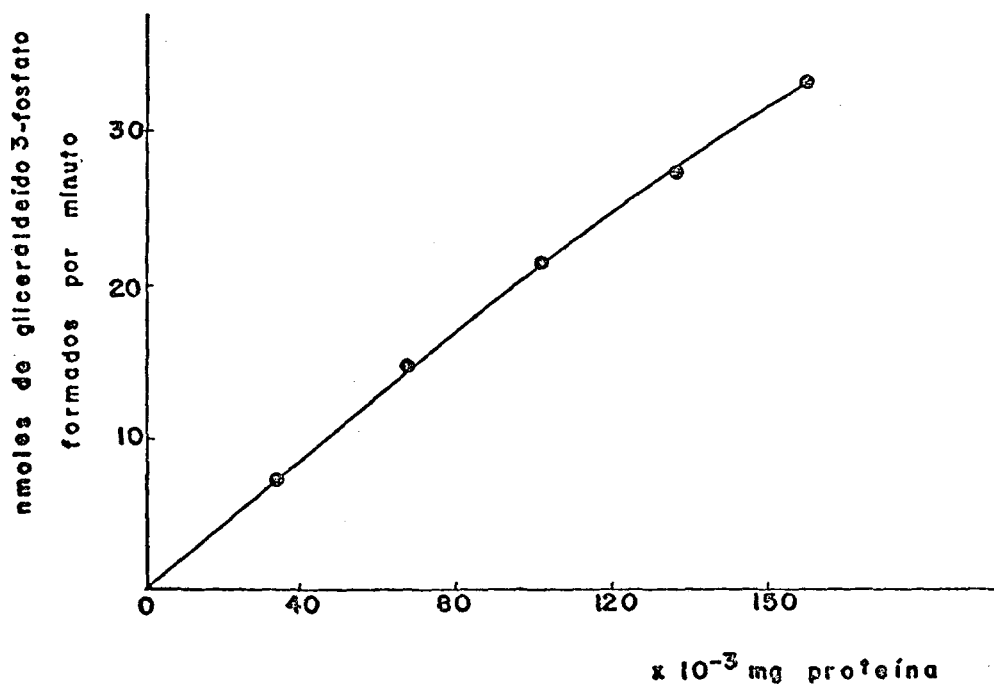


Sistema de incubação: 60 micromoles de tampão glicilglicina pH 8,0; 10 micromoles de MgSO_4 ; 1,5 micromoles de 6-fosfogluconato; 0,3 micromol de NAD^+ (ou NADP^+) e extrato livre de células (0,065 mg de proteína), num volume final de 1 ml.

Transcetolase

A figura 16 representa uma curva de concentração de enzima demonstrando a presença de transcetolase no extrato livre de células de P.cinnabarinus.

Figura 16

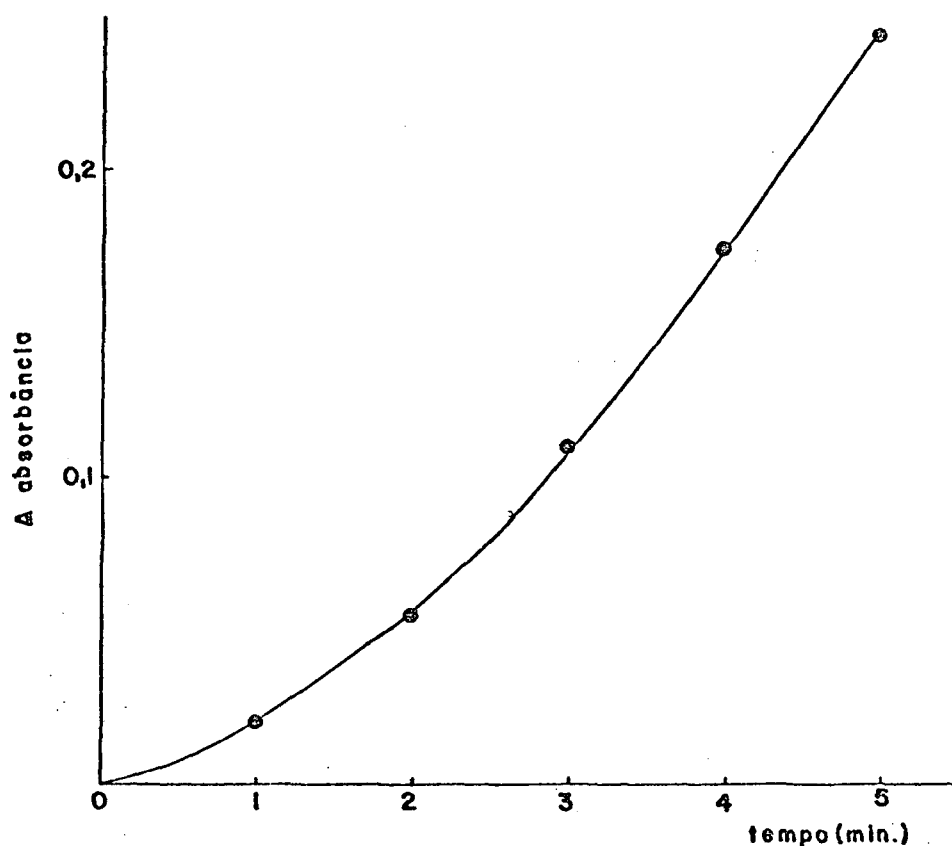


Sistema de incubação: 14 micromoles de tampão imidazol pH 8,0; 5 micromoles de ribose-5-fosfato; 3 micromoles de MgCl₂; 0,15 micromol de NADH; 0,115 micromol de TPP; triose fosfato isomerase 9,57 U; alfa-glicerolfosfato desidrogenase 10 U; mistura de ribose-5-fosfato isomerase e ribulose-5-fosfato epimerase 0,002 mg e extrato livre de células nas concentrações indicadas, num volume final de 1 ml. TPP = tiamina pirofosfato.

Ribose-5-fosfato isomerase e Ribulose-5-fosfato epimerase

A figura 17 demonstra a presença de ribose-5-fosfato isomerase e ribulose-5-fosfato epimerase no extrato livre de células de P.cinnabarinus, embora suas atividades específicas não tenham sido determinadas.

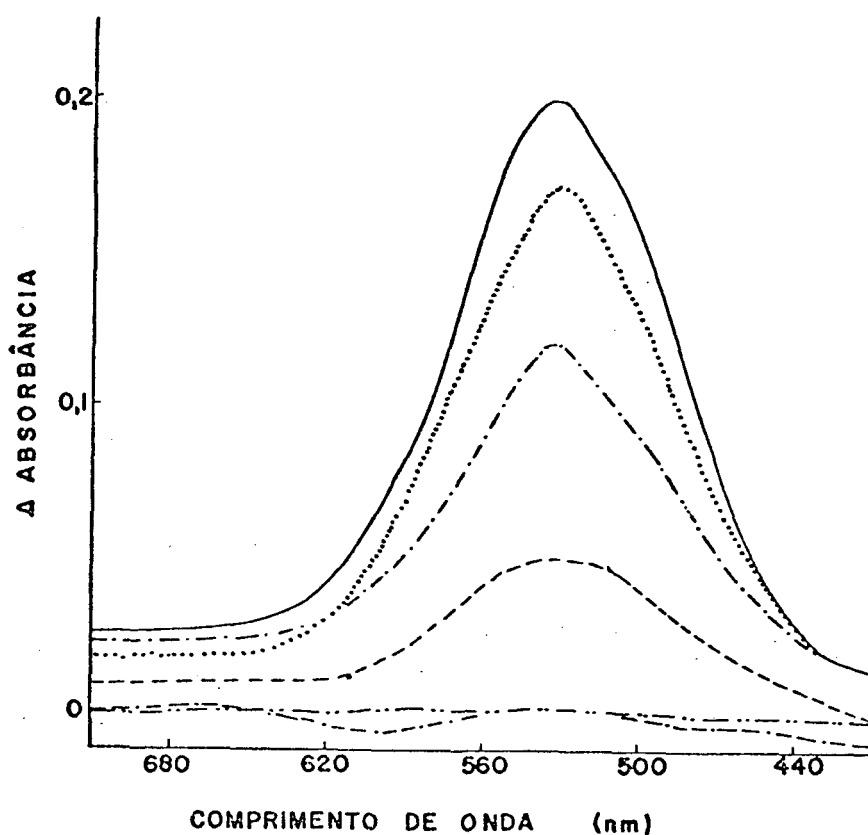
Figura 17



Evidenciação da atividade pentose isomerase e pentulose epimerase no extrato livre de células de P.cinnabarinus (0,135 mg de proteína). Sistema de incubação igual ao utilizado na determinação da transcetolase, exceto pela ausência da mistura de ribose-5-fosfato isomerase e ribulose-5-fosfato epimerase.

Da mesma forma, a figura 18 demonstra a presença de ribose-5-fosfato isomerase e ribulose-5-fosfato epimerase. A caracterização dos produtos das reações catalisadas por estas enzimas foi realizada traçando-se o espectro de uma alíquota da mistura de reação (0,05 ml), preparada como descrito em Materiais e Métodos. O pico de absorção a 540 nm é característico de pentulose-5-fosfato.

Figura 18

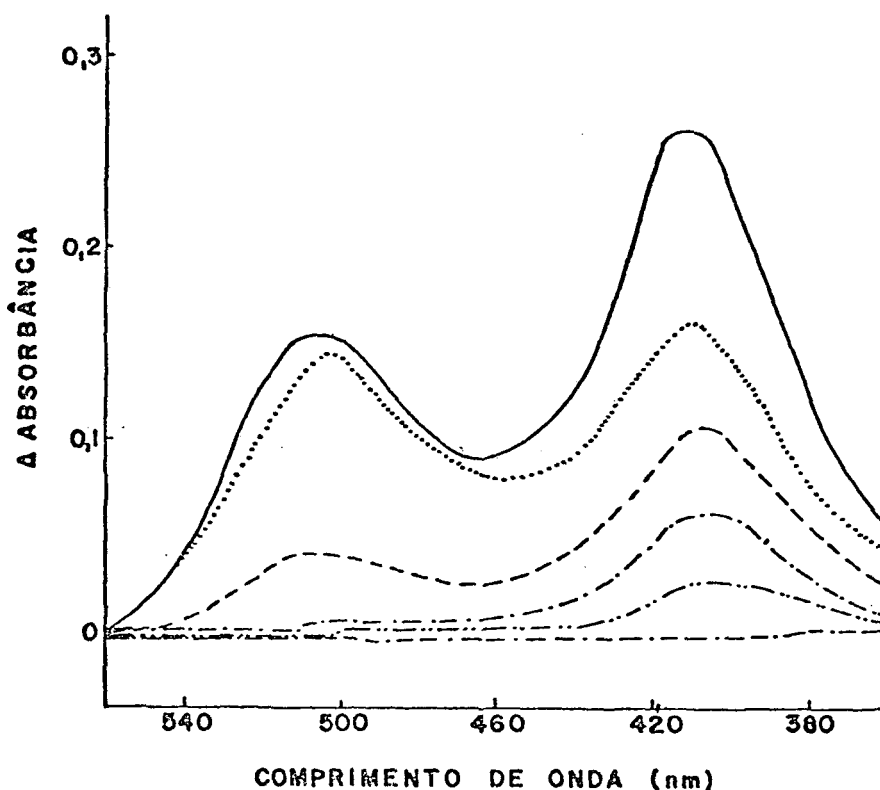


Caracterização do produto da reação da pentose isomerase (pentulose epimerase). Sistema de incubação: 100 micromoles de D-ribose-5-fosfato; 300 micromoles de tampão TRIS/HCl pH 7,6; 80 micromoles de $MgCl_2$ e extrato livre de células (18 mg de proteína), num volume final de 1 ml. --- Controle; -.-.- tempo zero; ---- 5 min.; -.-.- 15 min.; 30 min.; _____ 60 min.

Transaldolase

A caracterização do produto da reação catalisada pela transaldolase foi realizada traçando-se o espectro de uma alíquota da mistura de reação (0,05 ml), preparada como descrito em Materiais e Métodos. O pico de absorção a 505 nm é característico de Sedoheptulose-7-fosfato e a 415 nm é característico de hexoses-fosfato.

Figura 19



Caracterização do produto da reação da transaldolase. Sistema de incubação: 100 micromoles de D-ribose-5-fosfato; 300 micromoles de tampão TRIS/HCl pH 7,6; 80 micromoles de $MgCl_2$ e extrato livre de células (18 mg de proteína), num volume final de 15 ml. --- Branco; Controle; -.-.- tempo zero; -.-.-.- 5 min.; 30 min.; _____ 60 min.

A tabela I sumariza as atividades específicas das enzimas das vias Embden-Meyerhof-Parnas e Hexose-Monofosfato em P. cinnabarinus. As enzimas que constituem a via ED não foram detectadas neste microrganismo, nas condições do presente trabalho.

TABELA I

Atividades Enzimáticas em P. cinnabarinus

ENZIMA	ATIV. ESP.	ENZIMA	ATIV. ESP.
Via EMP		Via HMP	
Glucoquinase	500	Glucose-6-P desidrogenase	405
Fosfoglucoisomerase	740	6-fosfogluconato desidrog.	220
Fosfofrutoquinase	104	Transaldolase	ND
F-1,6-diP aldolase	40	Transcetolase	210
Triose-P isomerase	1800		
Glic.-3-P desidrogenase	370	Via ED	
3-fosfoglicerato quinase	778	KDPG aldolase	0
Enolase	1055		
Piruvato quinase	50		
Lactato desidrogenase	26		
Fosfogliceromutase	110		

§ Todas as atividades estão expressas como micromoles por minuto por miligrama de proteína x 10⁻³
 ND Não foi determinada a atividade específica
 KDPG 2-ceto-3-deoxi-6-fosfo gluconato.

III) DADOS OBTIDOS EM ESTUDOS METABÓLICOS, POR RADIORESPIROMETRIA.

Com a finalidade de constatar a operância das vias de utilização da glucose no fungo, foram realizados estudos radiorespirométricos utilizando aquela hexose marcada nos diferentes carbonos, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados obtidos estão demonstrados na tabela II.

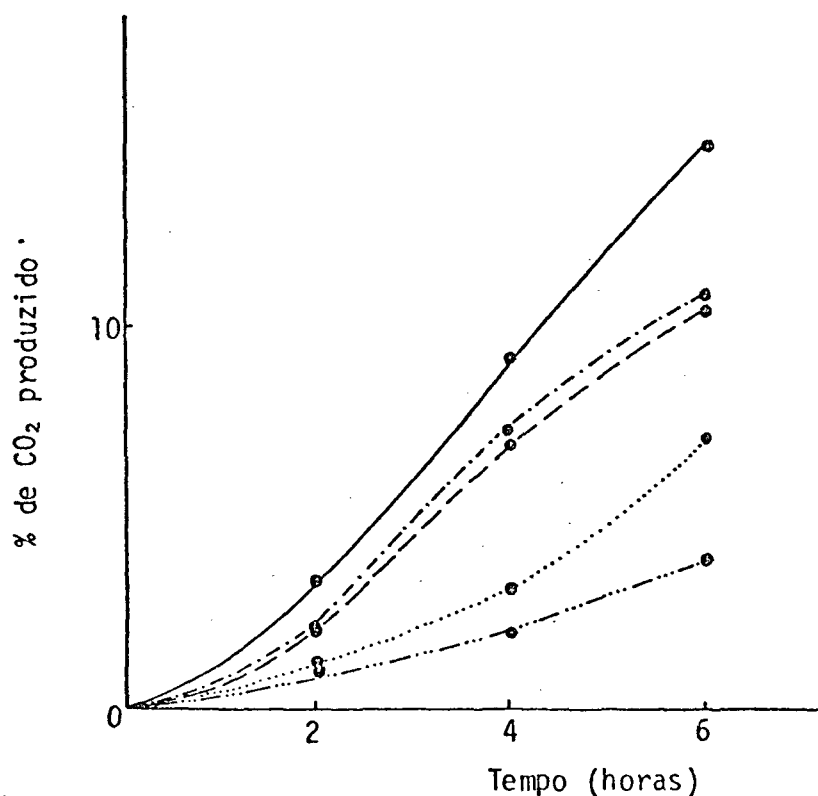
TABELA II

Utilização de glucose- ^{14}C por células de P. cinnabarinus em crescimento

SUBSTRATO	Radioatividade (cpm)			
	Tempo (horas)			
	0	2	4	6
Liberação de CO_2 radiativo dos átomos de C da glucose metabolizada.				
Glucose-1- ^{14}C	398	3233	10 152	15 065
Glucose-6- ^{14}C	504	1744	3 658	7 156
Glucose-3- ^{14}C	796	2644	7 192	10 481
Glucose-3,4- ^{14}C	997	4391	10 329	16 040
Radioatividade incorporada à célula.				
Glucose-1- ^{14}C	61	3921	12 254	21 462
Glucose-6- ^{14}C	57	4344	12 354	23 873
Glucose-3- ^{14}C	55	2319	7 088	11 621
Glucose-3,4- ^{14}C	49	2855	9 702	15 441

A figura 20 constitui uma representação gráfica dos dados apresentados na tabela II transformados em termos de porcentagem para melhor visualização dos resultados e análise dos mesmos.

Figura 20



Sistema de incubação: 2,75 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2; 50 mg de células (peso umido) e 0,25 ml de glicose (133 micromoles/ml) especificamente marcada em diferentes átomos de Carbono. A fração de $^{14}\text{CO}_2$ formado a partir de glicose- ^{14}C foi calculada através da diferença entre a fração produzida a partir de glicose- ^{14}C e glicose- ^{14}C . ——— C_{3,4}; - - - - - C₁; - - - - - C₃; C₆; - - - - - C₄

Os cálculos apresentados neste trabalho para a determinação da contribuição relativa das vias são baseados numa "unidade relativa de tempo" de 6 horas. Esta "unidade relativa de tempo" (WANG, 1958) é o tempo requerido para o microrganismo consumir uma quantidade apreciável do substrato marcado, originalmente adicionado ao meio. Ele marca o final da fase de assimilação e o começo da fase de depleção, e é indicado por um rápido decréscimo na produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glucose marcada.

TABELA III

Participação relativa das vias de degradação da glucose em P. cinnabarinus, seg. WANG (1959)

	Símbolo	Radioatividade(cpm)
Total de glucose administrada ($G_1 + G_6$)	G_T	$24,3 \times 10^4$
Total de glucose incorporada à célula	G_T'	$4,5 \times 10^4$
Liberação de CO_2 radioativo dos átomos de C da glucose metabolizada.		
Glucose-1- ^{14}C	G_1	$1,5 \times 10^4$
Glucose-6- ^{14}C	G_6	$0,7 \times 10^4$
Glucose-3- ^{14}C	G_3	$1,0 \times 10^4$
Glucose-3,4- ^{14}C	$G_{3,4}$	$1,6 \times 10^4$
Via	Símbolo	% Participação
Utilização da glucose		
Via EMP-TCA	G_{EMP}	96
Via IEMP	G_{HMP}	4,8

Os dados apresentados correspondem à incubação de 10 horas em que a concentração de glicose na célula atinge o equilíbrio.

TABELA IV

Participação relativa das vias de degradação da glicose em P.cinnabarinus, seg. KATZ (1963)

SUBSTRATO	Radioatividade (cpm)		
	CO ₂	Célula	Glucose consumida
Glucose-1- ¹⁴ C	18 800	27 060	85 653
Glucose-6- ¹⁴ C	17 670	21 480	84 160
Glucose-3,4- ¹⁴ C	10 229	34 997	99 021
Via	Símbolo	% Participação	
Utilização da glicose			
Via EMP-TCA	GEMP	95,3	
Via HMP	GHMP	4,7	

A determinação das atividades de uma sequência de enzimas de uma via metabólica em extratos brutos (não fracionados) apresenta consideráveis dificuldades, desde que os produtos de uma reação são substratos para a subsequente.

Uma das principais dificuldades para a demonstração individual das enzimas relacionadas com a degradação da glucose em Picnoporus cinnabarinus é a existência de uma nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) oxidase suficientemente ativa para interferir com os procedimentos mais eficientes no ensaio das enzimas glicolíticas, que seguem a oxidação ou redução de piridina nucleotídeo espectrofotometricamente. Das tentativas realizadas para excluir essa atividade oxidásica, obtivemos resultados positivos quando utilizamos centrifugação dos extratos a 113 000 x g durante 2 horas. Este tratamento elimina toda atividade de NADH oxidase demonstrando que esta se localiza em um sistema particulado.

Com as reações não oxidativas do ciclo das pentoses (via Hexose Monofosfato), a determinação das atividades enzimáticas é particularmente difícil, já que as reações são rapidamente reversíveis. Então, a existência das enzimas desta via em extrato bruto de fungos é geralmente evidenciada através da detecção dos produtos intermediários (SIH, 1957; McDONALD, 1960). Consequentemente, os métodos utilizados para o

ensaio de preparações enzimáticas altamente purificadas não são todos igualmente adequados para preparações de extrato bruto.

Considerando todos os fatores que poderiam levar-nos a falsos resultados, escolhemos métodos que eliminam as possíveis interferências e determinamos a atividade enzimática das enzimas citadas, demonstrando que este microrganismo possui aparentemente todas as enzimas necessárias para que as vias Hexose Monofosfato e Embden-Meyerhof-Parnas sejam perantes.

Como a atividade de uma determinada enzima depende de fatores que a condicionam, alguns métodos utilizados neste trabalho foram modificados dos originais citados no que concerne às exigências ótimas para a sua determinação em extratos livre de células.

Na determinação da atividade fosfoglucoisomerase pelo método de ROE (1934), foi verificado em experimentos preliminares que a atividade enzimática não era proporcional à concentração de proteína. Aumentando a concentração de substrato e diluindo o extrato livre de células de maneira que a deteção do produto estivesse dentro da sensibilidade do método, obtivemos uma faixa de proporcionalidade, como pode ser observado na figura 2. Este fato sugere que a enzima do fungo é mais ativa que a enzima do tecido muscular, utilizado por ROE.

Para demonstrar a redução do NAD^+ durante a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato pelo extrato de *P.cinnabari* nus, foram realizados testes que diferiram apenas no substrato

empregado.

No primeiro ensaio, utilizamos D-gliceraldeído-3-fosfato, como uma mistura equimolecular de ésteres triose fosfato, preparada fazendo-se uma solução de D-gliceraldeído-3-fosfato $1,5 \times 10^{-2}$ M e dihidroxiacetona fosfato $1,5 \times 10^{-2}$ M.

No segundo ensaio, utilizamos frutose-1,6-difosfato e acoplamos aldolase em excesso, para formação do substrato real (D-gliceraldeído-3-fosfato) e triose isomerase para deslocar o equilíbrio no sentido do mesmo impedindo que a formação do substrato constituísse etapa limitante.

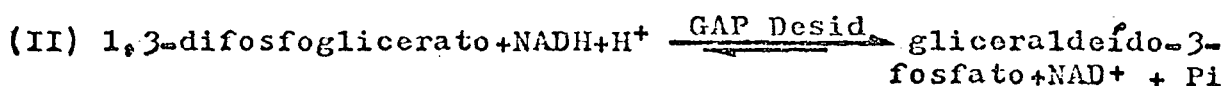
Em ambos os ensaios, pelo menos três reações interferem na determinação da atividade gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase: o sistema NADH oxidase, a oxidação do NADH pela glicerolfosfato desidrogenase durante a redução da triose fosfato e o equilíbrio da reação aldolase.

O sobrenadante de 113 000 x g não continha atividade detectável de NADH oxidase. Na presença de arseniato, a oxidação da triose fosfato leva à formação de 1-arseno-3-fosfoglicerato que se hidrolisa espontaneamente para 3-fosfoglicerato. Então, a oxidação torna-se irreversível dirigindo a reação aldolase em favor da clivagem de maneira efetiva.

O segundo ensaio revelou ser o mais adequado para a determinação da atividade gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em extrato bruto.

O sistema de reação utilizado para a determinação

da atividade fosfoglicerato quinase sofreu algumas modificações em relação ao sistema original, observando informações relatadas por BERGMEYER (1965). Nesta determinação, minimizamos a interferência de enzimas como a triose fosfato isomerase (atividade elevada no extrato bruto, como pode ser observado na tabela I) e alfa-glicerolfosfato desidrogenase, utilizando ácido D-3-fosfoglicérico. A medida da reação no sentido da formação do ácido D-3-fosfoglicérico tem a desvantagem do equilíbrio da reação acopladora estar deslocado no sentido da formação do aldeído 3-fosfoglicérico, como pode ser verificado pelas equações abaixo:



A reação (I) ocorre com uma velocidade 8,8 vezes menor da esquerda para a direita do que da direita para a esquerda. O equilíbrio da reação (II) está 65 % dirigido para a direita, de maneira que o 1,3-difosfoglicerato formado na reação (I) é depois transformado numa velocidade suficientemente rápida, especialmente quando a fosfoglicerato quinase está saturada com 3-fosfoglicerato (BÜCHER, 1947). A reação utilizada tem a vantagem de sofrer pouca ou nenhuma interferência de outras enzimas, pois a proporção de interconversão do éster fos-

PGK = fosfoglicerato quinase; GAP Desid = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

fato primário (D-3-fosfoglicerato) em éster fosfato secundário (D-2-fosfoglicerato) é relativamente baixa, como pode ser observado examinando-se a atividade fosfoglicero mutase (figura 8 e tabela I), comparada à atividade triose fosfato isomerase, além do fato do ácido 3-fosfoglicérico estar em concentração saturante.

A isomerização de fosfogliceratos pela fosfoglicero mutase requer, normalmente, dois cofatores: Mg^{++} e 2,3-difosfoglicerato (SUTHERLAND, 1949; SUTHERLAND, 1949a). No caso da enzima de P. cinnabarinus não houve alteração da atividade mutase, quando o 2,3-difosfoglicerato foi adicionado ao sistema, como pode ser observado pela superposição de curvas apresentadas na figura 8. Haveria possibilidade, entretanto, de que a quantidade endógena existente no extrato bruto estivesse mascarando esta observação. O extrato bruto foi submetido à diálise exaustiva na tentativa de eliminar o ácido 2,3-difosfoglicérico endógeno, mas todas as tentativas realizadas revelaram-se infrutíferas. Portanto, poder-se-ia supor que a enzima não necessita de cofator, ou que este se encontra fortemente ligado à mesma.

A medida da atividade transcetolase depende da formação de gliceraldeído-3-fosfato a partir de xilulose-5-fosfato na presença de um acceptor aldeído. A formação de gliceraldeído-3-fosfato é medida, ou com triose fosfato isomerase e alfa-glicerolfosfato desidrogenase, ou na presença de gliceralde

ido-3-fosfato desidrogenase. O ensaio com alfa-glicerolfosfato desidrogenase é particularmente adequado para medidas de transcetolase em extrato bruto. Tem a vantagem de que o produto da reação é removido tão logo é formado e assim não sofre reações colaterais, embora tenha a desvantagem de ser um ensaio indireto. A figura 16 representa uma curva de concentração de enzima demonstrando a presença de transcetolase no extrato livre de células de P. cinnabarinus.

Na determinação da atividade transcetolase, a xilulose-5-fosfato foi fornecida acoplando-se uma mistura de ribose-5-fosfato isomerase e ribulose-5-fosfato epimerase purificadas (NOVELLO & McLEAN, 1968) ao sistema de incubação, e utilizando-se ribose-5-fosfato como substrato. Na figura 17, podemos observar que houve uma oxidação apreciável da difosfopiridina nucleotídeo reduzido mesmo na ausência da mistura de enzimas. Esta ocorrência sugere a presença de ribose-5-fosfato isomerase e ribulose-5-fosfato epimerase no extrato livre de células. Entretanto, como já foi salientado, a determinação da atividade específica das mesmas é particularmente difícil, em se tratando de extrato bruto, que contém, aparentemente, todas as enzimas da via e os cofatores essenciais à atividade das mesmas em concentrações apreciáveis. A presença desses cofatores no extrato foi evidenciada quando determinamos a atividade fosfofrutoquinase. As experiências demonstraram que o extrato contém uma quantidade endógena de ATP, evidenciada por uma razão

vel oxidação do NADH mesmo na ausência daquele adênina nucleotídeo. A concentração deste nucleotídeo dificulta sobremaneira a determinação da atividade específica da transaldolase, porque nos ensaios realizados, à atividade transaldolase temos sempre somada a atividade fosfofrutoquinase, uma vez que as tentativas em se eliminar tal endógeno revelaram-se infrutíferas.

A impossibilidade de se determinar a atividade específica dessas enzimas levou-nos a evidenciar a sua existência no extrato livre de células através da caracterização de seus produtos de reação pelo espectro de absorção apresentado por estes compostos em reações características. Assim, as figuras 18 e 19 demonstram a presença de ribose-5-fosfato isomerase, ribulose-5-fosfato epimerase e transaldolase no extrato livre de células de P. cinnabarinus.

Experiências preliminares demonstraram que existe uma quantidade endógena de glucose no extrato livre de células, que limitava a observação da formação de hexoses-fosfato no sistema utilizado. Após a passagem do extrato pela coluna de Sephadex G-15, a concentração de glucose endógena foi reduzida a um mínimo que pode ser observada no traçado controle da figura 19, o que nos permite uma evidenciação precisa de hexoses formadas. Entretanto, as experiências realizadas não nos permitem quantificar a formação dos intermediários, uma vez que tanto a glucose-6-fosfato como a frutose-6-fosfato apresentam o mesmo espectro na reação Cistofina/H₂SO₄, o mesmo ocorrendo com ribulo-

se-5-fosfato e xilulose-5-fosfato na reação Cisteína/carbazol. A utilização de padrões não nos fornece dados conclusivos, uma vez que há interferência das hexoses fosfato na determinação de pentuloses fosfato e vice-versa.

O pico de absorção a 540 nm na reação Cisteína/carbazol é característico de pentulose-5-fosfato. Na reação Cisteína/H₂SO₄, o pico de absorção a 505 nm é característico de Sedoheptulose-7-fosfato e a 415 nm é característico de hexoses fosfato. O aumento de absorção nos referidos comprimentos de onda em função do tempo indica a formação dos referidos intermediários. Estes dados foram confirmados através da reação com Orcinol, que nos revelou um decréscimo na concentração de ribose-5-fosfato à medida que aumentamos o tempo de incubação, indicando que o substrato foi consumido na proporção da formação de intermediários.

A formação de sedoheptulose, hexoses e pentuloses fosfato a partir de ribose-5-fosfato pelo extrato livre de células indicam a existência das enzimas de interconversão do ciclo das pentoses, sugerindo que este microrganismo possui o ciclo das pentoses completo.

Além da atividade específica de enzimas existentes no extrato livre de células de P. cinnabarinus, consta da tabela IV, atividades de enzimas pertencentes à algumas bactérias e um fungo, escolhidos para análise comparativa de níveis enzimáticos e operância das diversas vias.

TABELA IV

Tabela comparativa das atividades enzimáticas
em diferentes microrganismos

ENZIMA	§ ATIVIDADES ESPECÍFICAS				
	A	B	C	D	E
Glucoquinase	500	4	84	59	79
Fosfoglucoisomerase	740	180	81	214	3
Fosfofrutoquinase	104	30	1	725	6
F-1,6-diP aldolase	40	30	1	39400	5500
Triose-P isomerase	1800	-	-	377	10
GAP desidrogenase	370	350	-	79	200
3-fosfoglicerato quinase	778	490	-	7260	650
Fosfogliceromutase	110	50	-	210	140
Enolase	1055	100	153	14160	12
Piruvato quinase	50	40	83	59	26
Lactato desidrogenase	26	40	1	85	5
Glucose-6-P desidrogenase	405	-	28	-	2203
6-PG desidrogenase	220	-	23	-	15
Transaldolase	ND	-	240	-	40
Transcetolase	210	-	106	-	27
KDPG aldolase	0	-	185	-	678

§ Todas as atividades estão expressas como micromoles por minuto por miligrama de proteína $\times 10^{-3}$.

A Picnoporus cinnabarinus

B Dictyostelium discoideum (CLELAND, 1968).

C Agrobacterium tumefaciens (ARTHUR et al., 1973).

D Clostridium perfringens (GROVES et al., 1969)

E Neisseria gonorrhoeae CS-7 (MORSE et al., 1974).

ND Não foi determinada a atividade específica.

Analisando, então, a tabela IV, podemos observar que em P.cinnabarinus, a glucose-6-fosfato desidrogenase e a 6-fosfogluconato desidrogenase, enzimas que catalisam as reações

GAP = gliceraldeído-3-fosfato; 6-PG = 6-fosfogluconato

NADP⁺-dependentes da via HMP, exibem uma atividade específica relativamente elevada em comparação àquelas apresentadas por Agrobacterium tumefaciens (ARTHUR et al., 1973). A atividade específica da transcetolase, enzima característica da via HMP, é comparável à da fosfofrutoquinase, enzima característica da via EMP. Em Agrobacterium tumefaciens, entretanto, em contraposição à elevada atividade transaldolase e transcetolase foi detectada baixa atividade fosfofrutoquinase. Nesta bactéria fitopatogênica, os trabalhos de ARTHUR et al. (1973) demonstraram que a mesma utiliza D-glucose por mecanismos estritamente aeróbicos envolvendo a via Entner-Doudoroff e a via Hexose Monofosfato, com uma participação relativa de 55 % e 44 %, respectivamente. 2-Ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolase e 6-fosfogluconato desidratase, enzimas críticas para que a via Entner-Doudoroff seja operante, não foram detectadas em P. cinnabarinus. As atividades específicas das enzimas relacionadas com a degradação da glucose através da via Embden-Meyerhof-Parnas, em extrato livre de células de P. cinnabarinus, são comparáveis àquelas descritas em Clostridium perfringens (GROVES et al., 1969). Nesta bactéria, entretanto, os trabalhos de GROVES et al. (1969) sugerem a ausência da via HMP, e nossas experiências evidenciaram a existência de todas as enzimas necessárias às vias HMP e EMP operantes em P. cinnabarinus.

Os níveis de atividade das enzimas glicolíticas que mais se assemelham ao do microorganismo estudado são apresenta-

dos por Dictyostelium discoideum durante os primeiros estágios de diferenciação. Neste fungo, entretanto, os trabalhos de CLELAND & COE (1968) não nos fornecem referências sobre a atividade das enzimas que constituem outras vias de degradação da glicose.

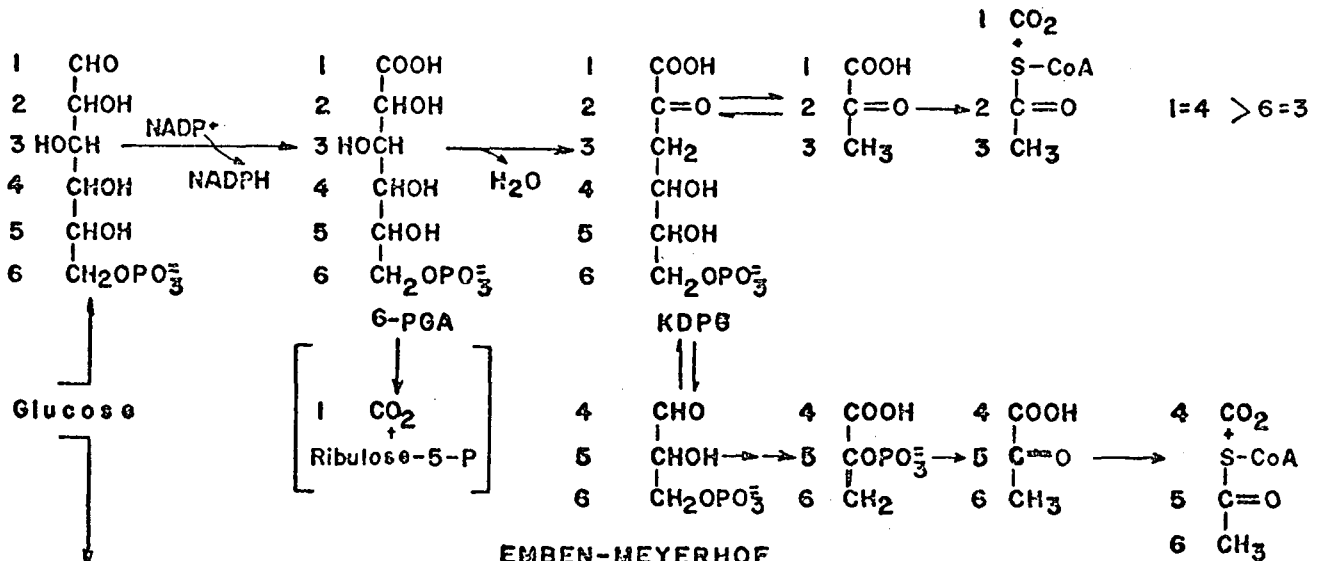
A existência de enzimas necessárias à atuação de uma via metabólica em extratos livre de células não constitui prova de que a mesma seja operante nos sistemas biológicos. Os trabalhos de MORSE et alii (1974), demonstraram que células de Neisseria gonorrhoeae em crescimento utilizam glicose por mecanismos estritamente aeróbicos envolvendo as vias ED e HMP. A via EMP parece não funcionar, embora todas as enzimas que a constituem tenham sido detectadas, como pode ser observado na tabela IV.

A figura 20 e a tabela II resumizam os resultados das experiências radiorespirométricas realizadas com a finalidade de constatar a operância das vias. Podemos observar que houve uma rápida produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose-3,4- ^{14}C . Da mesma maneira, evidenciou-se uma rápida produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose-1- ^{14}C , que ultrapassa bastante a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose-6- ^{14}C , indicando com isso que ocorre uma clivagem $\text{C}_1\text{-C}_5$, presumivelmente através da descarboxilação do fosfogluconato. Como a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose-1- ^{14}C foi também maior que a produção a partir de glicose-3- ^{14}C , poder-se-ia supor que a via Entner-Doudoroff estivesse

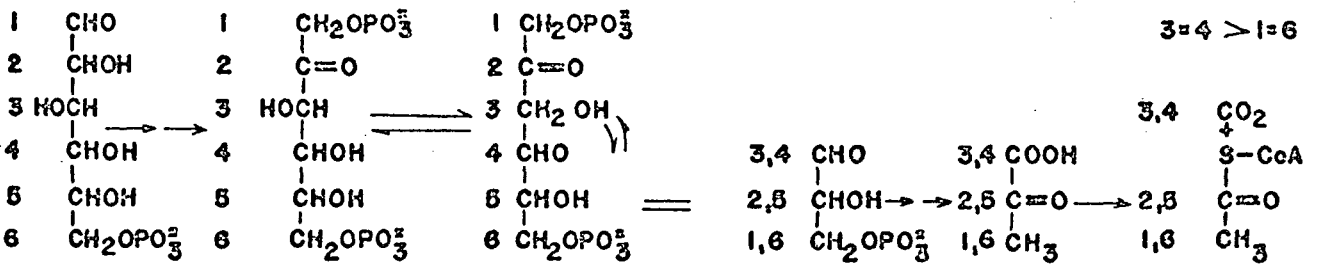
presente. Entretanto, esta situação também caracteriza a via HMP como se pode notar pelo esquema I e II, a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glucose- 4 - ^{14}C revelou ser menor do que a partir de glucose- 3 - ^{14}C e, além disso, não foi possível detectar as enzi \underline{m} as que constituem a via Entner-Doudoroff.

Esquema I

ENTNER-DOUDOROFF



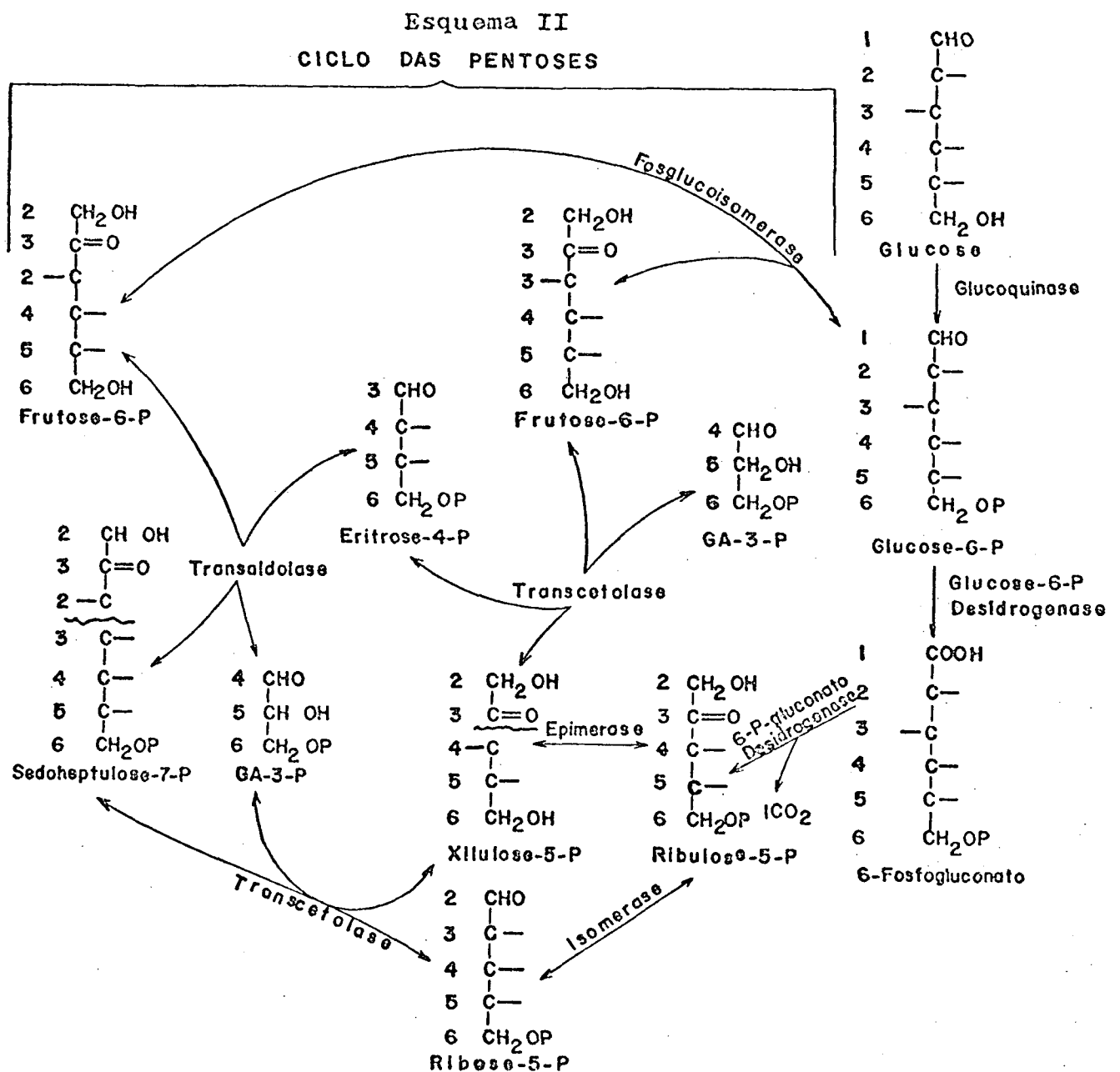
EMBEN-MEYERHOF



Destino dos átomos de Carbono da glucose em experiências radiorespirométricas. 6-PGA = 6-fosfogluconato; KDPG = 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato.

Observando o esquema I, se tivéssemos uma via EMP operando exclusivamente, dever-se-ia obter uma produção de $^{14}\text{CO}_2$

a partir de glicose-3-¹⁴C igual à de glicose-4-¹⁴C. Entretanto, os resultados obtidos não demonstraram esta igualdade. Esta de igualdade pode, talvez, ser explicada pelo fato de termos ambas as vias operantes no fungo em estudo.



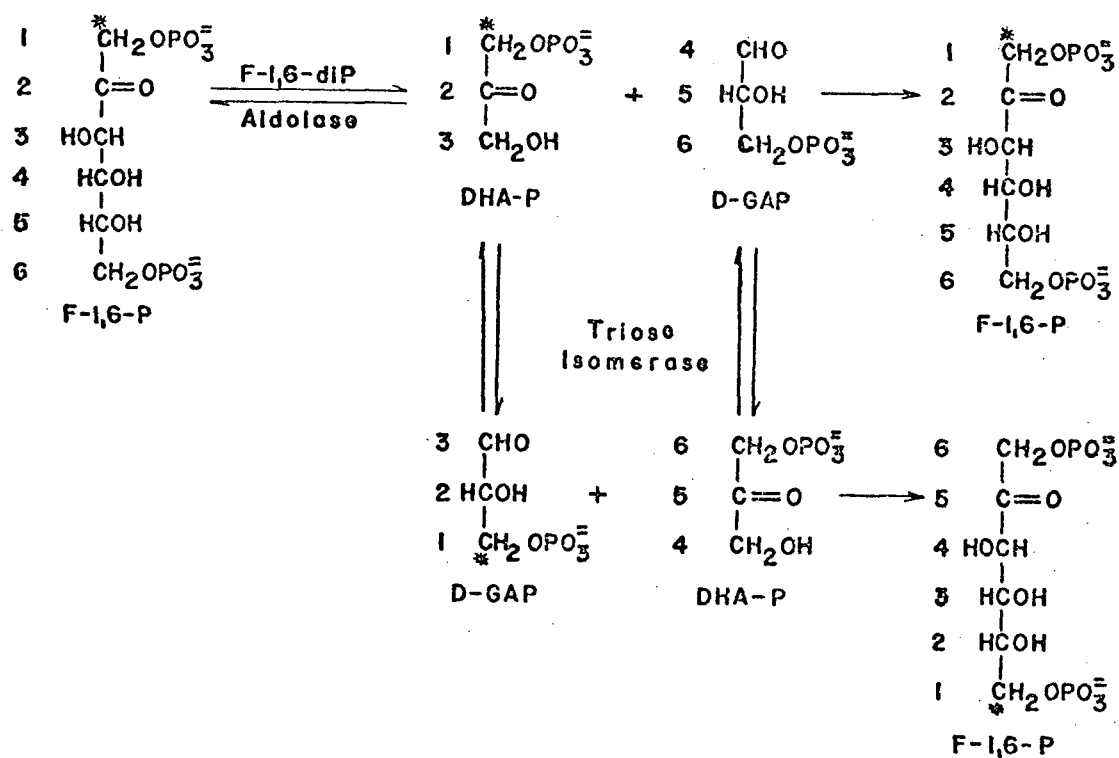
Destino dos átomos de Carbono da glicose em experiências radiorespirométricas.

A velocidade de produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glucose-3,4- ^{14}C foi notadamente maior do que a velocidade a partir de glucose-1- ^{14}C . Este fato sugere uma maior contribuição da via EMP, e os cálculos apresentados nas tabelas III e IV o confirmam, revelando que aproximadamente 95 % da glucose foi degradada através da via EMP e somente 5 % através da via HMP, nas condições fisiológicas em que as experiências foram realizadas.

Como se pode verificar pelo esquema de ambas as vias (esquema I e II), a glucose-1- ^{14}C e a glucose-6- ^{14}C produzem 1 mol de triose fosfato- ^{14}C quando são metabolizadas através da EMP, mas a via HMP produz triose fosfato- ^{14}C a partir de glucose-6- ^{14}C , mas não de glucose-1- ^{14}C . Entretanto, isto só pode ser tomado como um postulado se não considerarmos a reciclagem da hexose-monofosfato, isto é, a frutose-6-fosfato resintetizada na HMP não seria isomerizada a glucose-6-fosfato, mas seria fosforilada a frutose-1,6-difosfato, que seria posteriormente metabolizada pela EMP. Mas, as duas situações podem ocorrer dependendo das exigências da célula, uma vez que tanto a glucose-6-fosfato isomerase como a fosfofrutoquinase foram detectadas no extrato livre de células de P. cinnabarinus. Além disso, se considerarmos a possibilidade de que pode ocorrer uma síntese significativa de frutose-6-fosfato a partir de trioses fosfato formadas na metabolização de glucose-1- ^{14}C pela EMP, o ^{14}C se distribuiria na posição 6. Nestas circunstâncias

cias, o C-2 e o C-3 da glucose apareceria em posições 4 e 5, assim como nas posições 2 e 3. Isto é perfeitamente razoável, uma vez que o extrato livre de células de P. cinnabarinus apresenta uma considerável atividade frutose-1,6-difosfato aldolase.

Esquema III

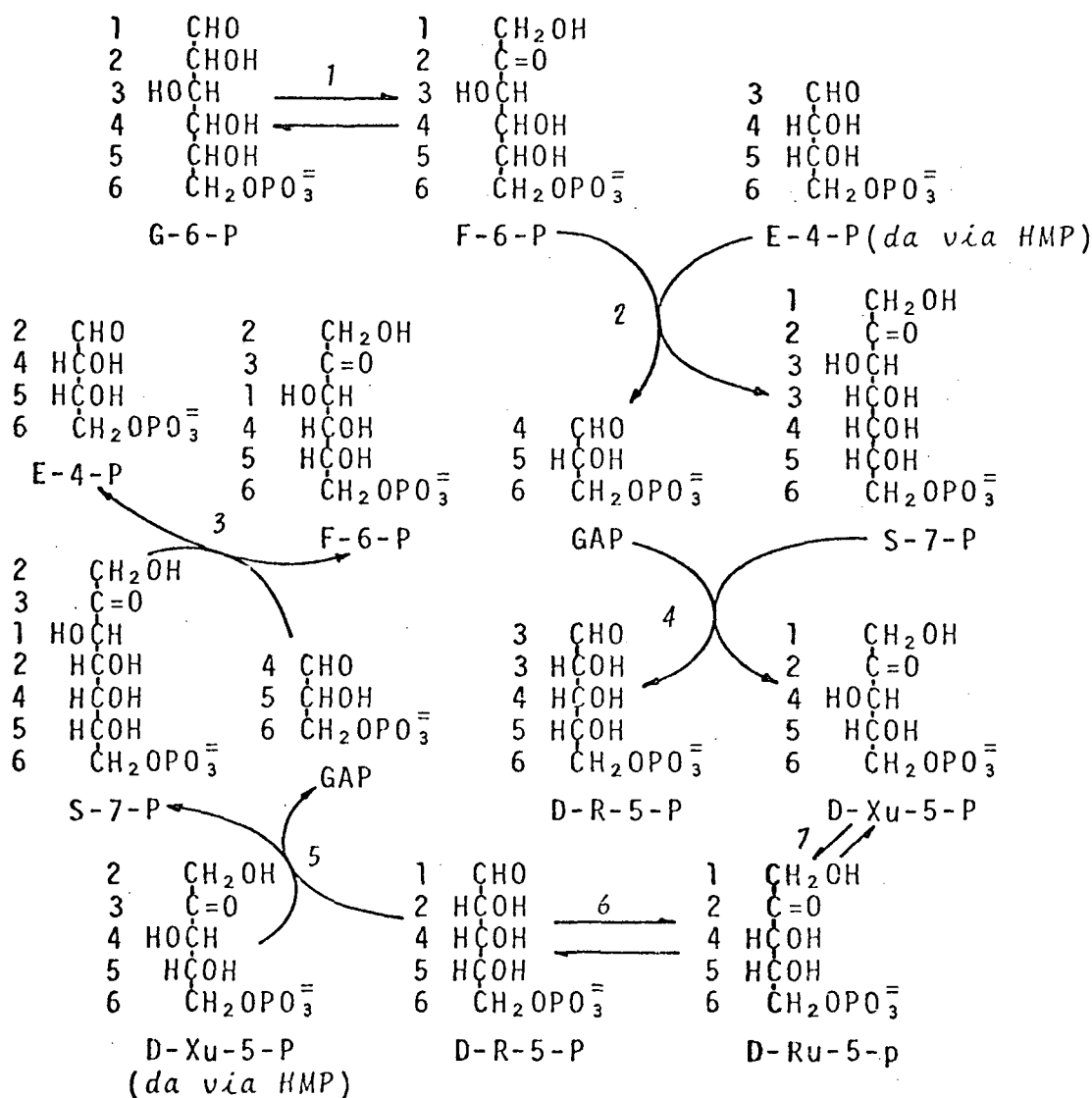


P. cinnabarinus pode, então, inversamente condensar moléculas de triose fosfato para produzir uma molécula de hexose fosfato com o C-1 derivado do C-6 da molécula original de glucose.

Se considerarmos, ainda, as reações transaldolase

e transcetolase como reversíveis, uma das possibilidades é que o C-1 da glucose se distribuiria na posição 3 e o C-2 e C-3 nas posições 1 e 2, respectivamente, como pode ser observado no esquema IV.

Esquema IV



1 = fosfoglucoisomerase; 2 e 3 = transaldolase; 4 e 5 = transcetolase; 6 = ribose-5-fosfato isomerase; 7 = ribulose-5-fosfato epimerase.

Todas as possibilidades de distribuição de ^{14}C ao acaso na estrutura molecular da hexose, a avaliação da extensão desta distribuição e sua importância na interpretação dos dados experimentais foram amplamente discutidas por WOOD & KATZ (1958). Estes autores estimaram a extensão de distribuição de ^{14}C ao acaso que ocorre na glucose-6-fosfato, no "steady-state" quando a glucose- ^{14}C é metabolizada via EMP completa. Eles demonstraram que esta extensão é proporcional à fração do metabolismo total da glucose- ^{14}C que procede pelo ciclo das pentoses.

Teoricamente, para interpretar a produção de $^{14}\text{CO}_2$ seria necessário avaliar a diluição que ocorre pela reciclagem e determinar também a extensão de oxidação dos Carbonos da triose fosfato. Para avaliar o primeiro parâmetro, dever-se-ia determinar a porcentagem de glucose-6-fosfato metabolizada pelo ciclo das pentoses. A determinação do segundo parâmetro é praticamente impossível, pois que varia muito com as condições experimentais e fisiológicas.

A tabela II demonstra que a radioatividade incorporada à célula é considerável e aumenta proporcionalmente com o tempo, demonstrando que há formação de compostos que são incorporados à célula. Portanto, em se tratando de sistemas biológicos metabolizando glucose marcada em diferentes átomos de Carbono, devemos considerar que o C-1 e o C-6 da glucose transformam-se em C-3 da triose fosfato na via EMP e são convertidos a CO_2 no ciclo de Krebs. Desde que, parte do Acetil-SCoA é utili

zado na síntese de ácidos graxos, somente uma parte entra no ciclo de Krebs, e desta, somente uma fração é liberada como CO₂, desde que uma parte será incorporada em compostos tais como aspartato e glutamato. O C-3 e o C-4 da glucose transformam-se em C-1 da triose fosfato na via EMP, que é convertida à serina, glicerol, etc., e em parte à piruvato, que por sua vez é convertido a Acetil-SCoA e CO₂.

Desde que os fungos são considerados microrganismos com elevada respiração endógena, as células de P.cinnabarinus utilizadas nas experiências radiorespirométricas foram colocadas em jejum por um período de 10 horas. Este tempo de jejum teve por finalidade induzir o catabolismo celular ativo da glucose, além de diminuir a respiração endógena. Então, a estimativa das contribuições relativas das vias de utilização da glucose em P.cinnabarinus foi realizada considerando que o catabolismo celular era preponderante.

Partindo-se da constatação de que apenas as vias EMP e HMP são operantes em P.cinnabarinus e considerando que haveria um equilíbrio das hexoses fosfato, de vez que a utilização de glucose-3,4-¹⁴C é mantida constante no período de 8 a 12 horas e, ainda, assumindo que as interconversões são negligenciáveis, os valores obtidos pelos diferentes métodos (tabela III e IV) não apresentam diferença significativa.

Por isso, embora os parâmetros que influem nos sistemas biológicos metabolizando glucose-¹⁴C nos levem a inter -

pretar os cálculos de contribuição relativa das vias de utilização da glucose com cautela, podemos considerar que realmente ocorre uma grande diferença de atuação das vias EMP e HMP em P.cinnabarinus, quando estudado sob as condições descritas, sendo a glucose preferencialmente metabolizada via EMP.

Embora a transcetolase seja, em muitos casos, a enzima limitante da via HMP, quando as enzimas são estudadas sob condições ótimas "in vitro", a velocidade total da via é, provavelmente, limitada pelo suprimento de NADP^+ , sendo a velocidade de reoxidação do NADPH nas reações sintéticas redutivas, um fator importante no controle do ciclo.

Como as nossas experiências foram realizadas sob condições que favorecem o catabolismo celular e, admitindo-se que nestas circunstâncias, as reações de degradação sobrepujam as reações de síntese, torna-se fácil compreender porque o suprimento de NADP^+ poderia ser o fator limitante à atuação da via HMP.

EAGON (1963) explica a proporção de contribuição desta via, também, em termos da limitação do suprimento de NADP^+ estudando os níveis enzimáticos dos principais sistemas de regeneração de NADP^+ - a NADPH oxidase e NAD(P)^+ transidrogenase.

Entretanto, o fluxo de metabolitos através da via HMP pode depender de vários outros fatores, entre eles as condições genéticas e ambientais (HANKINSON & COVE, 1972). Sejam

quais forem estes fatores, a velocidade da reação, em última análise, deverá ser dependente da razão coenzima oxidada/coenzima reduzida existente na célula.

Na degradação da glucose pela via EMP só ocorre uma reação oxidativa - a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato para ácido 1,3-difosfoglicérico. O NAD^+ é o aceptor para os equivalentes redutores desta reação, fazendo-se necessário um sistema de reoxidação do NADH para a manutenção contínua da glicólise. Os trabalhos de LÉJOHN (1971) relatam que o nível de NAD^+ e NADH parece ser de importância na regulação do metabolismo de carboidratos em fungos. A regeneração contínua ou reciclagem do NAD^+ e NADH depende da ação coordenada da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase da glicólise e lactato desidrogenase, bem como da atividade das enzimas mitocondriais responsáveis pela reoxidação do NADH, como a NADH oxidase (atividade específica = 0,005 micromol de NADH oxidado/minuto por miligrama de proteína). Portanto, podemos supor que, estando as enzimas presentes, elas sejam operantes no fungo, somando-se as suas atividades na efetiva regeneração do coenzima oxidado.

Todas estas alternativas são viáveis na regulação das vias de utilização da glucose em P.cinnabarinus, que entre tanto fogem ao escopo do presente trabalho podendo se constituir em assunto para posterior investigação.

1. ARNSTEIN, H.R.V. & BENTLEY, R. The biosynthesis of Kojic acid. I. Production from (1-C¹⁴) and (3:4-C¹⁴) glucose and (2-C¹⁴)-1:3-dihydroxyacetone. Biochem.J., 54:493 - 508, 1953.
2. ASHWELL, G. Colorimetric analysis of sugars. In: Methods in Enzymology, New York and London, Academic Press, 1957 vol. III, p. 76-8 e 81-2.
3. ASSIS, J.S. Ciclo do ácido glioxílico em Picnoporus cinnabarinus. Curitiba, 1973, p.15. Tese.
4. ARTHUR, L.O. et al. Carbohydrate metabolism in Agrobacterium tumefaciens. J.Bacteriol., 116(1):304-13, 1973.
5. BALLOU, C.E. Dihydroxyacetone phosphate. In: Biochem.Preps. New York and London, John Wiley & Sons, Inc., 1960, vol. 7, p.45-50.
6. BEISENHERZ, G. Triose phosphate isomerase from calf muscle. In: Methods in Enzymology, New York and London, Academic Press, 1955, vol. I, p.387-91.
7. BERGMAYER, H.U. Phosphoglycerate kinase (PGK) from yeast. In: Methods of enzymatic analysis. Weinheim, Chemie, 1965 p.994.
8. BIRKINSHAW, J.H. et al. Biochemistry of the wood-rotting fungi. 2. A study of the acids produced by Coniophora cerebella pers. Biochem.J., 34:906-16, 1940.
9. BIRKINSHAW, J.H. et al. Biochemistry of the wood-rotting

- fungi. 5. The production of D-threitol (1-erythritol) by Armillaria mellea (VAHL) Quélet. Biochem.J., 42:329-36, 1948.
10. BLUMENTHAL, H.J. Carbohydrate metabolism. 1. Glycolysis. In: AINSWORTH, G.C. & SUSSMAN, A.S. ed. The fungi advances treatise. New York, Academic, 1965, v.1, p.229-68.
11. BÜCHER, T. Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. Biochim.Biophys.Acta, 1:292-314, 1947.
12. BÜCHER, T. Phosphoglycerate kinase from Brewer's yeast. In: Methods in Enzymology. New York and London, Academic Press, 1955, vol.I, p.415.
13. BRAY, G.A. A simple efficient liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Analytical Biochemistry, 1:279-85, 1960).
14. CARTER, B.L.A. & BULL, T.A. Studies of fungal growth and intermediary carbon metabolism under steady and non steady state conditions. In: J.Bacteriol., 108:309-13, 1971
15. CHRISTENSEN, B.E. & CHELDELIN, V.H. Carbohydrate metabolism in Penicillium digitatum. Fed.Proc., 16(1):266(1139) . 1957.
16. CLARK, D.S. & WALLACE, R.H. Carbohydrate metabolism of Pullularia pullulans. Can.J.Microbiol., 4(1):43-54, 1958.
17. CLELAND, S.V. & COE, E.L. Activities of glycolytic enzymes during the early stages of differentiation in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. Biochim.Biophys

- Acta, 156:44-50, 1968.
18. COCHRANE, V.W. The metabolism of species of Streptomyces VIII. Reactions of the Embden-Meyerhof-Parnas sequence in Streptomyces coelicolor. J.Bacteriol., 69:256-63, 1955.
 19. DeBAUN, R.M. & NORD, F.F. The resistance of cork to decay by wood-destroying molds. Arch.Biochem.Biophys., 33:314-19, 1951.
 20. DeFIEBRE, C.W. & KNIGHT, S.G. The oxidation of glucose by Penicillium chrysogenum. J.Bacteriol., 66:170-7, 1953.
 21. DOWLER, W.M. et al. Terminal oxidation in cell-free extracts of fungi. J.Bacteriol., 36:9-17, 1963.
 22. EAGON, R.G. Rate limiting effects of pyridine nucleotides on carbohydrate catabolic pathways of microorganisms. Biochem.Biophys.Res.Comm., 12:274-9, 1963.
 23. FALCK, R. In: Arch.Biochem.Biophys., 9:419-37, 1946.
 24. FRIEDEMANN, T.E. & HAUGEN, G.E. Pyruvic acid. II. The determination of keto acids in blood and urine. J.Biol.Chem., 147:415, 1943.
 25. GERBER, N.N. Phenoxazinones by oxidative dimerization of aminophenols. Can.J.Chem., 46:790-2, 1968.
 26. GIBBS, M. & GASTEL, R. Glucose dissimilation by Rhizopus. Arch.Biochem.Biophys., 43:33-8, 1953.
 27. GROVES, D.J. & GRONLUND, A.F. Glucose degradation in Clostridium perfringens Type A. J.Bacteriol., 100:1420-23, 1969

28. HEATH, E.C. & KOFFLER, H. Biochemistry of filamentous fungi. II. The quantitative significance of an "Oxidative Pathway" during the growth of Penicillium chrysogenum. J.Bacteriol., 71:174-81, 1956.
29. HORECKER, B.L. The Orcinol reaction for mixtures of pentose and heptulose. In: Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1957, p. 105, v.III.
30. HORECKER, B.L. & KORNBERG, A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J.Biol.Chem., 175:385-90, 1948.
31. HUGGETT, A.St.G. & NIXON, D.A. Enzymic determination of blood glucose. Biochem.J., 66:12p, 1957.
32. KREBS, E.G. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from yeast. In: Methods in Enzymology. New York and London, Academic Press, 1955, v.I, p. 407.
33. LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-75, 1951.
34. MARGULIES, M. & VISHNIAC, W. Dissimilation of glucose by the MX strain of Rhizopus. J.Bacteriol., 81:1-9, 1961.
35. MARKUS, Z. et al. Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by Dactylium dendroides. App.Microbiol., 13(5):686-93, 1965.
36. McDONALD, J.K. et al. Glucose catabolism in the ergot fungus Claviceps purpurea. J.Bacteriol., 80:61-71, 1960.
37. McDONOUGH, M.W. & MARTIN, S.N. The hexose monophosphate

- pathways in Aspergillus niger. Can.J.Microbiol., 4:329-33, 1958.
38. MacGEE, J. & DOUDOROFF, M. A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. J.Biol.Chem., 210:618, 1954.
39. MORSE, S.A. et al. Glucose metabolism in Neisseria gonorrhoeae. J.Bacteriol., 120(2):702-14, 1974.
40. NEWBURGH, R.W. et al. Carbohydrate oxidation by the wheat smut fungus, Tilletia caries. J.Biol.Chem., 214:27-35, 1955.
41. NEWBURGH, R.W. & CHELDELIN, V.H. Oxidation of labelled substrates by dwarf bunt, Tilletia contraversa. Can.J.Microbiol., 5:415-17, 1959.
42. NIEDERPRUEM, D.J. Respiration of basidiospores of Schizophyllum commune. J.Bacteriol., 88(1):210-15, 1964.
43. NIEDERPRUEM, D.J. et al. Hexose monophosphate metabolism during basidiospore germination in Schizophyllum commune. J.Bacteriol., 89:908-9, 1965.
44. NIEDERPRUEM, D.J. et al. Polyol metabolism in the basidiomycete Schizophyllum commune. J.Bacteriol., 89:954-59, 1965a.
45. NG, W.S. et al. Changes in carbon catabolic pathways during synchronous development of conidiophores of Aspergillus niger. J.Gen.Microbiol., 71:495-504, 1972.
46. NG, A.M.L. et al. Influence of dilution rate on enzyme synthesis in Aspergillus niger in continuous culture. J.Gen.Microbiol., 81(2):425-34, 1974.

47. NORD, F.F. & SCIARINI, L.J. On the mechanism of enzyme action. Part 27. The action of certain wood-destroying fungi on glucose, xylose, raffinose and cellulose. Arch. Biochem. Biophys., 9:419-37, 1946.
48. NORD, F.F. & VITUCCI, J.C. On the mechanism of enzyme action. XXIX. The acetate metabolism of certain wood-destroying molds and the mechanism of wood decay. Arch. Biochem. Biophys., 14:229-41, 1947.
49. NORD, F.F. & VITUCCI, J.C. On the mechanism of enzyme action. XXX. The formation of methyl-p-methoxycinnamate by the action of Lentinus lepideus on glucose and xylose. Arch. Biochem. Biophys., 14:243-47, 1947a.
50. NOLTMANN, E.A. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (zwischenferment). I. Isolation of the crystalline enzyme from yeast. J. Biol. Chem., 236(5):1225-30, 1961.
51. NOVELLO, F. & McLEAN, P. The pentose phosphate pathway of glucose metabolism. Measurement of the non-oxidative reactions of the cycle. Biochem. J., 107:775-91, 1968.
52. PONTREMOLI, S. & GRAZIE, E. 6-phosphogluconate dehydrogenase. In: Methods in Enzymology. New York and London, Academic Press, 1966, vo. IX, p. 137.
53. RAMACHANDRAN, S. & GOTTLIEB, D. Pathways of glucose catabolism in Caldariomyces fumago (ILL). Biochim. Biophys. Acta, 69:74-84, 1963.
54. RAO, P.S. & NIEDERPRUEN, D.J. carbohydrate metabolism during

- morphogenesis of Coprinus lagopus (sensu Buller). J.Bacteriol., 100:1222-8, 1969.
55. ROE, J.H. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. J.Biol.Chem., 107:15, 1934
56. RUTTER, W.J. & HUNSLEY, J.R. Aldolase. I. Yeast. In: Methods in Enzymology. New York and London, Academic Press, 1966, vol.IX, p.480.
57. RACKER, E. et al. Crystalline Transketolase from Baker's yeast. In: Methods in Enzymology. New York and London, Academic Press, 1955, vol.I, p.375.
58. SIH, C.J. & KNIGHT, S.G. Carbohydrate metabolism of Penicillium chrysogenum. J.Bacteriol., 72:694-9, 1956.
59. SIH, C.J. et al. Demonstration of the pentose cycle reactions in Penicillium chrysogenum. J.Bacteriol., 73:447-51, 1957.
60. SOLS, A. & De La FUENTE, G. Glucosa oxidasa en analisis. Rev.Esp.de Fisiol. dezembro 1957, p.15).
61. SOLS, A. et al. Substrate specificity and some other properties of Baker's yeast hexokinase. Biochim.Biophys.Acta, 30:92, 1958.
62. SOLS, A. & SALAS, M.L. Phosphofructokinase. III. Yeast. In: Methods in Enzymology. New York and London, Academic Press, 1966, vol.IX, p. 436.
63. STEVENS, G. de et al. On the mechanism of enzyme action. XLV. The role of certain dicarboxylic acids in the for-

- mation of oxalic acid by wood-destroying molds. Arch. Biochem. Biophys., 33:304-13, 1951.
64. STOLZENBACH, F. Lactic dehydrogenases (Crystalline). In: Methods in Enzymology. New York and London, Academic Press, 1966, vol. IX, p.278.
65. SUTHERLAND, E.W. et al. The mechanism of action of phosphoglucomutase and phosphoglyceric acid mutase. J. Biol. Chem. 179:501, 1949.
66. SUTHERLAND, E.W. et al. Mechanism of the phosphoglyceric acid mutase reactions. J. Biol. Chem., 181(1):153-9, 1949a
67. VALENTINE, W.N. & TANAKA, K.R. Pyruvate kinase: Clinical aspects. In: Methods in Enzymology. New York and London, Academic Press, 1955, vol. I, p.392.
68. ZAGALLO, A.C. & WANG, C.H. Comparative catabolism in Corynebacteria. J. Gen. Microbiol., 47:347-57, 1967.
69. WANG, C.H. et al. Comparative study of glucose catabolism by the radiorespirometric method. J. Bacteriol., 76:207-16, 1958.
70. WANG, C.S. & RAPER, J.R. Isozyme Patterns and Sexual morphogenesis in Schizophyllum. Proc. Nat. Acad. Sci., 66:882-9, 1970.
71. WESTHEAD, E.W. & McLAIN, G. A purification of Brewer's and Baker's yeast enolase yielding a single active component J. Biol. Chem., 239:2464, 1964.
72. WOLD, F. & BALLOU, C.E. Studies on the enzyme enolase. I,

Equilibrium studies. J.Biol.Chem., 227:301-12, 1957.

73. WOOD, H.G. & KATZ, J. The distribution of ^{14}C in the Hexose phosphates and the effect of recycling in the pentose cycle. J.Biol.Chem., 233:1279-82, 1958.

Adendum:

74. HANKINSON, O. & COVE, D.J. Regulation of the pentose phosphate pathway in the fungus Aspergillus nidulans. Biochem.J., 127:18p, 1972.
75. LÉJOHN, H.B. D(-)-Lactate dehydrogenases in fungi. Kinetics and allosteric inhibition by guanosine triphosphate. J.Biol.Chem., 246(7):2116-26, 1971.
76. KATZ, J. & WOOD, H.G. The use of C^{14}O_2 yields from glucose-1- and -6- C^{14} for the evaluation of the pathways of glucose metabolism. J.Biol.Chem., 238(2):517-23, 1963.
77. WANG, C.H. & REED, D.J. Glucose metabolism in Penicillium digitatum. Can.J.Microbiol., 5:59-66, 1959.

Meus Agradecimentos,

À Dra. Déa Amaral, orientadora desta tese.

À Dra. Glaci T. Zancan, coordenadora do curso
de Pós-graduação em Bioquímica.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade
Federal do Paraná.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas

SUMÁRIO

Uma amostra homocariótica de Picnoporus cinnabarinus, basidiomiceto apodrecedor da madeira, isolada na região de Curitiba, foi estudada com respeito às vias de utilização da glucose.

As enzimas das vias de Embden-Meyerhof-Parnas e hexose monofosfato foram detectadas em extrato livre de células. A via de Entner-Doudoroff não foi encontrada nas condições estudadas.

Experiências radirespirométricas com células intactas deste microrganismo demonstraram que a via de Embden-Meyerhof-Parnas é preponderante sobre a de hexose-monofosfato.

ERRATA

- Onde se lê triose isomerase, leia-se triose fosfato isomerase.
- página 16: onde se lê ... catalisa a fosforilação da glucose em 10 minutos..., leia-se ... catalisa a fosforilação de 1 micromol de glucose em 10 minutos...
- página 55: ... é característico de pentulose-5-fosfato, segundo o método de Cisteína/carbazol.
- página 56: ... é característico de hexoses-fosfato, segundo o método de Cisteína/H₂SO₄.