

MURIEL MOURÃO

HEXOQUINASE DE POLYPORUS CIRCINATUS FR

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

*Arquivo de
547.191.3*

CURITIBA
1971

MURIEL MOURÃO

HEXOQUINASE DE POLYPORUS CIRCINATUS FR.

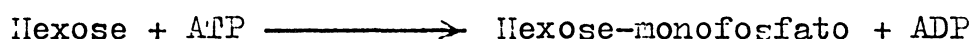
Tese de Mestrado em Bioquímica
apresentada ao Instituto de
Bioquímica da Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: .
Dra. Déa Amaral

Curitiba
1971

I N T R O D U Ç Ã O

HEXOSE-ATP-POSFOTRANSFERASE — EC 2711 (33),
comumente chamada HEXOQUINASE, catalisa a reação que representa a
etapa inicial do metabolismo de hexoses.



Meyerhof em 1927, verificou que uma fração de um precipitado alcoólico de autolisados de leveduras, quando adicionada a extratos de músculo de sapo e de coelho aumentava a utilização de glucose e frutose(9). Estudos posteriores de Colowick e Kalckar(8) e de Meyerhof(9) mostraram que o princípio ativador era uma enzima que catalisava a reação acima descrita.

A enzima foi também identificada em fígado(32); em cérebro(16, 42, 43, 44, 49); em outros tecidos animais(23, 39); em insetos(18, 35); em plantas superiores(36); em fungos(10, 27, 31, 34); em protozoários(4, 33, 38) e em bactérias(7, 17, 20).

Hexoquinase cristalina de levedura que catalisa a fosforilação de glucose, frutose e manose, foi estudada por Berger, Slein, Colowick e Cori em 1946(5); por Kunitz e McDonald em 1946(21); por Bayley e Webb em 1948(3). Em 1951 Brown relatou que a hexoquinase de levedura fosforilava D (+) glucosamina, além de glucose, frutose e manose(6). Traeger e Colowick estudaram as múltiplas formas da enzima de levedura, concluindo que provavelmente havia 6 isoenzimas no material estudado, apresentando elas as mesmas atividades, específicas, mas diferentes propriedades com relação aos valores de pH ótimo, Km e Vmáx.(48). Slein et al, em 1950(40), estudaram hexoquinase de levedura, comparando-a com a enzima de tecidos animais.

Juntamente com a hexoquinase de levedura, a hexoquinase de cérebro tem sido intensamente estudada. Meyerhof(28), Meyerhof et al(29), em 1947, estudaram a velocidade de glicólise de glucose e frutose em extratos de cérebro. Encontraram que a baixas concentrações de ATP, o extrato utilizava glucose mais rapidamente que frutose. Isto foi interpretado como sendo devido a um decréscimo muito maior da afinidade da enzima para frutose do que para glucose

a níveis mais baixos de ATP.

Uma preparação de cérebro que fosforilava glucose, frutose, manose, mas nenhum dos outros açúcares testados, foi descrita por Wiebelhaus e Lardey(49), discutindo os fatores que afetam a velocidade de glicólise e oxidação de glucose e frutose.

Hexoquinase particulada de cérebro foi estudada por Sols e Crane, abordando a especificidade de substrato(43) a inibição da enzima por reagentes sulfidrílicos(42) e a inibição por glucose-6P(44). Joshi e Jagannathan(16), verificaram que hexoquinase de cérebro obtida em forma solúvel, apresentava propriedades similares às da enzima particulada.

Em fungos, hexoquinase foi estudada juntamente com outras enzimas do metabolismo de carboidratos em Tilletia caries, por Newburger, Claridge e Cheldetin(31), quando investigaram o metabolismo oxidativo deste fungo, na tentativa de esclarecer as vias metabólicas envolvidas na utilização de carboidratos. Medina e Nicholas, purificaram uma Hexoquinase de Neurospora crassa(27), estudando algumas de suas propriedades. Posteriormente Davidson(10) descreveu uma hexoquinase de Aspergillus parasiticus que foi por ele purificada. Esta enzima apresenta a particularidade de catalisar a fosforilação de galactose e galactosamina, além dos substratos usuais glucose, frutose, manose e glucosamina. Ruiz-Amil e Sols purificaram parcialmente uma hexoquinase de Aspergillus oryzae, estudando suas propriedades(34).

Segundo Sols, a hexoquinase de cérebro apresenta um pH ótimo numa faixa ampla, variando de 6,0 a 8,0(42). Casos semelhantes foram observados em plantas superiores com pH ótimo entre os valores de 7,0 a 10,0(36); em Trypanosoma gambiense de 7,0 a 9,0(38); em Entamoeba histolytica de 7,0 a 8,5(33); em Neurospora crassa de 8,3 a 9,45(27). Na maioria dos casos estudados (4,17,18,27,36,37,38,46,50), o pH ótimo encontra-se entre os valores de 7,0 a 10,0. Clostridium butyricum - pH ótimo 6,7(12), Clostridium oedematien - pH ótimo 6,7-6,9(39) e glucoquinase de fígado de rato pH ótimo 6,5-7,0(19), representam alguns dos poucos casos estudados em que o pH ótimo encontra-se na zona ácida.

Hexoquinase de cérebro é fortemente inibida pelo produto da reação - Glucose-6P(16, 44). Tal fato foi também constatado em

enzimas de diferentes procedências, como por exemplo mucosa intestinal(45), insetos(18) e Neurospora crassa(27). Asensio em 1960(2) descreveu uma glucoquinase de E. coli que não é inibida por Glucose-6P, o mesmo verificou Ruiz-Amil e Sols, estudando hexoquinase de Aspergillus oryzae(34).

Entre os aspectos mais estudados desta enzima, acha-se o de sua especificidade em relação ao substrato. Enzimas específicas para apenas uma hexose foram identificadas em várias fontes, destacando-se GLUCOQUINASE e MANOQUINASE em Pseudomonas saccharophilia, Schistosoma mansoni, Echinococcus granulosus, FRUTOQUINASE em ervilhas, Echinococcus granulosus, GLICOSAMINOQUINASE em Schistosoma mansoni, e Echinococcus granulosus(9). Enzima inespecífica tendo como substratos glucose, manose, frutose e outros açúcares, tem sido identificada em tecidos animais(49); em plantas superiores(36); em insetos(18), em fungos: Neurospora crassa(27), Aspergillus parasiticus(10), Aspergillus oryzae(34) e em bactérias: Pseudomonas putrefaciens(20), Spirochaeta recurrentis(41).

A enzima requer para sua ação um ativador iônico, sendo o Mg^{++} , o mais eficiente(4,6,17,18,37,38). Medina e Nicholas descreveram uma Hexoquinase dependente de Zn^{++} , em Neurospora crassa(27).

O composto doador do grupamento fosforila é o ATP. Em 1961 Martinez verificou que o ITP pode substituir o ATP em hexoquinase de levedura(26). GTP, CTP e UTP são relativamente ineficazes(16,17,26,35).

O fungo Polyporus circinatus, basidiomiceto apodrecedor da madeira, utiliza normalmente polissacarídeos como fonte de carbono em seu habitat natural. A presença de várias carboidrases neste fungo foi constatada em trabalhos anteriores por Amaral(1) e Hishida(14), o que explica a hidrólise dos polissacarídeos existentes na polpa da madeira, às suas unidades fundamentais, como a primeira etapa para a utilização de hexoses pelo fungo. Por outro lado, sabendo-se que a fosforilação das hexoses representa a primeira etapa para a utilização de monossacarídeos e sendo a hexoquinase a enzima responsável pela fosforilação da glucose, frutose e manose, o seu estudo é de grande importância para a

elucidação do metabolismo de carboidratos pelo fungo, uma vez que a glucose-6P é o metabólito comum da via glicolítica, ciclo das pentose-fosfato e biossíntese de polissacarídeos do Polyporus circinatus.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. - Cultura de células.

A amostra de *Polyporus circinatus* Fr. foi cedida gentilmente pela Dra. Déa Amaral, da cadeira de Química Biológica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

A cultura foi mantida em meio sólido segundo Markus, Miller e Avigad(25), a partir dela inoculou-se a amostra em meio líquido(25) contendo glucose a 1g% como fonte de carbono.

O meio de cultura foi esterilizado a uma atmosfera de pressão por vinte minutos, em frascos de 1 e 2 litros contendo 250 e 500 ml de solução respectivamente.

O fungo foi crescido a 28°C em agitador rotatório com 100 agitações por minuto. Após 24 horas de crescimento, o micélio foi coletado por filtração, lavado em água destilada e guardado em congelador a -20°C. O material assim obtido foi usado como fonte de enzima.

2.2. - Preparo do extrato livre de células.

Em um bal foram colocados de 5 a 10 gramas de fungo e duas a três vezes o volume em areia do mar tratada. Esta mistura foi triturada e suspensa em EDTA 0,01M pH 7,0, num volume em ml correspondendo a 3 vezes o peso do micélio. Este material foi centrifugado a 11.000 g por 10 minutos, obtendo-se por decantação o extrato livre de células.

2.3. - Determinação da atividade enzimática.

A atividade enzimática foi determinada medindo-se a glucose residual livre pelo método da glucose oxidase (Nugget e Nixon)(15), modificado por Soler et al.(46). Este método baseia-se em que a glucose-6P não é substrato para a glucose oxidase. Assim, incubando uma mistura tamponada de glucose com um excesso de ATP- μ

e uma quantidade apropriada de hexoquinase, a quantidade de glucose livre disponível para a glucose oxidase, decresce à medida que se forma a glucose-6P.

Estimativa da glucose residual em um dado tempo pode facilmente ser realizada pelo tratamento direto da mistura de incubação com o reagente glucose-oxidase-peroxidase-cromogênio, contendo EDTA 0,5M excesso suficiente para inibir a reação da Hexoquinase.

A mistura de incubação era constituída de 4 umoles de tampão fosfato pH 7,0; 1 umol de $MgCl_2$; 1 umol de ATP pH 7,0; 0,2 umoles de glucose; enzima em quantidades variáveis e água destilada suficiente para completar 0,1 ml. Incubação por 10 minutos a 37°C. Após este tempo a reação foi interrompida, acrescentando-se 2 ml do reagente glucose oxidase-peroxidase-cromogênio, sendo a seguir incubada por uma hora. A cor desenvolvida foi lida em um espectrofotômetro Beckman DU a 420 mμ. Nas experiências de Lin e especificidade foi usado o método de Somogyi(47) e Nelson(30), para medida do açúcar redutor, sendo a reação interrompida pela adição de $Ba(OH)_2$ 0,3N e $ZnSO_4$ 5%, para a precipitação do éster fosfórico.

2.4. - Determinação da proteína.

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Lowry et al.(24).

2.5. - Definição da unidade de enzima.

Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para catalisar a fosforilação de 1 umol de hexose em 10 minutos, nas condições de ensaio.

2.6. - Purificação da Hexoquinase.

O extrato livre de células foi dialisado em tampão fosfato $10^{-3}M$ pH 7, durante 3 horas a 4°C, para eliminação da glucose livre. A seguir foi corrigido o pH deste material para

5,8 a 7,0 com NaOH 0,3M e submetido a um fracionamento de 0-40% com sulfato de amônio, sendo o material centrifugado a 13.000 g por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi submetido a um segundo fracionamento com sulfato de amônio de 40 a 70%, centrifugado também a 13.000 g por 15 minutos.

O precipitado que continha a enzima foi suspenso em EDTA $10^{-2}M$ pH 7,0, em um volume aproximadamente de 7 a 8 vezes menor que o volume de extrato original. Este material foi dialisado a 4°C, durante 3 horas, contra uma solução contendo EDTA-lig $10^{-3}M$.

Este material dialisado foi adsorvido em gel de alumina C γ , na proporção de 1mg de sólido (peso seco) por mg de proteína.

A mistura foi deixada 10 minutos em repouso e centrifugado a 20.000 g por 10 minutos. A enzima adsorvida ao precipitado foi eluída com tampão fosfato 0,1M pH 7,0.

O sobrenadante contendo a enzima foi cromatografado em uma coluna de DEAE-celulose de 15 cm de altura por 7 mm de diâmetro, com um fluxo de 0,2 ml por minuto a 4°C. A DEAE-celulose foi anteriormente equilibrada em tampão fosfato 0,1M pH 7,0. Usou-se como eluente tampão fosfato pH 7,0 0,1M (9 ml), 0,25M (9 ml) e 0,3M (9 ml), respectivamente, coltando-se manualmente frações de 3 ml.

Quando a atividade enzimática era medida pelo desaparecimento do açúcar redutor pelo método de Somogyi e Nelson, a enzima cromatografada era dialisada contra tampão fosfato 0,02M pH 7, por 2 horas a 4°C, para eliminar o excesso de fosfato que interferia na determinação.

2.7. - Estudos cinéticos.

A fração obtida da coluna de DEAE-celulose que apresentava maior atividade, foi usada como fonte de enzima para a determinação do efeito da concentração da enzima, efeito do tempo de incubação, efeito da temperatura de incubação, efeito do pH, determinação da especificidade em relação ao doador do grupamento fosforila e em relação ao substrato, determinação da constante de Michaelis-Menten e determinação da estabilidade da enzima.

A determinação da constante de Michaelis-Menten foi feita pelo método de Lineweaver-Burk(22), modificado por Dixon(11).

2.8. - Enzimas e produtos químicos.

Glucose-oxidase e peroxidase (glucostat) foram fornecidas pela Worthington. ATP foi fornecido pela Sigma Chemical Company. Os açúcares utilizados como substrato eram cromatograficamente puros. D-glucose, D-manose, D-frutose e D-galactose fornecidas pela Calbiochem; Glucosamina, N-acetil-glucosamina e L-xilose por Mann Research Laboratories; L-sorbose pela Nutritional Biochemicals Corporation e L-arabinose por Pfanstiehl Laboratories.

DIAGRAMA DAS DIVERSAS FASES DE PURIFICAÇÃO

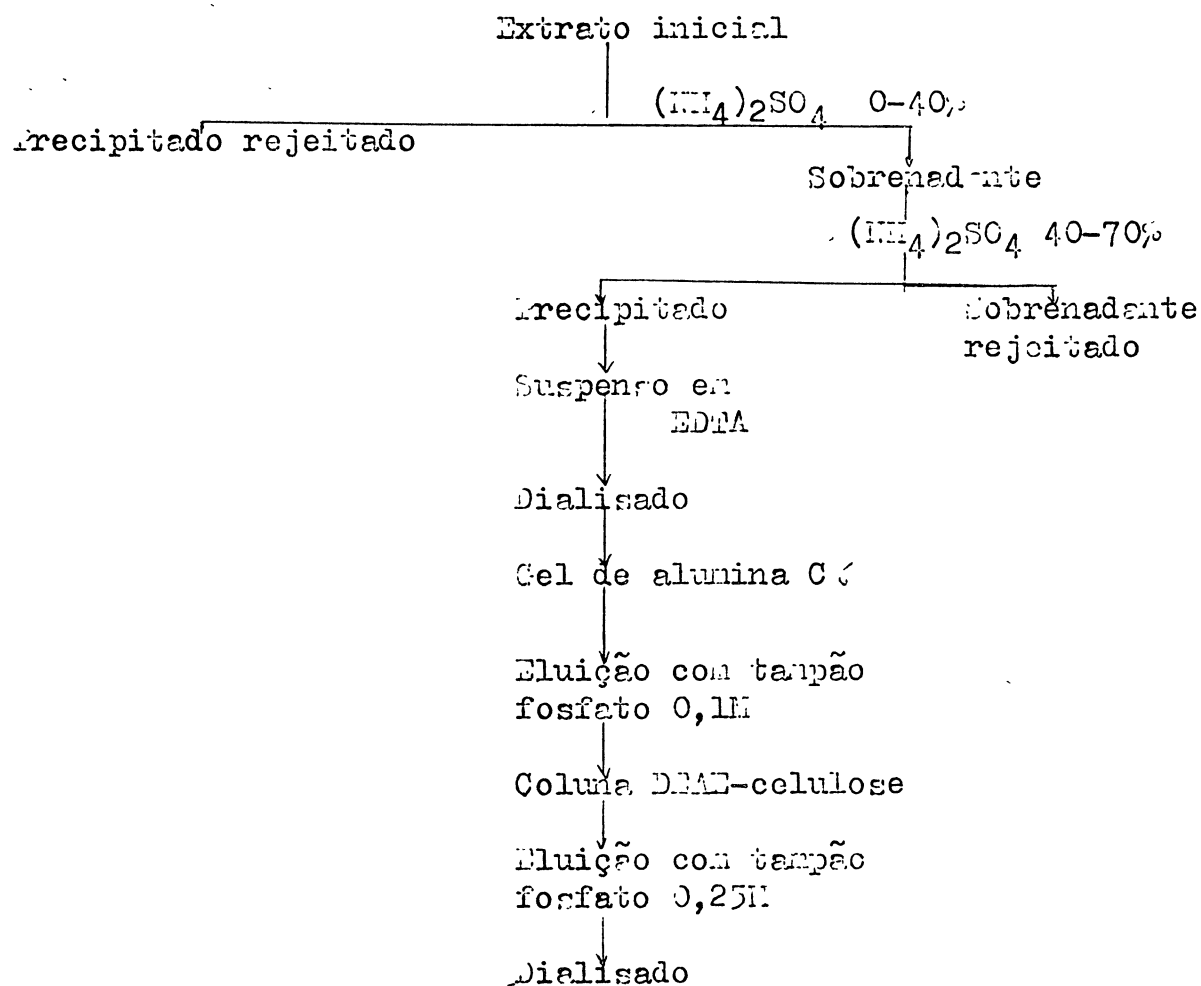


Fig. 1 - Diagrama das diversas etapas de purificação da Hexoquinase de *Polyporus circinatus*.

3 - RESULTADOS

3.1. - Purificação da enzima

O extrato livre de células de *Polyporus circinatus* tratado com sulfato de amônio, foi adsorvido em gel de alumina C γ , e-luído com tampão fosfato 0,1M pH 7. Este material foi cromatografado em uma coluna de DEAE-celulose, sendo a enzima eluída com tampão fosfato 0,25M pH 7. Através da figura 2, podemos observar a separação cromatográfica da Hexoquinase em DEAE-celulose. A enzima foi purificada 15,7 vezes, como demonstram os dados da tabela I.

T A B E L A I

Purificação de hexoquinase de *Polyporus circinatus*

Tratamento	U/ml	Proteína ng/ml	Atividade específica	Unid. totais	Rend. %	Purif.
Extr. bruto	28,5	12,26	2,32	427,5		
(NH ₄) ₂ SO ₄ 40-70%	81,0	15,56	5,20	202,5	47,3	2,24
Gel de alu- mina C γ	65,5	7,47	8,76	163,75	38,3	3,77
DEAE-celu- lose	17,14	0,47	36,46	68,56	16,0	15,71

3.2. - Efeito da concentração da enzima.

A fig. 3 demonstra que o aumento da velocidade é diretamente proporcional à concentração da enzima.

3.3. - Efeito do tempo de incubação.

O efeito do tempo de incubação sobre a velocidade da reação a 37°C é demonstrado na fig. 4.

3.4. - Efeito da temperatura.

A fig. 5 nos mostra o efeito da temperatura de incubação sobre a atividade da Hexoquinase. Observa-se que a temperatura ótima para a fosforilação da glucose é de 37°C, perdendo quase toda sua atividade acima de 60°C.

3.5. - Efeito do pH.

Para determinação do efeito do pH na atividade enzimática, foram usados os seguintes tampões: acetato 0,2M de pH 4,0 a 5,6; fosfato 0,2M de pH 5,8 a 7,8; e Tris (hidroxi-etilaminometano) 0,2M de 8,0 a 9,0. O pH real das misturas de incubação foi verificado após a mistura dos reagentes. A fig. 6 nos mostra que o pH ótimo da Hexoquinase de *Polyporus circinatus* é de 6,4.

3.6. - Especificidade da enzima em relação ao doador do grupamento fosforila.

A tabela II nos demonstra que GTP, UTP e CTP são menos eficientes como doadores do grupamento fosforila em relação ao ATP.

3.7. - Especificidade da hexoquinase em relação à Hexose.

A especificidade foi estudada em relação a vários açúcares. Pela Tabela III, podemos verificar que a enzima é inespecífica fosforilando glucose, manose, frutose e glucosamina.

T A B E L A . . . I I

Especificidade da hexoquinase em relação ao doador do grupamento fosforila.

Nucleotídeos	umoles de glucose fosf./ml enzima	Atividade relativa %
ATP	8,75	100
CTP	0,75	8,5
GTP	0,75	8,5
UTP	0,75	8,5

Sistema de incubação: 4 umoles de tampão fosfato pH 7,0; 0,2 umoles de glucose, 1 umol de $MgCl_2$, 1 mmol de ATP, CTP, GTP ou UTP; 10 ug de proteína? 0,02 ml de água destilada. Período de incubação de 10 minutos, a 37°C.

3.8. - Determinação da constante de Michaelis-Menten.

A constante de Michaelis-Menten foi determinada para a glucose, manose e frutose, substratos naturais da enzima, obtendo-se, respectivamente, os valores de $9 \times 10^{-4}M$, $5,0 \times 10^{-4}M$ e $5,5 \times 10^{-3}M$, conforme indicam as figuras 7, 8 e 9.

3.9. - Estabilidade da enzima purificada.

A enzima purificada, conservada no congelador a -20°C, é bastante estável, perdendo 50% de sua atividade após 90 dias.

T A B E L A I I I
 ::::::::::::::::::::

Especificidade da Hexoquinase em relação ao açúcar

Substrato conc. 12 mM	Atividade máxima relativa *
Glucose	1,0
Manose	0,7
Frutose	2,0
Glucosamina	0,5
N-acetil-glucosamina	—
Sorbose	—
Xilose	—
Galactose	—
Arabinose	—

* Um traço indica velocidade indetectável nesta concentração de substrato.

Sistema de incubação: 3 μ moles de $HgCl_2$; 3 μ moles de ATP; 3,6 μ moles de hexose; 40 μ g de proteína; água destilada para completar 0,3 ml. Glucose, manose, frutose e glucosamina foram incubados 15 minutos a 37°C, os demais açúcares testados foram incubados por 6 horas.

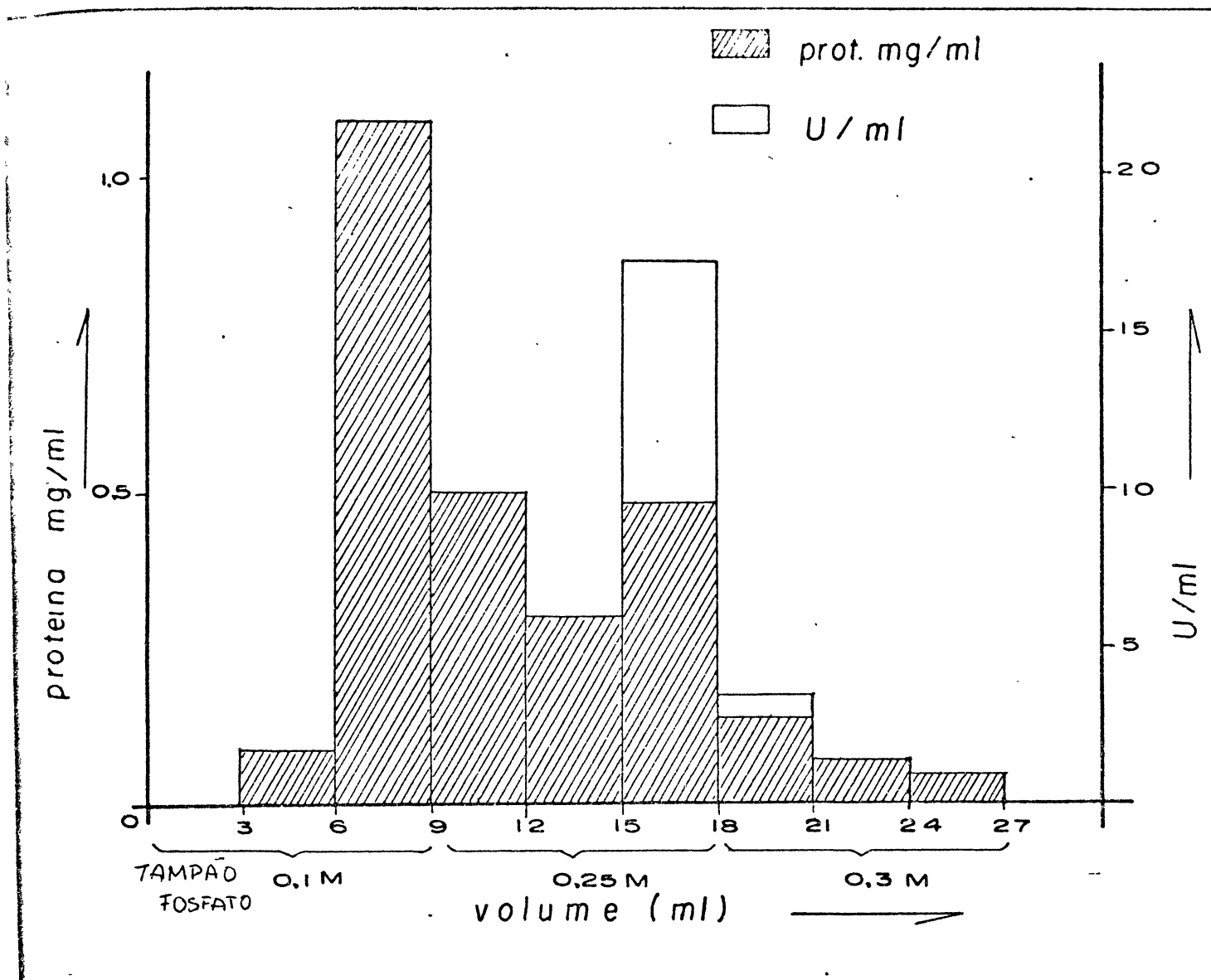


Fig. 2 - Purificação da Hexoquinase de *Polyporus circinatus* por cromatografia em coluna de DEAE-celulose.

Sistema: 4 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 1 μ mol $MgCl_2$, 1 μ mol de ATP; 0,2 μ moles glucose; enzima em quantidades variáveis e água destilada suficiente para completar 0,1 ml.

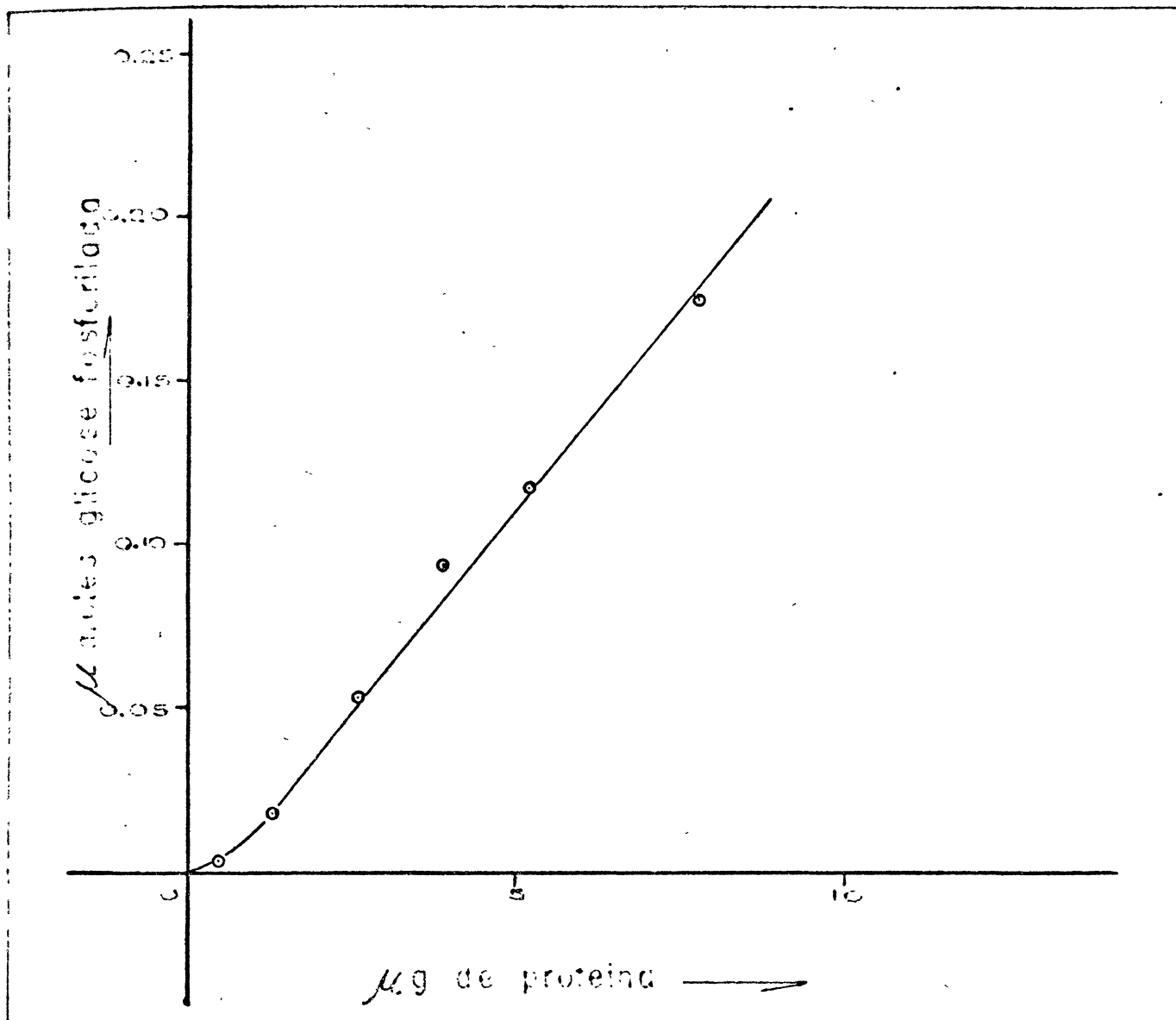


Fig. 3 - Efeito da concentração da enzima na velocidade de reação.

Sistema: 8 μmoles tampão fosfato pH 7,0; 2 μmoles $HgCl_2$; 2 μmoles ATP. 0,4 μmoles glucose; quantidades variáveis de enzima e água destilada em quantidade suficiente para completar 0,2 ml.

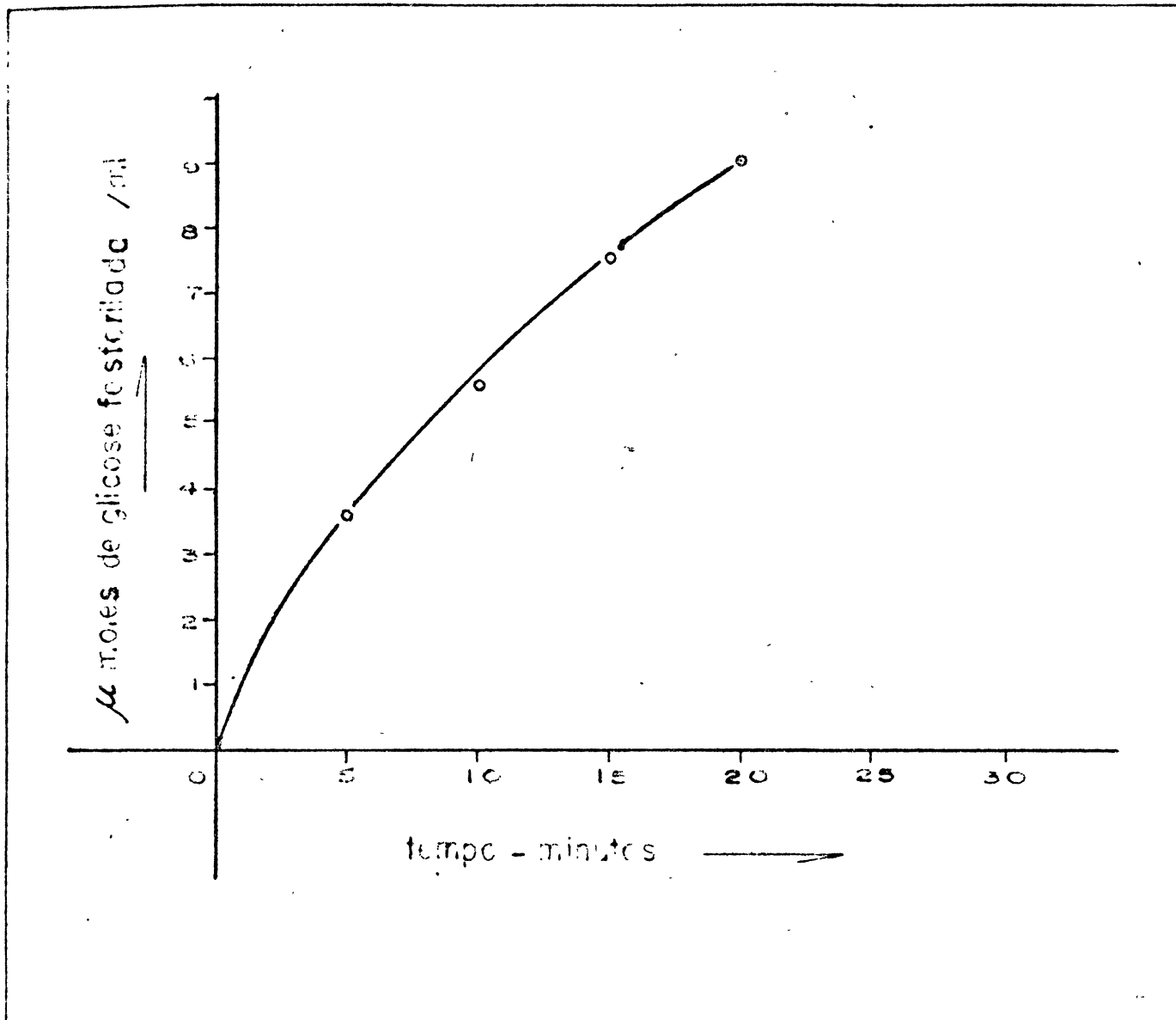


Fig. 4 - Efeito do tempo de incubação sobre a velocidade da reação.

Sistema: 4 μmoles de tampão fosfato pH 7,0; 1 μmol de MgCl₂; 1 μmol de ATP; 0,2 μmoles de glucose; 9 μg de proteína, água destilada em quantidade suficiente para completar 0,1 ml.

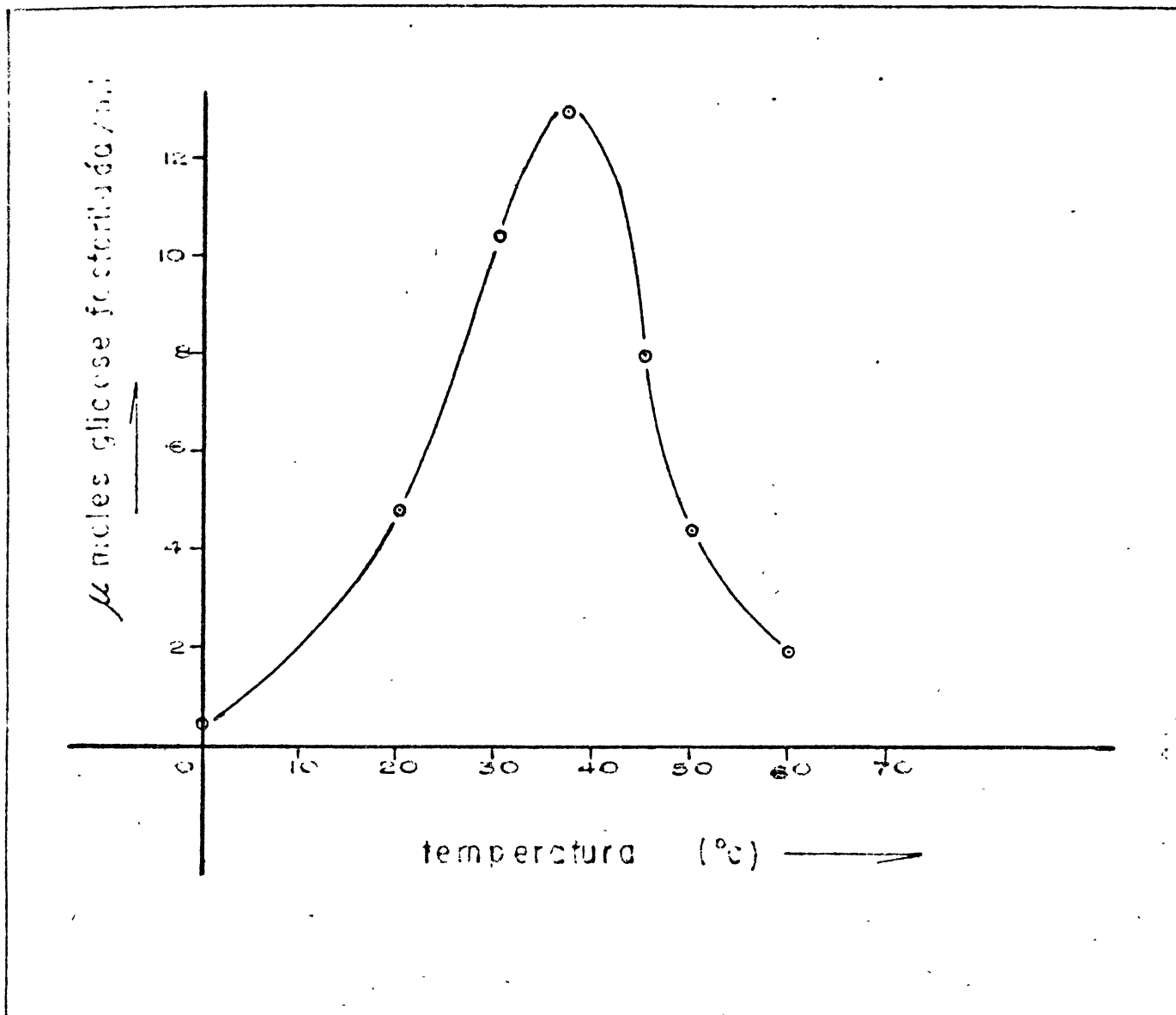


Fig. 5 - Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade da Hexoquinase.

Sistema: 4 μmoles de tampão fosfato pH 7,0; 1 μmol de MgCl₂; 1 μmol de ATP; 0,2 μmoles de glucose. 6 μg de proteína; água destilada em quantidade suficiente para completar 0,1 ml.

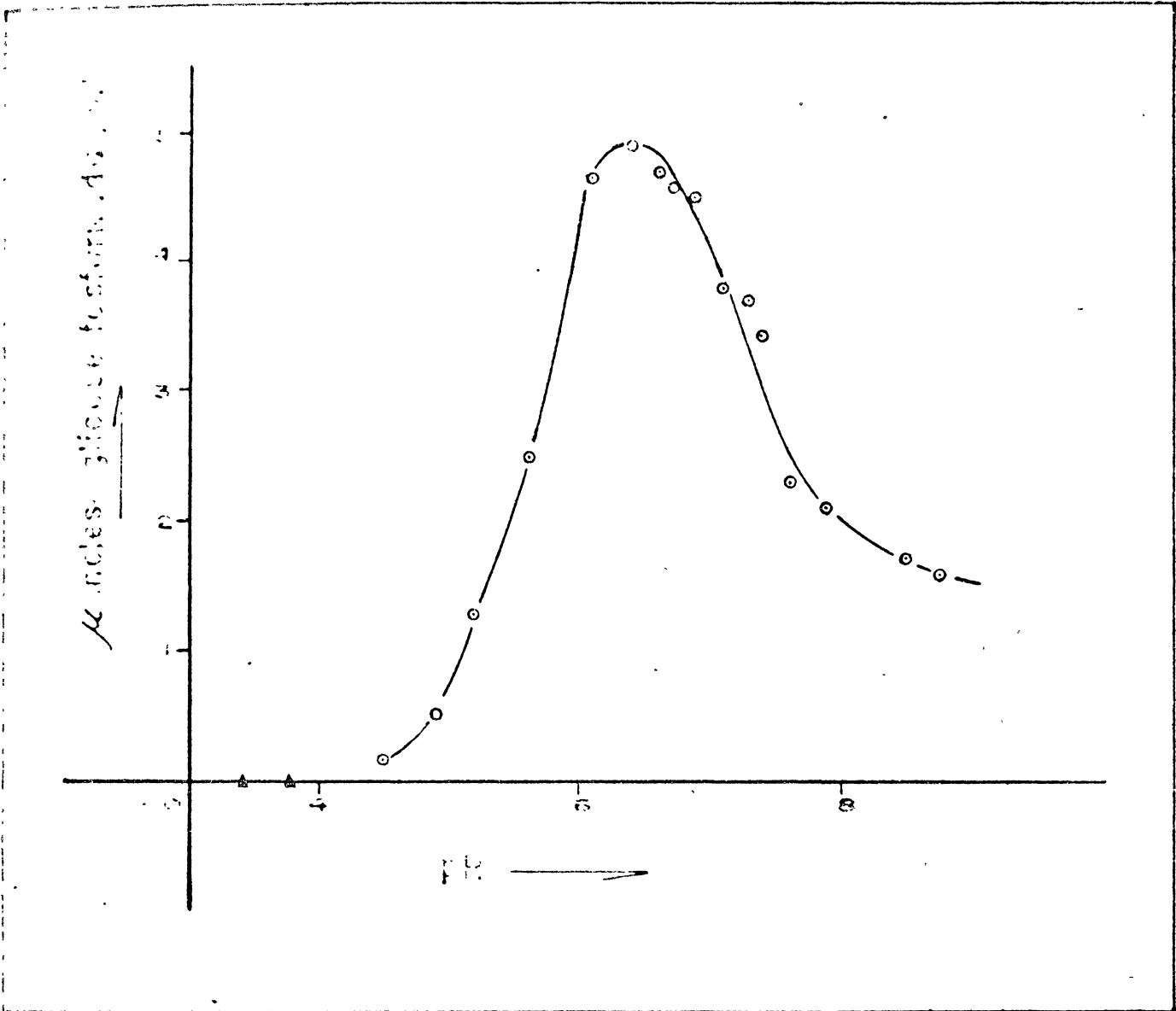


Fig. 6 - Efeito do pH sôbre a atividade da enzima.

Sistema: 50 μ moles de tampão, 2 μ moles de $MgCl_2$; 2 μ moles de ATP; 0,3 μ moles de glucose, 7,0 μ g de proteína.

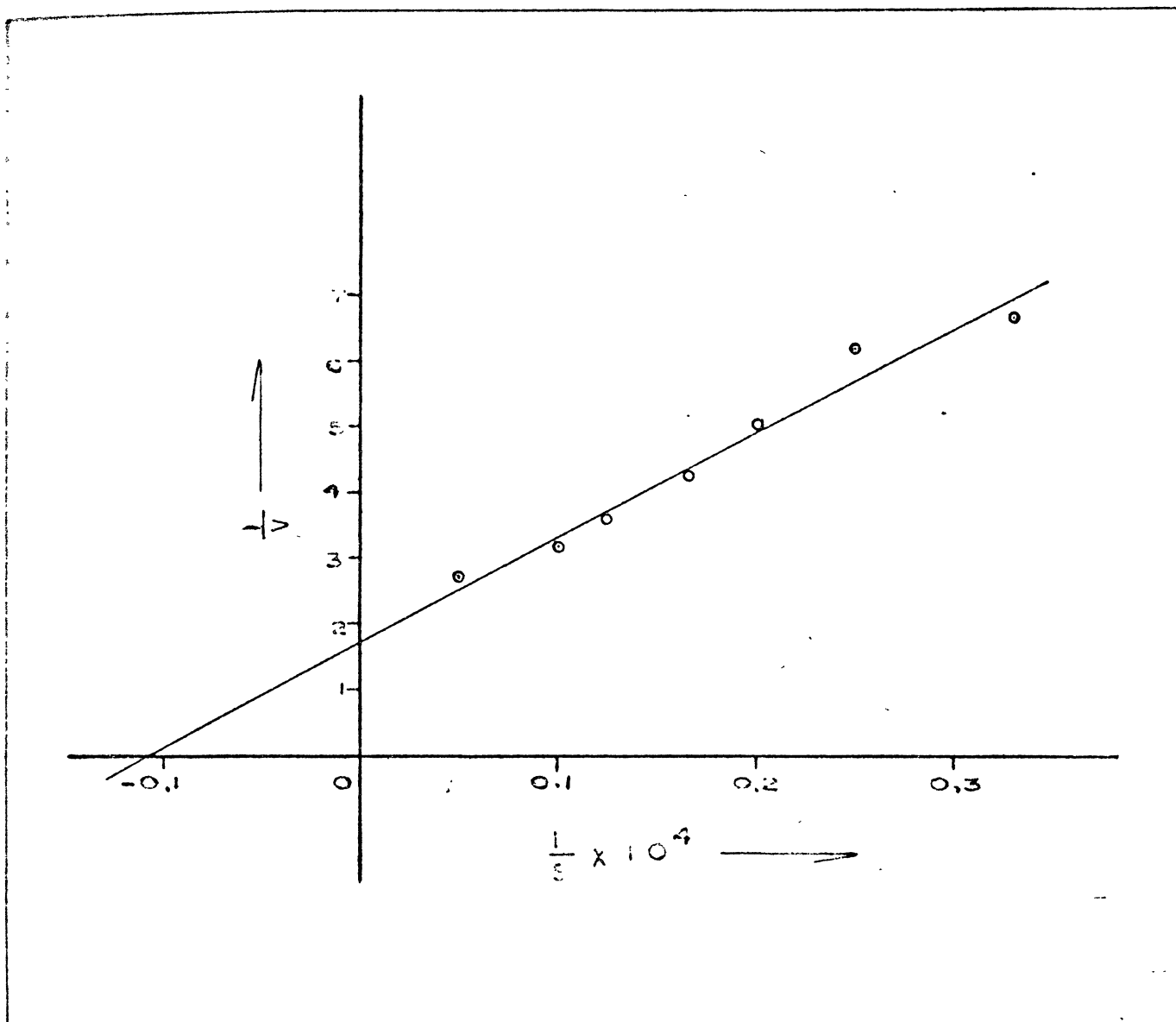


Fig. 7 - Determinação da constante de Michaelis-Menten para GLUCOSE.

Sistema: 6 μ moles de MgCl_2 ; 6 μ moles de ATP, 24 μ g de proteína; glucose em quantidades variáveis e água destilada em quantidade suficiente para completar 0,5 ml.

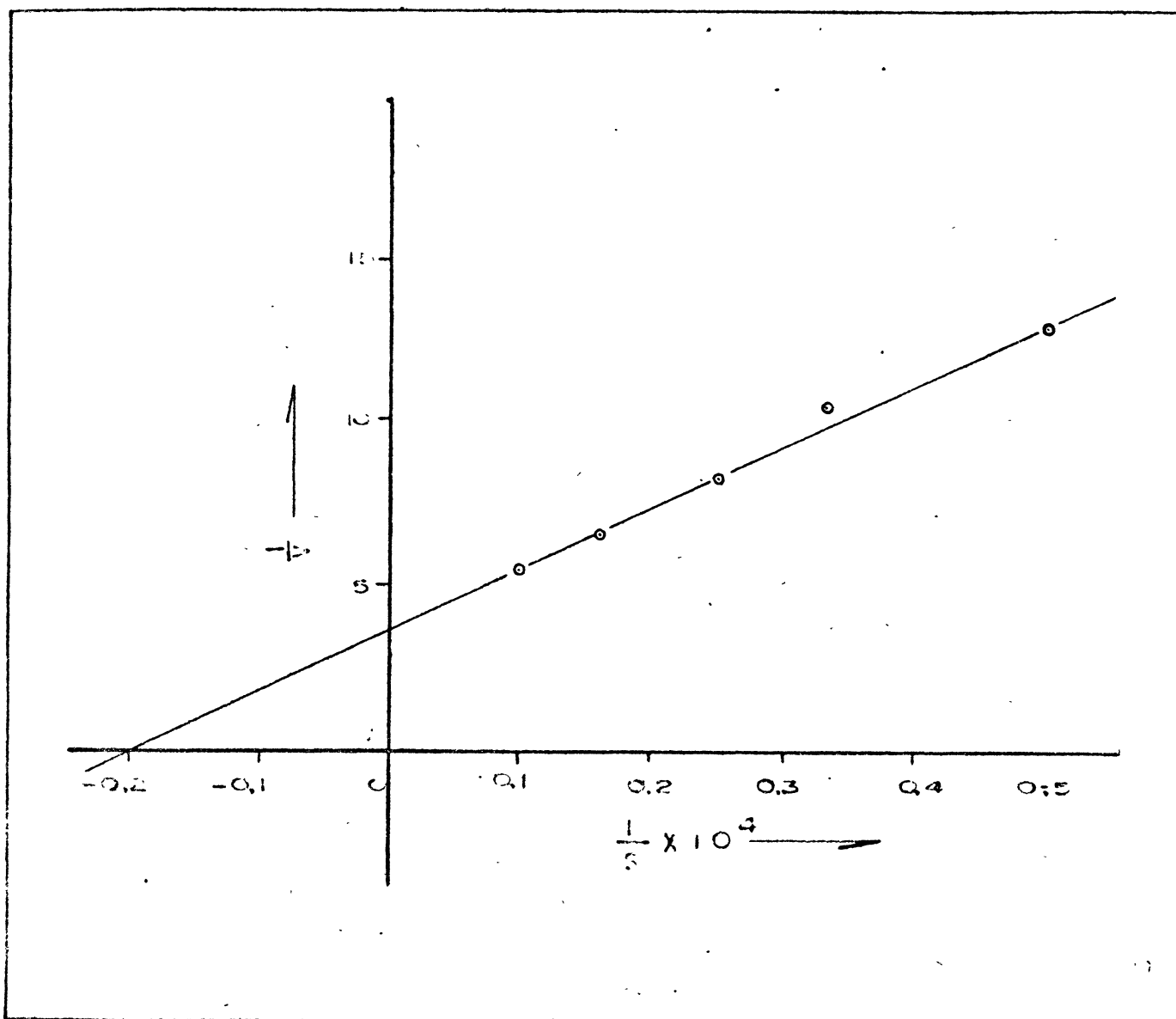


Fig. 8 - Determinação da constante de Michaelis-Menten para MANOSE.

Sistema: Sistema idêntico ao da fig 7, usando-se neste caso, 48 μ g de proteína e quantidades variáveis de manose.

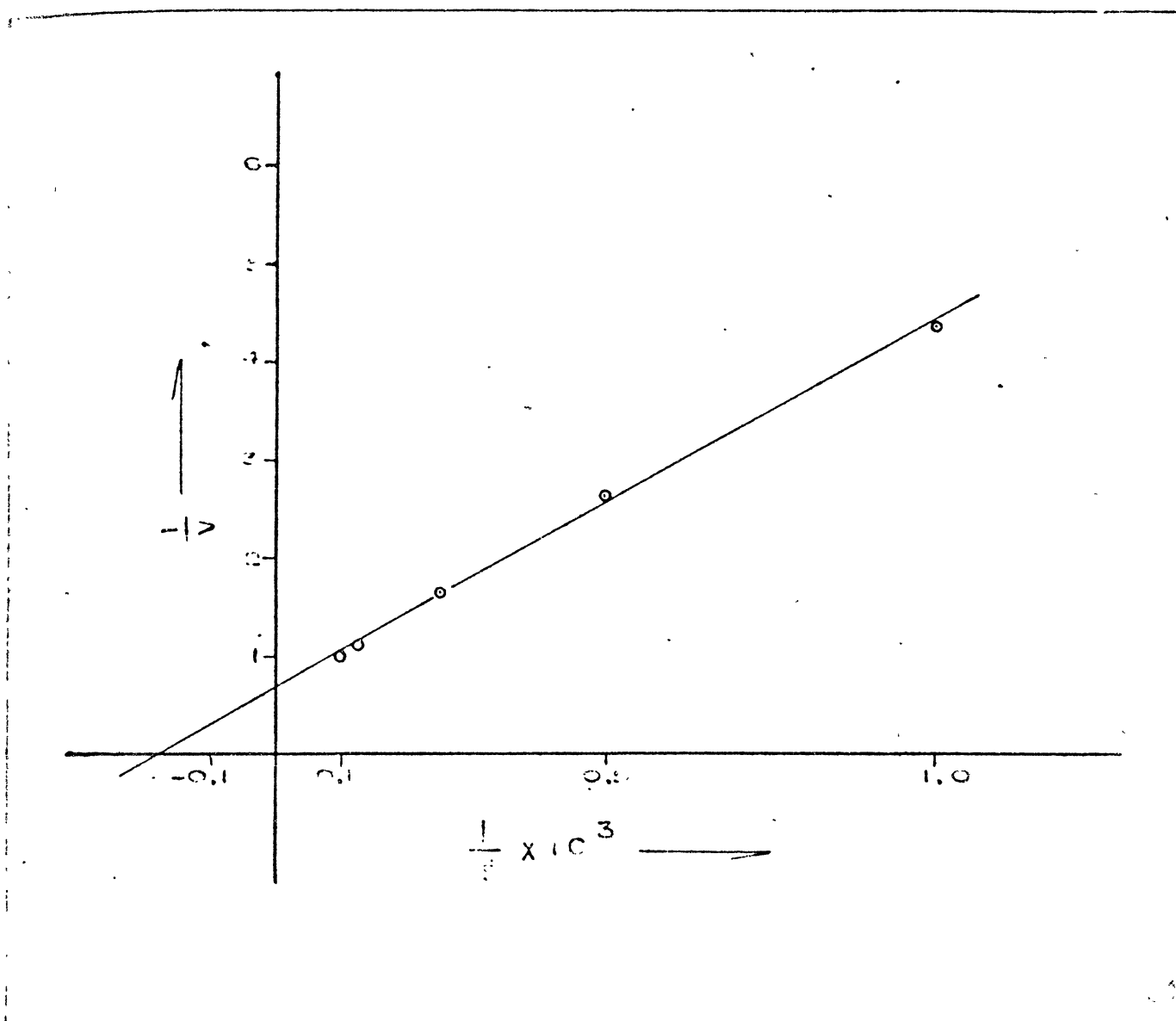


Fig. 9 - Determinação da constante de Michaelis-Menten para FRUTOSE.

Sistema: 3 μ moles de $HgCl_2$; 3 μ moles de ATP; 36 μ g de proteína; frutose em quantidades variáveis e água destilada suficiente para completar 0,3 ml.

DISCUSSÃO

Atividade de Hexoquinase foi observada em extratos livres de células de *Polyporus circinatus* Fr. A enzima parcialmente purificada, apresentou bastante estabilidade, levando 90 dias, aproximadamente, para perder 50% de sua atividade, e, era isenta de galactoseoxidase e outras enzimas que pudessem interferir nos processos de determinação.

O estudo do efeito do pH sobre a atividade enzimática, revela que o pH ótimo para a fosforilação da glucose é de 6,4, como mostra a fig. 6, sendo que a pH 8, a atividade cai a 40%. O fato desta enzima apresentar máxima atividade em meio ácido, a diferença da maioria das enzimas estudadas, incluindo as de fungo, - que apresentam seu máximo entre valores de pH de 7,0 a 10,0. (4,17, 18,27,36,37,38,46,50).

Em relação a este fator, a enzima de *Polyporus circinatus* assemelha-se mais à enzima de *Clostridium butyricum*-pH-6,7 (12); *Clostridium oedematien*-pH 6,7-6,9 (39); e Glucoquinase de fígado de rato pH 6,5-7,0 (19).

A temperatura ótima de incubação foi encontrada ser de 37°C, semelhante à observada por Salthan em enzima de plantas superiores (36).

A tabela II nos mostra que o doador efetivo do grupoamento fosforila é o ATP, sendo UTP, GTP e CTP menos eficientes, representando apenas 0,5% da atividade em relação ao ATP. A ineficácia destes nucleotídeos em comparação ao ATP, foi também constatada por Martinez, em levedura (26), por Ruiz-Artil em abelha (35); por Kamel et al. em *Aerobacter aerogenes* (17) e por Joshi e Jagannathan em cérebro (16).

Crane e Sols, em 1954, demonstraram que a hexoquinase de cérebro é inibida não competitivamente pelo produto da reação Glucose-6-fosfato(44). A enzima de *Polyporus circinatus* não é inibida por G-6P, diferindo, portanto, da enzima de cérebro e da enzima de *Neurospora crassa*(27) e assemelhando-se à enzima de *Aspergillus oryzae*(34). Hexoquinase de *Polyporus circinatus*, é inespe-

cífica, fosforilando glucose, manose, frutose e glucosamina. Os valores encontrados, para velocidade máxima relativa na saturação de substrato, são comparáveis aos encontrados por Sols e Crane, para Hexoquinase de cérebro(43) e por Sols et al, para Hexoquinase de levedura(46).

Os dados aqui encontrados diferem dos obtidos por Medina e Nicholas, para Hexoquinase de Neurospora crassa(27), principalmente devido à baixa velocidade dos demais açúcares em relação à glucose.

A enzima de Aspergillus parasiticus, é diferente destas citadas, por fosforilar galactose a uma velocidade semelhante à da glucose(10).

Estas comparações feitas podem ser mais claramente observadas através da tabela IV.

T A B E L A . . . I V

Substrato	F O N T E				
	Cérebro (43)	Levedura (46)	<u>Aspergillus</u> <u>Paras.</u> (10)	<u>Neurospora</u> <u>crassa</u> (27)	<u>Polypo</u> <u>rus cir-</u> <u>cinatus</u>
	Velocidade máxima relativa				
Glucose	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Manose	0,4	0,8	0,64	0,23	0,7
Frutose	1,5	1,8	0,28	0,23	2,0
Glucosamina	0,6	0,7	0,55	0,29	0,5

A tabela indica que a hexoquinase de Polyporus circinat assemelha-se mais à enzima de cérebro e levedura, do que a hexoquinase de outros fungos, no que diz respeito aos parâmetros de velocidade máxima relativa.

A ordem de afinidade em relação ao substrato, para a

enzima de P.circinatus é: FRUTOSE > GLUCOSE > FRUTOSE, enquanto que a ordem de velocidade máxima na saturação é justamente a inversa. Isto é também observado em hexoquinase de cérebro(43) e de levedura (46).

A enzima de Polyporus circinatus apresenta baixa afinidade em relação à frutose, sendo o $K_m = 5,5 \times 10^{-3}M$, enquanto que a hexoquinase de levedura apresenta um K_m para a frutose mais alto da ordem de $10^{-4}M$ (46).

A afinidade da enzima pela glucose não é uma constante nesta enzima, pois, a ordem de afinidade varia com relação às várias fontes. Através da fig. 7, podemos ver que o K_m para a glucose é da ordem de $10^{-4}M$, esta mesma ordem de grandeza foi encontrada para a enzima de Neurospora crassa(27), Aspergillus parasiticus (10), e levedura(43). Sols e Crane encontraram para hexoquinase de cérebro um K_m da ordem de $10^{-6}M$ (43), e Ruiz-Amil e Sols, estudando o K_m para Aspergillus oryzae, obtiveram um valor da ordem de $10^{-5}M$ (34).

A maior afinidade que a hexoquinase de Polyporus circinatus apresenta é em relação à manose. O K_m encontrado é $5 \times 10^{-4}M$, valor igual ao obtido por Hernandez e Sols para hexoquinase de tecido adiposo de rato (13).

CONCLUSÕES

Hexoquinase de *Polyporus circinatus* é inespecífica, fosforilando glucose, sacarose, frutose e glucosamina, sendo o valor de seu pH ótimo de 6,4.

AGRADECIMENTO

A autora agradece de modo especial, à Dra. Déa Anarel, pela orientação deste trabalho.

Ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, ao Conselho de Pesquisas da Universidade Federal do Paraná, ao D.N.D.E.-FUNPEC e ao Conselho Nacional de Pesquisas, por possibilitarem a execução desta tese.

Aos componentes do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelo estímulo e colaboração.

B I B L I O G R A F I A

- 1 - Amaral, D.- Mecanismo de degradação da Rafinose por glicosidases de *Polyporus circinctus* Fr. Tese de concurso à docência livre da cadeira de Química Biológica - 1968.
- 2 - Asensio, C.- Rev. españ. fisiol. 16, suppl. 2 - 121 (1960), in Chem.Abstr. 55, 4639h (1961).
- 3 - Bayley, N. e Webb, E.C.- Bioch.J. 42, 60 (1948).
- 4 - Belski, K. e Schultz, J.- J.Protoz. 9, 195 (1962), in Chem. Abstr. 57, 17058a (1962).
- 5 - Berger, L., Slein, M.W., Colowick, S.P. e Cori, G.T.- J. Gen. Physiol. 29, 379 (1946).
- 6 - Brown, J.H.- Bioch.Biophys.Acta 7, 487 (1951).
- 7 - Cardini, C.E.- Enzymologia, 14, 362 (1951).
- 8 - Colowick, S.P. e Kalckar, H.M.- J.Biol.Chem. 148, 117 (1943).
- 9 - Crane, R.H.- in Boyer, P.D. et al ed. The Enzymes vol. 6 - New York - Acad. Press 1962 - 47.
- 10 - Davidson, E.A.- J.Biol.Chem. 235(1), 23 (1960).
- 11 - Dixon, H.- Bioch.J. 55, 170 (1953).
- 12 - Gavard, R.- Compt. rend. 238, 1620 (1954), in Chem.Abstr. 49, 1836c (1955).
- 13 - Hernandez, A. e Sols, A.- Bioch.J. 86, 166 (1963).
- 14 - Hishida, M.- Ciência e Cultura, 20(2), 383 (1968).
- 15 - Hugget, A.St.G. e Nixon, D.A.- Bioch.J. 66, 12p (1957).

- 16 - Joshi, M.D. e Jagannathan, V.- Arch.Bioch.Biophys. 125, 460 (1958).
- 17 - Kanel, H.Y., Allyson, J.P. e Anderson, R.B.- J.Biol.Chem. 241 (3), 690 (1966).
- 18 - Kerly, R. e Leaback, D.H.- Bioch.J. 67, 245 (1957).
- 19 - Klaus, O.- J.Physiol.Chem. 345(1), 42 (1966), in Chem.Abstr. 65, 14027e.(1966).
- 20 - Klein, H.P.- J. Bacter. 66, 650 (1953).
- 21 - Lunitz, M. e McDonald, H.R.- J.Gen.Physiol. 29, 393 (1946).
- 22 - Lineweaver, H. e Burk, D.- J.Amer.Chem.Soc. 56, 658 (1934).
- 23 - Long, C.- Bioch.J. 50, 407 (1952).
- 24 - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. e Randall, R.J.- J. Biol.Chem. 193, 265 (1951).
- 25 - Markus, Z., Miller, G. e Avigad, G.- Applied.Microb. 13, 686 (1965).
- 26 - Martinez, R.J.- Arch.Bioch.Biophys. 93, 508 (1961).
- 27 - Medina, A. e Nicholas, D.J.D.- Bioch.J. 66, 573 (1957).
- 28 - Meyerhof, O. e Geliaskowa, W.- Arch.Bioch. 12, 405 (1947).
- 29 - Meyerhof, O.- Arch.Bioch. 13, 485 (1947).
- 30 - Nelson, L.- J.Biol.Chem. 153, 375 (1944).
- 31 - Newburger, R.W., Claridge, C.A. e Cheldetin, V.M.- J. Biol. Chem. 214, 27 (1955).
- 32 - Pilkis, S.J.- Proc.Soc.Exp.Med. - 129(3), 681 (1968).
- 33 - Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry 1961 - Oxford (etc). Pergamon Press, 1961, 159 p.

- 34 - Ruiz-Amil, M. e Sols, A.- Biochim. 334, 168 (1961).
- 35 - Ruiz-Amil, M.- J.Insect Physiol. 8, 259 (1962), in Chem.Abstr. 58, 2607a (1963).
- 36 - Saltman, P.- J.Biol.Chem. 200, 145 (1953).
- 37 - Sato, R., Makenori, T. e Ebata, H.- J.Bioch.(Japan) 43(5), 623 (1956).
- 38 - Seed, J.R. e Baquero, H.F.- J.Protoz. 12(3), 427 (1965), in Chem.Abstr. 64, 956h (1966).
- 39 - Shemanova, E.F. e Dogoveshehenskii, V.A.- Biokhimiya 21, 356 (1956), in Chem.Abstr. 50, 16904f (1956).
- 40 - Stein, H.L., Cori, G.F. e Cori, C.L.- J.Biol.Chem. 186, 763 (1950).
- 41 - Smith, P.J.C.- Bioch.J. 76, 514 (1960).
- 42 - Sols, A. e Crane, R.- J.Biol.Chem. 206, 925 (1954).
- 43 - Sols, A. e Crane, R. - J.Biol.Chem. 210, 531 (1954).
- 44 - Sols, A. e Crane, R. - J.Biol.Chem. 210, 597 (1954).
- 45 - Sols, A.- Bioch. et Biophys.Acta 19, 144 (1956).
- 46 - Sols, A., De la Fuente, G, Villar-Palasi, C. e Asensio, C. - Bioch. et Biophys.Acta 30, 92 (1958).
- 47 - Somogyi, H.- J.Biol.Chem. 160, 69 (1945).
- 48 - Trayster, M.A. e Colowick, S.P.- Arch.Bioch.Biophys, 94, 177 (1961).

- 49 - Wiebelhaus, W.D. e Lardey, H.A. - Arch. Bioch. 21, 321 (1949).
- 50 - Wolter, S. - Naturforsch, B., 23(6), 839 (1968), in Chem. Abstr. 69, 49393u (1968).

