

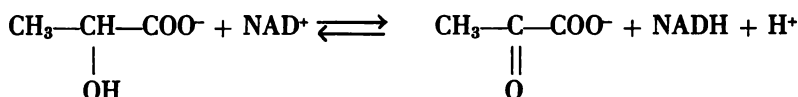
“DESHIDROGENASAS LACTICAS DE RHIZOPUS NIGRICANS”

JOSÉ IVÁN VÁZQUEZ ALCÁNTARA *
RICARDO YÁÑEZ AVILA **

INTRODUCCIÓN

La deshidrogenasa láctica (L-Lactato: NAD

oxidorreductasa E.C.1.1.1.27), cataliza la transformación del lactato en piruvato y viceversa, utilizando NAD⁺ como coenzima



La deshidrogenasa láctica fue reconocida por primera vez en el año de 1920 por Thunberg (1920). Varios investigadores (Cahn y col., 1962, Market, 1963, 1964 y 1965, Shaw y Barto, 1963, Boyer y col., 1963, Pesce y col., 1967, Jaenicke y Knof, 1968, Adams y col., 1968), han informado que esta enzima está presente en casi todos los tejidos de los vertebrados y en otros muchos organismos en diferente proporción y además que se encuentra en cinco diferentes formas moleculares o isoenzimas. Las isoenzimas de la deshidrogenasa láctica son tetrámeros formados por la combinación de dos tipos de monómeros, denominados cadena (A) o (M) y cadena (B) o (H), con un peso molecular de 33 500. Markert (1963) comprobó que estos tetrámeros o isoenzimas se unen en las siguientes combinaciones posibles.

AAAA LDH₅ (M₄)
AAAB LDH₄ (M₃H₁)
AABB LDH₃ (M₂H₂)
ABBB LDH₂ (M₁H₃)
BBBB LDH₁ (H₄)

Estas isoenzimas presentan propiedades catalíticas y metabólicas diferentes. La LDH₅ (M₄) muestra una afinidad muy elevada por el piruvato, en cambio, la LDH₁ (H₄) tiene una afinidad relativamente baja y además se inhibe a concentraciones elevadas. Las isoenzimas híbridas presentan propiedades intermedias en forma proporcional a su estructura molecular. Cada tejido de un organismo presenta una concentración característica de cada isoenzima y aparentemente existe una correlación entre la composición isoenzimática y la actividad fisiológica, ya que, las isoenzimas M predominan en tejidos que requieren energía en periodos de anaerobiosis, como los músculos voluntarios y los tejidos embrionarios, debido a que son muy efectivas para reducir el piruvato reoxidando el NADH₂ proveniente de la glicolisis. Las isoenzimas H están presentes en tejidos con un suministro constante de oxígeno, como el corazón. En es-

* Sección de Bioquímica del Centro Interdisciplinario de Ciencias de la Salud del Instituto Politécnico Nacional. Apartado Postal 5, México (23), D.F.

** Becario de la COFAA del I.P.N.
Departamento de Bioquímica y Biofísica de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. México (17), D.F.

tas células como la afinidad de las isoenzimas por el piruvato es baja, el NADH_2 es reoxidado en la cadena respiratoria.

Se ha descrito una sexta isoenzima de la deshidrogenasa láctica, la LDH_x , presente en las células de testículo maduro y esperma (Blanco y Zinkham, 1963). La LDH_x , es también un tetrámero, pero constituida por cadenas polipeptídicas diferentes, denominadas unidades "C". Esta isoenzima-x presenta propiedades catalíticas intermedias entre la LDH_1 y la LDH_5 . Se ha encontrado en diferentes especies, aunque varían tanto en número como en movilidad electroforética.

Las cadenas polipeptídicas (A, B y C), que constituyen las diferentes isoenzimas de la deshidrogenasa láctica, están codificadas por genes diferentes (Shaw y Barto, 1963), por lo que las reacciones metabólicas en que participan están determinadas genéticamente en base a la diferenciación celular, y al desarrollo del organismo, aunque es posible modificar el pa-

trón isoenzimático mediante cambios fisiológicos.

La especificidad de las isoenzimas de los tejidos de diferentes vertebrados es similar (Fondy y Kaplan, 1965). Se ha demostrado que las propiedades químicas y catalíticas de los dos tipos de subunidades son relativamente constantes en los vertebrados (Kaplan, 1964 y Pesce y col., 1967).

En microorganismos la deshidrogenasa láctica ha sido poco estudiada debido a que, con pocas excepciones, es difícil de purificar. Se conoce una gran variedad de deshidrogenasas lácticas bacterianas, de las cuales, exceptuando la de *Lactobacillus plantarum*, ninguna se ha purificado exhaustivamente. Sin embargo, los estudios realizados en preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas de bacterias, indican una gran variación tanto en sus propiedades químicas como catalíticas dependiendo del microorganismo de que se trate. Como se puede apreciar en la siguiente table:

PROPIEDADES DE DESHIDROGEASAS LACTICAS BACTERIANAS
(Tarmy y Kaplan, 1968)

Autor	Año	Organismo	Isómero de Lactato formado	PM	Inhibición por Oxamato	Activador
Dennis y Kaplan	1960	<i>Lactobacillus plantarum</i>	D	60000-70000	—	Ninguno
Dennis y Kaplan	1960	<i>Lactobacillus plantarum</i>	L	155000	+	Ninguno
Dennis, Colowick y Kaplan	1962	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	D	80000	+	Ninguno
Wittenberger	1966	<i>Butyribacterium rettgeri</i>	D	?	?	Piruvato
Tarmy y Kaplan	1965	<i>Escherichia coli</i>	D	115000	+	Piruvato
Pascal y Pichinoty	1966	<i>Aerobacter aerógenes</i>	D		?	Urea o sales
Yoshida y Freese	1965	<i>Bacillus subtilis</i>	L	140000	?	?
Wolin	1964	<i>Streptococcus bovis</i>	L	?	?	Fructuosa
					?	1,6 di p

Como se puede apreciar las propiedades de las deshidrogenasas lácticas en bacterias son más diversificadas que en los animales. Se han descrito varias enzimas no dependientes de piridin nucleótidos capaces de catalizar la oxidación del lactato a piruvato. Snoswell (1963), informa de la purificación parcial de una D y una L, lactato deshidrogenasa, independientes de NAD, pero capaces de reducir ciertos indicadores de óxido-reducción, a partir de células de *Lactobacillus arabinosus*.

Witternberger y Haaf (1966) informan que los extractos celulares de *Butyribacterium rettgeri*, son capaces de reducir el piruvato a lactato con NADH_2 y oxidar el lactato sin la participación de NAD, por reducción de ferricianuro o diclorofenol indofenol. La síntesis de este último sistema enzimático es reprimida por glucosa, fructosa o piruvato. La actividad de la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD se eleva varias veces en esas condiciones.

Witternberger y Fulco (1967) purificaron la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD de *Butyribacterium rettgeri* y demostraron que era capaz de catalizar la reducción de piruvato a lactato utilizando NADH_2 como coenzima, pero fue incapaz de catalizar la oxidación de lactato con NAD. Pero si actuó con el 3-acetilpiridin-nucleótido. Otros análogos del NAD fueron inefectivos.

Se han estudiado también las deshidrogenasas lácticas presentes en hongos microscópicos. Varios autores (Gleason y col., 1966; Gleason y Price, 1969; Purohit y Turian, 1972) han descrito la deshidrogenasa láctica de varios Oomycetes y del Chytridiomycetes *Allomyces*. Lejohn (1970) estudió el mecanismo de control de la deshidrogenasa láctica, en varias Oomycetes, Hipochytridiomycetes y Chytridiomycetes y encontró que está controlada genéticamente y modulada por GTP, lactato y NADH_2 .

La deshidrogenasa láctica de un grupo muy abundante de hongos productores de ácido láctico, el Zygomycete, ha sido muy poco investigada. Obayashi y col., (1966) purificaron parcialmente la deshidrogenasa láctica de *Rhizopus oryzae* y comprobaron que esta enzima

cataliza la reducción de piruvato y la oxidación de lactato. Posteriormente Pritchard (1971), demostró que la enzima de *Rhizopus oryzae*, responsable de la formación de ácido láctico, no participaba en la oxidación de este ácido en las etapas finales de su crecimiento. El mismo Pritchard, comprobó que la oxidación del láctico la realiza una deshidrogenasa láctica independiente de NAD, que es activa solo en los estados finales del crecimiento y que puede usar como aceptor de electrones el diclorofenol indofenol, el ferricianuro o el citocromo C.

Pritchard (1973) estudió los factores que afectan la actividad y síntesis de la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD de *R. oryzae* y encontró que su actividad es dependiente de la concentración de glucosa en el medio, en forma directamente proporcional. Las concentraciones bajas de zinc en el medio también incrementan los niveles de esta enzima.

En este trabajo se pretende demostrar la presencia de isoenzimas de la deshidrogenasa láctica dependientes e independientes de NAD, en *Rhizopus nigricans*, hongo microscópico productor de ácido láctico, perteneciente al mismo género en el cual Pritchard (1971) encontró las isoenzimas de la deshidrogenasa láctica dependiente e independiente de NAD.

Para demostrar lo anterior se planeó el trabajo en 3 etapas que fueron:

1) demostrar en extractos libres de células los dos tipos de actividad de la deshidrogenasa láctica, la dependiente y la independiente de NAD.

2) purificar parcialmente cada isoenzima y estudiar algunas de sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo la separación electroforética de las dos formas moleculares.

3) estudiar la relación entre la actividad de cada isoenzima y el estado de desarrollo del hongo con objeto de investigar si hay funciones metabólicas específicas.

Material y Métodos

El microorganismo empleado en este estudio fue *Rhizopus nigricans* cepa 6227-B proporcionada por el laboratorio de Micología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Las reactivos empleados fueron de grado analítico. Las determinaciones de absorbencia se efectuaron en un espectrofotómetro Varian-Techtron modelo 635. Las separaciones de los extractos se hicieron en una centrifuga refrigerada Sorvall modelo RC-2B. La purificación de las isoenzimas se hizo por cromatografía en un colector de fracciones Buchler. La separación electroforética se llevó a cabo en tiras de acetato de celulosa sepraphore III de 2.5 por 14.5 cm., de la casa Gelman. El equipo de electroforesis fue también Gelman.

El cultivo del hongo tanto para las pruebas de desarrollo como para el cultivo masivo se llevó a cabo a 25°C en fase estacionaria utilizando un medio líquido con glucosa, glutamato, sales minerales y con un pH inicial de 5.7. El micelio se cosechó por filtración al vacío y el extracto libre de células se obtuvo moliendo el micelio en un mortero, a -10°C, con un poco de arena limpia hasta obtener un polvo fino al cual se le agregaron 3 ml de solución reguladora TRIS-HCl 0.1 M, pH 7.2, por cada gramo de micelio. La pasta así obtenida se centrifugó a 15,000 rpm durante 15 minutos, a 4°C, y el sobrenadante constituyó el extracto libre de células.

El estudio de la relación entre la actividad de las isoenzimas con el estado de desarrollo del hongo se efectuó determinando, a diferentes periodos de incubación; la glucosa por el método de Nelson Somogyi (1945) y el ácido láctico por el método enzimático (Sterling, 1966) en el medio de cultivo (filtrado), y la actividad de las isoenzimas respectivas en el extracto libre de células.

La actividad de deshidrogenasa láctica dependiente de NAD se determinó midiendo las variaciones de absorbencia por minuto a 340 nm causadas por la adición de 0.2 ml de extracto, diluido convenientemente, a una mez-

cla compuesta de: 2.6 ml de sol. reguladora de fosfatos 0.1 M, pH 6.5, 0.1 ml de solución de NADH₂ 0.0025 M y 0.1 ml de piruvato de sodio 0.25 M.

La actividad de deshidrogenasa láctica independiente de NAD se determinó midiendo las variaciones de absorbencia por minuto a 600 nm causadas por la adición de 0.2 ml de extracto, diluido convenientemente, a una mezcla compuesta de: 2.35 ml de solución reguladora de fosfatos 0.1 M, pH 7.0, 0.2 ml de 2,6-diclorofenol indofenol 0.001 M y 0.25 ml de lactato de sodio 0.2 M.

La purificación parcial de las isoenzimas se efectuó por precipitación diferencial con (NH₄)₂SO₄ y cromatografía con DEAE Sephadex A 50-120 en una columna de 1.5 por 50 cm. La deshidrogenasa láctica dependiente de NAD se eluyó con una solución reguladora de fosfatos 0.01 M, pH 6.5, y la isoenzima independiente de NAD se eluyó con una solución reguladora de fosfato 0.01 M, pH 7.0. Se colectaron fracciones de 5 ml. En todas las fracciones se determinó la actividad de las isoenzimas respectivas y la concentración de proteínas por el método del biuret (Clark, 1964).

La separación electroforética se efectuó utilizando la técnica descrita por Opher (1966) y la visualización de las isoenzimas se llevó a cabo en base a la técnica descrita por Markert y Moller (1959). Se emplearon dos diferentes tipos de solución reveladora: una cuya acción se basa en la formación de compuestos coloridos por la reducción de sales de tetrazolio, técnica A (Barnett, 1964) y la otra basada en la decoloración, por reducción, de diclorofenol-indofenol, técnica B (Snoswell, 1963).

Resultados

Las pruebas para confirmar la existencia de la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD mostraron un cambio en la densidad óptica a 340 nm de 0.063/min., provocada por un extracto crudo diluido 1:20. La mezcla reaccionante no presentó ninguna variación de su absorbencia a 340 nm cuando se le agregaron

2.5 ml de lactato de sodio 0.2 M, pH. 7.0.

La existencia de la deshidrogenasa láctica independiente de NAD se demostró porque el extracto anterior no fue capaz de modificar la absorbencia a 340 nm en una mezcla compuesta de lactato y NAD⁺ 0.01 M a pH 7.0, pero si produjo un cambio en la absorbencia a 600 nm de 0.033/min., con lactato y dicloro-fenol indofenol 0.001 M a pH 7.0.

La relación entre la actividad de ambas isoenzimas de la deshidrogenasa láctica con el estado de desarrollo del hongo, se puede apreciar en las gráficas de la figura 1.

—Purificación de las isoenzimas.

a) Deshidrogenasa láctica dependiente de NAD.— A partir de un extracto crudo cuya actividad específica fue de 623.56* unidades Wroblewski/mg de proteína, se obtuvo finalmente una fracción cromatográfica con una actividad específica de 7,136.7 unidades Wroblewski/mg de proteína, la cual representó un incremento de 11.4 veces la actividad específica inicial y un rendimiento de 1.1% de la actividad total.

b) Deshidrogenasa láctica independiente de NAD.— A partir de un extracto crudo cuya actividad específica fue de 59.96** unidades/mg de proteínas se obtuvo una fracción cromatográfica con una actividad específica de 736.5 unidades/mg de proteína, la cual representó un incremento de 12.9 veces la actividad específica inicial y un rendimiento de 5.67%.

*Una unidad Wroblewski se define como la cantidad de enzima que es capaz de producir un cambio de 0.001 en la absorbencia a 340 nm en 3 ml de mezcla (Wroblewski 1955). Las unidades Wroblewski se calculan multiplicando Δ D.O./min. por 10,000 y por el factor de dilución.

** Análogamente, una unidad de deshidrogenasa láctica independiente de NAD se define como la cantidad de enzima que es capaz de producir un cambio de 0.001 en la absorbencia a 600 nm en un minuto en 3 ml de mezcla. Estas unidades se calcularon multiplicando Δ D.O./min., por 10,000 y por el factor de dilución.

Los datos obtenidos en las diferentes etapas de ambas purificaciones parciales, aparecen en las tablas 1 y 2.

Pruebas cinéticas:

Las fracciones con mayor actividad específica de las deshidrogenasas lácticas, dependiente e independiente de NAD, fueron empleadas para determinar: el pH óptimo y el efecto de la concentración de sustrato. Los resultados aparecen en las figuras 2, 3, 4, 5 y 6.

Electroforesis:

a) Del extracto crudo.—Las tiras reveladas con la técnica A mostraron dos bandas de color rosa intenso, una desplazada hacia el cátodo y la otra hacia el ánodo. Las tiras reveladas con la técnica B mostraron una banda blanca en un fondo azul, desplazada hacia el ánodo.

b) De la fracción purificada LDH-NAD-DEP.— Las tiras reveladas con la técnica A mostraron una banda de color rosa desplazada hacia el cátodo. Las tiras reveladas con la técnica B mostraron una banda blanca apenas perceptible en un fondo azul, desplazada hacia el ánodo.

c) De la fracción purificada LDH-NAD-IND.— Las tiras reveladas no mostraron ninguna banda con ninguna de las dos técnicas.

DISCUSIÓN

Las pruebas para detectar dos tipos de actividad de deshidrogenasa láctica en *Rhizopus nigricans* mostraron una isoenzima que presenta actividad de piruvato reductasa dependiente de NAD y otra con actividad de lactato oxidasa independiente de NAD. Esta isoenzima es capaz de utilizar dicloro-fenol indofenol como aceptor de electrones en la oxidación del lactato.

Tabla 1

Purificación de la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD de *Rhizopus nigricans*

Fracción	Actividad total (unidades Wroblewski)	Actividad específica (U.W/mg de proteína)	Incremento en la purificación	% de recuperación
Extracto crudo	1408 000	623.56	0	100
F-S-30 ⁽¹⁾	1232 000	830.46	1.33	87.5
F-30-50-P ⁽²⁾	768 600	1134.64	1.81	54.58
F-C ⁽³⁾	15 488	7136.7	11.4	1.1

⁽¹⁾ Fracción sobrenadante después de llevar el extracto crudo a un 25% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y eliminar por centrifugación el precipitado enzimáticamente inactivo.

⁽²⁾ Fracción obtenida al disolver el precipitado resultante de llevar la fracción anterior (F-S-30) al 50% de saturación con sulfato de amonio, en solución de TRIS-HCl 0.1 M pH 7.2 y sometida a diálisis a 4°C contra el mismo regulador.

⁽³⁾ Fracción obtenida al pasar la fracción anterior (F-30-50-P) a través de una columna refrigerada de DEAE-SEPHADEX, A-50, preparado según la técnica recomendada por Latner y Skillen (1968). La muestra se eluyó con solución reguladora de fosfatos 0.01 M pH 6.5. La velocidad de elución fue de 1 ml/2.5 minutos. Se colectaron fracciones de 5 ml. En cada fracción se determinó la actividad enzimática y la concentración de proteína. Se juntaron los tubos 12-20 y se precipitaron con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 55% de saturación. El precipitado se disolvió en el mínimo de solución reguladora de fosfato 0.01 M pH 6.5 y se dializó a 4°C contra la misma solución.

Tabla 2

Purificación de la deshidrogenasa láctica independiente de NAD de *Rhizopus nigricans*

Fracción	Actividad total (unidades Wroblewski)	Actividad específica (U.W/mg de proteína)	Incremento en la purificación	% de recuperación
Extracto crudo	362 000	56.96	0	100
F-40-S ⁽¹⁾	328 000	437.33	7.67	90.60
F-40-60-P ⁽²⁾	318 500	606.66	10.64	87.98
F-C ⁽³⁾	20 272	736.5	12.93	5.6

⁽¹⁾ Fracción sobrenadante después de llevar el extracto crudo a un 40% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y eliminar por centrifugación el precipitado enzimáticamente inactivo.

⁽²⁾ Fracción obtenida al disolver el precipitado resultante de llevar la fracción anterior (F-40-S), a un 60% de saturación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, en solución de TRI-HCl 0.1 M pH 7.2 y sometida a diálisis a 4°C contra el mismo regulador.

⁽³⁾ Fracción obtenida al pasar la fracción anterior (F-40-60-P) a través de una columna refrigerada de DEAE-SEPHADEX, A-50, preparado como lo describe Latner y Skillen (1968). La muestra se eluyó con solución reguladora de fosfato 0.01 M pH 7.0. La velocidad de elución fue de 1 ml/2.5 minutos. Se colectaron fracciones de 5 ml. En cada fracción se determinó la actividad enzimática y la concentración de proteína. Se seleccionó el tubo con mayor actividad específica para los estudios de cinética.

Las pruebas de actividad de las isoenzimas en función del estado de desarrollo del hongo mostraron que ambas isoenzimas están presentes desde las etapas iniciales de crecimiento y que la enzima dependiente de NAD alcanza un máximo de actividad a las 72 horas de incubación, después de este tiempo su actividad decrece coincidiendo este decremento con la falta de glucosa en el medio. Por su parte la isoenzima independiente de NAD logra un máximo de actividad después de las 90 horas de incubación, cuando la esporulación es franca.

Las diferentes etapas de la purificación, así como las pruebas cinéticas mostraron que estas isoenzimas presentan diferentes propiedades fisicoquímicas. La deshidrogenasa láctica independiente de NAD es más sensible al almacenamiento a -10°C y al proceso de purificación. Cada una presentó diferente grado de precipitación diferencial con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; la enzima dependiente de NAD inicia su precipitación a una saturación del 30% y precipita totalmente a 50% de saturación por su parte la enzima independiente de NAD inicia su precipitación a una saturación de 40% y precipita totalmente a 55% de saturación.

El pH óptimo de la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD fue de 5.8 y 7.0 el de la deshidrogenasa láctica independiente de NAD. Pritchard (1971) encontró en *R. oryzae* que la isoenzima dependiente de NAD presentó un pH óptimo más ácido que el de la isoenzima independiente (7.2 y 8.4 respectivamente). En bacterias que presentan este tipo de isoenzimas se ha encontrado un fenómeno inverso (Dennis y Kaplan, 1960).

Estas isoenzimas fueron susceptibles de separarse electroforéticamente. Es claro que la banda incolora que aparece revelada con la técnica B corresponde a la deshidrogenasa láctica independiente de NAD; lo que resulta contradictorio es que en las bandas teñidas con la técnica A, que utiliza NAD como coenzima, aparezca una banda que presenta desplazamiento similar. Si la isoenzima desplazada

hacia el ánodo es la deshidrogenasa láctica independiente de NAD, su visualización mediante la técnica A puede explicarse suponiendo que los electrones liberados en la oxidación del lactato son aceptados directamente por el intermediario transportador de electrones o por el colorante indicador de red-ox que la técnica utiliza.

Respecto a la banda de las tiras reveladas con la técnica A que aparece desplazada hacia el cátodo y que mediante la técnica B no aparece, se puede suponer que corresponde a la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD, la que a pesar de las condiciones extremas de pH en las que ocurre la reacción de visualización (pH 9.0), tan alejadas de su pH óptimo (pH 5.8), aún pudiera ser capaz de oxidar el lactato.

Los resultados obtenidos con la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD purificada, concuerdan con los obtenidos en los extractos crudos. La banda correspondiente a la isoenzima independiente de NAD apenas fue perceptible con ambos métodos de tinción lo cual puede deberse a que esa isoenzima es más sensible al proceso de purificación, a su eliminación parcial o a una combinación de ambas posibilidades. Con la deshidrogenasa láctica independiente de NAD purificada no se obtuvo ninguna banda lo que puede deberse a la gran inestabilidad de la enzima en soluciones diluidas.

En base a las diferencias fisicoquímicas y cinéticas anteriores se puede inferir la posibilidad de diferentes funciones metabólicas para estas isoenzimas.* Sin embargo, aún deben conocerse o esclarecerse, muchos aspectos uno de ellos es investigar cuál es la coenzima natural de la enzima independiente NAD.

* Por regla general las isoenzimas presentan una distribución diferente en los tejidos, la cual depende de las características fisiológicas. En organismos unicelulares que no presentan diferenciación tisular la presencia de isoenzimas puede explicarse por la necesidad de atender diferentes condiciones metabólicas que se presentan en su desarrollo.

RESUMEN

En el presente trabajo se informa de la existencia de dos isoenzimas de la deshidrogenasa láctica en las células de *Rhizopus nigricans*, una de ellas con actividad de lactato oxidasa independiente de NAD y la otra dependiente de NADH₂ capaz de reducir el pirúvico a láctico. Ambas enzimas se purificaron parcialmente y se determinaron algunas de sus propiedades fisicoquímicas y cinéticas como: solubilidad en presencia de SO₄ (NH₄)₂, pH óptimo, K_M para los sustratos (lactato y piruvato) y para las coenzimas (NAD y NADH₂), y movilidad electroforética.

Se estudió la relación que existe entre la actividad de cada isoenzima y el estado de desarrollo del hongo como un primer paso para determinar si hay funciones metabólicas específicas. Se encontró que la enzima dependientes de NAD es más activa en las etapas tempranas del desarrollo cuando la concentración de glucosa es alta. En cambio, la isoenzima independiente de NAD presenta mayor actividad en las etapas finales del crecimiento, cuando la concentración de glucosa es muy baja y la esporulación muy activa.

SUMMARY

In this paper a report is made of the presence of two isoenzymes of the lactic dehydrogenase in the *Rhizopus nigricans* cells, one of them with lactate oxidase activity, non-dependent of NAD and the NADH₂ dependent capable of reducing piruvate to lactate. Both enzymes were partially purified and some of their physicochemical and kinetic properties were determined such as: solubility in presence of (NH₄)₂SO₄ optimum pH, Km for the substrates (lactate and piruvate) and for the coenzymes, (NAD and NADH₂) and electrophoretic mobility.

The relation existing between the activity of each coenzyme and the state of development of the fungus was studied as a first step to determine if there are specific metabolic functions. The NAD dependent enzyme was found

to be more active in the early stages of development (enzyme was found to be more active in the early stages of development) when the glucose concentration is high. Whereas the NAD nondependent isoenzyme presents greater activity in the final stages of development, when the glucose concentration is very low and sporulation is very active.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, M. J., BUENER M., CHANDRASEKHAR K., FORD G. C., HACKERT M. L., LILJAS A., ROSENANN M. G., SMILEY I. E., ALLISON W.S., EVERSE J. KAPLAN N. O., y S. S. TAYLOR, "Structure Function relationships in lactate dehydrogenase". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 1968-1972 (1973).
2. BARNETT, H. "The staining of lactic dehydrogenase isoenzymes after electrophoretic separation on cellulose acetate", J. Clin. Pathol, 17, 567-570 (1964).
3. BLANCO, A.; y W. H. ZINKHAM, "Lactate dehydrogenases in human testes". Science, 139, 101-109 (1963).
4. BOYER, S. H., FAINER D. C., y E. J. WATSON-WILLIAMS, "Lactate Dehydrogenase variant from human blood: Evidence for molecular sub units". Science, 141, 642-643 (1963).
5. CAHN, R. D., KAPLAN N. O., LEVINE L., E. ZWILLING, "Nature and development of lactate dehydrogenases", Science, 139, 962 (1962).
6. CLARK J. M., "Experimental Biochemistry" Ed. W. H. Freeman and Company, Londres (1964).
7. DENNIS, D., y N. O. Kaplan, "D- and L-lactic acid dehydrogenases". Science, 136, 962 (1960).
8. FONDY, T. P., y N. O. Kaplan "Lactate Dehydrogenase Isozymes in vertebrate tissue". Am N.Y. Acad. Sci., 119, 888 (1965).
9. GLEASON, F. H., NOLAN R. A., WILSON A. C. y R. EMERSON, "D (—) Lactate Dehydrogenase in lower fungi", Science, 152, 1272-1273 (1966).
10. GLEASON, F. H., y J. S. PRICE, "Lactic acid fermentation in lower fungi", Mycologia, 61, 945-956 (1969).
11. JAENICKE, R., y KNOOF, "Molecular weight and quater nary structure of lactic dehydrogenase. III. Comparative determination by sedimentation analysis, light scattering, and osmosis". Eur. J. Biochem., 4, 157-163 (1968).
12. KAPLAN, N. O., "Catalytic properties of lactate dehydrogenase subunits vertebrates" Brokhaven Symp. Biol. 17, 131 (1964).
13. LEJOHN, H. B., "D (—) Lactate dehydrogenases in fungi", Journal of Biological Chemistry, 246, 2116-2126 (1970).
14. MARKERT, C. L. y F. MOLLER, "Multiple forms of enzymes. Tissue ontogenetic and species patterns". Proc. Nat. Acad. Sci. 45, 753 (1959).
15. MARKERT, C. L. "Lactate dehydrogenase isozymes; dissociation and recombination of subunits", Science, 140, 1329 (1963).
16. MARKERT, C. L., "Developmental Genetics", The Harvey lectures, Series 59, Ed. Academic Press Inc. Nueva York (1964).
17. MARKERT, C. L., "Mechanisms of cellular differentiation", citado por J. A. Moore, Ideas in

- Modern Biology, Ed. The Natural History Press, Nueva York (1965).
18. NELSON N., "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose" *J. Biol. Chem.*, *153*, 375 (1944).
 19. OBAYASHI, A., YORIFUGI M., YAMAGATA T., IJICHI T., y M. KANIE, "Respiration in organic acid forming molds. Part I/Purification of cytochrome C, coenzyme Q, and L-lactic dehydrogenase from lactate forming *Rhizopus oryzae*", *Agricultural and Biological Chemistry*, *30*, 717-724 (1966).
 20. O'PHER, A. W., COLLIER C. S., y J. M. MILLER, "Rapid electrophoretic method for the determination of the isoenzymes of serum lactate dehydrogenase", *Clin. Chem.*, *12*, 308-313 (1966).
 21. PESCE, A., FONDY T. P., STOLZENBACH F., CASTILLO F., y N. O. KAPLAN, "The comparative enzymology of lactic dehydrogenases III - Properties of the H₄ and M₄ enzymes from a number of vertebrates", *J. Biol. Chem.*, *242*, 2151-2167 (1967).
 22. PRITCHARD, G. G., "An NAD-independent L-lactate dehydrogenase from *Rhizopus oryzae*", *Biochemica et Biophysica Acta*, *250*, 25-34 (1971).
 23. PRITCHARD, G. G., "Factors affecting the activity and synthesis of NAD-dependent lactate dehydrogenase in *Rhizopus oryzae*", *Journal of General Microbiology*, *78*, 125-137 (1973).
 24. PUROHIT, K., TURIAN, "D (—) Lactate dehydrogenase from *Allomyces*", *Archiv für Mikrobiologie*, *84*, 287-300 (1972).
 25. SHAW, C. R., BARTO, "Genetic evidence for the subunit structure of lactate dehydrogenase isozymes", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *50*, 211-214 (1963).
 26. SNOSWELL, A. M., "Oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide independent lactate dehydrogenases of *Lactobacillus arabinosus*". *Biochemica et Biophysica Acta*, *77*, 7-19 (1963).
 27. STERLING C., "Biochemistry laboratory techniques" John Wiley and Sons, Inc. Nueva York Londres (1966). Cap. 10.
 28. TARMY, E. M., y N. O. KAPLAN, "Chemical characterization of D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*". *Journal of Biological Chemistry*, *253*, 10, 2579-2586 (1968).
 29. THUNBERG, T., "Zur Kenntnis des Intermediären Stoffwechsels und der dabei wirkenden Enzymen". *Skand. Arch. Physiol.*, *40*, 1 (1920). Loco citado en: Blanco A.; "Estudio sobre la lactato deshidrogenasa" Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Argentina (1965).
 30. WITTERBERGER, C. L., y J. G. FULCO, "Purification and allosteric properties of a nicotinamide-adenine dinucleotide linked D (—) specific lactate dehydrogenase from *Butyrivacterium rettgeri*", *Journal of Biological Chemistry*, *242*, 2917-2924 (1967).

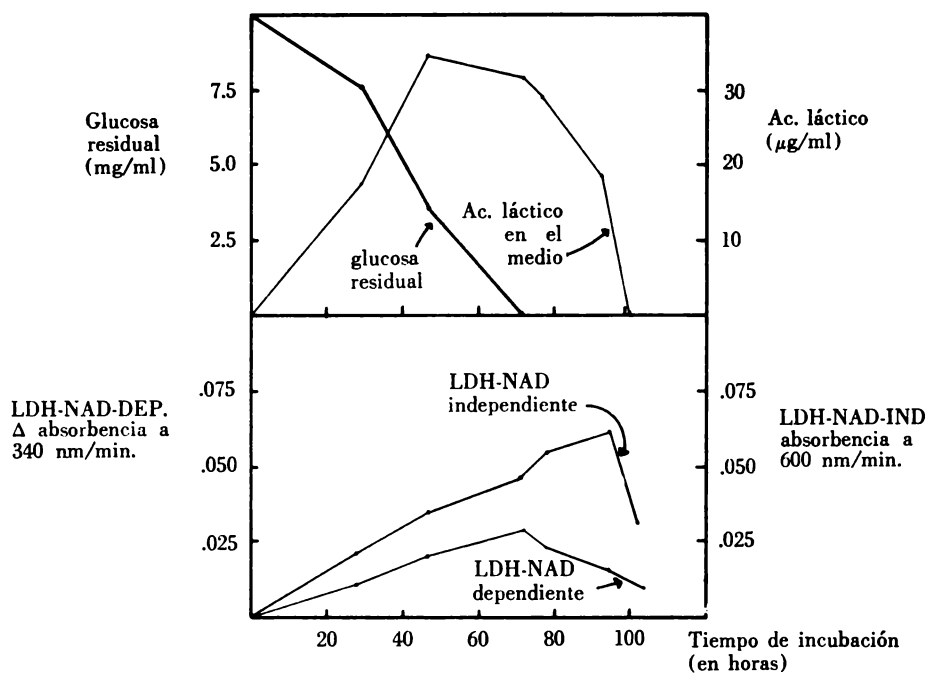


FIG. 1. Glucosa residual, ácido láctico producido, actividad de deshidrogenasa láctica dependiente de NAD y actividad de deshidrogenasa láctica independiente de NAD en función del tiempo de incubación.

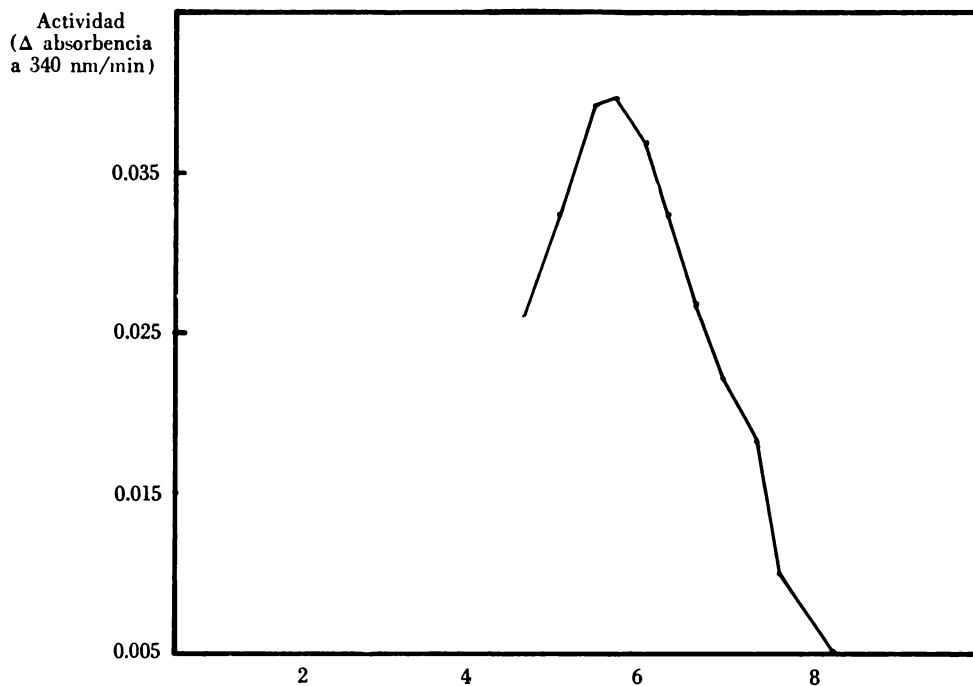


FIG. 2. Efecto del pH sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD.

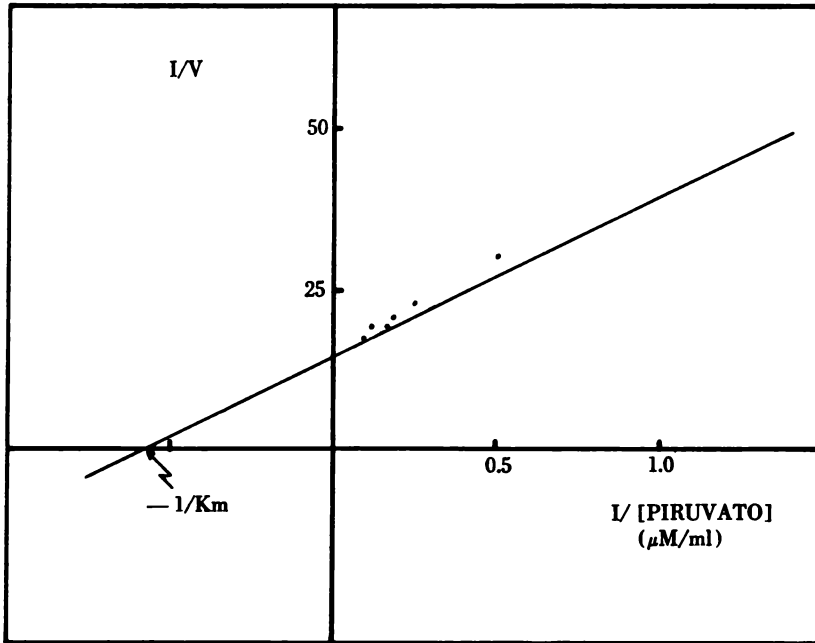


FIG. 3. Determinación de K_m de piruvato para la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD mediante el método de Lineweaver-Burk ($K_m = 1.694 \times 10^{-3}$ M).

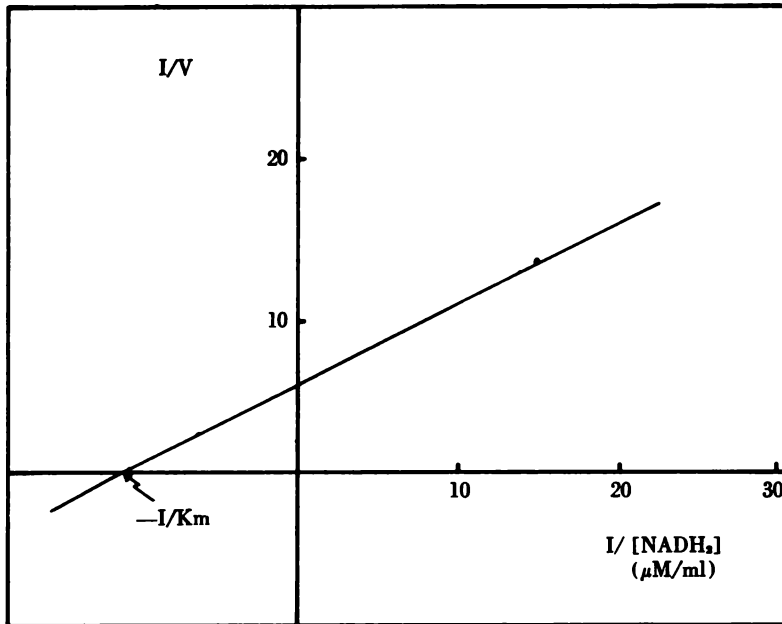


FIG. 4. Determinación de K_m de $NADH_2$ para la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD mediante el método de Lineweaver-Burk. ($K_m = 9.8 \times 10^{-5}$ M).

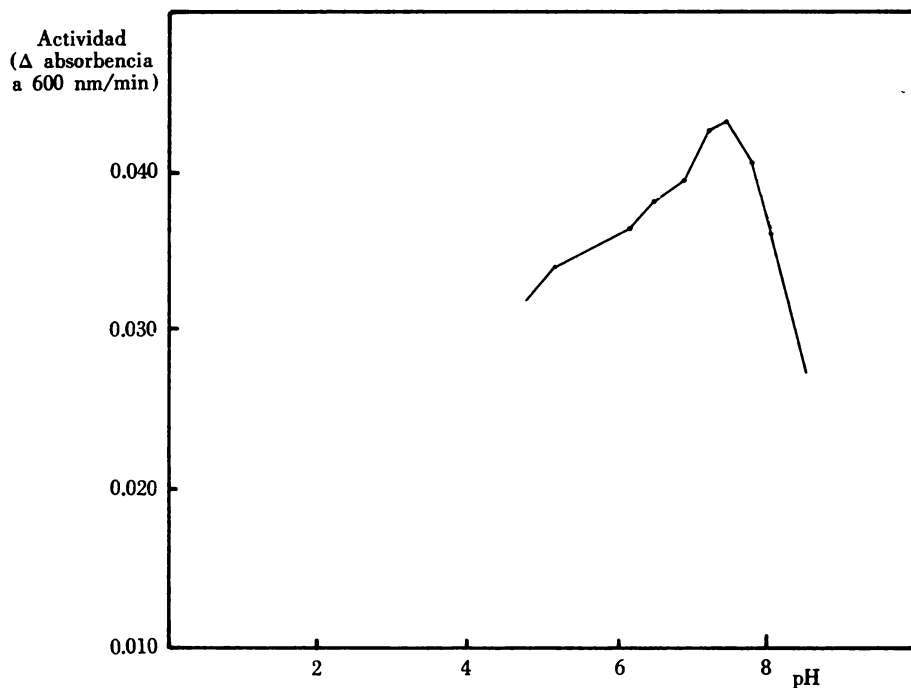


FIG. 5. Efecto del pH sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica independiente de NAD.

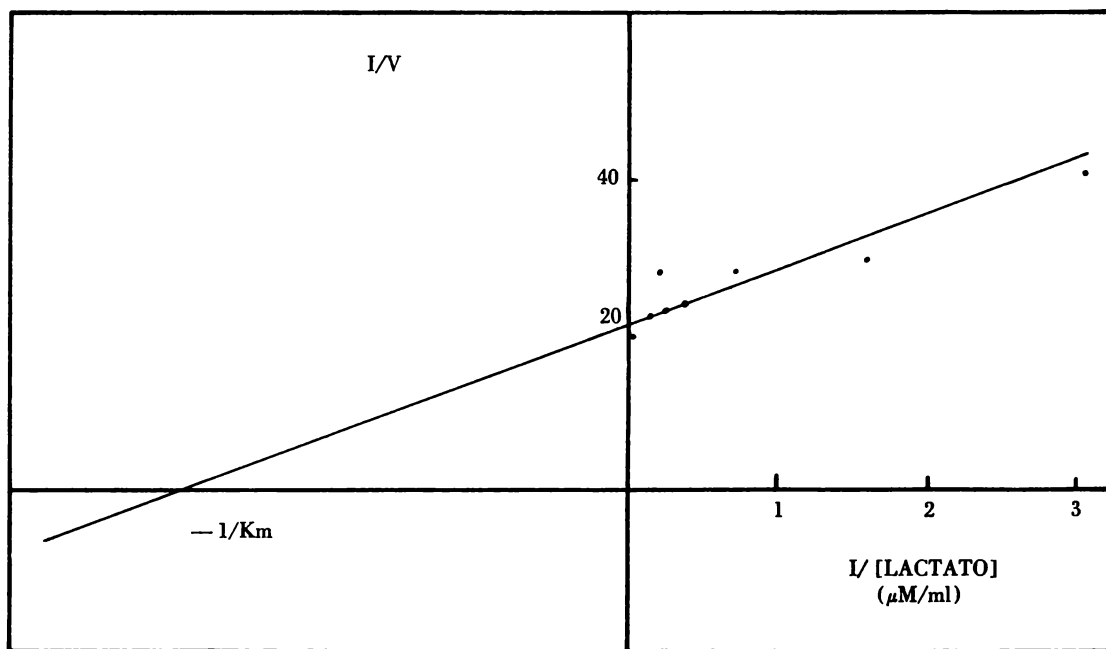


FIG. 6. Determinación de K_m de lactato para la deshidrogenasa láctica independiente de NAD mediante el método de Lineweaver-Burk (K_m . 0.394×10^{-3} M).