

## GLUCOSA Y GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASAS EN HÍGADO DE TENCA (*Tinca tinca*).

Fuentes, J.M.; Bautista, J.M. y Soler, G.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética.  
Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria, 10071  
CÁCERES.

### Summary:

Using differential staining of PAGE gels we have identified three G6P dehydrogenase activities on tench liver homogenates.

One of these enzymatic activities has a wide specificity for glucose, G6P, NAD<sup>+</sup>, and NADP<sup>+</sup>, and has been considered as a Glucose dehydrogenase. The other two activities are very specific for G6P and for one of the two co-enzymes being considered as G6PD isoenzymes.

Studies of thermic inactivation of the three dehydrogenase activities are in agreement with the electrophoretic patterns. On the other hand all three activities are inhibited by NADH and NADPH. Finally we have carried out some kinetic studies and assay the enzyme activity as a function of pH.

**Palabras clave:** Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, Glucosa deshidrogenasa, isoenzimas, hígado, *Tinca tinca*.

### INTRODUCCIÓN.

El metabolismo de los glúcidos proporciona energía y precursores para reacciones de síntesis y para los mecanismos de oxidación-reducción en la célula. La glucosa, producto mayoritario de la digestión de los carbohidratos en peces (1,2, 3) pasa a la célula atravesando la membrana para ser fosforilada. La glucosa-6-fosfato (G6P) es sustrato común para todas las vías del metabolismo de los carbohidratos, pues una vez formada, la G6P no puede atravesar la membrana celular, y es metabolizada por una de las tres rutas más funcionales: a) síntesis de glucógeno, b) glicólisis, y c) vía de las pentosas-fosfato, y por supuesto, en algunos tejidos puede ser convertida en glucosa (4).

En el reino animal los enzimas que tienen actividad deshidrogenásica para G6P existen en dos formas moleculares distintas, una es Hexosa-6-fosfato deshidrogenasa (H6PD) (5), y la otra es Gluco-

sa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Por otra parte, la existencia de una actividad deshidrogenásica para la glucosa puede estar ligada en algunas especies a la H6PD (6).

Uno de los mecanismos de regulación metabólica desarrollado por algunos animales reside en la existencia de isoenzimas. La presencia de isoenzimas de G6PD en animales acuáticos, descrita por varios autores (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) soportan la hipótesis de que este enzima es crucial en la regulación del flujo metabólico entre la ruta de las pentosas y la glicólisis.

El presente trabajo da cuenta de la existencia de dos formas isoenzimáticas de G6PD en el hígado de tenca (*Tinca tinca L.*) y de una Glucosa deshidrogenasa, así como alguna de las características de especificidad, cinéticas y reguladoras, con objeto de conocer la funcionalidad de estos enzimas en la encrucijada que representa la ruta de las pentosas.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### Material biológico.

Las tenca (*Tinca tinca L.*) procedían del Centro de Acuicultura *Vegas del Guadiana* (Badajoz), y fueron transportadas vivas hasta el laboratorio, donde se sacrificaron. Los hígados con un peso entre 4 y 6 gramos se utilizaron enteros, bien recién extraídos, bien congelados a  $-24^{\circ}\text{C}$ .

### Preparación de extractos hepáticos.

Los extractos hepáticos se prepararon 25% p/v en Tris-HCl 0.02 M pH 7.6 (conteniendo glicerol 9%,  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.7 mM, y EDTA 0.4 mM) y se homogeneizaron a 2000 r.p.m. durante 10 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . El material así tratado se centrifugó a  $20000 \times g$  durante 30 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante resultante se diluyó en 1:10 en el mismo tampón para la realización de los ensayos enzimáticos, los tratamientos térmicos y los análisis electroforéticos.

### Ensayos enzimáticos.

Las actividades enzimáticas fueron seguidas a 340 nm en un espectrofotómetro Hitachi 150-20, con el receptáculo de cubetas termostatzado a  $30^{\circ}\text{C}$ .

Las mezclas de reacción se indican en los respectivos pies de gráficos y de tablas.

Una unidad de actividad (U) fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de un  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de  $\text{NAD(P)}^+$  a  $30^{\circ}\text{C}$ .

### Electroforesis.

Las electroforesis se realizaron sobre geles de poliacrilamida en placa en gradiente entre 5 y 10% para el gel separador y al 2.5% para el gel espaciador según la técnica descrita por Hames (19).

Las actividades enzimáticas en los geles fue visualizada utilizando una modificación del método descrito por Criss & McKerns (20). La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 0.1 pH 8, Fenazina metasulfato 0.12 mM, Nitro Blue tetrazolium 0.14 mM,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM, con

$\text{NAD}^+$  12 mM o  $\text{NADP}^+$  0.65 mM, y glucosa 250 mM o glucosa-6-fosfato 5 mM. Los geles se incubaron con sus respectivas mezclas en la oscuridad a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 60 min.

### Determinación cuantitativa de proteína.

La proteína fue determinada colorimétricamente mediante el método descrito por Bradford (21) con la modificación fenólica de Marshall y Williams (22) usando seroalbúmina bovina como estándar.

### Reactivos.

$\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ , G6P fueron proporcionados por Boehringer Mannheim GmbH, Fenazina metasulfato y Nitro blue tetrazolium por Sigma Chemical Co., la acrilamida y los reactivos para la electroforesis por Bio-Rad Laboratories y el resto de productos empleados eran de la mayor pureza comercialmente disponible.

## RESULTADOS.

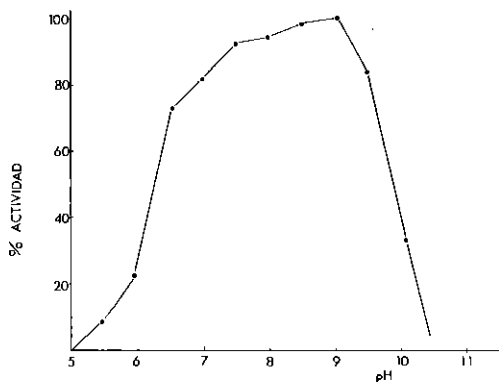
### Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

En el extracto crudo de hígado de tenca la máxima actividad G6PD se presenta en una meseta entre pH 7 y pH 9.5 (Fig. 1); su máxima estabilidad a  $4^{\circ}\text{C}$  en función del pH se presenta entre pH 5.5 y pH 8 (Fig. 2) a las 24 h. La actividad G6PD resulta ser bastante inestable en el extracto a  $4^{\circ}\text{C}$ , encontrándose dos tendencias (Fig. 3): a) la actividad G6PD a pH 7 a las 24 h pierde un 20% y a las 96 h. un 71%; b) la actividad G6PD a pH 9.5 e extingue casi totalmente a las 24 h. (a las 2 h. pierde el 30% de la actividad).

Después de congelar a  $-24^{\circ}\text{C}$  el extracto enzimático se mantiene la actividad G6PD pH 7 en un 90%, no produciéndose más pérdidas en sucesivas congelaciones-descongelaciones.

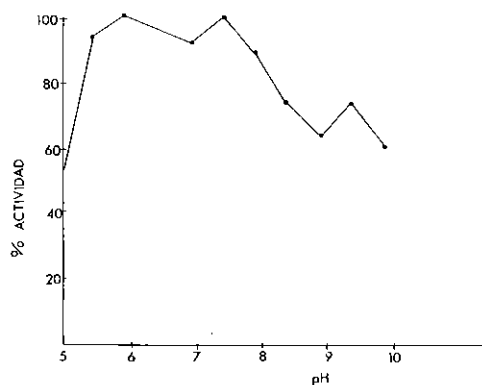
La actividad específica G6PD calculada a pH 7 en el extracto hepático recién preparado es de  $130 \pm 20$  mU/mg de proteína.

Del cálculo de las constantes de Mi-



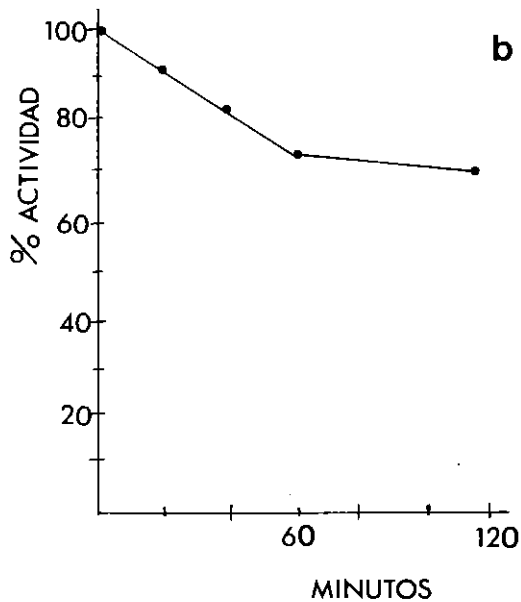
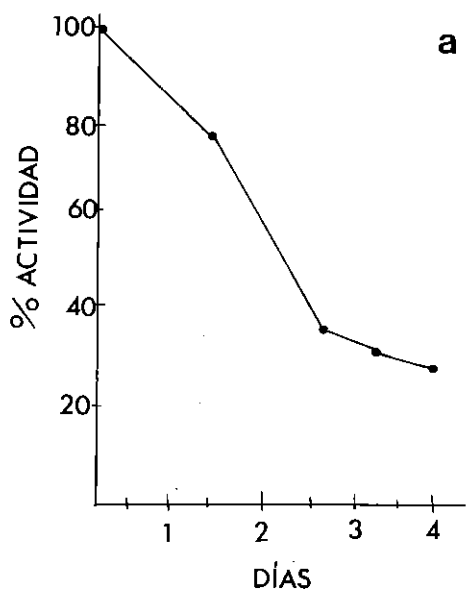
**Figura 1 : Efecto del pH en la actividad deshidrogenasa para G6P en extracto crudo de hígado de tenca.**

La mezcla de reacción contenía: Tris-maleato 0.1 M a cada pH ensayado, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NADP<sup>+</sup> 0.5 mM y G6P 1 mM.



**Figura 2 : Efecto del pH sobre la estabilidad de la deshidrogenasa para G6P en extracto crudo de hígado de tenca.**

El extracto fue incubado en Tris-maleato 0.1 M durante 24 h., ensayándose la actividad en las mismas condiciones que en fig.1 a pH 7.



**Figura 3: Estabilidad a 4 °C en función del tiempo de la deshidrogenasa para G6P a pH 7 (a) y a pH 9.5 (b). La actividad residual fue determinada como en fig. 1.**

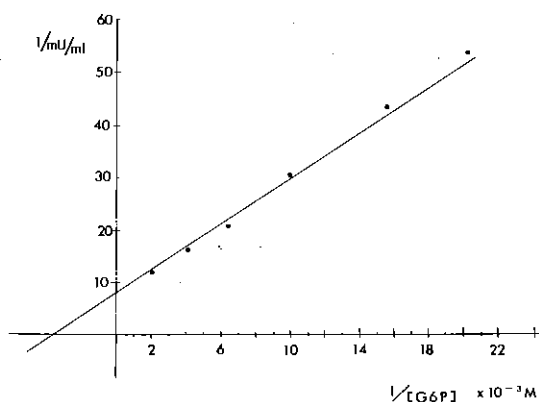


Figura 4: Representación de Lineweaver-Burk de actividad deshidrogenásica a pH 7 frente a G6P. La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NADP<sup>+</sup> 0.5 mM y concentraciones de G6P desde 50 a 2000 μM.

chaelis de la G6PD en extracto hepático a pH 7 a partir de la representación de Lineweaver-Burk se obtuvieron unos valores de  $0.34 \times 10^{-3}$  M para la G6P (fig. 4) y de  $0.18 \times 10^{-3}$  M para el NADP<sup>+</sup> (Fig. 5).

#### Análisis electroforético.

La electroforesis sobre geles de polia-

Tabla I: Actividades deshidrogenásicas para glucosa y G6P en extracto crudo de hígado de tenca a pH 7.5 y 9.5.

pH	NAD <sup>+</sup> 2 mM		NADP <sup>+</sup> 0.5 mM	
	7.5	9.5	7.5	9.5
Glucosa 80 mM	ND	D	D	D
G6P 3 mM	ND	D	D	D

ND: No detectables en condiciones de ensayo  
D: Detectable significativamente en las condiciones de ensayo.

crilamida de muestras de hígado de tenca, seguido de incubación de los geles en diferentes soluciones de tinción diferencial, muestran una banda de escasa migración electroforética (Fig. 6: I) con actividad deshidrogenásica tanto para glucosa como para G6P, que utiliza como coenzima NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> indistintamente. Así mismo, aparecen dos bandas con actividad deshidrogenásica para G6P; la de mayor migración (Fig. 6: III) sólo aparece al incubarse en presencia de NADP<sup>+</sup> como coenzima, mientras que la que tiene una migración electroforética intermedia entre las dos anteriores (Fig. 6: II) precisa NAD<sup>+</sup> en la mezcla de incubación.

#### Actividades deshidrogenásicas para glucosa y glucosa-6-fosfato.

A la vista de los resultados anteriores se determinaron las actividades deshidrogenásicas de glucosa y G6P que concurrían en el extracto hepático a pH 7.5 y a pH 9.5 (Tabla I). Con NADP<sup>+</sup> a pH 7.5 y a pH 9.5 existe actividad tanto Glucosa

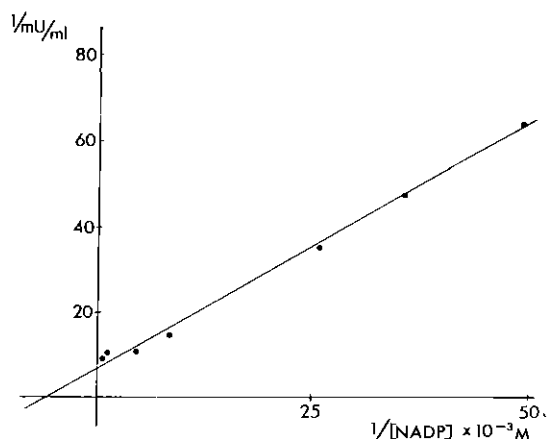


Figura 5: Representación de Lineweaver-Burk de actividad deshidrogenásica para G6P a pH 7 frente a NADP<sup>+</sup>. La mezcla contenía Tris-HCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, G6P 3 mM y concentraciones de NADP<sup>+</sup> desde 20 μM a 800 μM.

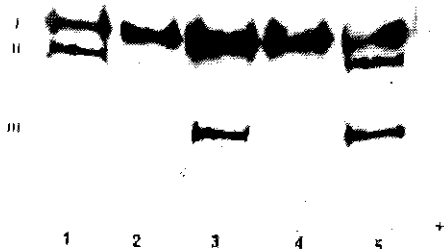


Figura 6 : Electroforesis de extracto crudo de hígado de tenca en gel de poliacrilamida en un gradiente entre 5 y 10 %. Las tinciones se realizaron con Fenazina metasulfato y Nitro blue tetrazolium y los siguientes compuestos para cada caso: 1)  $\text{NAD}^+$  y G6P; 2) NAD y glucosa; 3)  $\text{NADP}^+$  y G6P; 4)  $\text{NADP}^+$  y glucosa; 5)  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NAD}^+$ , G6P y glucosa. Las concentraciones utilizadas se especifican en la sección de material y métodos.

deshidrogenasa como Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; en cambio con  $\text{NAD}^+$  estas actividades sólo se manifiestan a pH 9.5, no detectándose a pH 7.5.

Los ensayos de inhibición de estas actividades por NADPH y NADH demue-

tran que tanto las actividades dependientes de  $\text{NAD}^+$  como las de  $\text{NADP}^+$  resultan inhibidas por NADH o NADPH indistintamente y tanto a pH 7.5 como a pH 9.5 (Tabla II).

#### Comportamiento frente a la temperatura.

Alicuotas del extracto hepático fueron incubadas durante 5 minutos a diferentes temperaturas entre 30 °C y 60°C, y posteriormente se determinó las actividades deshidrogenásicas para glucosa y G6P que se habían detectado en el apartado anterior (Fig. 7). Los comportamientos aparecidos pueden agruparse en tres tendencias: a) la actividad Glucosa deshidrogenasa con  $\text{NADP}^+$  desaparece del extracto a 40 °C; b) la actividad G6PD con  $\text{NAD}^+$  desciende progresivamente entre 30 °C y 55 °C disminuyendo del 92% al 64%, y extinguiéndose por completo a 60 °C; c) la actividad G6PD con  $\text{NADP}^+$  disminuye también entre 30 °C y 55 °C, pero con unos rendimientos menores del 70-64% al 21-23%, y es también extinta a 60 °C. La actividad Glucosa deshidrogenasa con  $\text{NAD}^+$  a pH 9.5 presenta un comportamiento intermedio entre el b) y el c), pues participa del c) desde los 30 °C hasta los 45 °C, y se asemeja al b) entre éstos y los 55 °C, pudiendo ser muy bien una tendencia diferente a las otras tres.

#### DISCUSIÓN.

Mediante electroforesis sobre geles de poliacrilamida, han sido distinguidas

Tabla II: Inhibición por NADH y NADPH de las actividades deshidrogenásicas para glucosa y G6P en extracto crudo de hígado de tenca a pH 7.5 y 9.5. Las concentraciones utilizadas de los coenzimas reducidos fue de 0.5 mM.

pH	$\text{NAD}^+$ 2 mM		$\text{NADP}^+$ 0.5 mM			
	9.5		7.5		9.5	
	NADH	NADPH	NADH	NADPH	NADH	NADPH
Glucosa 80 mM	+	+	+	+	+	+
G6P 3 mM	+	+	+	+	+	+

(+): Inhibición significativa de la actividad.

tres actividades deshidrogenasas para G6P en el hígado de tenca. El patrón electroforético equivaldría en parte al que muestran para hígado de trucha Shatton *et al.* (7), dado que también aparecen tres bandas con actividad G6PD, y la de menor movilidad corresponde –al igual que en el hígado de tenca– a la de especificidad más amplia (glucosa, G6P,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ), y que denominan Glucosa deshidrogenasa que confronta con la descrita por Metzger *et al.* (23) y por Beutler & Morrison (6) y con la H6PD descrita por Ohno *et al.* (5). Sin embargo la especificidad de las otras dos bandas descritas por Shatton *et al.* (7) es diferente, ya que muestran una pequeña actividad con glucosa además de con G6P y ambas tienen exclusivamente actividad con  $\text{NADP}^+$ , mientras que en tenca las dos bandas de mayor movilidad poseen exclusivamente actividad G6PD, si bien una sólo lo efectúa con  $\text{NAD}^+$  y la otra sólo  $\text{NADP}^+$ . Por otra parte, los patrones de es-

tos mismos autores para rata aparecen con dos bandas de actividad exclusiva G6PD, una actúa con  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  indistintamente, y la otra con  $\text{NADP}^+$  exclusivamente. En animales acuáticos han sido reportados diferentes números de isoenzimas de G6PD; en lubina, Bautista *et al.* (18), han caracterizado dos formas moleculares, este mismo número han hallado Cederbaum & Yoshida (13) en trucha arco iris y Hart & Pontier (16) en Brachydanio; Yamauchi & Goldberg (10) han identificado hasta cinco especies moleculares distintas de G6PD en tres especies diferentes de trucha; Rodríguez-Segade & Freire (17) encuentran tres isoenzimas de G6PD en hepatopáncreas de mejillón aunque no verifican si alguno de ellos posee afinidad también por glucosa.

Han sido descritas varias G6PD con afinidad tanto por  $\text{NAD}^+$  como por  $\text{NADP}^+$  indistintamente en diversas especies de microorganismos, mamíferos y

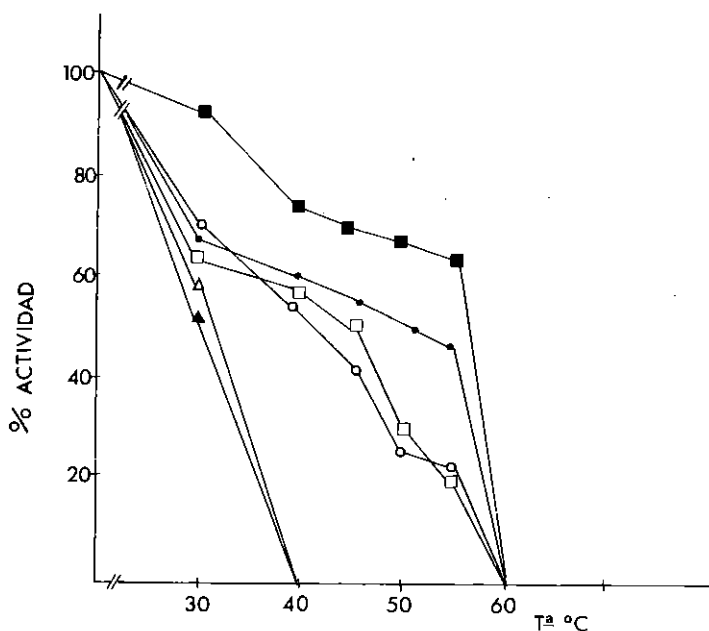


Figura 7: Efecto de la inactivación térmica de las diferentes actividades deshidrogenásicas de glucosa y G6P. El extracto fue incubado durante 5 minutos a las temperaturas indicadas. La determinación de la actividad se efectuó en tampón Tris-maleato 0.1 M con  $\text{MgCl}_2$  5 mM y en presencia en cada caso de: (■) G6P 3 mM y  $\text{NAD}^+$  8 mM; (●) Glucosa 80 mM y  $\text{NAD}$  8 mM; (□) y (○) G6P 3 mM y  $\text{NADP}^+$  0.5 mM; (▲) y (△) Glucosa 80 mM y  $\text{NADP}^+$  0.5 mM. La actividad fue determinada a pH 7.5 en los casos (○) y (△), y a pH 9.5 en el resto de los casos.

de peces (24), pero solamente ha sido descrita una G6PD con afinidad exclusiva por NAD<sup>+</sup> en *Acetobacter xylinum* (24). Este hecho sugiere una adopción por parte de la tenca de una isoenzima de la G6PD que, aún no siendo común, haya sido desarrollado en esta especie la cual puede crecer en condiciones extraordinariamente adversas de nutrición y de oxigenación de forma que con esta isoenzima podría obtener NADH directamente de la oxidación de la glucosa en su paso por la ruta de las pentosas.

Por otra parte, el hecho de que las actividades G6PD dependientes de NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> se vean inhibidas indistintamente por cualquiera de los dos nucleótidos reducidos aboga por una eficiente regulación de esta ruta a nivel de poder reductor más que por el específico nucleótido reducido producto de la reacción, ya que en el excepcional caso de *A. xylinum* (24) cada uno de los dos isoenzimas específicos para NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> solamente son inhibidos por sus correspondientes nucleótidos reducidos.

El comportamiento de las diferentes actividades indicadas frente a la temperatura (Fig. 7) se ajusta a la presencia de tres formas moleculares diferentes halladas en las electroforesis, si bien la actividad Glucosa deshidrogenasa con NAD<sup>+</sup> a pH 9.5 no estaría encuadrada entre ellas; bien porque la técnica de revelado específico de los geles está limitada a pH 8 y por tanto esta actividad no se manifestaría en ellos y se trataría en consecuencia de otra forma molecular de Glucosa deshidrogenasa; o bien que siendo la misma molécula que la H6PD pudiese perder en el tratamiento térmico a 40 °C la actividad con NADP<sup>+</sup> y permanecer con la de NAD<sup>+</sup>; este último efecto vendría avalado por la posible fragmentación a que pueden ser sometidas H6PDs de diversa procedencia en moléculas menores enzimáticamente activas (25, 26).

Las dos tendencias halladas respecto a la estabilidad de la actividad G6PD NADP<sup>+</sup>-dependiente y el amplio margen de pH en el que se encuentra esta activi-

dad apoya la existencia de dos enzimas que oxidan la G6P con NADP<sup>+</sup>, uno de los cuales sería el isoenzima G6PD de mayor movilidad electroforética y el otro la glucosa deshidrogenasa, la cual posee en otras especies un pH de máxima actividad entre 9 y 10 y cataliza también la deshidrogenación de G6P (9, 27, 28, 25, 29, 26, 30).

## RESUMEN.

Han sido identificadas tres actividades deshidrogenásicas para la G6P en hígado de tenca, mediante electroforesis sobre geles de poliacrilamida, utilizando tinciones diferenciales.

Una de estas actividades posee una amplia especificidad por glucosa y G6P, así como por NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> por lo que ha sido considerada como Glucosa deshidrogenasa. Las otras dos actividades poseen especificidad exclusiva por G6P y por uno sólo de los dos coenzimas, por lo que son consideradas como dos isoenzimas de la G6PD.

Estudios de inactivación térmica de las tres actividades muestran tendencias que están de acuerdo con el análisis de los patrones electroforéticos. Las inhibiciones por NADH y NADPH indican que cualquiera de las tres actividades es inhibida por ambos nucleótidos reducidos.

Han sido también realizado estudios cinéticos y ensayos de actividad en función del pH.

## AGRADECIMIENTOS.

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a Pedro Emilio López Calvelo por su asistencia técnica, y a la Dra. Campo por la revisión crítica del manuscrito.

## ABREVIATURAS.

G6P	: Glucosa 6-fosfato
NADP <sup>+</sup>	: Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato oxidado
NAD <sup>+</sup>	: Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidado

NADPH : Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato reducido  
 NADH : Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido  
 G6PD : Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa  
 H6PD : Hexosa 6-fosfato deshidrogenasa  
 EDTA : Etilén Diamino Tetra-acético

## BIBLIOGRAFÍA.

- (1) HOCHACHKA, P.W. (1969): Intermediary metabolism in fishes. In *Fish Physiology* (HOAR, W.G. & RANDALL, D.J. Edts), Vol I, pp. 351-390. Academic Press, New York.
- (2) TARR H.L.A. (1972): Enzymes and systems of intermediary metabolism. In *Fish Nutrition* (HALVER, J.E. Ed.) pp. 255-326. Academic Press, New York.
- (3) DEMAËL, A. (1978): Quelques particularities du métabolisme glucidique des poissons. *Oceanis* 4, 353-365.
- (4) WALTON, M.J. & COWEY, C.B. (1982): Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 59-79.
- (5) OHNO, S.; PAYNE, H.W.; MORRISON, M. & BEUTLER, E. (1966): Hexose-6-phosphate dehydrogenase found in human liver. *Science* 153, 1015-1016.
- (6) BEUTLER, E. & MORRISON, M. (1967): Localization and characteristics of hexose 6-phosphate dehydrogenase (glucose dehydrogenase). *J. Biol. Chem.* 242, 5289-5293.
- (7) SHATTON, J.B.; HALVER, J.E. & WEINHOUSE, S. (1971): Glucose (Hexose 6-Phosphate) Dehydrogenase in Liver of Rainbow Trout. *J. Biol. Chem.* 246, 4878-4885.
- (8) STEGEMAN, J.J. & GOLDBERG, E. (1971): Distribution and characterization of Hexose 6-Phosphate Dehydrogenase in Trout. *Biochem. Genet.* 5, 579-589.
- (9) STEGEMAN, J.J. & GOLDBERG, E. (1972): Properties of hepatic Hexose-6-phosphate Dehydrogenase purified from brook trout and lake trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 43B, 241-256.
- (10) YAMAUCHI, T. & GOLDBERG, E. (1973): Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Brook, Lake, and Splake Trout: An Isozymic and Immunological Study. *Biochem. Genet.* 10, 121-134.
- (11) YAMAUCHI, T. (1975): Glucose-6-phosphate dehydrogenase in brook, lake, and splake trout: an isozymic and developmental study. In *Isozymes III: Developmental Biology* (MARKERT, C. Ed.), p. 403. Academic Press, New York.
- (12) YAMAUCHI, T.; STEGEMAN, J.J. & GOLDBERG, E. (1975): The effects of starvation and temperature acclimation on pentose phosphate pathway dehydrogenase in brook trout liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 13-20.
- (13) CEDERBAUM, S.D. & YOSHIDA, A. (1976): Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase in Rainbow Trout. *Biochem. Genet.* 14, 245-258.
- (14) SHAKLEE, J.B. & WHITT, G.S. (1977): Patterns of enzyme ontogeny in developing sunfish. *Differentiation* 9, 85-95.
- (15) PHILIPP, D.P.; CHILDERS, W.F. & WHITT, G.S. (1979): Evolution of patterns of differential gene expression: a comparison of the temporal and spatial patterns of isoenzyme locus expression in two closely related fish species. *J. Exp. Zool.* 210, 473-478.
- (16) HART, N.H. & PONTIER, P.J. (1982): Ontogeny of Glucose-6-Phosphate and Phosphogluconate Dehydrogenases in *Brachydanio*. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B, 193-200.
- (17) RODRÍGUEZ-SEGADE, S. & FREIRE, M. (1982): Partial purification and properties of three enzymatic forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mytilus edulis* L. hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, 117-121.
- (18) BAUTISTA, J.M.; GARRIDO PERTIERRA, A. & RUÍZ-AMIL, M.



- (1984): Purification and properties of two enzymatic forms of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Dicentrarchus labrax* L. liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **77B**, 843-848.
- (19) HAMES, B.D. (1981): Polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. (HAMES, B.D. & RICKWOOD, D. Edts). IRL Press, New York.
- (20) CRISS, W.E. & McKERNS, K.W. (1968): Purification and partial characterization of Glucose 6-phosphate dehydrogenase from cow adrenal cortex. *Biochemistry* **7**, 125-134.
- (21) BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- (22) MARSHALL, T. & WILLIAMS, K.M. (1986): Phenol enhancement of the coomassie dye binding assay. *Bio-Techniques* **4**, 308-310.
- (23) METZGER, R.P.; WILCOX, S.S. & WICK, A.N. (1964): Studies with rat liver glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **239**, 1769-1772.
- (24) LEVY, H.R. (1979): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *Advances in Enzymology* (MEISTER, A. Ed.) Vol. 48, pp. 97-192. John Wiley & Sons. New York.
- (25) MOCHIZUKI, Y. & HORI, S.H. (1976): Hexose 6-phosphate dehydrogenase in starfishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **54B**, 489-494.
- (26) MATSUOKA, N.; MOCHIZUKI, Y. & HORI, S.H. (1977): Homology of starfish and vertebrate hexose 6-phosphate dehydrogenases. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool.* **21**, 12-20.
- (27) NAGAYAMA, F.; OHSHIMA, H. & TAKEUCHI, T. (1975): Studies on the Enzyme System of Carbohydrate Metabolism in Fish-III. Properties of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase and Glucose Dehydrogenase. *Bull. Japan. Soc. Scien. Fish.* **41**, 1069-1074.
- (28) CARPER, W.R.; TOEWS, M.L.; THOMPSON, R.E. & BUSS, C.M. (1976): A kinetic study of pig liver glucose dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 312-320.
- (29) SADO, Y. & HORI, S.H. (1976): Properties of hepatic hexose 6-phosphate dehydrogenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase from fishes and amphibians. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool.* **20**, 277-287.
- (30) SADO, Y. (1980): Properties of hexose 6-phosphate dehydrogenase from a Japanese ray, *Raja pulchra*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool.* **22**, 156-163.