

**ASPECTOS DO METABOLISMO DE GLUCOSE EM
POLYPORUS CIRCINATUS**

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

Curitiba – 1977

Tese orientada pela
Profª. Dra. Glaci Therezinha Zancan

A minhas Filhas
A meus Pais
Ao meu Marido

I N D I C E

INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	15
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	58
SUMÁRIO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
AGRADECIMENTOS	74

INDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura nº 1	39
Figura nº 2	40
Figura nº 3	41
Figura nº 4	42
Figura nº 5	43
Figura nº 6	44
Figura nº 7	45
Figura nº 8	46
Figura nº 9	47
Figura nº 10	48
Figura nº 11	49
Figura nº 12	50
Figura nº 13	51
Figura nº 14	52
Figura nº 15	53
Figura nº 16	54
Figura nº 17	56
Tabela I	55
Tabela II	57

INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos extremamente versáteis capazes de utilizar uma grande variedade de carboidratos, os quais podem variar desde uma unidade monomérica até polissacarídeos complexos. É natural que utilizando polissacarídeos como fonte de carbono, estes açúcares devem ser hidrolizados a unidades monoméricas antes de serem metabolizados, para tanto, os fungos utilizam endo ou exoenzimas hidrolíticas na maioria das vezes constitutivas. A via anaeróbica de EMBDEM-MEYERHOF-PARNAS (EMP), somente foi constatada em fungos, meio século após os estudos pioneiros realizados por BUCHNER em 1897. A razão disso é atribuída primariamente às dificuldades técnicas encontradas quando se trabalha com fungos filamentosos. Durante a década de 50 foi demonstrada a existência da via da hexosemonofosfato (HMP) e da via ENTNER-DOUDOROFF (ED) em fungos filamentosos.

Estudos feitos na tentativa de detectar ou avaliar a participação das vias de degradação da glucose em diferentes fungos foram realizados medindo-se o teor metabólitos intermediários ou constatando a presença de enzimas pertencentes a uma via particular e ainda empregando técnicas radiorespirométricas para medir o grau de dissimilação de açúcares-¹⁴C, como poderá ser apreciado no decorrer desta introdução.

NORD et al. (55) trabalharam com Merulius niveus, Merulius tremellosus, Merulius confluens e Fomes annosus, fungos conhecidos como deterioradores da madeira e estudaram a formação de pro

dutos de metabolismo desses fungos crescidos em meio líquido contendo a glucose, xilose, rafinose e celulose. Os autores observaram a formação de etanol em anaerobiose, em todas as espécies estudadas, quando a glucose era o substrato. Já a fermentação da xilose, rafinose e celulose variava com as espécies estudadas.

Prosseguindo os estudos, NORD et al. (56) verificaram que Merulius niveus, Merulius tremellosus, Fomes annosus eram capazes de produzir ácido oxálico a partir de ácido pirúvico, láctico, glicólico e dimetilsuccínico e somente o M. niveus produzia ácido oxálico a partir de dimetilfumárico, acético e málico.

BIRKINSHAW et alii. (7) cresceram Armillaria mellea em meio de cultura de composição semidefinida contendo glucose e verificaram que o pó dos micélios submetido a extração contínua com solventes orgânicos como éter de petróleo e acetato de etila, produzia uma substância cristalina identificada como L-eritritol e correspondia a cerca de 13% do peso seco dos micélios.

De FIEBRE et al. (18) trabalhando com Penicillium chrysogenum NRRL 1951-B25 realizaram ensaios radiorespirométricos empregando glucose-1-¹⁴C e glucose-2-¹⁴C e verificaram que 30% da radioatividade recuperada como CO₂ provinha da glucose-1-¹⁴C e apenas 0,2% da glucose-2-¹⁴C. Os autores, sugerem que a glucose foi metabolizada através de uma via oxidativa, provavelmente, o ciclo das pentoses fosfato, o que foi posteriormente verificado por SIH et alii. (67) através da determinação das enzimas envolvidas.

COCHRANE et alii. (16) realizaram ensaios radiorespirométricos empregando glucose-1-¹⁴C e glucose-3,4-¹⁴C e verificaram

que as células de Streptomyces coelicolor e Streptomyces reticuli liberavam $^{14}\text{CO}_2$ preferencialmente da glucose-1- ^{14}C sugerindo que o ciclo das pentoses fosfato seria a via principal no metabolismo de glucose nestes organismos. A presença de atividade de hexoquinase, glucose-6-P desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase em extratos de S.coelicolor e S. reticuli bem como a formação de pentoses a partir de glucose-6-P levaram os autores a concluir que o ciclo das pentoses fosfato está presente e é operativo nas espécies estudadas. Contudo nem as células intactas de S. coelicolor nem seus extratos livre de células tinham capacidade de metabolizar a glucose em anaerobiose sendo sugerido que essa incapacidade era devido a não reoxidação da difosfopiridinonucleotídeo.

GIBBS et al. (24) trabalhando com Rhizopus oryzae NRRL395 verificaram por radiorespirometria que o fungo produzia $^{14}\text{CO}_2$ em quantidades muito baixas quando fermentava a glucose-1- ^{14}C mas que o produzia quantidades apreciáveis quando fermentava glucose-3,4- ^{14}C . Com estes resultados e com aqueles da distribuição da radioatividade no carbono do etanol e do ácido lático quando o fungo fermentava glucose-1- ^{14}C ou glucose-3,4- ^{14}C concluíram que o R oryzae converte a glucose em ácido lático tanto aerobicamente como anerobicamente pela via de EMBDEM-MEYERHOF-PARNAS.

NEWBURGH et alii. (48) demonstraram a presença de hexoquinase, aldolase, glucose-6-P desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase em extrato livre de células de Tilletia caries, fungo manchador do trigo. Os autores observaram a formação de pentose, sedo-

heptulose, hexoses, trioses, quando o extrato livre de células era incubado com ribose-5-P em condições adequadas. Dos resultados obtidos eles sugeriram a presença do ciclo das pentoses fosfato.

WANG et alii. (73) estudaram radiorespirometricamente o metabolismo da glucose-1-¹⁴C, glucose-2-¹⁴C e glucose-6-¹⁴C pela levedura de padeiro baseando-se na recuperação cumulativa de ¹⁴CO₂ calcularam a participação da EMP e da HMP, concluíram ser respectivamente 87 e 13%.

HEATH et alii. (28) trabalharam com células de Fusarium lini ATCC 9593 e observaram por ensaios respirométricos, que essas células sob condições anaeróbicas, metabolizavam glucose-3,4-¹⁴C de maneira muito mais efetiva do que a glucose-1-¹⁴C. Por outro lado, sob condições aeróbicas, metabolizavam a glucose-1-¹⁴C de maneira mais efetiva que a glucose-3,4-¹⁴C. Dos resultados obtidos, os autores sugeriram que a via glicolítica e a via das pentoses fosfato provavelmente seriam operantes nas condições dos ensaios. Aparentemente o referido fungo metabolizava a glucose de maneira semelhante a Saccharomyces cerevisiae que fermenta a glucose pela via EMP mas também usa, via oxidativa em aerobiose (8).

HEALTH et al. (27) trabalhando com extrato livre de células de Penicillium chrysogenum amostra Q 176, detectaram a presença de glucose-6-P desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase bem como confirmaram os dados obtidos por De FIEBRE et al. (18) para outra amostra de Penicillium chrysogenum.

SIH et al. (66) trabalharam com extrato livre de células de amostra NRRL 825 de Penicillium chrysogenum e demonstraram a presença de todas as enzimas da cadeia glicolítica com exceção da fosfofrutoquinase. Dos dados, os autores sugerem a presença do ciclo glicolítica e ciclo das pentoses fosfato nesta amostra de P. chrysogenum.

WANG et alii. (74) através de estudos radiorespirométricos com Penicillium digitatum verificaram que a incorporação de glucose-1-¹⁴C, glucose-2-¹⁴C, glucose-3,4-¹⁴C e glucose-6-¹⁴C foram respectivamente 44,56,41 e 53%. Estes resultados sugeriram a existência da via glicolítica, ciclo das pentoses fosfato e um limitado ciclo de Krebs. A distribuição das vias metabólicas da glucose em P. digitatum foi estimada pelo método de WANG et al. (73) sendo da ordem de 80-82% para a glicolise e 18-20% para via oxidativa direta.

JENSEN et alii. (32) trabalhando com extrato livre de células de Trichophyton mentagrophytes amostra 8410 detectaram a presença de hexoquinase, fosfoglucose isomerase, fosfofrutoquinase, aldolase, gliceraldeído-3-P desidrogenase, α -glicerofosfato desidrogenase e 15 outras desidrogenases como por exemplo álcool desidrogenase, lactato desidrogenase, succinato desidrogenase, glucose desidrogenase, galactose desidrogenase, etc., além de aconitase e fumarase. A existência do ciclo das pentoses fosfato e da cadeia glicolítica e do ciclo de Krebs neste dermatófito foi sugerida por autores com base nas enzimas detectadas.

CLARK et al. (13) estudaram radiorespirometricamente o metabolismo de glucose-1-¹⁴C e glucose-6-¹⁴C em Pullularia pullulans ATCC 11942 e verificaram que a reação ¹⁴CO₂ da glucose-1-¹⁴C e da glucose-6-¹⁴C decresce com o tempo de cultivo, embora os resultados surgiram que a maioria do CO₂ radioativo provinha do C₁ da glucose.

NEWBURG et al. (49) através de estudos radiorespirometricos em esporos e micélios do fungo Tilletia caries amostra 10 verificaram que nos esporos a fração de glucose metabolizada pela via ENTNER DOUDOROFF era de 100% ao passo que nos micélios não foi detectada. A fração de glucose metabolizada pela via glicolítica nos micélios era de 66%, enquanto nos esporos estava ausente. Desses resultados tornou-se evidente que existe diferença entre vias de metabolismo da glucose pelos micélios e esporos de T. caries.

WANG et alii. (75) propuseram um método radiorespirométrico para avaliar a participação das vias das pentoses fosfato, glicolítica e ENTNER-DOUDOROFF, usando glucose-1-¹⁴C, glucose-2-¹⁴C, glucose-3,4-¹⁴C e glucose-6-¹⁴C. Os estudos comparativos entre diferentes microrganismos levaram os autores a concluir que existe uma semelhança muito grande de metabolismo da glucose entre Escherichia coli e Saccharomyces cerevisiae, entre Pseudomonas saccharophila e Pseudomonas reptilvora, entre Aspergillus niger e Streptomyces griseus, entre Penicillium digitatum e Penicillium chrysogenum.

MacDONOUGH et al. (39) demonstraram a presença de enzimas do ciclo das pentoses fosfato em extrato livre de células de Aspergillus niger, N.R.C. al 233 crescidos em diferentes meios de culturas

Os autores demonstraram ainda a presença de hexose, heptulose e triose bem como, a presença de atividade de fosfohexoisomerase, sugerindo ser o ciclo das pentoses fosfato operante neste tipo de fungo.

Continuando com os estudos em Tilletia, NEWBURGH et al. (50) realizaram estudos radiorespirométricos e calcularam as percentagens de participação das vias metabólicas em esporos de Tilletia contro-versa encontrando 67% para a via das pentoses fosfato e 33% para a via glicolítica.

REED et al. (61) estudaram a utilização da glucose-1-¹⁴C, glucose-3,4-¹⁴C e glucose-6-¹⁴C, e determinaram a participação das diferentes vias metabólicas pelo método de WANG et al. (75) e pelo método de KORKES (35) em Penicillium digitatum. Os autores verificaram que existe grande similaridade entre os dois métodos; as percentagens de participação da EMP e da HMP pelo primeiro método foram respectivamente 77 e 23 e pelo segundo método 89 e 11.

CHEN (12) estudou o efeito quantitativo da aeração sobre o metabolismo da glucose-1-¹⁴C, glucose-6-¹⁴C e glucose-3,4-¹⁴C pela Saccharomyces cerevisiae, verificando que as percentagens de participação da HMP permanecem inalterada durante a variação da aeração. Entretanto as percentagens de participação do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) aumentam significativamente com o aumento da aeração. Em contraposição as percentagens de participação da EMP aumentam com a diminuição dos níveis de aeração.

MCDONALD et alii. (44) trabalhando com extrato livre de células de Claviceps purpurea verificaram a presença de hexoquinase, fos-

foriboisomerase, fosfocetopentosepimerase, transcetolase, transaldolase e fosfofrutoquinase. Os autores calcularam ainda a percentagem de glucose metabolizada pelas diferentes vias, 90% da glucose foi metabolizada pela via glicolítica aeróbica e 10% pelo ciclo da pentose fosfato. Ensaio radiorespirométrico com células não proliferantes, jejuadas, permitiram observar uma queda de 50-60% na quantidade de glucose oxidada pela via das pentoses fosfato, sugerindo os autores que o fato seja devido a um decréscimo no requerimento de pentoses em células não proliferantes.

MARGULIES et al. (41) observaram que o Rhizopus amostra MX quando crescido em meio líquido mineral, contendo glucose-1-¹⁴C ou glucose-2-¹⁴C como fonte de carbono produzia quantidades diferentes de ácido lático, ácido fumárico e etanol dependendo da condição de aerobiose ou anaerobiose. Dos resultados deste estudo com substrato marcado e da determinação de atividades específicas das enzimas envolvidas na formação do etanol e ácido lático, concluíram os autores que a produção do álcool e do ácido lático se processa pela via EMP, não esclarecendo todavia o mecanismo de formação do ácido fumárico.

MARUYAMA et al. (43) trabalharam com extrato de micélios e com microconídias de Fusarium oxysporum verificando que os valores de atividades específicas para aldolase eram muito similares nestas duas formas evolutivas.

MELOCHE (45) verificou em pó cetônico de Lactarius torminosus NRRL 2900 a presença de enzimas da cadeia glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato. No entanto, o autor não conseguiu detec-

tar a presença de fosfofrutoquinase e triosefosfato isomerase, sugerindo que este resultado negativo poderia ser atribuído a desnaturação dessas enzimas durante a preparação. O autor discute ainda que o ciclo das pentoses fosfato poderia ser a maior via de metabolismo da glucose neste tipo de fungo, uma vez que a atividade de glucose-6-P desidrogenase é muito maior que a do gliceraldeído-3-P desidrogenase.

DOWLER et alii. (20) trabalharam com dez diferentes fungos a saber: Phycomyces nitens, Gibberella zeae, Monolinia fructicola, Stemphylium solani, Schizophyllum commune, Glomerella cingulata, Aspergillus fumigatus, Claviceps purpurea, Pythium debarynum e Rhizoctonia sp. medindo as enzimas envolvidas com o metabolismo oxidativo. Entre outras, os autores observaram que estes extratos livre de células continham as atividades de desidrogenases de glucose-6-P, triose-P, isocitrato, succinato, malato e glutamato bem como de NADH oxidase e citocromo c redutase.

RAMACHANDRAN et al. (59) estudaram o metabolismo da glucose -1-¹⁴C pelo Caldariomyces fumago ILL. Baseando-se no fato que o C₁ da glucose quando metabolizada pela via ENTNER-DOUDOROFF torna-se o grupo carboxílico do ácido pirúvico e quando metabolizada via das pentoses fosfato o C₁ da glucose é liberado como CO₂ antes que se forme ácido pirúvico, eles verificaram que na primeira hora cerca de 86% da glucose era metabolizada via ENTNER-DOUDOROFF e apenas 13,8% via das pentoses fosfato. Na quinta hora 65% era metabolizada pela via ENTNER-DOUDOROFF e 35% pela via das pentoses fosfato. Como

os autores não conseguiram detectar a presença de glucoquinase em extrato livre de células de C. fumago sugeriram a ausência da via glicolítica neste fungo tido como imperfeito.

NIEDERPRUEM et alii. (53) compararam atividades de glucose - 6-P desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase durante a germinação de basideosporo e no crescimento dos micélios de Schizophyllum commune 699 verificando que a atividade da primeira é maior nos esporos e sendo que a segunda estava aumentada no micélio.

NIEDERPRUEM et alii. (51) verificaram que extrato livre de células de diferentes formas evolutivas de Schizophyllum commune continha atividades de várias poliois desidrogenases observando a sua variação com a morfogenese.

VanETTEN et alii. (70) estudaram grande número de enzimas do ciclo das pentoses fosfato, da via glicolítica, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e do transporte de eletrons terminais em fungos Rhizoctonia solani e Sclerotium bataticola em função do tempo de crescimento da cultura, verificando comportamento diferente das enzimas estudadas nos dois fungos. Assim ocorria um aumento da atividade de hexoquinase, α -glicerofosfato desidrogenase, malato desidrogenase e citocromo oxidase com o tempo de cultivo. Enquanto havia um decréscimo na atividade de fosfohexoquinase, aconitase, isocitrato desidrogenase, NADH oxidase, enolase, piruvato quinase e 2,3-difosfoglicerato mutase em relação ao tempo de crescimento em R. solani, já em S. bataticola eles observaram um aumento de atividade de fosfohexoquinase, piruvato desidrogenase, fumarase, malato desidrogenase e enzima máli

ca não constatando diminuição da atividade com o tempo de cultivo.

CLELAND et al. (15) trabalhando com Dictyostelium discoi - deum na forma de "amoebae" e no estágio de preculminação não observaram diferenças significativas no teor das enzimas da cadeia glicolítica em dois estágios de desenvolvimento.

Van SCOYOC et al. (71) dosaram enzimas do EMP e HMP em extratos de Venturia inaequalis (Cke), sugerindo dos dados que a de gradação inicial de carboidratos fosse feita através das vias EMP e HMP.

RAO et al. (60) detectaram a presença de D-manitol desidrogenase, sorbitol desidrogenase e xilitol desidrogenase dependentes de NAD; glucose-6-P desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase dependentes de NADP; frutose redutase NADH dependente; xilose redutase NADPH dependente e trealase, tanto em extrato de micélios monocariótico como em extratos do corpo de frutificação dicarióticos de Coprinus lagopus. Os autores observaram também que a razão entre xilitol desidrogenase e sorbitol desidrogenase foi maior que a unidade tanto em micélios como em corpos de frutificação, mas tal razão decresce no tecido do talo.

NG et alii. (52) demonstraram que o EMP e HMP estão presentes e são operativos em todos os estágios de desenvolvimento de Aspergillus niger mas que o percentual relativo de ambas diferem. Assim o EMP é mais ativo nos períodos iniciais do crescimento vegetativo enquanto o ciclo das pentoses fosfato tem maior atividade nos estágios do desenvolvimento do conidioforo.

LYNCH et al. (38) estudaram através de técnicas radiorespirométricas a variação da participação do ciclo glicolítico e ciclo das pentoses fosfato durante o crescimento da fase plasmodial do Physarum flavicomum observando diminuição no teor de participação das vias quando no meio de cultura era adicionado nitrato de amônio, favorecendo ao EMP.

ARTHUR et alii. (2) estudaram o metabolismo da glucose pelo Agrobacterium tumefaciens NRRL B36. A análise dos dados radiorespirométricos e enzimáticos permitiram aos autores concluir que a glucose era estritamente metabolizada pelas vias oxidativas, a saber, a HMP, ED e TCA; das quais a HMP e ED eram as vias de maior participação, concluindo ainda que a EMP não é operante neste organismo.

TYRRELL et al. (69) trabalhando com Entomophthora pyriformis dosaram 14 enzimas das vias EMP e HMP, sugerindo que células vegetativas possuiriam potencial para degradar glucose por ambas as vias. O teor das enzimas era muito baixo nos esporos, aumentando com a germinação. Das enzimas estudadas, cinco não foram detectadas, entre elas fosfofrutoquinase, piruvatoquinase, fosforiboseisomerase, sugerindo os autores que este fato seja importante na manutenção da dormência dos esporos.

HIRONO (29) estudando o metabolismo da glucose pelo basidiomiceto Picnoporus cinnabarinus, verificou que as enzimas da via glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato estavam presentes e que a glucose era utilizada preferencialmente através da cadeia glicolítica (95,3%).

CHEN (12) estudando o efeito da aeração sobre as várias vias metabólicas para utilização da glucose em S. cerevisae, observou que a aeração provoca a alteração no funcionamento das vias.

Como tivemos oportunidade de observar, as principais vias de utilização da glucose em fungos são: via glicolítica, via das pentoses fosfato e via de ENTNER-DOUDOROFF. Os estudos radiorespirométricos datam da década de 50, e permitiram demonstrar a existência de vias metabólicas, bem como, a sua operabilidade em células intactas de fungos ou outros organismos. A melhor compreensão das vias envolvidas na degradação da glucose provém dos estudos das enzimas isoladas e das técnicas isotópicas aplicadas às células intactas. No entanto, há uma ampla variação no teor das vias conforme as espécies estudadas.

té o presente momento, observa-se que há carencias de estudos de avaliação de vias metabólicas empregando técnicas radiorespirométricas em fungos, principalmente aos pertencentes à classe Basidiomicetos.

Poucos são os trabalhos que procuram correlacionar os dados radiorespirométricos com a determinação de enzimas envolvidas nas diferentes vias metabólicas; geralmente faz-se avaliação dosando apenas as atividades específicas de algumas enzimas envolvidas nas diferentes vias ou somente apresentando dados radiorespirométricos.

Entre os fungos apodrecedores da madeira isolados da Araucária angustifolia encontra-se o Polyporus circinatus, cujas condições de cultivo da forma micelial foram perfeitamente padronizadas (3). Em nosso laboratório foram isoladas e parcialmente caracterizadas a hexoqui-

nase (47) e a glucose-6-P desidrogenase (25) do referido fungo. Ainda foi estudada uma L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente, que aparecia em concentrações mensuráveis somente quando o Polyporus circinatus era crescido em meio de cultura contendo lactato de sódio como única fonte de carbono e energia (23). Entretanto os dados obtidos não são suficientes para concluir a existência operacional da cadeia glicolítica, da via das pentoses fosfato e da via de ENTNER-DOUDOROFF; assim o presente trabalho foi levado a efeito empregando técnicas radiorespirométricas e dosando as enzimas com a finalidade de determinar e avaliar as vias metabólicas operantes em Polyporus circinatus crescido em meio contendo glucose como única fonte de carbono.

MATERIAIS E MÉTODOS

I. MATERIAIS

I.1 REAGENTES QUÍMICOS:

Ácido perclórico (Merck)

ADP (Adenosina-5'-difosfato - Sigma Chemical Company)

ATP (Adenosina-5'-trifosfato- Sigma Chemical Company)

Carbazol (Merck)

Cisteína (Mann Research Laboratories Inc.)

O-Dianisidina (Merck)

2,3-Difosfoglicerato (sal ciclohexilamonio - Sigma Chemical Company)

EDTA (Etilenodiaminotetraacetato de sódio - Sigma Chemical Company)

Eritrose-4-fosfato (sal sódico - Sigma Chemical Company)

B-Feniletilamina (Sigma Chemical Company)

Fosfato ácido de sódio (Merck)

Fosfato diácido de potássio (Merck)

Fosfoenolpiruvato (sal sódico - Sigma Chemical Company)

2-Fosfoglicerato (sal sódico - Sigma Chemical Company)

3-Fosfoglicerato (sal de cálcio - Sigma Chemical Company)

6-Fosfogluconato (sal sódico - Sigma Chemical Company)

Frutose (Merck)

Frutose-6-fosfato (sal sódico - Sigma Chemical Company)

Frutose-1,6-difosfato (sal sódico - Sigma Chemical Company)

Gliceraldeído-3-fosfato (sal sódico - Sigma Chemical Company)

Glicilglicina (Merck)

Glicina (Sigma Chemical Company)

D-glucose (Merck)

D-glucose-1-¹⁴C (45 mci/mmol) - Calatomic Corporation)

D-glucose-3-¹⁴C (1 µci/0.1 µmol - New England Nuclear)

D-glucose-3,4-¹⁴C (10 µci/0.738 µmol - New England Nuclear)

D-glucose-6-¹⁴C (388 mci/mmol - New England Nuclear)

Glucose-6-fosfato (sal sódico - Sigma Chemical Company)

Imidazol (Merck)

2-Mercaptoetanol (The Matheson Company Inc.)

Mops (Morpholinopropane Sulfonic Acid - Sigma Chemical Company)

NAD (Nicotinamida adenina dinucleotídeo dissódico - Sigma Chemical Company)

NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido dissódico - Sigma Chemical Company)

NADP (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato dissódico - Sigma Chemical Company)

Pirofosfato de sódio (Baker Analyzed' Reagent)

Ribose-5-fosfato (sal sódico - Sigma Chemical Company)

Ribulose-5-fosfato (sal sódico - Sigma Chemical Company)

Tiamina pirofosfato (Merck)

Trietanolamina (Merck)

Tris (Trihidroximetilaminometano - Merck)

Todos os reagentes eram pró-análise

I. 2 ENZIMAS

Aldolase - 8.5 unid./mg prot. (Sigma Chemical Company)

Desidrogenase láctica - 815 unid./mg prot. (Boehringer Mannheim GmbH)

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - 77 unid./mg prot. (Sigma Chemical Company)

α -Glicerofosfato desidrogenase - 80 unid./mg prot. (Sigma Chemical Company)

Glucose-6-fosfato desidrogenase - 405 unid./mg prot. (Sigma Chemical Company)

Glucose oxidase - 1.4 unid./mg prot. (Sigma Chemical Company)

Peroxidase - 1000 unid./mg prot. (Sigma Chemical Company)

Triosefosfato isomerase - 12600 unid./mg prot. (Sigma Chemical Company)

I. 3 AMOSTRA DE MICRORGANISMO:

A amostra monocariótica de Polyporus circinatus Fr nos foi cedida pela Profa. Dra. Glaci Theresinha Zancan do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, e mantida em meio sólido de Sabouraud. A amostra do meio sólido era transferida para um frasco com 200 ml de meio líquido proposto por MARKUS et alii. (42), contendo glucose a 0,5%. As culturas foram incubadas a 28^o e agitadas em um agitador rotatório a 100 rpm durante 48 horas, constituindo inóculo inicial. Desta cultura foram repicados micélios em frascos contendo 200 ml de meio acrescidos de glucose na concentração final de

0,5%. Após 24 horas a 28^o, os micélios foram coletados por filtração em gaze, lavados com água destilada e o líquido de lavagem removidos por compressão. Após a pesagem eram utilizados imediatamente ou estocados em congelador a -20^o para posterior utilização.

II. MÉTODOS

II.1 PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS:

Na preparação do extrato livre de células, a massa micelial (1.0 g) foi triturada com areia do mar previamente tratada (1.0g) em um gral à temperatura de 4^o. O macerado foi suspenso em 2.0 ml de tampão adequado para cada experimento. A areia e os fragmentos miceliares foram removidos por centrifugação a 7000 x g por 15 minutos - em centrífuga refrigerada Janetzki K24. O sobrenadante assim obtido, identificado como extrato livre de células, foi utilizado para ensaios de atividade enzimática.

II.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA:

As dosagens de proteínas foram realizadas de acordo com o método de LOWRY et alii. (37), empregando soro albumina bovina como padrão.

II.3 DOSAGEM DE GLUCOSE:

As dosagens de glucose foram realizadas de acordo com o método da glucose oxidase (31).

II.4 APARELHOS USADOS:

- a. Centrífuga refrigerada Janetzki K24.
- b. Espectrofotometro Coleman modelo 6A.
- c. Espectrofotometro Beckman modelo DU-2 com registrador acoplado.
- d. Banho-maria Dubnoff Metabolic Shaking Incubator-GCA Corporation
- e. Espectrometro de cintilação líquida Beckman LS-133

II.5 PREPARAÇÕES:

- a. O 3-fosfoglicerato de cálcio foi convertido em sal sódico pelo tratamento com resina trocadora de cations Dowex 50x8 sob a forma H^+ .
- b. A enolase foi preparada de acordo com o método proposto por WESTHEAD et al. (76) e apresentava atividade específica de 40 unid./mg prot.
- c. A mistura de ribose-5-P e ribulose-5-P foi preparada de acordo com o método proposto por LA HABA et al. (36).
- d. O líquido para medida de radioatividade foi preparada conforme BRAY (9).

II.6 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA:

A atividade das diferentes enzimas foi determinada no extrato livre de células seguindo em 340 nm a velocidade de oxidação ou redução de piridinonucleotídeo (NAD, NADH ou NADP) envolvido na reação. A quantidade de coenzima que se oxidava ou se reduzia era calculada tomando-se seu coeficiente de extinção molar a 340 nm como

$6,22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (30). Nas determinações das atividades da fosfoglicero mutase e enolase o PEP formado foi dosado espectrofotometricamente a 240 nm, tomando o coeficiente de extinção molar do fosfoenolpiruvato como $1,73 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (78). A determinação da atividade de outras enzimas foi feita pela dosagem do produto da reação por métodos químicos. Em cada caso, foram realizadas duas preparações enzimáticas e os pontos correspondem à média das determinações. Um controle era sempre feito, contendo todos os reagentes do ensaio, exceto os substratos específicos.

1. Glucoquinase (E.C.2.7.1.1): A dosagem da atividade de enzima foi medida segundo o método descrito por CRANE et al. (17). O extrato livre de células foi obtido utilizando-se tampão fosfato 0,1 M pH 6,4. O sistema de incubação continha: 10,0 μmoles de tampão fosfato pH 6,4, 2,0 μmoles de MgCl_2 , 2,0 μmoles de ATP, 1,0 μmol de glucose e extrato em concentrações de 65 a 520 μg de proteínas num volume de 0,1 ml. Esta mistura foi incubada por 3 minutos a 37° e a reação foi interrompida pelo aquecimento a 100° por 3 minutos. Após esta operação o volume da mistura foi elevado para 0,5 ml com água destilada e centrifugado a $3000 \times g$ por 5 minutos. No sobrenadante obtido foi dosada a glucose-6-P formada seguindo a redução do NADP a 340 nm, utilizando o seguinte sistema de incubação: 10,0 moles de tampão Tris-HCl pH 8,4, 0,4 μmoles de NADP, 2,0 μg de glucose-6-P desidrogenase, 0,1 ml do sobrenadante de $3000 \times g$, num volume final de 1,0 ml.

2. Frutoquinase (E.C.2.7.1.4): A dosagem da atividade de frutoquina-

se foi medida segundo o método de CRANE et al. (17). O sistema consistia em acumular frutose-6-P determinada posteriormente, acoplando-se as enzimas glucose-6-P isomerase e glucose-6-P desidrogenase. O extrato livre de células foi preparado empregando-se tampão fosfato 0.1M pH 6,4 e a mistura de incubação continha: 10,0 moles de tampão fosfato pH 6.4, 2,0 μ moles de $MgCl_2$, 2,0 μ moles de ATP, 1,0 μ mol de frutose e extrato nas concentrações de 65 a 520 μ g de proteínas num volume final de 0.1 ml. Esta mistura foi incubada por 3 minutos a 37^o e a reação interrompida por aquecimento a 100^o por 3 minutos. Após estas operações o volume da mistura foi elevado para 0,5 ml com água destilada e centrifugado a 3000xg por 5 minutos. No sobrenadante obtido foi dosada a frutose-6-P formada seguindo a redução do NADP a 340 nm utilizando o seguinte sistema de incubação: 10,0 μ moles de tampão Tris-HCl pH 8,4, 0,4 μ moles de NADP, 0,1 ml do sobrenadante de 3000xg, 1,0 μ g glucose-6-P isomerase, 2,0 μ g glucose-6-P desidrogenase em um volume final de 1,0 ml.

3. Fosfohexoisomerase (E.C.5.3.1.9): O método para dosagem de fosfohexoisomerase consiste na medida da frutose-6-P formada pelo método de ROE et alii. (62). A enzima foi extraída com tampão Tris-HCl 0,1M pH 7.0. A fosfohexoisomerase foi ensaiada num sistema de incubação de 1,0 ml contendo: 40,0 μ moles de tampão Tris-HCl pH 7,0, 5,0 μ moles de glucose-6-P e extrato livre de células em concentrações de 4,5 a 27 μ g de proteínas. O sistema foi incubado a 30^o durante 5 minutos. Após este período de incubação, a enzima foi inativada adicionando-se 3,0 ml de HCl (5:1). 1,0 ml do reagente re

sorcinol foi adicionado a seguir e o sistema foi aquecido a 80° por 10 minutos. A leitura foi feita a 540 nm em espectrofotometro Coleman modelo 6A. Controles para cada tubo foram feitos, onde a glucose-6-P era adicionada após a inativação da enzima pelo HCl. O tubo branco era constituído com todos os reagentes exceto o extrato. Curva padrão de frutose-6-P foi feita utilizando esta em concentrações que variaram de 0,05 a 0,7 μ moles.

4. Fosfofrutoquinase (E.C.2.1.11): A fosfofrutoquinase foi ensaiada segundo o método modificado de SILLERO et alii. (68), em que o tampão imidazol e o GTP foram substituídos por tampão glicilglicina - NaOH e ATP, uma vez que naquelas condições a atividade de fosfofrutoquinase era muito baixa. Para a extração da fosfofrutoquinase foi utilizada tampão glicilglicina-NaOH 0,1M pH 7,5 contendo mercaptoetanol 0,02M. Foi feito um sistema de incubação contendo 25,0 μ moles de tampão glicilglicina-NaOH pH 7,5, 5,0 μ moles de mercaptoetanol, 2,0 μ moles KCl, 5,0 μ moles de $MgCl_2$, 1,0 μ moles de ATP, 3,0 μ moles de frutose-6-P e extrato em concentrações de 73 a 292 μ g de proteínas num volume final de 0,1 ml. A mistura acima foi incubada por 5 minutos a 37° e a reação interrompida por aquecimento em banho-maria a 100° por 3 minutos. Após estas operações o volume da mistura foi elevada para 0,5 ml com água destilada e centrifugada a 3000xg por 5 minutos. No sobrenadante obtido foi dosada a frutose-1,6-difosfato acumulada seguindo a oxidação do NADH a 340 nm utilizando o seguinte sistema de incubação: 50,0 μ moles de glicilglicina NaOH pH 7,5 2,0 μ moles de mercaptoetanol, 2,0 μ moles de KCl, 0,1

µmoles de NADH, 2,0 µg de aldolase, 1,0 µg de triose - P isomerase, 1,0 µg α-glicerofosfato desidrogenase e 50,0 µl de sobrenadante de 3000xg num volume final de 1,0 ml. Além do controle sem substrato, foi feito um controle contendo todos os reagentes exceto ATP.

5. Aldolase (E.C.4.1.2.13): Foi empregado para determinação de aldolase o método indicado por RUTTER et al. (63), salvo que a solução tampão glicilglicina-NaOH foi substituída pela de Tris-HCl e a concentração de K^+ foi reduzida para um terço do método original, já que nestas condições observa-se maior atividade enzimática. As triosefosfatos resultantes da clivagem da frutose-1,6-diP foram medidas a triosefosfato isomerase através da oxidação do NADH e α-glicerofosfato empregando-se desidrogenase como enzimas reagentes. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,8, contendo mercaptoetanol 0,05 M e KCl 0,2M foram utilizados na extração da enzima. Em 1,0 ml do sistema de incubação estavam contidos: 50,0 µmoles de tampão Tris-HCl pH 7,8, 25,0 µmoles de mercaptoetanol, 100,0 µmoles de KCl, 2,0 µmoles frutose - 1,6-diP, 0,1 µmoles de NADH, 1,0 µg triosefosfato isomerase, 1,0 µg α-glicerofosfato desidrogenase e extrato nas concentrações de 51 a 204 µg de proteínas. Além do controle sem frutose-1,6-diP, foi feito outro para NADH oxidase, utilizando sistema sem frutose-1,6-diP e as enzimas acoplantes.

6. Triosefosfato isomerase (E.C.5.3.1.1): O método utilizado para a dosagem da atividade de triosefosfato isomerase é o apresentado por BERSENERZ (5). Gliceraldeído-3-fosfato é utilizado como substrato e a α-glicerofosfato desidrogenase como enzima acoplante. A enzima

foi extraída com tampão trietanolamina-HCl 0,1M pH 7,5 contendo EDTA 0,005M. A mistura de incubação completa continha em 1,0 ml: 80,0 μ moles tampão trietanolamina-HCl pH 7,5, 0,01 μ moles EDTA, 0,6 μ moles gliceraldeído-3-fosfato, 0,1 μ moles NADH, 1,0 μ g α -glicerofosfato desidrogenase e extrato em concentrações de 1,25 a 10,0 μ g de proteínas. Independente do controle sem gliceraldeído-3-fosfato foi feito um controle para NADH oxidase num sistema contendo todos os reagentes exceto gliceraldeído-3-fosfato e α -glicerofosfato desidrogenase.

7. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (E.C.1.2.1.12): A determinação da atividade de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi baseada no método de ALLISON (1), onde a frutose-1,6-diP substituiu o gliceraldeído-3-fosfato e foram incluídos aldolase e cisteína, como indica o sistema de incubação abaixo. A redução do NAD foi seguida a 340 nm. Aldolase e triosefosfato isomerase foram utilizados como enzimas acoplantes a fim de fornecer o substrato para a reação. A enzima foi extraída com tampão pirofosfato-HCl 0,03M pH 8,5, contendo cisteína 0,006M. O sistema de incubação continha: 21,0 moles de tampão pirofosfato-HCl pH 8,5, 4,0 moles de cisteína, 10,0 μ moles de frutose-1,6-diP, 0,8 μ moles de NAD, 15,0 μ moles de arseniato de sódio, 1,0 μ g de aldolase, 1,0 μ g de triosefosfato isomerase e extrato em concentrações que variaram entre 8,5 a 68 μ g de proteínas num volume final de 1,0 ml. A reação foi iniciada com a adição de arseniato.

8. Fosfogliceratoquinase (E.C.2.7.2.3): A atividade da enzima foi medida pelo método de BUCHER (10). Esta quinase pode ter sua atividade determinada tanto pela reação direta como pela reação no sentido

inverso. Na reação no sentido direto utiliza-se o DL-gliceraldeído-3-fosfato como substrato e segue-se o aumento da absorbância devido a redução do NAD. A determinação da atividade de fosfogliceratoquinase pelo processo inverso tem como substrato o 3-fosfoglicerato e verifica-se o decréscimo da absorbância devido a oxidação do NADH. No presente trabalho empregamos o ensaio no sentido inverso. A enzima foi extraída com tampão Mops-NaOH 0,1M pH 7,0. Em 1,0 ml do sistema de incubação estavam contidos: 40,0 μ moles de tampão Mops - NaOH pH 7,0, 5,0 μ moles de $MgSO_4$, 20,0 μ moles de cisteína, 5,0 μ moles de 3-fosfoglicerato, 0,1 μ moles de NADH, 2,0 μ moles de ATP, 1,0 μ g de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e extrato livre de células nas concentrações de 103 a 515 μ g de proteínas. Além do controle para substrato, foram feitos controles para NADH oxidase num sistema contendo todos os reagentes menos 3-fosfoglicerato e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e controle para ATP endógeno.

9. Fosfogliceromutase (E.C.2.7.5.3): A fosfogliceromutase foi ensaiada como descrita por GRISOLIA (26) com exceção da solução tampão que foi substituída por imidazol-HCl. Para medida da atividade da enzima fosfogliceromutase, a enolase foi purificada a partir de leveduras, segundo o método de WESTHEAD et al. (76). A extração da enzima foi feita com tampão imidazol-HCl 0,1M pH 7,6. O sistema de incubação completa continha em 1,0 ml: 10,0 μ moles de tampão imidazol-HCl pH 7,6, 1,0 μ mol de $MgSO_4$, 0,01 de μ moles EDTA, 5,0 μ g de 3-fosfoglicerato, 0,2 μ g enolase e extrato em concentrações de 51 a 408 μ g de proteínas. Na realização do ensaio, o aparelho foi cali -

brado com um sistema contendo todos os reagentes exceto o extrato livre de células. A atividade de fosfogliceromutase no extrato livre de células não dialisado não foi alterada quando se adicionava ao sistema 2,0 ou 5,0 μ moles de 2,3-difosfoglicerato.

10. Enolase (E.C.4.2.1.11): A atividade de enolase foi medida segundo o método de WESTHEAD et al. (76). Verifica-se a produção de fosfoenolpiruvato espectrofotometricamente a 240 nm. A enzima foi extraída usando tampão Tris-acetato 0,1M pH 7,4. A mistura de incubação de 1,0 ml continha: 50,0 μ moles de tampão Tris-acetato pH 7,4, 0,01 μ moles de EDTA, 5,0 μ moles de acetato de magnésio, 2,4 μ moles de 2-fosfoglicerato e extrato nas concentrações de 25 a 200 μ g de proteínas. Além do controle sem substrato, foi feito um sistema contendo todos os reagentes exceto o 2-fosfoglicerato.

11. Piruvatoquinase (E.C.2.7.1.40): A atividade de piruvatoquinase foi ensaiada acoplando-se a desidrogenase láctica e medindo a oxidação do NADH, segundo o método de BUCHER et al. (11), sendo que a solução tampão de trietanolamina foi substituída pela de Mops-NaOH na mesma ordem de grandeza de pH. O extrato livre de células foi preparado com tampão Mops-NaOH 0,1M pH 7,5. A mistura de incubação era composta de: 40,0 μ moles de tampão Mops-NaOH pH 7,5, 20,0 μ moles de KCl, 2,0 μ moles de $MgCl_2$, 4,0 μ moles de ADP, 0,1 μ moles de NADH, 4,0 μ moles de fosfoenolpiruvato, 1,0 μ g desidrogenase láctica e extrato livre de células em concentrações de 42 a 336 μ g de proteínas num volume total de 1,0 ml. Foi feito além do controle sem fosfoenolpiruvato, controle para ADP e controle para NADH oxidase.

12. Glucose-6-fosfato desidrogenase (E.C.1.1.1.49): A glucose-6-fosfato desidrogenase foi dosada segundo o método de NOLTMANN et alii (54), o qual consiste fundamentalmente em seguir a velocidade da reação dosando o NADPH formado. A extração da enzima foi realizada com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,4. A atividade de glucose-6-fosfato desidrogenase foi ensaiada no seguinte sistema de incubação: 10,0 μ moles de tampão Tris-HCl pH 8,4, 2,0 de μ moles $MgCl_2$, 2,0 μ moles 2,0 μ moles de glucose-6-P, 0,4 μ moles de NADP e extrato de concentrações de 13 a 130 μ g de proteínas num volume final de 1,0 ml.

13. 6-Fosfogluconato desidrogenase (E.C.1.1.1.44): A 6-fosfogluconato desidrogenase foi determinada pelo método de PONTREMOLI e alii (57), que consiste em seguir a velocidade de redução do NADP quando em presença de 6-fosfogluconato. A enzima foi extraída com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,4. A mistura de reação continha: 10,0 μ moles de tampão Tris-HCl pH 8,4, 2,0 μ moles de $MgCl_2$, 4,0 μ moles de 6-fosfogluconato, 0,3 μ moles de NADP e extrato em concentrações de 13 a 65 μ g de proteínas num volume final de 1,0 ml.

14. Fosforibose isomerase (E.C.5.3.1.6): O método adotado para determinar a atividade foi o de AXELROD et al. (4). A enzima foi extraída com tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0. Um sistema de incubação contendo : 50,0 μ moles de tampão Tris-HCl pH 7,0, 1,25 μ moles de ribose - 5 P, extrato nas concentrações de 4,2 a 16,8 μ g de proteínas, foi incubado a 37^o por 10 minutos. No final deste tempo, a ribulose-5-P formada, foi determinada pela técnica de DISCHE et al. (19). A cor desenvolvida após 30 minutos a 37^o foi medida em um espectrofotometro Co-

leman modelo 6A a 540 nm. Além do tubo branco sem extrato, foram feitos controles para cada tubo teste onde a ribose-5-P foi adicionada após a adição do H_2SO_4 . Curva padrão de ribulose-5-P também foi feita, utilizando a mesma em concentrações que variaram de 0,05 a 0,5 μ moles.

15. Transcetolase (E.C.2.2.1.1): O método utilizado para a dosagem da atividade de transcetolase é o apresentado por LA HABA et al. (36). A transcetolase catalisa a formação de gliceraldeído-3-P e heptulose 7-P a partir de uma mistura de ribulose-5-P e ribose-5-P. Na presença de triosefosfato isomerase e α -glicerofosfato desidrogenase, a triosefosfato é reduzida a α -glicerofosfato em presença de NADH, cujo o desaparecimento é medido espectrofotometricamente a 340 nm. O tampão glicilglicina-NaOH 0,1M, pH 7,4 foi a solução usada para a preparação do extrato livre de células. A mistura de incubação continha em um volume de 1,0 ml: 50 μ moles de tampão glicilglicina - NaOH pH 7,4, 5,0 μ moles $MgCl_2$, 01 μ moles de NADH, 50,0 μ g de tiamina pirofosfato, 7,0 μ moles da mistura de ribose-5-P e ribulose-5-P, 1,0 μ g de triosefosfato desidrogenase, 1,0 μ g de α -glicerofosfato desidrogenase e extrato nas concentrações que variaram de 33 a 264 μ g de proteínas. Além do controle sem a mistura de ribose-5-P e ribulose-5-P foi feito um controle para NADH oxidase.

16. Transaldolase (E.C.2.2.1.2): O método adotado para sua determinação é basicamente de VENKATARAMAN et al. (72), somente a solução tampão original foi substituída pela de Mops-NaOH, 0,1 ml pH 7,5. A dosagem de transaldolase é baseada na formação do gliceraldeído-3-P a partir de frutose-6-P e eritrose-4-P em reação reversa. Gliceraldeí-

do-3-P é determinado pela ação combinada de triosefosfato isomerase e α -glicerofosfato desidrogenase. Para a extração da transaldolase foi empregado tampão Mops-NaOH 0,1M pH 7,5. O sistema de incubação continha: 50,0 μ moles tampão Mops-NaOH pH 7,5, 2,0 μ moles de frutose-6-P, 2,0 μ moles de eritrose-4-P, 0,1 μ moles de NADH, 1,0 g de triosefosfato isomerase, 1,0 μ g de α -glicerofosfato desidrogenase e extrato livre de células nas concentrações de 17,5 a 240 μ g de proteínas, num volume final de 1,0 ml. Além do controle sem substrato foi feito um controle para NADH oxidase num sistema contendo todos os reagentes exceto eritrose-4-P e as enzimas acoplantes.

17. Fosfogluconato desidrase(E.C.4.2.1.12): A fosfogluconato desidrase é a enzima que converte o ácido 6-fosfogluconico a um fosfocetoácido, o 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato que pela ação de 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolase, dará piruvato e D-gliceraldeido-3-fosfato. As enzimas que constituem a via de ENTNER-DOUDOROFF foram pesquisadas através da formação de cetoácidos intermediários num sistema de incubação que continha: 50,0 μ moles de tampão Tris-HCl (pH 6,7, 7,6 e 8,2) 2,0 μ moles de glutation reduzido, 2,0 μ moles de FeSO_4 ou MnCl_2 e extrato em concentrações variáveis de proteínas (20 a 80 μ g). Após a pré-incubação a 37^o por 5 minutos foi adicionada à mistura anterior 2,0 μ moles 6-fosfogluconato e reincubadas a 37^o por 15 minutos. A presença de cetoácidos totais foi pesquisada pelo método de MacGEE et al (40) e piruvato pelo método de FRIEDEMANN et al. (22).

II. 7 UNIDADE DE ENZIMA E ATIVIDADE ESPECÍFICA:

Uma unidade de enzima, em todos os casos, foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1,0 micromol de substrato ou formação de 1,0 micromol de produto por minuto.

A atividade específica foi expressa pela relação entre as unidades de enzima por miligrama de proteína.

II. 8 ESTUDOS METABÓLICOS POR RADIORESPIROMETRIA:

A velocidade de evolução de $^{14}\text{CO}_2$ da oxidação de glucose marcada em átomos de carbono específicos foi medida de acordo com os métodos de WANG et alii. (74). Micélios de P. circinatus crescidos por 24 horas em meio contendo glucose a 0,5 g% e homogenizados com pérolas de vidro, foram utilizados nestes experimentos. Os micélios foram colhidos por filtração em papel Whatman n° 1 e lavados com tampão fosfato 0,1M pH 5,6. Os micélios assim obtidos foram ressuspensos em tampão fosfato 0,1 M pH 5,6 e submetidos ao jejum por 12 horas. Após este tempo de jejum, os micélios foram colhidos pelo processo já mencionado. Amostra de 50 mg, em peso úmido, de micélio foi previamente padronizada através de ensaios preliminares com glucose-U- ^{14}C (16×10^6 cpm/ml-220 $\mu\text{moles/ml}$). Os 50 mg de peso úmido de micélios foram suspensos em 2,9 ml de tampão fosfato 0,1M pH 5,6 e colocados em frascos com capacidade de 25 ml. Os frascos foram fechados com tampas de borracha transpassadas por fios de alumínio que suportavam 10 discos (6 mm de diâmetro) de papel de filtro Whatman n° 17, de tal modo que esses discos ficavam a uma altura média entre o fundo e o gargalo do

frasco e vedados, posteriormente, com papel parafinado. Ensaios preliminares, com $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (1.06×10^5 cpm/ μmol) foram feitas com o intuito de testar a recuperação de CO_2 usando β -feniletilamina como fixador de CO_2 (77) e verificou-se que cerca de 98 a 100% da radioatividade era recuperada sob as condições experimentais descritas .

0.1 ml de glicose (22 μmoles) especificamente marcada em diferentes átomos de carbono (D-glucose-1- ^{14}C : 5250 cpm/ μmol ; D-glucose - 3 - ^{14}C : 4690 cpm/ μmol ; D-glucose-3,4- ^{14}C : 4977 cpm/ μmol ; D-glucose - 6- ^{14}C : 4977 cpm/ μmol) eram adicionados aos frascos, com auxílio de uma seringa hipodérmica. Os frascos foram colocados em banho-maria Dubnoff Metabolic Shaking Incubator-GCA Corporation a 28° por tempos específicos de incubação. Ao final do tempo de incubação, 0,2 ml de β -feniletilamina era injetada através da tampa de borracha sobre os discos de papel de filtro com auxílio de seringa hipodérmica. Após esta etapa, 0,5 ml de ácido perclórico 4.5 M era injetado diretamente para a mistura de incubação a fim de parar a reação e converter qualquer bicarbonato em CO_2 . Os frascos foram mantidos no banho-maria com agitação por mais 30 minutos para permitir a absorção quantitativa de CO_2 . Ao final dos 30 minutos de incubação, fio de alumínio contendo os discos de papel embebidos com a base orgânica foi colocado em 10 ml do líquido de BRAY (9) e a radioatividade medida em um espectrometro de cintilação líquida Beckman LS-133 após 8 horas, tempo adequado para se obter cpm constantes. A mistura de incubação foi depois filtrada em Millipore e as células retidas no filtro foram lavadas exaustivamente com tampão fosfato 0,1 M pH 5.6. As células lavadas foram colocadas em 10 ml do líquido de BRAY

e a radioatividade medida. Esta radioatividade constitui o que se chama radioatividade incorporada. Alíquotas do líquido filtrado foram utilizadas para dosagem de glucose residual pelo método de glucose oxidase (31) bem como, para a medida da radioatividade residual. Controles foram feitos para a avaliação da interferência da β -feniletilamina e do Ácido perclórico, nas condições do ensaio, sobre a medida da radioatividade, corrigindo-os os valores obtidos nos ensaios. Os dados obtidos são médias aritméticas de dois experimentos.

RESULTADOS

Os resultados dos ensaios para a medida da atividade das enzimas das vias das pentoses fosfato e glicolítica, presentes em extrato livre de células de Polyporus circinatus, encontram-se nos gráficos de nº 1 e 16, mostrando que todas elas apresentaram linearidade em função da quantidade de enzima. As atividades específicas das enzimas detectadas estão relacionadas na tabela I.

1. Glucoquinase (E.C.2.7.1.1): Os ensaios preliminares indicaram que em pH próximos a 6.4 esta enzima não apresentava sua atividade máxima, o que está de acordo com os estudos realizados por MOURÃO (47). A atividade foi medida, no presente trabalho, seguindo-se a velocidade de formação de glucose-6-P através da redução de NADP, como pode ser verificado na figura nº 1.
2. Frutoquinase (E.C.2.7.1.4): O sistema de incubação para esta enzima é fundamentalmente igual ao da glucoquinase uma vez que em outros valores de pH a atividade enzimática era significativamente diminuída. A atividade de frutoquinase em função da concentração de enzima encontra-se na figura nº 2.
3. Fosfohexoisomerase (E.C.5.3.1.9): A atividade de fosfohexoisomerase foi medida através da formação de frutose-6-P. A quantidade de frutose-6-P formada é proporcional à concentração de enzima como mostra a figura nº 3.
4. Fosfofrutoquinase (E.C.2.7.1.11): As substituições indicadas nos métodos foram realizadas uma vez que o ótimo de atividade somente

era obtido quando o sistema de incubação era tamponado a pH 7.5 com glicilglicina-NaOH se bem que a enzima apresenta boa atividade na faixa de pH alcalino (7.5-8.0). A fosforilação da frutose-6-P só era obtida quando se utilizava o ATP como coenzima e somente na concentração ótima de 10 mM se obtinha proporcionalidade entre a velocidade de formação de frutose-1,6-diP e a concentração era substituído por GTP, não se observava atividade enzimática. A interferência de NADH oxidase na dosagem da fosfofrutoquinase foi eliminada inativando-se a enzima antes da determinação dos produtos formados. A figura nº 4 ilustra a velocidade de oxidação do NADH num sistema que continha frutose-1,6-diP acumulada pela ação da fosfofrutoquinase sobre a frutose-6-P.

5. Aldolase (E.C.4.1.2.13): As alterações sofridas na concentração de K^+ e no sistema tampão da mistura de incubação original, indicada em métodos, foram necessárias para se obter perfeita proporcionalidade entre a velocidade de reação e a concentração de enzima presente no extrato livre de células. A figura nº 5 ilustra a velocidade de oxidação do NADH pela ação de α -glicerofosfato desidrogenase e da triose fosfato isomerase e sobre as trioses fosfato formadas pela ação da aldolase presente no extrato livre de células.

6. Triosefosfato isomerase (E.C.5.3.1.1): Na figura nº 6 observa-se que a atividade de triosefosfato isomerase no extrato livre de células é proporcional à concentração de proteínas.

7. Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (E.C.1.2.1.12): O método

original foi modificado com a finalidade de obter o substrato da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase a partir da frutose 1,6 difosfato por ação da aldolase. A figura nº 7 representa a velocidade de redução do NAD pela ação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase sobre o gliceraldeído-3-P.

8. Fosfogliceratoquinase (E.C.2.7.2.3): Embora a velocidade da reação direta, isto é, de gliceraldeído-3-P para 3-fosfoglicerato, seja muito maior que da reação no sentido inverso, tem a desvantagem de sofrer interferência da triosefosfato isomerase e α -glicerofosfato desidrogenase, podendo estas reações se tornarem reações principais; razão pela qual no presente trabalho foi utilizada a reação no sentido inverso. A figura nº 8 mostra o efeito da concentração de fosfogliceratoquinase do extrato livre de células sobre o gliceraldeído-3-P. Isto é traduzido pela oxidação do NADH presente no sistema de incubação.

9. Fosfogliceromutase (E.C.2.7.5.3): A solução tampão do método original foi substituída por imidazol-HCl pH 7,6 por ser este pH no qual se observou a melhor atividade enzimática e além disso quando o sistema de incubação era tamponado a pH 7,6 com tampão Tris - HCl a atividade enzimática observada era inferior à anterior. A atividade de fosfogliceromutase foi medida pela velocidade de formação de fosfoenolpiruvato a 240 nm a partir de 3-fosfoglicerato, acoplado excesso de enolase. A figura nº 9 vê-se que a reação é proporcional à concentração de enzima.

10. Enolase (E.C.4.2.1.11): A figura nº 10 representa a velocidade

de formação de fosfoenolpiruvato a partir de 2-fosfoglicerato pela ação da enolase.

11. Piruvatoquinase (E.C.2.7.1.40): Embora se tenha empregado diferentes soluções tampão como trietanolamina-HCl, imidazol-HCl e Tris-HCl de mesma concentração molar e no mesmo pH do método original, somente foi possível obter o ótimo de atividade e linearidade de reação quando o sistema de incubação foi tamponado com Mops - NaOH. As atividades observadas quando o sistema era tamponado com trietanolamina-HCl, imidazol-HCl e Tris-HCl eram respectivamente 22,75 e 26% da observada quando tamponada com Mops-NaOH. A figura nº 11 ilustra a formação do piruvato a partir do fosfoenolpiruvato pela ação de piruvatoquinase. A velocidade de formação do piruvato é proporcional à concentração de enzima.

12. Glucose-6-fosfato desidrogenase (E.C.1.1.1.49): A figura nº 12 representa a velocidade de redução do NADP por um sistema que tinha por substrato glucose-6-P. NAD não pode substituir o NADP demonstrando que a enzima é completamente dependente de NADP.

13. 6-fosfogluconato desidrogenase (E.C.1.1.1.44): 6 fosfogluconato desidrogenase é também uma enzima NADP específica. Na presença de excesso de substrato, a velocidade de redução é proporcional à quantidade de enzima presente no sistema e é o que apresenta a figura nº 13.

14. Fosforibose isomerase (E.C.5.3.1.6): A figura nº 14 ilustra a atividade de fosforibose isomerase do extrato livre de células em função da concentração de proteínas.

15. Transcetolase (E.C.2.2.1.1): A figura n° 15 demonstra que a velocidade de formação de gliceraldeído-3-P medido através da oxidação do NADH em presença de α -glicerofosfato desidrogenase é proporcional à concentração de enzima.

16. Transaldolase (E.C.2.2.1.2): Das diferentes soluções tampões utilizadas nos ensaios preliminares, somente aquela preparada a partir do Mops-NaOH mostrou-se adequada para o estudo desta enzima. As atividades observadas quando o sistema era tamponado com trietanolamina-HCl, Tris-HCl e glicilglicina-NaOH foram respectivamente 3,5, 13 e 26% da observada quando tamponada com Mops-NaOH. A figura n° 16 ilustra a formação de gliceraldeído-3-P a partir de frutose-6-P e eritrose-4-P pela ação da transaldolase. A velocidade de formação do gliceraldeído-3-P foi medida através da oxidação do NADH em presença de triosefosfato isomerase e α -glicerofosfato desidrogenase.

Na tabela I estão resumidas as atividades específicas das enzimas do ciclo das pentoses fosfato e da cadeia glicolítica.

17. Fosfogluconato desidrase (E.C.4.2.1.12): Não foi possível detectar a atividade da fosfogluconato desidrase nas diferentes condições testadas, indicando que a via ED não é operativa na forma micelial do fungo.

Ensaio radiorespirométrico: A figura n° 17 ilustra o ensaio radiorespirométrico com células não proliferantes e jejuadas, observando-se uma rápida evolução de $^{14}\text{CO}_2$ a partir das glucoses especificamente marcadas. Sendo a evolução de $^{14}\text{CO}_2$ diferentes ^{14}C C_2 > ^{14}C C_{3-4} > ^{14}C C_3 > ^{14}C C_1 , o que indicaria ser a via EMP preferencial em todos os tempos

da experiência.

Os dados da tabela II correspondem à uma incubação de 8 horas quando não havia mais glucose detectável no meio pela técnica da glucose oxidase (31). Portanto a radioatividade medida no meio deve corresponder a outros compostos provenientes do catabolismo do fungo, motivo pelo qual o cálculo da percentagem de participação relativa das vias ficou prejudicado.

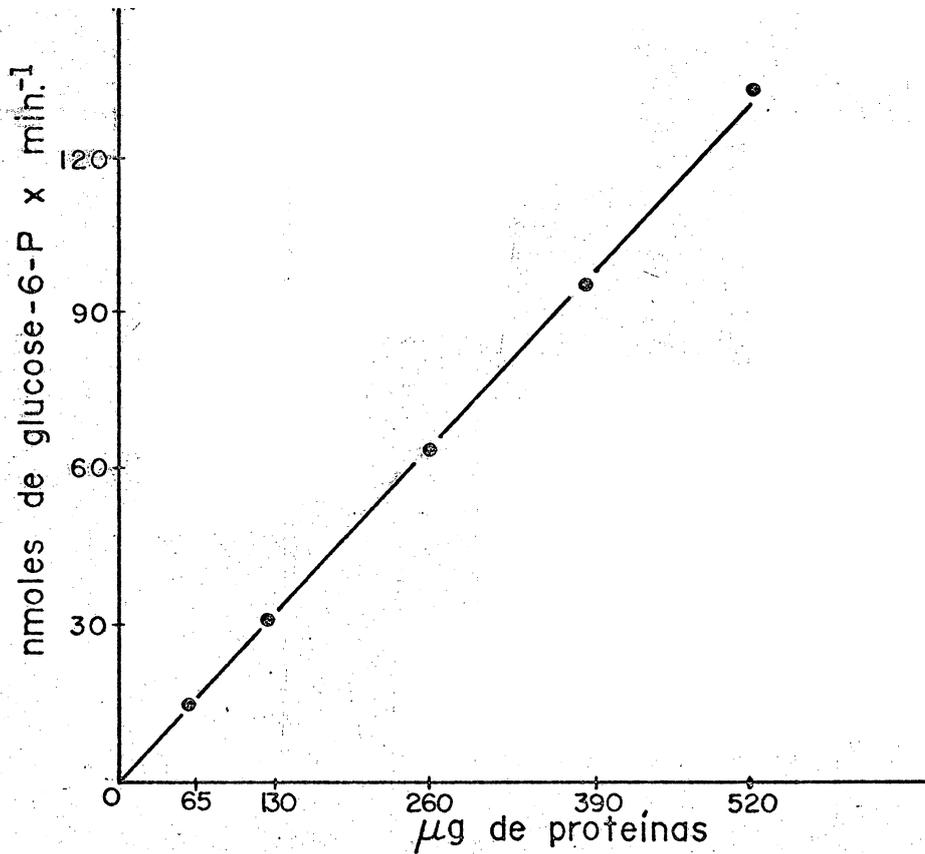


Fig. 1 Medida da Atividade de Glucoquinase

Sistema de incubação: 10,0 μmoles de tampão fosfato pH 6,4; 2,0 μmoles de MgCl_2 ; 2,0 μmoles de ATP ; 1,0 μmol de glucose e quantidades variáveis de proteínas.

Volume final de 1,0 ml.

A glucose-6-P acumulada foi dosada conforme descrito em Materiais e Métodos.

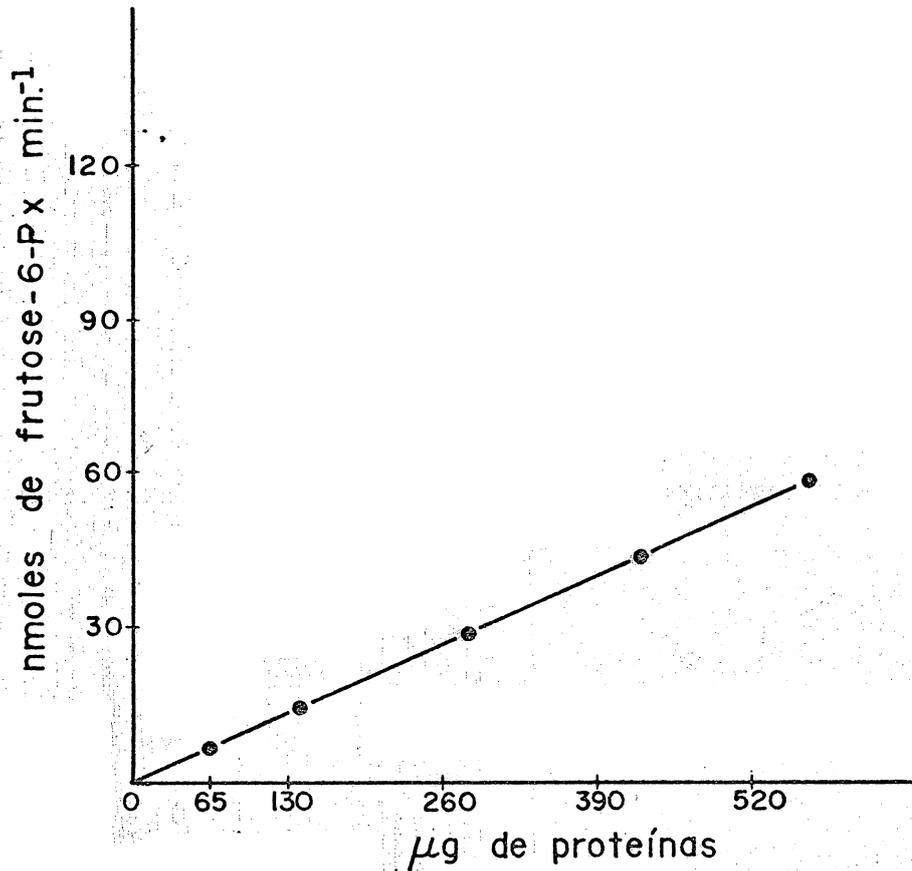


Fig. 2 Medida da Atividade de Frutoquinase

Sistema de incubação: 10,0 μmoles de tampão fosfato pH 6,4; 2,0 μmoles de MgCl₂ 2,0 μmoles de ATP; 1,0 μmol de frutose e quantidades variáveis de proteínas.

Volume final de 1,0 ml.

A frutose-6-P acumulada foi dosada conforme descrito em Materiais e Métodos.

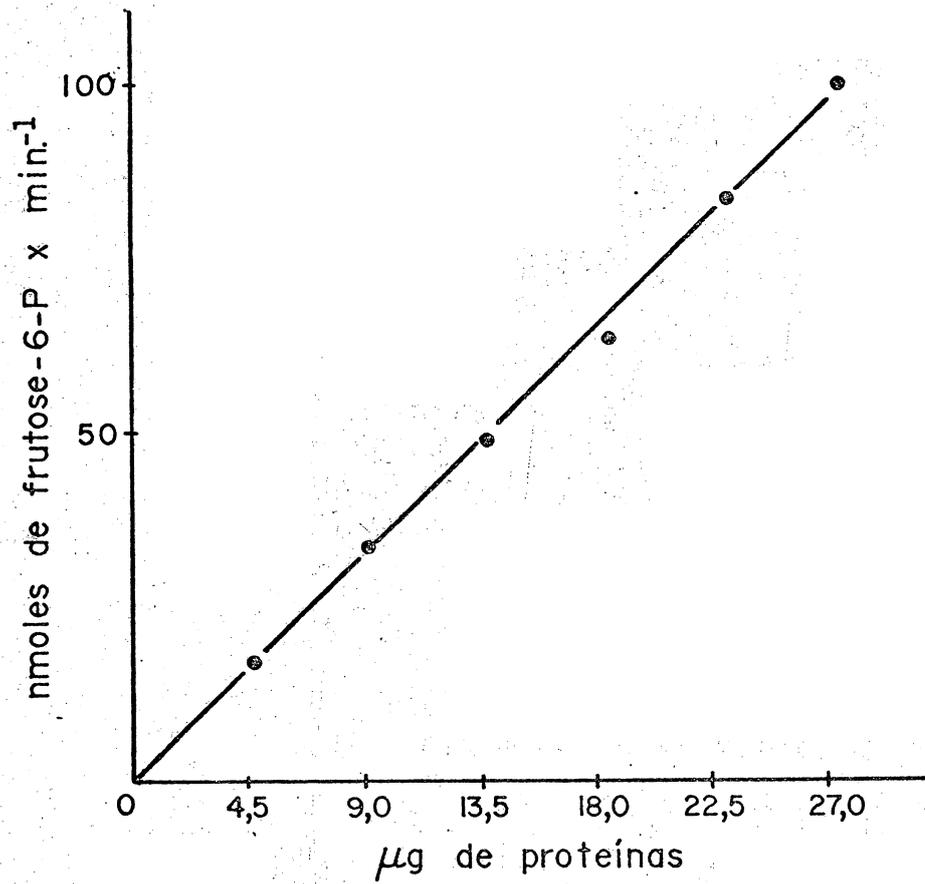


Fig. 3 Medida da Atividade de Fosfohexoisomerase
Sistema de incubação: 40,0 µmoles de tampão Tris-HCl
pH 7,0; 5,0 µmoles de glucose-6-P e quantidades va-
riáveis de proteínas.
Volume final de 1,0 ml.
A frutose-6-P acumulada foi dosada conforme descrito
em Materiais e Métodos.

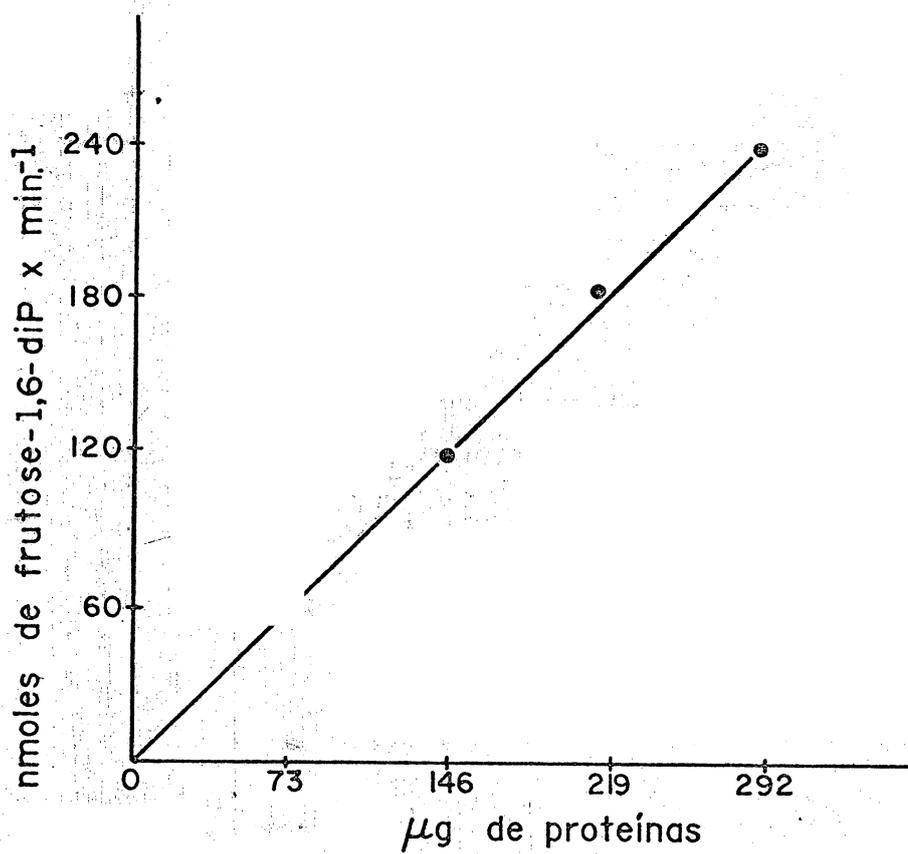


Fig. 4 Medida da Atividade de Fosfofrutoquinase

Sistema de incubação: 25,0 μmoles de tampão glicilglicina-NaOH pH 7,5; 5,0 μmoles de Mercaptoetanol; 2,0 μmoles de KCl; 5,0 μmoles de MgCl₂; 1,0 μmol de ATP; 3,0 μmoles de frutose-6-P e quantidade variáveis de proteínas.

Volume final de 0,1 ml.

A frutose-1,6-diP acumulada foi dosada conforme descrito em Materiais e Métodos.

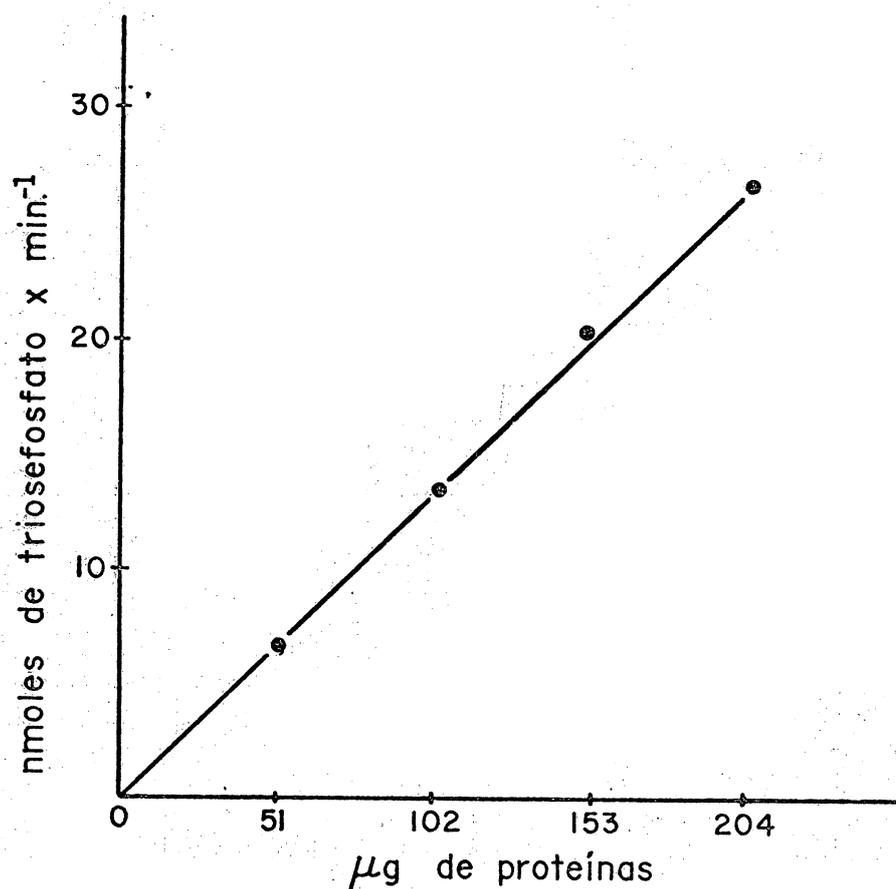


Fig. 5 Medida da Atividade de Aldolase

Sistema de incubação: 50,0 μmoles de tampão Tris-HCl pH 7.8; 25,0 μmoles de mercaptoetanol; 100,0 μmoles de KCl; 2,0 μmoles de frutose-1,6-diP; 0,1 μmol de NADH 1,0 μg de triosefosfato isomerase; 1,0 μg de α-glicerofosfato desidrogenase e quantidades variáveis de proteínas.

Volume final de 1,0 ml.

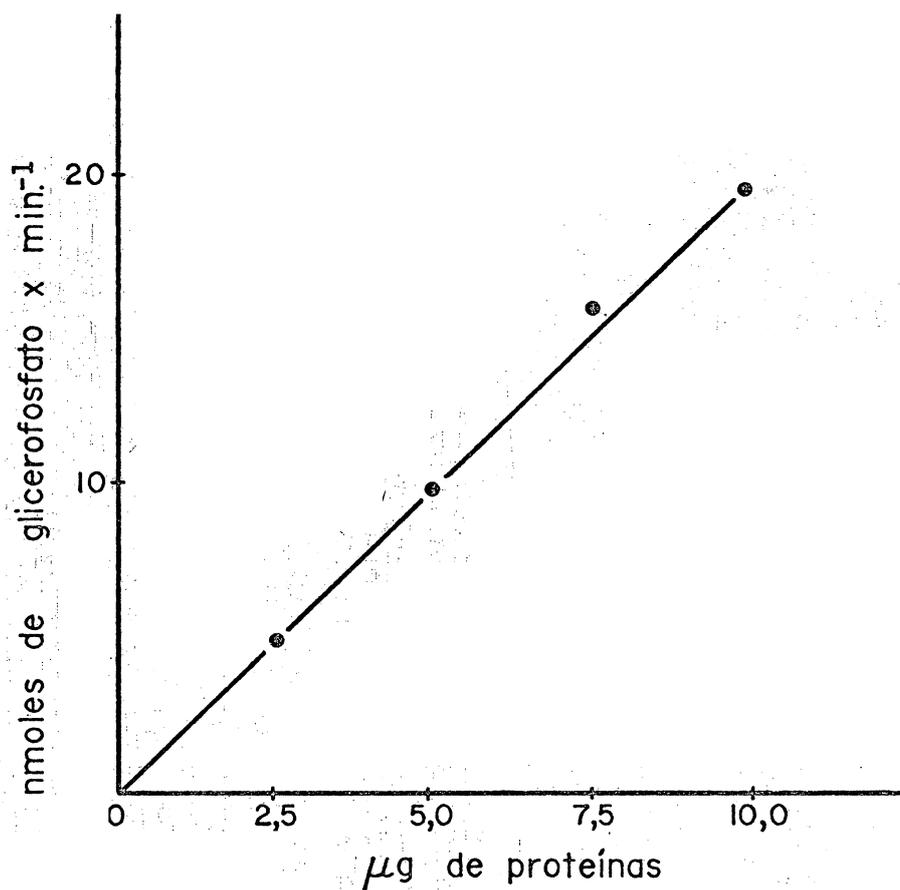


Fig. 6 Medida da Atividade de Triosefosfato isomerase
Sistema de incubação: 80,0 µmoles de tampão tri
etanolamina-HCl pH 7,5; 0,01 µmoles de EDTA ;
0,60 µmoles de gliceraldeído-3-P; 0,10 µmoles
de NADH; 1,0 µg de α-glicerofosfato desidroge-
nase e quantidades variáveis de proteínas.
Volume final de 1,0 ml.

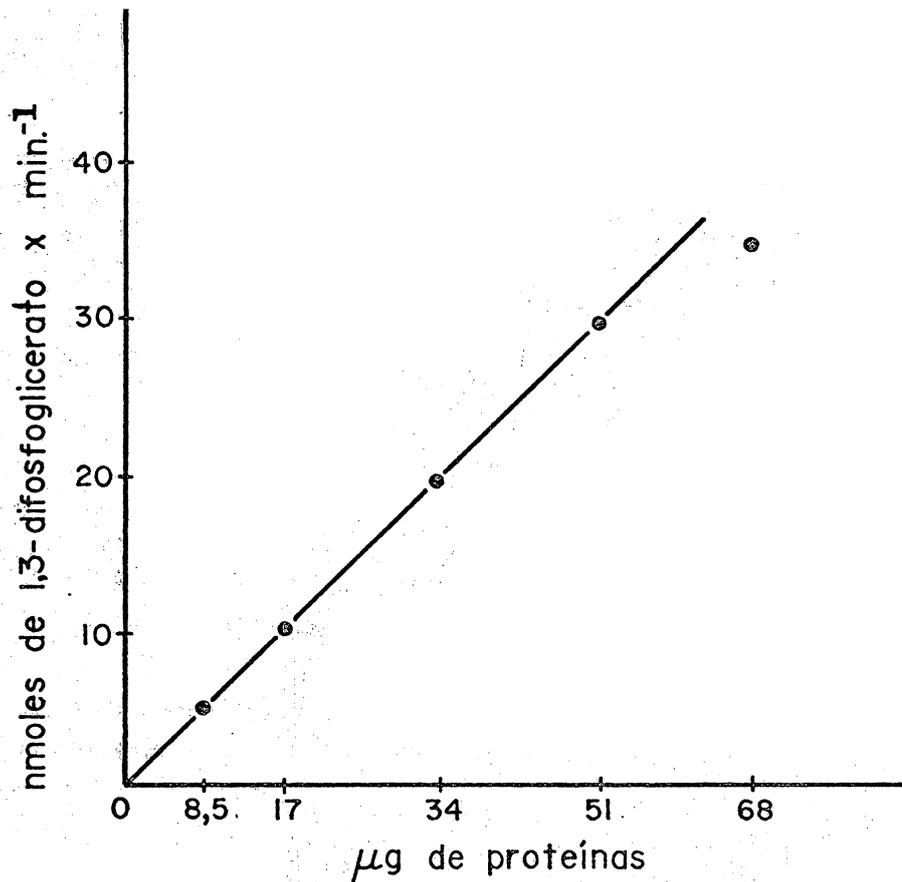


Fig. 7 Medida da Atividade de Gliceraldeído-3-P desidrogenase
Sistema de incubação: 21,0 µmoles de tampão pirofosfato-HCl pH 8,5; 4,0 moles de cisteína; 10,0 µmoles de frutose-1,6-diP; 0,8 µmoles de NAD⁺; 15,0 µmoles de Arseniato de sódio; 1,0 µg de aldolase; 1,0 µg de triose fosfato isomerase e quantidades variáveis de proteínas. Volume final de 1.0 ml.

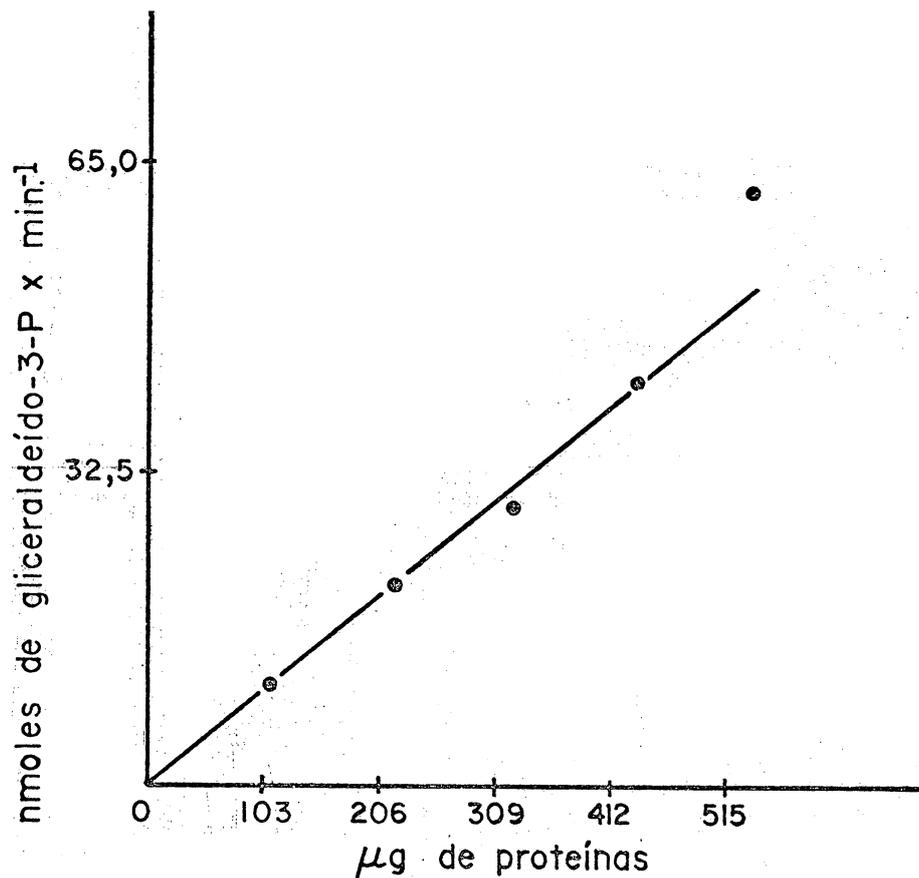


Fig. 8 Medida da Atividade de Fosfogliceratoquinase

Sistema de incubação: 40,0 µmoles de tampão Mops-NaOH pH 7,0; 5,0 µmoles de MgSO₄ 20,0 µmoles de cisteína; 5,0 µmoles de 3-fosfoglicerato; 0,1 µmoles de NADH; 2,0 µmoles de ATP 1,0 µg de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e quantidades variáveis de proteínas. Volume final de 1,0 ml.

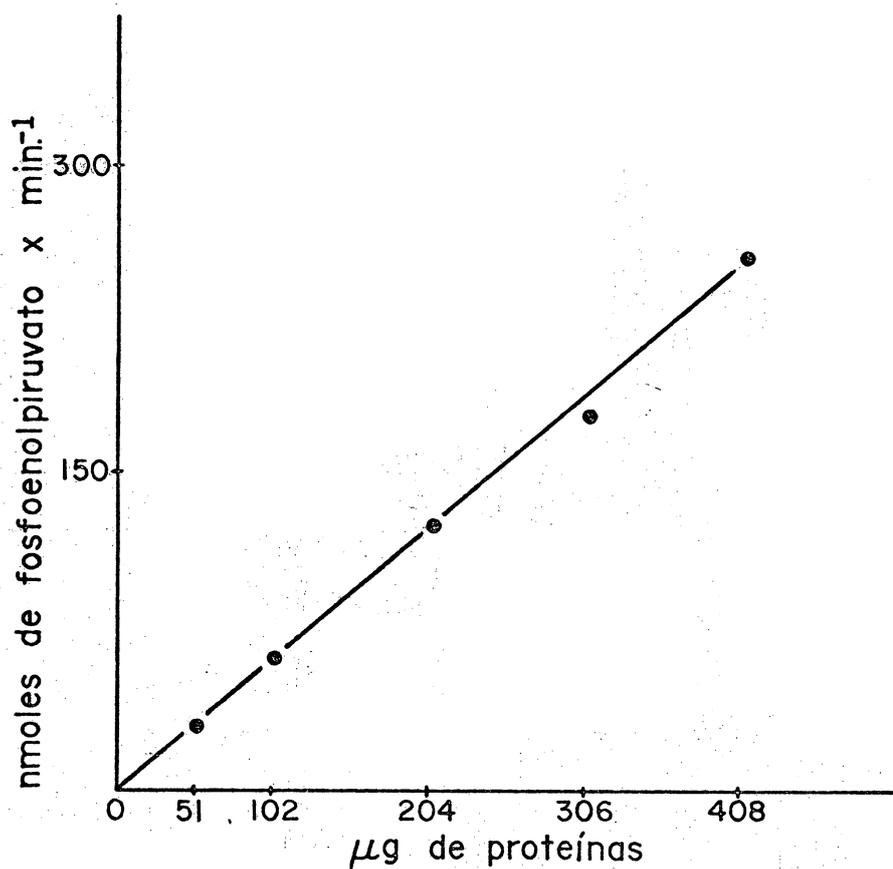


Fig. 9 Medida da Atividade de Fosfogliceromutase

Sistema de incubação: 10,0 μ moles de tampão imidazol-HCl pH 7,6; 1,0 μ mol de $MgSO_4$; 5,0 μ moles de 3-fosfoglicerato; 0,01 μ moles de EDTA; 0,2 μ g de enolase e quantidades variáveis de proteínas.
Volume final de 1,0 ml.

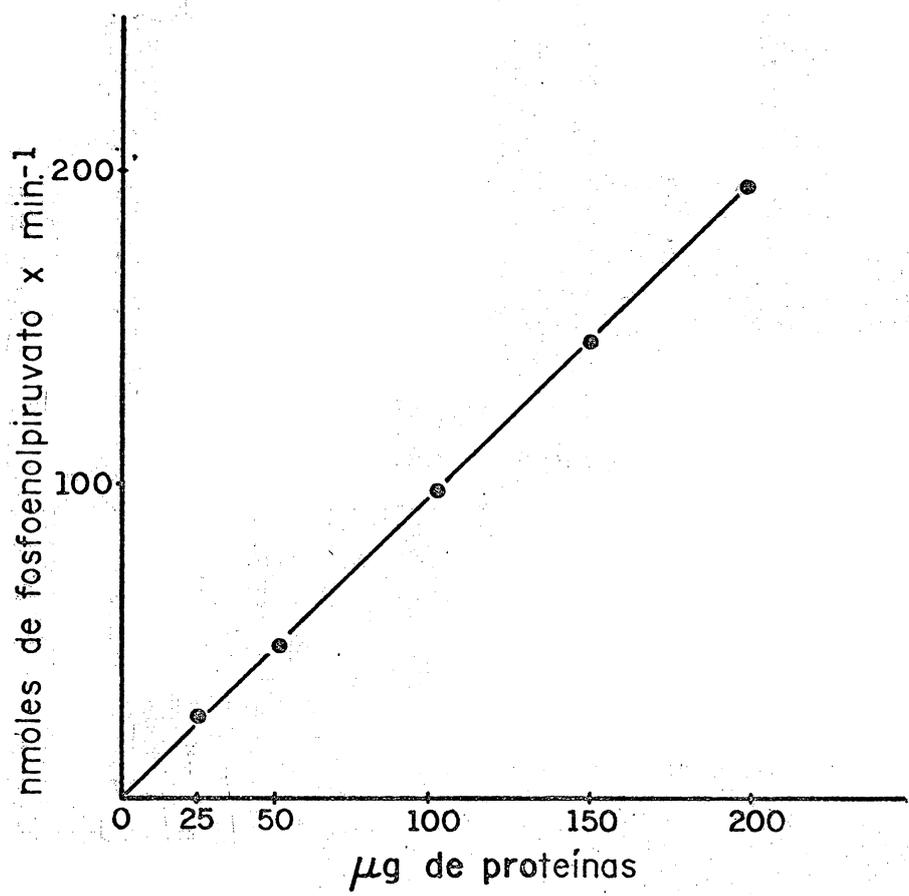


Fig. 10 Medida da Atividade de Enolase

Sistema de incubação: 50,0 µmoles de tampão Tris-acetato pH 7,4; 0,01 µmoles de EDTA; 5,0 µmoles de acetato de magnésio; 2,4 µmoles de 2-fosfoglicerato e quantidades variáveis de proteínas.
Volume final de 1,0 ml.

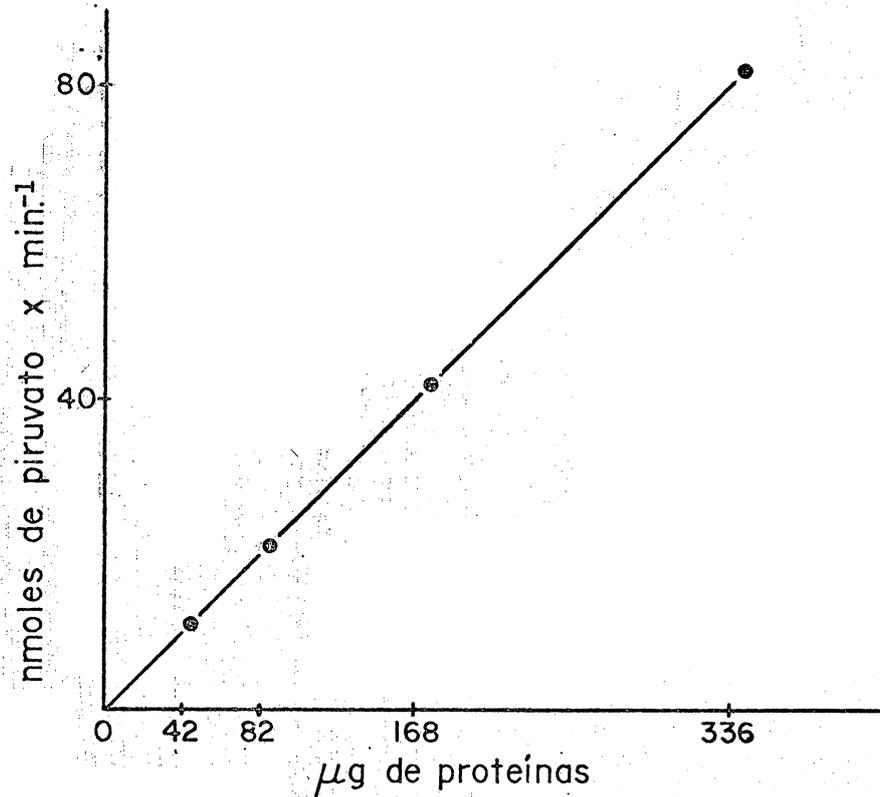


Fig. 11 Medida da Atividade de Piruvatoquinase

Sistema de incubação: 40,0 µmoles de tampão

Mops-NaOH pH 7,5; 20,0 µmoles de KCl; 2,0 µmo

les de MgCl₂; 4,0 µmoles de ADP; 0,1 µmoles

de NADH; 4,0 µmoles de fosfoenolpiruvato - K;

1,0 µg de desidrogenase lática e quantidades
variáveis de proteínas.

Volume final de 1,0 ml.

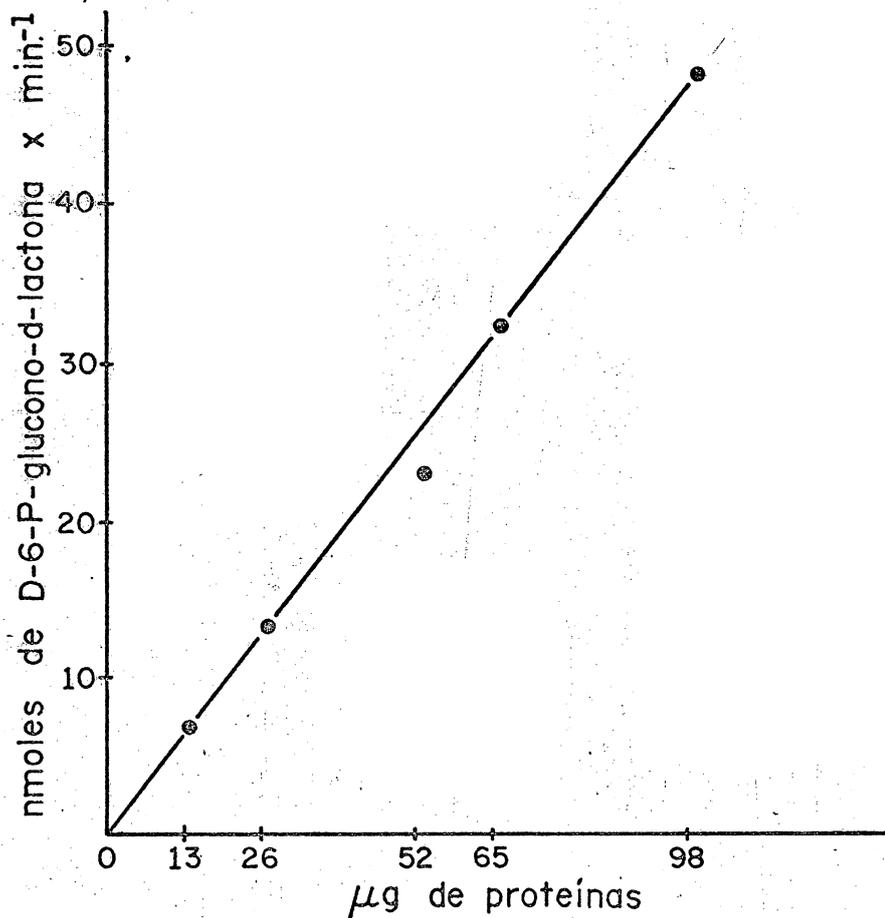


Fig. 12 Medida da Atividade de Glucose-6-P desidrogenase

Sistema de incubação: 10,0 µmoles de tampão Tris-HCl pH 8,4; 2 µmoles de MgCl₂; 0,40 µmoles de NADP⁺; 2,0 µmoles de glucose-6-P e quantidades variáveis de proteínas.

Volume final de 1,0 ml.

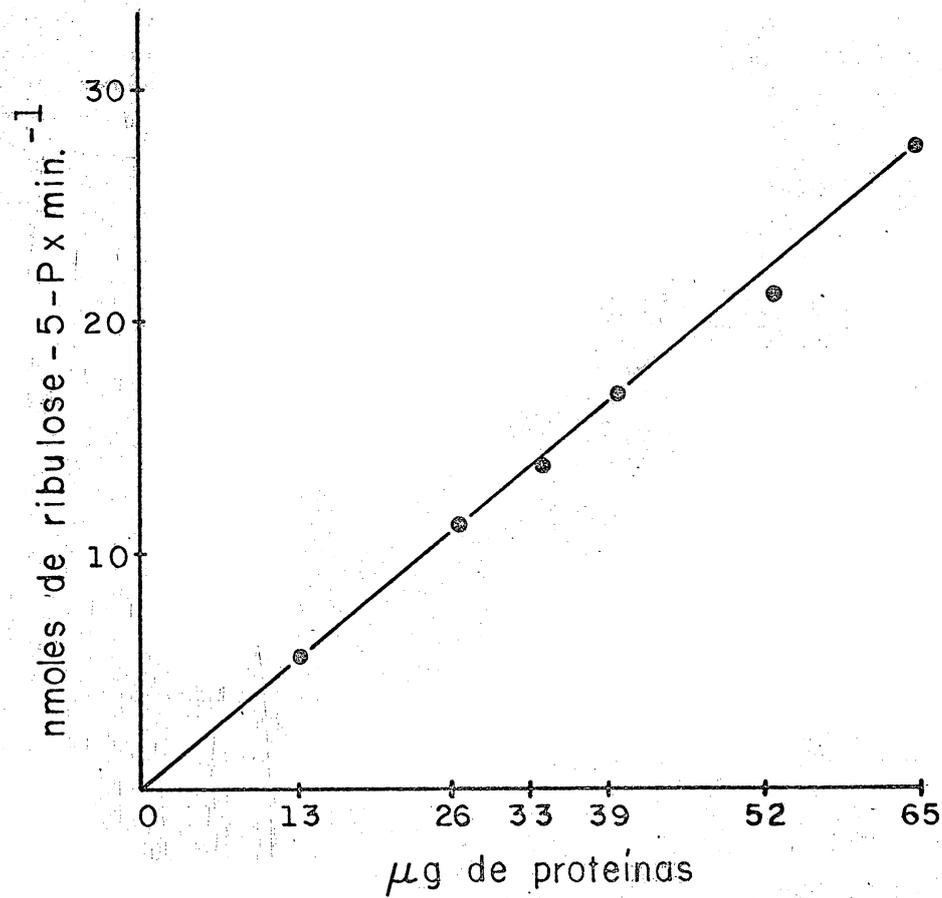


Fig. 13 Medida da Atividade de Fosfogluconato desidrogenase
Sistema de incubação: 10,0 μmoles de tampão Tris -
HCl pH 8,4; 2,0 μmoles de MgCl₂; 4,0 μmoles de 6 -
fosfogluconato; 0,3 μmoles de NADP⁺ e quantidades va
riáveis de proteínas.
Volume final de 1,0 ml.

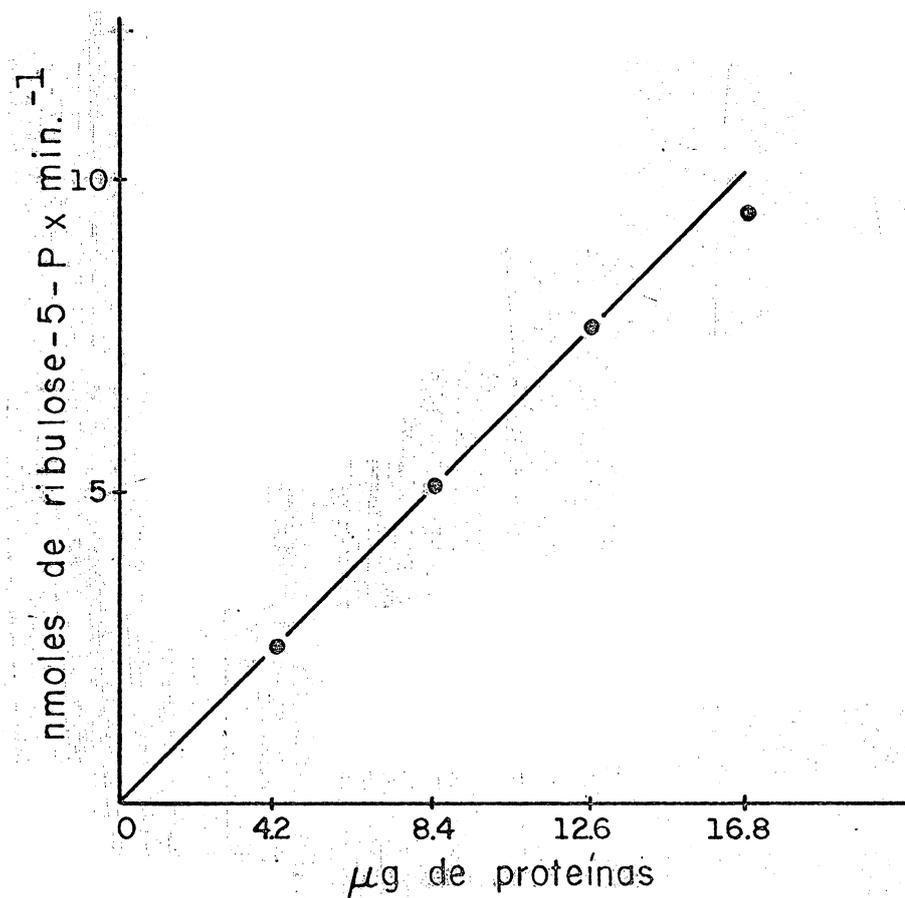


Fig. 14 Medida da Atividade de Fosforibose isomerase

Sistema de incubação: 50,0 µmoles de tampão Tris-HCl pH 7,0; 1,25 µmoles de ribose-5-P e quantidades variáveis de proteínas.

Volume final de 1,0 ml.

A ribulose-5-P acumulada foi dosada conforme descrito em Materiais e Métodos.

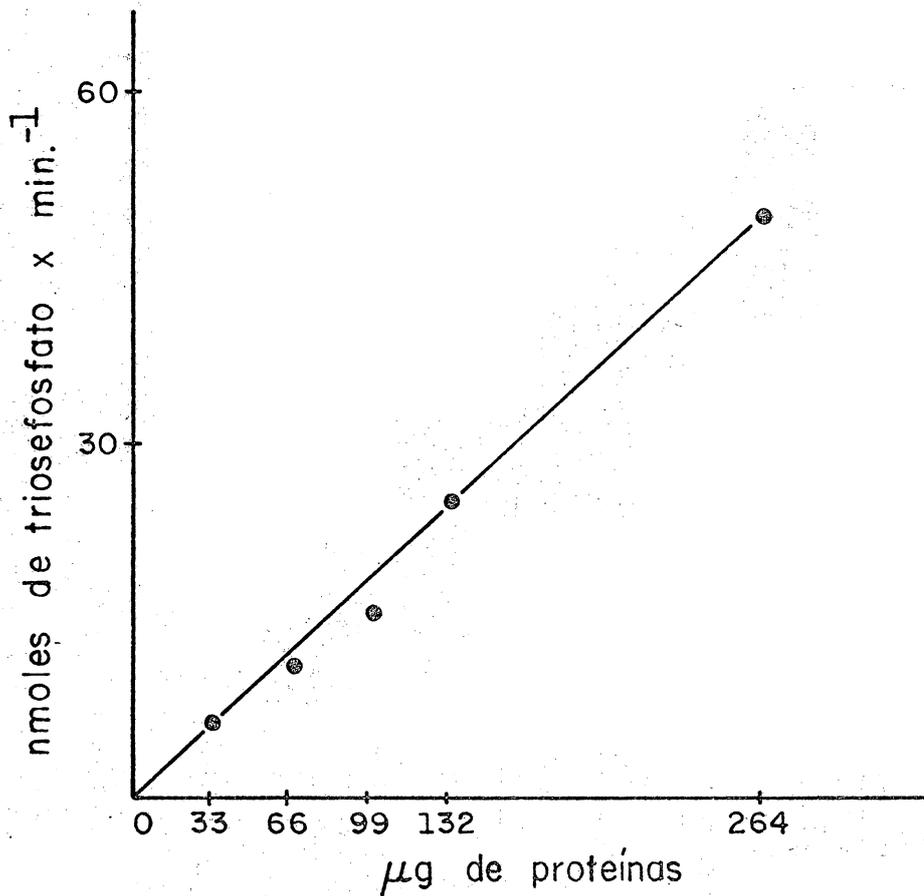


Fig. 15 Medida da Atividade de Transcetolase

Sistema de incubação: 50,0 µmoles de tampão glicil glicina-NaOH pH 7,4; 5,0 µmoles de MgCl₂; 0,1 µmoles de NADH; 50,0 µg de tiamina pirofosfato; 7,0 µmoles da mistura de ribose-5-P e ribulose-5-P ; 1,0 µg de triosefosfato isomerase; 1,0 µg de α-glicerofosfato desidrogenase e quantidades variáveis de proteínas.

Volume final de 1,0 ml.

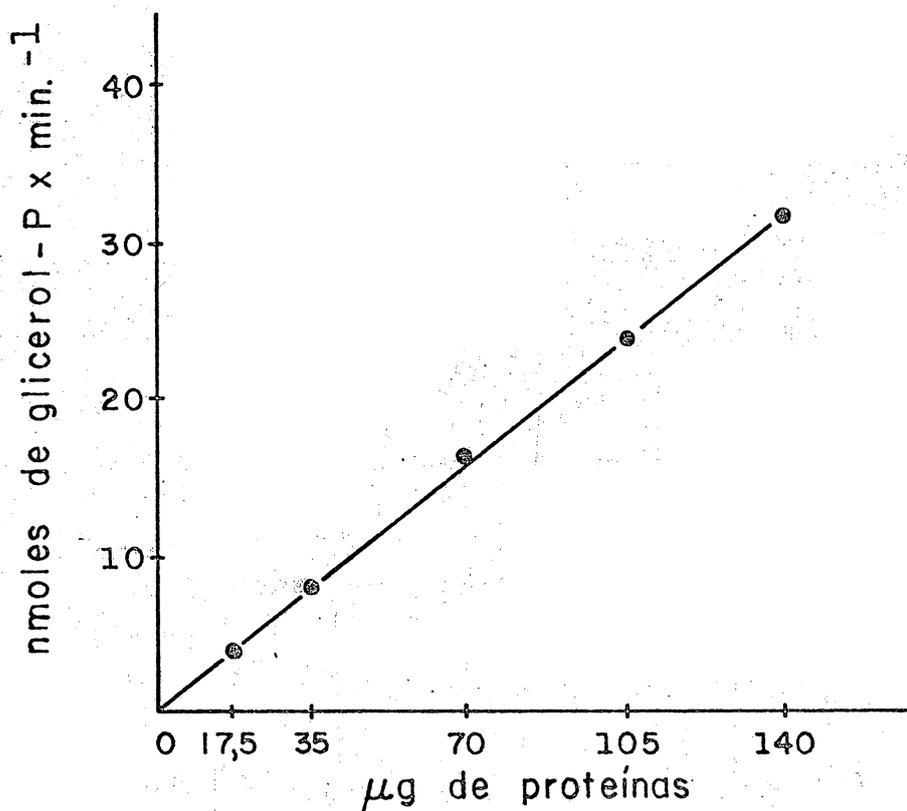


Fig. 16 Medida da Atividade de Transaldolase

Sistema de incubação: 50,0 μmoles de tampão Mops - NaOH pH 7,5; 2,0 μmoles de frutose-6-P 2,0 μmoles de eritrose-4-P; 0,1 μmoles de NADH; 1,0 μg de tri_osefosfato isomerase; 1,0 μg de α -glicerofosfato desidrogenase e quantidades variáveis de proteínas. Volume final de 1,0 ml.

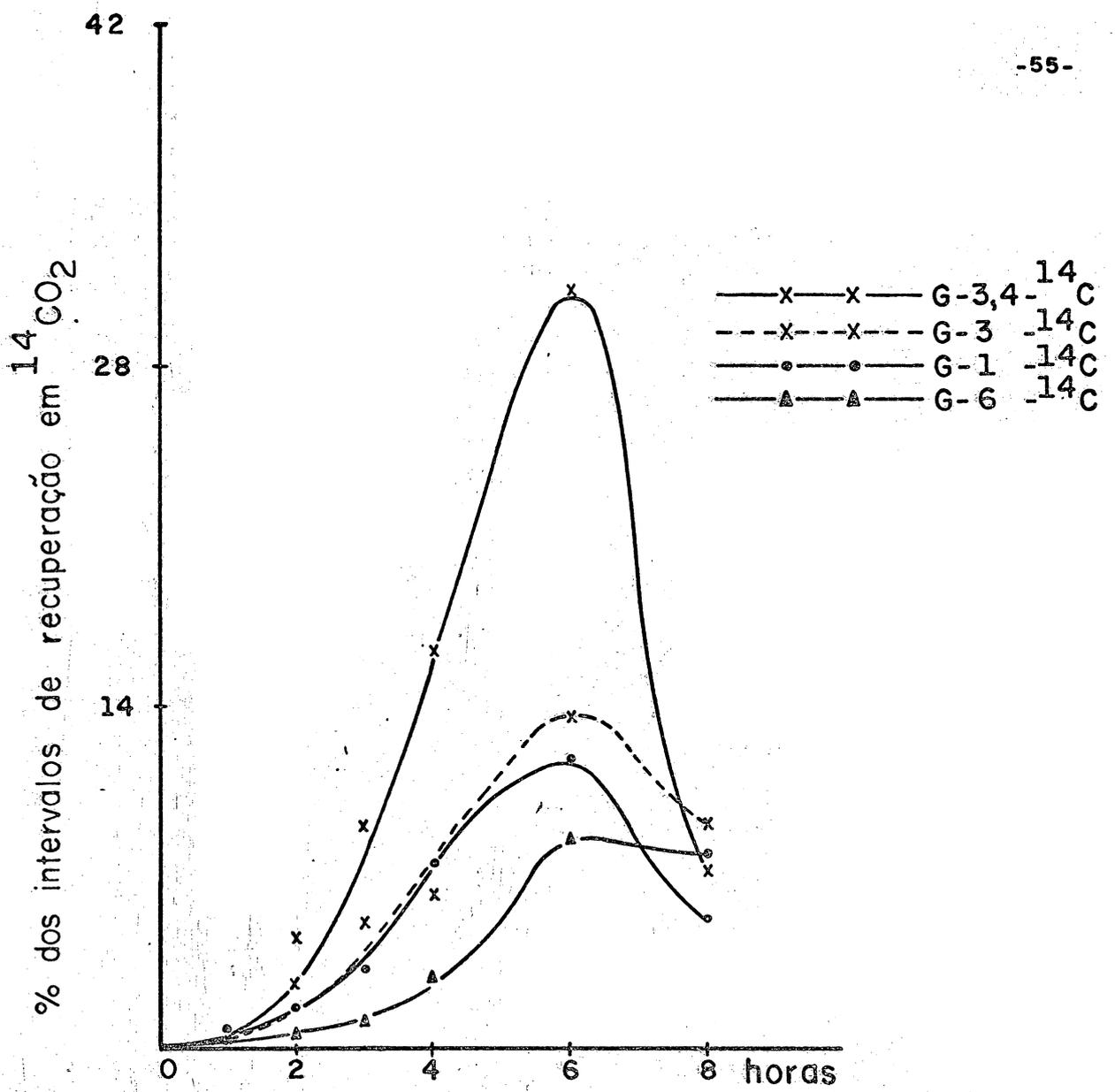


Fig. 17 Diagrama Radiorespirométrico de Utilização de Glucoses por células de *P. circinatus*. Condições técnicas segun Materials e Métodos.

TABELA I

Atividades enzimáticas em extrato livre de células
de P. circinatus

E.C.	Enzima	Atividade específica
2.7.1.1	Glucocquinase	0,253
2.7.1.4	Frutoquinase	0,128
5.3.1.9	Fosfohexoisomerase	3,496
2.7.1.11	Fosfofrutoquinase	0,764
4.1.2.13	Aldolase	0,122
5.3.1.1	Triosefosfato isomerase	1,700
1.2.1.12	Gliceraldeido-3 P desidrogenase	0,525
2.7.2.3	Fosfogliceratoquinase	0,100
2.7.5.3	Fosfogliceromutase	0,603
4.2.1.11	Enolase	0,980
2.7.1.40	Piruvatoquinase	0,264
1.1.1.49	Glucose-6-P desidrogenase	0,492
1.1.1.44	6-Fosfogluconato desidrogenase	0,428
5.3.1.6	Fosforibose isomerase	0,595
2.2.1.1	Transcetolase	0,160
2.2.1.2	Transaldolase	0,228

TABELA II

Utilização de (^{14}C) - glucose por células não proliferantes
de Polyporus circinatus

Substratos	Recuperação isotópica (%)		
	CO_2	Células	Meio
Glucose-1- ^{14}C	5,29	34,02	59,02
Glucose-3- ^{14}C	9,25	22,38	51,46
Glucose-3,4- ^{14}C	7,43	27,95	44,01
Glucose-6- ^{14}C	7,90	31,60	53,44

DISCUSSÃO

A análise da distribuição das vias nas diferentes espécies estudadas demonstra grande variabilidade quanto a percentagem de participação das mesmas. Enquanto na maioria das espécies dos fungos a via glicolítica predomina, em outras, a glucose é metabolizada pelas vias hexosemonofosfato e ou ENTNER-DOUDOROFF, como é o caso de C. fumago (59), T. caries (48) e A. tumefaciens (2).

Os dados sobre o metabolismo intermediário em fungos apodrecedores de madeira são escassos e imprecisos como a de C. cerebella (6), M. tremellosus, M. confluens e F. annosus (55,56).

A simples detecção ou determinação de atividade específica das enzimas pertencentes a diferentes vias metabólicas, pode ser suficiente para constatar se determinada via existe mas não nos permite concluir se ela é ou não operante. Assim, extratos livres de células de Neisseria gonorrhoeae (46) mostram atividades de todas as enzimas da EMP, HMP e ED, contudo, ensaios radiorespirométricos indicam que a EMP não é operante neste microrganismo, sendo operantes apenas a HMP e ED.

Por outro lado, somente a dosagem de $^{14}\text{CO}_2$ liberados durante o metabolismo de glucoses radioativas, marcadas em diferentes átomos de carbono não é condição suficiente para afirmar conclusivamente que uma determinada via é completa e ou operante, já que certos organismos podem utilizar partes de diferentes vias para metabolizar completamente o substrato em questão. Assim, o A niger (14) primeiro oxida a glucose a ácido glucônico e este a ácido 2-cetoglu

cônico e somente após essa transformação é que ele entra na via de HMP para ser oxidado.

O estudo comparativo das atividades dos diferentes organismos (69,58,29) mostra que na maioria das enzimas estudadas, o extrato livre de células de P. circinatus apresenta atividades maiores em relação a esses organismos. Pode-se então, de modo mais conclusivo, afirmar que o P. circinatus possui as enzimas de ambas as vias. A presença de todas as enzimas da EMP e da HMP ensaiadas indicam que a forma vegetativa de P. circinatus, potencialmente utiliza ambas as vias para a oxidação da glucose semelhantemente a outros fungos aqui mencionados.

Os dados radiorespirométricos obtidos são evidências de que ambas as vias são operantes nas formas vegetativas de P. circinatus. Na figura nº 17 observa-se uma rápida evolução de $^{14}\text{CO}_2$ da glucose-3,4- ^{14}C , a qual atinge o máximo após 6 horas de incubação o que sugere uma maior participação da via EMP em P. circinatus. O fato de $\text{C}_3 > \text{C}_1$ reflete a operação preferencial pelo EMP.

Analisando ainda o gráfico, (Fig.17) observa-se que a evolução de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glucose-1- ^{14}C é significativamente maior que o da glucose-6- ^{14}C até a 6ª hora, observando-se uma inversão quando a glucose do meio era totalmente consumida. A variação na participação das vias indicada por esta alteração poderia ser explicada pela troca na concentração do substrato (34).

A capacidade do extrato livre de células de P. circinatus produzir 6-fosfogluconato, implica no fato que as vias HMP ou ED ou

ambas sejam operantes neste organismo. Como as duas enzimas chaves da ED, isto é, a 6-fosfogluconato desidrase e a 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconatoaldolase não foram detectadas, a via HMP seria a aquela operante uma vez que foi demonstrada a presença da 6-fosfogluconato desidrogenase, transaldolase e transcetolase, enzimas da via HMP (tabela I).

Os dados da tabela II demonstram que a radioatividade é significativamente incorporada à célula, indicando que os substratos radioativos foram utilizados para a síntese de material celular. Por outro lado, observa-se uma alta percentagem de radioatividade residual, não glucose, sugerindo a permanência no meio de compostos que não foram totalmente metabolizados.

A extensão da participação dessas vias no metabolismo total não pode ser quantitativamente determinada sem informações adicionais como por exemplo, dados que indiquem o quanto de substrato radioativo foi utilizado para biossíntese de glicogênio, ácidos graxos, lactose, glucoronides e o quanto de radioatividade que permanece em unidades de três átomos de carbono (triosesfosfatos, lactato, piruvato) que não foram totalmente metabolizados (34).

Os dados de utilização da glucose pelo Polyporus circinatus são típicos de um organismo que utiliza principalmente a cadeia glicolítica e em menor extensão a via de clivagem do fosfogluconato. Igualmente, os resultados radiorespirométricos e as atividades específicas das enzimas ensaiadas dessas vias sugerem que a cadeia glicolítica e o ciclo das pentoses fosfato estão presentes e operantes em P. circi-

natus.

Pela análise cuidadosa dos ensaios radiorespirométricos realizados na maioria dos fungos aqui mencionados (74,44,2) e mesmo em bactéria (46) observa-se que as percentagens de participação da HMP são sempre inferiores a da EMP, a despeito do fato de que estes organismos sejam preferencialmente aeróbicos. Embora a baixa percentagem de participação da via HMP, seja um fato comprovado nesses organismos, ela possui funções importantes como o fornecimento de pentose fosfato para biossíntese de nucleotídeos e de equivalentes de redução na forma de NADPH para biossíntese de ácidos graxos. Estes requerimentos são variáveis, de modo que, o mecanismo regulatório se adapta a velocidade do ciclo total de acordo com as necessidades. Esta regulação provavelmente ocorre nas etapas iniciais da HMP, ou seja, ao nível das reações catalisadas pela glucose-6-P desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, que formam NADPH e ribulose-5-P pela descarboxilação de 6-fosfogluconato. Em alguns casos a transcetolase é tida como enzima limitante da HMP, já que ela catalisa a formação de xilulose-5-P e ribose-5-P.

Desde que a concentração de glucose-6-P intracelular é cerca de três vezes maior que o seu K_m para a glucose-6-P desidrogenase em alguns organismos (21), fica fácil entender que a regulação não é realizada pela concentração limitante de glucose-6-P mas sim da de NADP. O NADPH é tido como inibidor competitivo muito mais eficiente para a 6-fosfogluconato desidrogenase do que para a glucose-6-P desidrogenase tendo o NADP como substrato variável e desde que concentra

ções intracelulares de NADPH pode inibir quase que completamente a 6-fosfogluconato desidrogenase (65), seria necessário "in situ" uma forte ativação da 6-fosfogluconato desidrogenase ou uma via do tipo anaplerótica que permitisse o metabolismo de 6-fosfogluconato, cujos intermediários seriam reciclados a HMP, permitindo assim o funcionamento da via. Das duas alternativas a primeira parece mais provável, já que EGGLESTON et al. (21) verificaram que concentrações fisiológicas de glutathion podem bloquear o efeito inibitório do NADPH sobre a glucose-6-P desidrogenase, embora não tenha até então provado o efeito regulador do glutathion sobre a 6-fosfogluconato desidrogenase ou mesmo sobre a glucose-6-P desidrogenase in vivo.

Como as experiências realizadas no presente trabalho foram realizadas sempre em condições que favorecessem as reações de degradação ao invés de síntese, o suprimento de NADP constituiria o fator limitante para o funcionamento da HMP e as velocidades das reações catalisadas pela glucose-6-P desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase seriam dependentes da relação NADP/NADPH. A glucose-6-P desidrogenase é realmente inibida por NADPH conforme demonstrou GOMES (25).

Em contraposição a HMP, via que reduz NADP necessária aos processos de biossíntese, a EMP reduz o NAD, o qual está envolvido nos processos de degradação (64,33). De todas as etapas da EMP, somente a da oxidação do gliceraldeído-3-P a ácido 1,3-difosfoglicérico pela gliceraldeído-3-P desidrogenase produz um equivalente de redução em NADH ou dois equivalentes por molécula de glucose metaboli-

zada por esta via. Para que o ciclo opere normalmente torna-se necessário a presença de um sistema de reoxidação do NADH o que pode ser realizado em parte pela NADH oxidase como principalmente, pela cadeia respiratória.

Todas estas possibilidades podem ocorrer em P. circinatus, entretanto fogem a proposição do presente trabalho que tinha o intuito de estudar as vias envolvidas no metabolismo da glucose, presentes neste organismo, abrindo no entanto, margem a sua continuidade.

SUMÁRIO

Todas as enzimas da cadeia glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato foram detectadas em extrato livre de células de uma amostra monocariótica de Polyporus circinatus. Estudos radiorespirométricos foram também realizados, observando-se que a cadeia glicolítica e o ciclo das pentoses fosfato são operantes em células não proliferantes, sendo a primeira, preferencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLISON, W.S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase crystalline. II. Lobster tail muscle. In methods in Enzymology. Vol. IX. London and New York, Academic Press, 1966. pp. 210-215.
2. ARTHUR, L.O., BULLA Jr., L.A., S^t. JULIAN, G. and NAKAMURA, L.K. Carbohydrate metabolism in Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol. 116:304-313, 1973.
3. AVIGAD, G., AMARAL, D., ASENSIO, C. and HORECKER, B.L. The galactose oxidase of Polyporus circinatus. J. Biol. Chem. 237:2736-2743, 1962.
4. AXELROD, B. and JANG, R. Purification and properties of phosphoriboisomerase from alfafa. J. Biol. Chem. 209:847-855, 1954.
5. BERSENERZ, G. Triosephosphate isomerase from calf muscle. In Methods in Enzymology. Vol. I. New York, Academic Press, 1955. pp. 387-391.
6. BIRKINSAW, J.H., FINDLAY, P.K. and WEBB, R.A. Biochemistry of the wood-rotting fungi. A study of the acids produced by Cornioophora cerebella pers. Biochem. J. 34:906-916, 1940.
7. BIRKINSHAW, J.H., STICKINGS, C.E. and TESSIER, P. Biochemistry of the wood-rotting fungi. The production of D-threitol (L-erythritol) by Armillaria mellea (Vahl) Quelet. Biochem. J. 42: 329-332, 1948.
8. BLUMENTHAL, H., LEWIS, K.F. and WEIHOUSE, S. An estimation of pathways of glucose catabolism in yeast. J. Amer. Chem. Soc. 76:

6093-6097, 1954.

9. BRAY, G.A. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Anal. Biochem. 1:279-285, 1960.
10. BUCHER, T. Phosphoglycerate kinase from Brewer's yeast. In Methods in Enzymology. Vol. I. New York, Academic Press, 1955. pp. 415-422.
11. BUCHER, T. and PFLEIDERER, G. Pyruvate kinase from muscle. In Methods in Enzymology. Vol. I. New York, Academic Press, 1955. pp. 435-440.
12. CHEN, S.L. Carbohydrate assimilation in actively growing yeast Saccharomyces cerevisiae. I. Metabolic pathways for (¹⁴C)glucose utilization by yeast during aerobic fermentation. Biochim. Biophys. Acta. 32:470-479, 1959.
13. CLARK, D.S. and WALLACE, R.H. Carbohydrate metabolism of Pullularia pullulans. Can. J. Microbiol. 4: 43-54, 1958.
14. CLELAND, W.W. and JOHNSON, M.J. Studies on the oxalic acid by Aspergillus niger. J. Biol. Chem. 220: 595-606, 1956.
15. CLELAND, S.V. and COE, E.L. Activities of glycolytic enzymes during the early stages of differentiation in the slime mold Dictyostelium discoideum. Biochim. Biophys. Acta. 156: 44-50, 1968.
16. COCHRANE, V.W., PECK Jr., H.D. and HARRISON, A. The metabolism of species of Streptomyces. VII. The hexose monophosphate shunt and associated reactions. J. Bacteriol. 66:17-23, 1953.

17. CRANE, R.K. and SOLS, A. Animal tissue hexokinase. In Methods in Enzymology. Vol. I. New York, Academic Press, 1955. pp. 277-286.
18. De FIEBRE, C.W. and KNIGHT, S.C. The oxidation of glucose by Penicillium chrysogenum. J.Bacteriol. 66: 170-172, 1953.
19. DISCHE, Z. and BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. J.Biol.Chem. 192:583-587, 1951.
20. DOWLER, W.M., SHAW, P.D. and GOTTLIEB, D. Terminal oxidation in cell-free extracts of fungi. J.Bacteriol. 86:9-17, 1963.
21. EGGLESTON, L.V. and KREBS, H.A. Regulation of the pentose phosphate cycle. Biochem.J. 138: 425-435, 1974.
22. FRIEDEMANN, T.E. and HAUGEN, G.E. Pyruvic acid II. The determination of ketoacids in blood and urine. J.Biol.Chem. 147:415-442, 1943.
23. FUNAYAMA, S. and ZANCAN, G.T. Purification and properties of pyridine nucleotide-independent L-lactate dehydrogenase from Polyporus circinatus. J.Bacteriol. 119:1000-1005, 1974.
24. GIBBS, M. and GASTEL, R. Glucose dissimilation by Rhizopus. Arch.Biochem.Biophys. 43:33-38, 1953.
25. GOMES, T.P.A. Contribuição ao estudo da glucose-6-P desidrogenase de Polyporus circinatus Fr. Tese de Mestrado - Curitiba, 1972. 47 páginas mimeografadas.
26. GRISOLIA, S. Phosphoglyceric acid mutase. In Methods in Enzymology. Vol. V. New York, Academic Press, 1962. pp. 236-242.

27. HEATH, E.C. and KOFFLER, H. Biochemistry of filamentous fungi. II. The quantitative significance of an "oxidative pathway" during the growth of Penicillium chrysogenum. J.Bacteriol. 71: 174-181, 1956.
28. HEATH, E.C., De LILL, N. and KOFFLER, H. Biochemistry of filamentous fungi. III. Alternative routes for the breakdown of glucose by Fusarium lini. Arch.Biochem.Biophys. 64: 80-87, 1956.
29. HIRONO, E. Vias de utilização da glucose em Picnoporus cinnabarinus. Tese de Mestrado - Curitiba, 1976. 90 páginas mimeo-grafadas.
30. HORECKER, B.L. and KORNBERG, A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J.Biol.Chem. 175: 385-390, 1948.
31. HUGGETT, A. S^t.G. and NIXON, D.A. Enzymic determination of blood glucose. Biochem.J. 66:12p. 1957.
32. JENSEN, E.M., ALTSCHULLER, H. and BARD, R.C. Glycolitic and respiratory enzymes of Trichophyton mentagrophytes. J. Bacteriol. 74:656-660, 1957.
33. KATO, K., KOIKE, S., YAMADA, K., YAMADA, H. and TANAKA, S. Di and triphosphopyridine nucleotide linked glutamic dehydrogenase of Piricularia cryzae and their behaviors in glutamate media. Arch.Biochem.Biophys. 98:346-347, 1962.
34. KATZ, J. and WOOD, H.G. The use of ¹⁴CO₂ yields from glucose-1- and -6-¹⁴C for the evaluation of the pathways of glucose me-

- tabolism. J.Biol.Chem. 235:517-523, 1963.
35. KORRES, S. Carbohydrate metabolism. Ann.Rev.Biochem. 25:685-734, 1956.
36. La HABA, G. and RACKER, E. Crystalline transketolase from Baker's yeast. In Methods in Enzymology. Vol. I. London and New York, Academic Press, 1955. pp. 375-380.
37. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, A., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin reagent. J.Biol.Chem. 193: 265-275, 1951.
38. LYNCH, T.J. and HENNEY Jr., H.R. Carbohydrate metabolism in the plasmodium of the myxomycete Physarum flavicomum. Can. J. Microbiol. 19:803-810, 1973.
39. MacDONOUGH, M.W. and MARTIN, S.M. The hexosemonophosphate pathways in Aspergillus niger. Can. J. Microbiol. 4: 329 - 333, 1958.
40. MacGEE, J. and DOUDOROFF, M. A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. J.Biol.Chem. 210:617-626, 1954.
41. MARGULIES, M. and VISHNIAC, W. Dissimilation of glucose by the Mx strain of Rhizopus. J.Bacteriol. 81: 1-15, 1961.
42. MARKUS, Z., MILLER, G. and AVIGAD, D. Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by Dactylium dendroides. Appl. Microbiol., 13: 686-693, 1965.
43. MARUYAMA, Y. and ALEXANDER, M. Localization of enzymes in the mycelium and microconidia of Fusarium oxysporum. J.Bacteriol 84: 304-312, 1962.

44. McDONALD, J.K., CHELDELIN, V.H. and KING, T.E. Glucose catabolism in the ergot fungus Claviceps purpurea. J. Bacteriol. 80:61-71, 1960.
45. MELOCHE, Jr., H.P. Enzymatic utilization of glucose by a basidiomycete. J. Bacteriol. 83: 766-774, 1962.
46. MORSE, S.A., STEIN, S. and HINES, J. Glucose metabolism in Neisseria gonorrhoeae. J. Bacteriol. 120:702-714, 1974.
47. MOURÃO, M. Hexoquinase de Polyporus circinatus Fr. Arq. Biol. Tecnol. (Brasil). 18: 39-45, 1975.
48. NEWBURGH, R.W., CLARIDGE, C.A. and CHELDELIN, V.H. Carbohydrate oxidation by the wheat smut fungus Tilletia caries. J. Biol. Chem. 214: 27-35, 1955.
49. NEWBURGH, R.W. and CHELDELIN, V.H. Glucose oxidation in mycelia and spores of the wheat smut fungus Tilletia caries. J. Bacteriol. 76:308-311, 1958.
50. NEWBURGH, R.W. and CHELDELIN, V.H. Oxidation of labelled substrate by Dwarf bunt, Tilletia controversa. Can. J. Microbiol. 5: 415-417, 1959.
51. NIEDERPRUEM, D.J., HAFIZ, A. and HENRY, L. Polyol metabolism in the basidiomycete Schizophyllum commune. J. Bacteriol. 89:954-959, 1965.
52. NG, W.S., SMITH, J.E. and ANDERSON, J.G. Changes in carbon catabolic pathways during synchronous development of conidiophores of Aspergillus niger. J. Gen. Microbiol. 71:495-504, 1972.
53. NIEDERPRUEM, D.J., UPDIKE, J. and HENRY, L. Hexose monophosphate

- metabolism during basidiospore germination in Schizophyllum comune. J.Bacteriol. 89: 908-909, 1965.
54. NOLTMANN, E.A., GUBLER, C.J. and KUBY, S.A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Zwischenferment). I. Isolation of the crystalline enzyme from yeast. J.Biol.Chem. 236:1225-1230, 1961.
55. NORD, F.F. and SCIARINI, L.J. On the metabolism of enzyme action. The action of certain wood-destroying fungi on glucose, xylose, raffinose and cellulose. Arch.Biochem. 9: 419-437, 1946.
56. NORD, F.F. and 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. 14:229-241, 1947.
57. PONTREMOLI, S., De FLORA, A., GRAZI, E., MANGIAROTTI, G., BONSIGNORE, A. and HORECKER, B.L. Crystalline D-gluconate-6-P dehydrogenase. J.Biol.Chem. 236:2975-2980, 1961.
58. PRESCOTT, L.M., HOYME, H.E., CROCKETT, D. and HUI, E. Carbohydrate metabolism in Acanthamoeba castellanii. I. The activity of key enzymes and ¹⁴C glucose metabolism. Can.J.Microbiol. 19: 1131-1136, 1973.
59. RAMACHANDRAN, S. and GOTTLIEB, D. Pathways of glucose catabolism in Caldariomyces fumago (ILL). Biochim.Biophys.Acta. 69:74-84, 1963.
60. RAO, P.S. and NIEDERPRUEM, D.J. Carbohydrate metabolism during morphogenesis of Coprinus lagopus (sensu buller). J.Bacteriol. 100: 1222-1228, 1969.

61. REED, D.J. and WANG, C.H. Glucose metabolism in Penicillium digitatum. Can.J.Microbiol. 5:59-66, 1959.
62. ROE, J.H., EPSTEIN, J.H. and GOLDSTEIN, N.P. A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. J.Biol. Chem. 178:839-845, 1949.
63. RUTTER, W.J. and HUNSLEY, J.R. Fructose diphosphate aldolase. In Methods in Enzymology. Vol.IX. London and New York, Academic Press, 1966. pp. 479-486.
64. SANWAL, B.D. and LATA, M. Effect of glutamic on the formation of two glutamic acid dehydrogenases of Neurospora. Biochem . Biophys.Res.Comms. 6:404-409, 1961.
65. SAPAG-HAGAR, M., LAGUNA, R. and SOLS, A. Apparent unbalance between the activities of 6-phosphogluconate and glucose-6-phosphate dehydrogenases in rat liver. Biochem.Biophys.Res.Comms. 50: 179-185, 1973.
66. SIH, C.J. and KNIGHT, S.C. Carbohydrate metabolism of Penicillium chrysogenum. J.Bacteriol. 72:694-699, 1956.
67. SIH, C.J., HAMILTON, P.B. and KNIGHT, S.G. Demonstration of the pentose cycle reactions in Penicillium chrysogenum. J.Bacteriol. 73:447-451, 1957.
68. SILLERO, A., SILLERO, M.A.G. and SOLS, A. Regulation of the level of key enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in liver. Europ.J.Biochem. 10:351-354, 1969.
69. TYRELL, D. and SIMPSON, J.E. Glycolytic enzymes in resting spores and vegetative mycelia of Entomophthora pyriformis. Can.J.

- Microbiol. 21:301-304, 1974.
70. Van EFTEN, J.L., MOLITORIS, H.P. and GOTTLIEB, D. Changes in fungi with age. II. Respiration and respiratory enzymes of Rhizoctonia solani and Sclerotium bataticola. J. Bacteriol. 91: 169-175, 1966.
71. Van SCOYOC, S.W. and WILLIAMS, E.B. Respiratory enzymes in Venturia inaequalis. Can. J. Microbiol. 16:181-185, 1969.
72. VENKATARAMAN, R. and RACKER, E. Mechanism of action of transaldolase. I. Crystallization and properties of yeast enzyme. J. Biol. Chem. 236:1876-1882, 1961.
73. WANG, C.H., GREGG, C.T., FORBUSCH, I.A., CHRISTENSEN, B.E. and CHELDELIN, V.H. Carbohydrate metabolism in Baker's yeast. I. Time course study of utilization. J. Amer. Chem. Soc. 78: 1869-1872, 1956.
74. WANG, C.H., REED, D.J., NOBLE, E., CHRISTENSEN, B.E. and CHELDELIN, V.H. Carbohydrate metabolism in Penicillium digitatum. Fed. Proc. 16:266, 1957.
75. WANG, C.H., STERN, I., GILMOUR, C.M., KLUGSOYR, S., REED, D.J., BIALY J.J., CHRISTENSEN, B.E. and CHELDELIN, V.H. Comparative study of glucose catabolism by the radiorespirometric method. J. Bacteriol. 76:207-216, 1958.
76. WESTHEAD, E.W. and McLAIN, G. A purification of Brewer's and Baker's yeast enolase yielding a single active component. J. Biol. Chem. 239, 2464-2468, 1964.

77. WOELLER, F.H. Liquid scintillation counting of $C^{14}O_2$ with phenethylamine. Anal. Biochem. 2:508-511, 1961.
78. WOLD, F. and BALLOU, C.E. Studies on the enzyme enolase. I. equilibrium studies. J. Biol. Chem. 227:301-312, 1957.

AGRADECIMENTOS

A minha eterna gratidão e reconhecimento se estende a meus pais, que não pouparam sacrifícios para que eu tivesse uma boa orientação e me ensinaram a dar valor a tudo que me era ensinado; ao Shigue pelo carinho, compreensão e apoio nas horas difíceis de irritação pelas quais passei; a Dra. Glaci, orientadora desta tese, que com estímulo e dedicação acompanhou em todas as fases e detalhes o seu desenvolvimento e a sua orientação segura e firme devo o mérito desta tese. Expresso também meus agradecimentos aos colegas do laboratório, pela amizade e boa vontade que sempre me dispensaram, ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e a todos os seus componentes que colaboraram de modo direto ou indireto na realização deste trabalho. Agradeço também ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Técnico e Científico (CNPq) e a FUNTEC pela ajuda financeira que possibilitou a elaboração desta tese.