

MÔNICA HOLTZ CAVICHIOLO GROCHOCKI

Regulação da Expressão
da Amino Oxidase em
Dactylium dendroides

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1986

Tese orientada pela

Dra. GLACI THEREZINHA ZANCAN

Ao meu marido Aluizio
e aos meus pais,
com muito amor.

AGRADECIMENTOS

\`A Dra. Glaci Therezinha Zancan, orientadora desta tese, pela orientação, assist4ncia e confiança com que acompanhou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Marcello Iacomini, Coordenador do Curso de P4s-graduação em Bioqu4mica, pelo apoio sempre demonstrado.

Ao Dr. F4bio de Oliveira Pedrosa, pelas sugest4es recebidas, pelo fornecimento de reativos e pelo empr4stimo de equipamentos.

\`A CAPES pelo suporte financeiro durante o per4odo de desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas, professores e funcion4rios do Departamento de Bioqu4mica da Universidade Federal do Paran4 pela solidariedade e ajuda demonstradas.

\`As amigas Maria de Lourdes C. Cust4dio da Silva, Stela M. Romanowski, Miriam Blumel Chociai, M4rcia H. Mendonça, Maril4ia Scartezini e Madalena Baron, pelo apoio, amizade e companheirismo que sempre me dispensaram.

\`A minha fam4lia que entendeu a minha aus4ncia.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| SUMÁRIO | v |
| LISTA DE TABELAS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| RESUMO | xi |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. OBJETIVOS DO TRABALHO | 9 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 10 |
| 2.1. REAGENTES | 10 |
| 2.2. MICRORGANISMO | 11 |
| 2.3. MEIOS DE CULTURA | 11 |
| 2.4. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E CULTIVO DO <u>Dactylium</u> <u>dendroides</u> | 13 |
| 2.4.1. Conservação das amostras | 13 |
| 2.4.2. Preparo do pré-inóculo | 14 |
| 2.4.3. Condições de crescimento..... | 14 |
| 2.4.4. Pré-indução da amino oxidase em presença de íons amônio | 15 |
| 2.5. PREPARO DA SUSPENSÃO DE MICÉLIOS | 15 |
| 2.6. AJUSTE DA TENSÃO DE OXIGÊNIO NA FASE GASOSA | 16 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.7. | DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA MASSA MICELIAL | 17 |
| 2.8. | PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS | 17 |
| 2.9. | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMINO OXIDASE | 17 |
| 2.10. | EFEITO DE INIBIDORES SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTI- CA | 19 |
| 2.11. | DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS | 19 |
| 2.12. | DETERMINAÇÃO DE PEROXIDASE | 19 |
| 2.13. | DETERMINAÇÃO DO pH DO MEIO DE CULTIVO | 20 |
| 2.14. | DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE <u>D</u> -GLUCOSE | 20 |
| 3. | RESULTADOS | 21 |
| 3.1. | NÍVEIS DE AMINO OXIDASE EM FUNÇÃO DO CRESCIMENTO DE <u>Dactylium dendroides</u> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA | 21 |
| 3.2. | EFEITO DE INIBIDORES SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTI- CA DA AMINO OXIDASE..... | 22 |
| 3.3. | EFEITO DA n-BUTILAMINA SOBRE OS NÍVEIS DE AMINO OXIDASE EM CÉLULAS EM FASE ESTACIONÁRIA DE CRESCIMENTO | 22 |
| 3.4. | EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE n-BUTILAMINA SOBRE A INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE | 23 |
| 3.5. | EFEITO DA FONTE DE CARBONO SOBRE A INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE | 23 |
| 3.6. | EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE OS NÍVEIS DA AMINO OXIDASE | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.7. | EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA <u>L</u> -GLUTAMINA SOBRE OS NÍVEIS DA AMINO OXIDASE | 25 |
| 3.8. | CINÉTICA DA INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE EM PRESENÇA DE ÍONS AMÔNIO NA AUSÊNCIA E EM PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA | 25 |
| 3.9. | INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE POR n-BUTILAMINA EM MEIO LIVRE DE ÍONS AMÔNIO..... | 26 |
| 3.10. | CINÉTICA DE INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE EM 20 % E 80 % DE OXIGÊNIO | 26 |
| 3.11. | EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIGÊNIO SOBRE OS NÍVEIS DA AMINO OXIDASE EM PRESENÇA DE ÍONS AMÔNIO E n-BUTILAMINA..... | 27 |
| 3.12. | EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIGÊNIO SOBRE OS NÍVEIS DA AMINO OXIDASE EM MEIO LIVRE DE ÍONS AMÔNIO E CONTENDO n-BUTILAMINA NA AUSÊNCIA E EM PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA | 27 |
| 3.13. | ATIVIDADE DE PEROXIDASE | 28 |
| 4. | DISCUSSÃO | 45 |
| 5. | CONCLUSÕES | 52 |
| 6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |

LISTA DE TABELAS

| | Páginas |
|-----|--|
| I | EFEITO DE INIBIDORES SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMINO OXIDASE 29 |
| II | EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE n-BUTILAMINA SOBRE A INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE 30 |
| III | EFEITO DA FONTE DE CARBONO SOBRE A INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE 31 |

LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|---|---------|
| 1. Níveis de amino oxidase em função do crescimento em meio A (41 mM de íon amônio) | 32 |
| 2. Níveis de amino oxidase em função do crescimento em meio B (11 mM de íon amônio) | 33 |
| 3. Níveis de amino oxidase em função do crescimento em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina como fonte única de nitrogênio | 34 |
| 4. Níveis de amino oxidase em função do crescimento em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina como fonte de nitrogênio e de carbono | 35 |
| 5. Efeito da adição de n-butilamina em células em fase estacionária de crescimento | 36 |
| 6. Efeito da concentração de <u>D</u> -glucose na indução da amino oxidase | 37 |
| 7. Efeito da concentração de íons amônio sobre os níveis de amino oxidase | 38 |
| 8. Efeito da concentração da <u>L</u> -glutamina no meio de cultura sobre a expressão da amino oxidase | 39 |
| 9. Cinética da indução da amino oxidase em presença de íons amônio na ausência e em presença de cicloheximida | 40 |

| | | |
|-----|---|----|
| 10. | Indução da amino oxidase por n-butilamina em meio livre de íons amônio | 41 |
| 11. | Cinética de indução da amino oxidase em 20% e 80% de oxigênio | 42 |
| 12. | Efeito da concentração do oxigênio sobre os níveis de amino oxidase em presença de íons amônio e n-butilamina em células pré-induzidas ... | 43 |
| 13. | Efeito da concentração do oxigênio sobre os níveis de amino oxidase em meio livre de íons amônio contendo n-butilamina na ausência e em presença de cicloheximida | 44 |

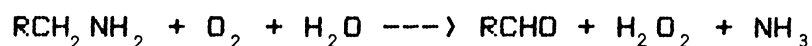
RESUMO

A presença de amino oxidase foi demonstrada em micélio de Dactylium dendroides crescido em meio contendo diferentes teores de íons amônio. A adição de n-butilamina resultou em um aumento de 186 vezes na atividade específica da enzima, aumento este que não foi observado na presença de cicloheximida. Quando a suspensão de micélios foi incubada em meio sem fonte de nitrogênio, não se observou alteração nos níveis da enzima. Na presença de indutor a expressão da enzima foi diminuída em presença de íon amônio e de L-glutamina.

A suspensão de micélios de D. dendroides expostos a concentrações variáveis de oxigênio apresentou um aumento de 296 vezes nos níveis da enzima quando a concentração de oxigênio na fase gasosa variou de zero a 100 %, enquanto que a massa micelial aumentou apenas 1,35 vezes. A adição de cicloheximida ao sistema impediu a síntese da enzima e diminuiu o consumo de D-glucose e de oxigênio.

1. INTRODUÇÃO

As amino oxidases são enzimas que catalisam a desaminação oxidativa de amino grupo terminal de mono-, di-, e poliaminas, com a formação de quantidades estequiométricas de aldeído, peróxido de hidrogênio e amônia (34,61,63), de acordo com a equação:



Como as monoaminas, diaminas e poliaminas são largamente distribuídas na natureza, as amino oxidases podem atuar como reguladoras da concentração destas aminas, e assim, participar de um grande número de processos biológicos (34).

As amino oxidases em animais têm ampla especificidade, e tomam parte importante no metabolismo de aminas biogênicas (38).

As amino oxidases são geralmente divididas em dois grupos: monoamino e diamino oxidases. Esta classificação baseava-se inicialmente na especificidade das enzimas pelos substratos (66), onde monoamino oxidases atuariam em monoaminas alifáticas e aromáticas, enquanto que as diamino oxidases seriam responsáveis pela oxidação de diaminas alifáticas e aromáticas (61). BLASCHKO & DUTHIE (7), entretanto, registraram que algumas monoamino oxidases são capazes de catalisar a oxidação de diaminas

alifáticas de cadeia longa, que não são substrato das diamino oxidases.

De uma forma geral, diaminas com estrutura $H_2N(CH_2)_nNH_2$ são substratos das diamino oxidases. A velocidade da reação aumenta em função do tamanho da cadeia carbonada até 5 átomos de carbono, decrescendo com número de carbono superior. As diaminas com 14 a 18 átomos de carbono não são oxidadas pelas diamino oxidases, e sim, pelas monoamino oxidases (67).

A classificação utilizada atualmente é baseada na sensibilidade a inibidores. Assim monoamino oxidases, que catalisam a oxidação de amins primárias, secundárias e terciárias (EC 1.4.3.4), são inibidas pela 2-fenilcloropropilamina, seu inibidor específico (68); enquanto que diamino oxidases, que catalisam a oxidação de monoaminas primárias e diaminas (EC 1.4.3.6), são inibidas por hidrazina e acil-hidrazidas não substituídas (68), sendo a semicarbazida e isoniazida seus inibidores típicos (9,11).

As amino oxidases são amplamente distribuídas em animais e vegetais (61). Ocorrem em invertebrados como moluscos, equinodermos, anelídeos (8), insetos, plantas, bactérias (9) e outros microrganismos (61); e ainda em muitos tecidos vertebrados como fígado, glândulas paratireóide e submaxilar, tecido nervoso, gônadas, músculo cardíaco (9), rins (67), plasma (57,61). As diamino oxidases são mais encontradas em bactérias e plantas superiores, enquanto que as monoamino oxidases são mais encontradas no reino animal (68).

ROULET & ZELLER (46) registraram que Mycobacterium smegmatis foi capaz de desaminar oxidativamente amins como

agmatina, putrescina, cadaverina, histamina e espermina. SATAKE (47) demonstrou a atividade de oxidase sobre diaminas e poliaminas em Achromobacter sp crescida em meio contendo amina como fonte única de nitrogênio e de carbono. A enzima catalisava preferencialmente a oxidação da histamina e da putrescina enquanto BACHRACH (4) verificou que Serratia marcescens produziu uma enzima que catalisava a oxidação da espermidina.

Pseudomonas aminovorans crescida em meio contendo metilamina, dimetilamina ou trimetilamina produziu uma enzima que catalisava a oxidação destas aminas (16).

Micrococcus luteus e Klebsiella aerogenes produziram monoamino oxidases que têm sido denominadas tiramina oxidase, por apresentarem alta especificidade por tiramina e compostos relacionados (38,40). A enzima está ligada a membrana e foi induzida por tiramina (38).

YAMADA e colaboradores (61) verificaram que fungos dos gêneros Penicillium, Aspergillus, Monascus, e Fusarium produziam amino oxidase endomicelial quando crescidos em meio contendo aminas como fonte única de nitrogênio, e concluíram que a enzima tem importante papel no crescimento do fungo nestas condições.

A enzima sintetizada por Aspergillus niger e Penicillium chrysogenum, independentemente da amina usada como fonte de nitrogênio, apresentou a mesma especificidade pelo substrato. As aminas oxidadas em maior velocidade foram as monoaminas alifáticas que possuem de 3 a 6 átomos de carbono, como a fenetilamina, benzilamina, agmatina e histamina. As diaminas alifáticas com 3 a 6 átomos de carbono foram oxidadas a menores velocidades, e as

poliaminas, como espermina e espermidina, não foram oxidadas (61).

As enzimas de Monascus anka e Fusarium bulbigenum catalisavam a oxidação de monaminas alifáticas, mas não da benzilamina. A histamina foi oxidada a baixas velocidades, e as diaminas foram oxidadas em presença da enzima do Fusarium bulbigenum, mas não de Monascus anka (61).

Quando Penicillium chrysogenum foi crescido em meio contendo espermidina ou espermina como fonte de nitrogênio produziu uma poliamino oxidase (28,29), o mesmo ocorrendo com fungos dos gêneros Aspergillus, Mucor, Rhizopus, Cylindrocarpon, Fusarium e Giberella (65).

Candida boidinii apresentou duas amino oxidases distintas quando crescida em meio contendo n-butilamina (25). Os autores sugeriram que uma razão possível para a existência das duas enzimas pudesse residir na especificidade pelo substrato. A presença das duas enzimas permitiria que o microrganismo utilizasse aminas como fonte de nitrogênio, com eficiência máxima, especialmente quando presentes em concentrações muito baixas.

Nos estudos realizados com as amino oxidases de origem fúngica não há referência sobre o tipo de enzima, sendo usado o termo genérico de amino oxidase. Em sua revisão, MALMSTROM (34) se refere a enzima de Aspergillus niger como sendo diamino oxidase, baseado em sua sensibilidade a semicarbazida, inibidor específico da diamino oxidase.

A amino oxidase de A. niger foi purificada até cristalização e considerada homogênea por ultracentrifugação (1,62). A

preparação homogênea da enzima de Aspergillus niger apresentou peso molecular 252.000 (31,56,62), existindo discordância quanto ao número de subunidades e o conteúdo em cobre da enzima. ADACHI e colaboradores (1) verificaram que quando a enzima de A. niger foi dialisada contra cloreto de guanidina 6M contendo mercapto-etanol 0,1M, foi dissociada em subunidades de 85.000 de peso molecular. Baseado no peso molecular da enzima nativa, sugeriram que a enzima fosse composta de 3 subunidades covalentemente ligadas (-S-S-) e provavelmente, do mesmo tamanho. KUMAGAI e colaboradores (31) encontraram o mesmo valor de peso molecular para a enzima nativa, mas após tratamento com sódio dodecilsulfato obtiveram duas subunidades de peso molecular 125.000 cada uma, sugerindo ser a enzima um dímero. Por análise de absorção atômica os mesmos autores constataram que a enzima contém um átomo-grama de cobre ligado a cada subunidade.

Os íons de cobre estão firmemente ligados, mas podem ser parcialmente removidos tratando-se a enzima com dietilditiocarbamato. Quando da remoção do cobre, a atividade enzimática cessa. A reativação é obtida com a adição de cobre, ou do cobre juntamente com piridoxal fosfato. A função do cobre nas amino oxidases ainda não foi bem estabelecida. Como o metal é necessário para a atividade catalítica, sugere-se que esteja envolvido na transferência de elétrons da proteína reduzida pelo substrato para oxigênio molecular (34).

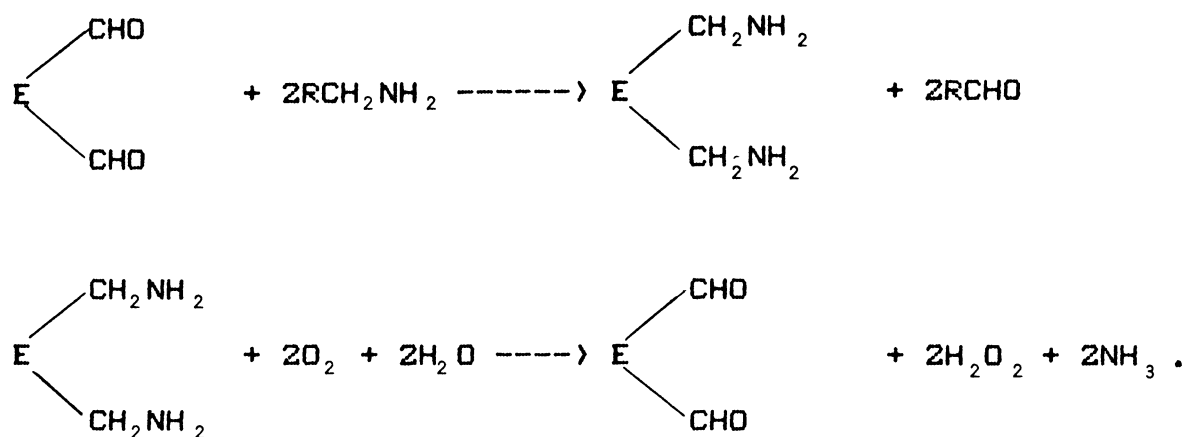
A amino oxidase de A. niger contém piridoxal fosfato fortemente ligado a enzima (1,2) e admite-se que a molécula da enzima contenha 2 grupos piridoxal fosfato (34).

A inibição das amino oxidases de origem fúngica tem sido estudada, observando-se que são fortemente inibidas por agentes quelantes de metal, sendo a inibição reversível por diálise ou adição de íons metálicos, com exceção do dietilditiocarbamato (54,64). Sugere-se que os quelantes provoquem inibição formando complexo com o cobre ligado a enzima, enquanto que o dietilditiocarbamato remove o cobre da proteína (34,64). Não foram observados efeitos na atividade enzimática em presença de $3 \cdot 10^{-4}$ M de EDTA (60,64).

A reação da amino oxidase é inibida por íons metálicos como prata, mercúrio, e cobre em altas concentrações, e por reagentes para grupo sulfidrílico (55).

Todas as diamino oxidases são fortemente inibidas por reagentes para grupos carbonílicos tais como hidrazinas, hidroxilamina, semicarbazida, aminoguanidina e cianeto de sódio. Estes agentes são geralmente inibidores em concentração de 10^{-5} a 10^{-7} M. Os inibidores parecem formar complexos covalentes com grupos carbonílicos do piridoxal fosfato, nas enzimas que o possuem, ou com algum cofator desconhecido naquelas que não o contem. As monoamino oxidases são inibidas por 2-fenilcloropropilamina (34).

SUZUKI e colaboradores (52) propuseram as seguintes etapas na reação da enzima de A. niger: uma transaminação, que ocorreria anaerobicamente, seguida de desaminação oxidativa, que ocorreria na presença de oxigênio molecular



Os estudos sobre o efeito da concentração dos substratos sobre a amino oxidase de Aspergillus niger relatam um valor de Km de 2,36 mM para a n-butilamina em pH 7,5 e 25 °C (53), e de 1,2 mM para a putrescina em pH 8,5 e 20 °C (63). Com relação à benzilamina, os valores variam de 17 µM em pH 7,2 e 20 °C a 0,56 mM em pH 7,5 e 25 °C (53). O valor estimado para o Km aparente do oxigênio é de 50 µM em pH 7,5 e 25 °C (53). Já a enzima de Candida boidinii apresenta um Km de 12 µM para o oxigênio e 0,16 mM para a metilamina (25).

Os estudos realizados por YAMADA e colaboradores (61) mostram que a amino oxidase de Aspergillus niger foi induzida por n-butilamina, com produção máxima da enzima após 12 horas de crescimento, decaindo os níveis em seguida, à medida que a n-butilamina foi sendo consumida. Entre as aminas testadas como fonte de nitrogênio, as monoaminas e diaminas foram eficientes na indução da amino oxidase e no crescimento do fungo, o mesmo não ocorrendo com as poliaminas como espermina e espermidina. Outras fontes de nitrogênio como sais de amônio, nitrato, uréia e aminoácidos não induziram a formação de enzima. Além disso, a adição de sais de amônio, uréia e aminoácidos ao meio contendo amina,

ocasionou a repressão da amino oxidase. Todos os estudos sobre a expressão da enzima foram realizados cultivando os fungos a uma tensão de 20% de oxigênio.

Os estudos sobre a expressão da superóxido dismutase, uma cobre-enzima que catalisa a degradação do íon superóxido, sugerem que a sua síntese seja regulada pela presença de pressões elevadas de oxigênio na fase gasosa (6,21,22,23,24,39).

GREGORY e colaboradores (23) constataram o efeito indutor do oxigênio sobre a superóxido dismutase de Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus, onde os níveis da enzima citoplasmática e mitocondrial foram 6,5 vezes maiores na levedura crescida em 100 % de oxigênio do que anaerobicamente, ocorrendo aumento de catalase em níveis menores.

O efeito do oxigênio em fungos filamentosos é pouco conhecido (10). NATVIG (39) examinou várias espécies de fungos aquáticos, produtores de ácido láctico, expondo-os a um atmosfera de 90% de oxigênio, estudando a variação do crescimento e sua habilidade em degradar o peróxido de hidrogênio e o íon superóxido. O autor observou que os organismos anaeróbicos e anaeróbicos aerotolerantes foram mais sensíveis ao oxigênio e exibiram menores níveis de superóxido dismutase, catalase e peroxidase do que as espécies fortemente oxidativas.

BAR-LEV & KIRK (5) observaram um aumento de atividade no sistema ligninolítico responsável pela degradação da lignina quando culturas de Phanerochaete chrysosporium foram submetidas a diferentes tensões de oxigênio.

PEDROSA & ZANCAN (43) registraram o efeito da pO_2 sobre a síntese e secreção de galactose oxidase em Dactylium

dendroides. A galactose oxidase é uma cobre-enzima que catalisa a oxidação da D-galactose, concomitantemente com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio. Os autores observaram que quando o fungo em crescimento exponencial foi colocado em presença de quantidades crescentes de oxigênio na fase gasosa, a atividade da galactose oxidase extracelular aumentou 39 vezes quando a tensão de oxigênio variou de zero a 100%. Os níveis intracelulares de galactose oxidase, catalase e superóxido dismutase aumentaram 10,4, 2,3, e 2,1 vezes, respectivamente nas mesmas condições descritas.

1.1. OBJETIVOS DO TRABALHO

Como os estudos sugerem que o oxigênio exerceria um efeito marcante sobre a síntese de enzimas, é possível que este efeito se estenda a outras enzimas além da superóxido dismutase e galactose oxidase já estudadas (21,43).

O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito do oxigênio sobre a expressão da amino oxidase, uma cobre-enzima, no fungo filamentosso Dactylium dendroides.

Para atingir este objetivo, tendo em vista que os dados de YAMADA e colaboradores (61) sugeriam que a síntese da amino oxidase de Aspergillus niger sofresse indução por amina e repressão por íons amônio, será necessário primeiramente determinar o efeito da fonte de nitrogênio e de carbono nos níveis de amino oxidase de Dactylium dendroides.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES

Albumina bovina, 4-aminoantipirina, cicloheximida, cloridrato de semicarbazida, o-dianisidina, glucose oxidase tipo II, peroxidase tipo VI, sal tetrassódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram obtidos da Sigma Chemical Company. Ácido clorídrico, ácido láctico, ácido sulfúrico, n-butilamina, carbonato de sódio anidro, dicloreto de tiamina, dietilditiocarbamato, extrato de levedura, fenol, fosfato básico de potássio, fosfato dibásico de sódio, glicerina, D(+)-glucose, hidróxido de sódio, e sulfato de magnésio eram provenientes da Merck AG. Darmstadt. Cloreto de potássio foi obtido da Baker Chemical Co., Phillipsburg; fosfato monobásico de potássio e sulfato de amônio foram obtidos da Química Moderna. L-glutamina era da Calbiochem; sulfato de cobre pentahidratado e sulfato de manganês pentahidratado eram provenientes da Riedel - de Haenig; álcool etílico pa foi obtido da Quimibrás; oxigênio, nitrogênio e argônio eram provenientes da White Martins; nitrato de amônio e cloridrato de hidroxilamina foram obtidos da Montedison Farmacêutica Carlo Erba.

As demais substâncias utilizadas neste trabalho foram obtidas de diversas fontes e consideradas quimicamente puras.

2.2. MICRORGANISMO

A amostra original do fungo Dactylium dendroides foi gentilmente cedida pela Dra. Déa Amaral do Departamento de Bioquímica da UFPR.

O fungo, classificado inicialmente como Polyporus circinatus Fr., teve sua classificação contestada, sendo classificado como Dactylium dendroides. Existe incerteza quanto a sua identificação, e vários estudos foram realizados na tentativa de esclarecer a posição taxonômica do microrganismo, sendo que os resultados sugerem ser o mesmo uma espécie distinta do Dactylium dendroides (30).

2.3. MEIOS DE CULTURA

2.3.1. Ágar malte

A composição do meio de cultura sólido empregado (ágar-malte) era a seguinte:

| | |
|---------------------|---------|
| extrato de malte | 3,0 g% |
| extrato de levedura | 0,5 g% |
| ágar | 1,5 g% |
| água destilada qsp | 100 ml. |

O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a pressão de 1 atmosfera, e em seguida os tubos foram inclinados.

2.3.2. Meio A

O meio líquido utilizado para o desenvolvimento do pré-inóculo foi o proposto por MARKUS e colaboradores (35) e se constituía de:

| | |
|------------------------------------|----------|
| fosfato monobásico de potássio | 9,0 g |
| fosfato dibásico de sódio | 8,0 g |
| sulfato de amônio | 2,0 g |
| sulfato de magnésio heptahidratado | 400 mg |
| nitrato de amônio | 1,0 g |
| extrato de levedura | 1,0 g |
| sulfato de manganês pentahidratado | 2,0 mg |
| sulfato de cobre pentahidratado | 2,5 mg |
| água destilada qsp | 1.000 ml |

2.3.3. Meio B

A composição do meio líquido utilizado para o crescimento do microrganismo era o meio A contendo 0,55 g/l de sulfato de amônio e 0,26 g/l de nitrato de amônio, o que perfazia 21 mg% de nitrogênio.

2.3.4. Meio C

Nas experiências de indução da amino oxidase foi utilizado meio mínimo com composição semelhante à do meio A, utilizando-se 5 mg/l de dicloreto de tiamina como fator de crescimento no lugar do extrato de levedura e 0,1 g% de n-butilamina como

fonte única de nitrogênio no lugar dos sais de amônio. O teor de nitrogênio total do meio é de 19,1 mg%.

O pH final dos meios de cultura foi corrigido para 5,8 com ácido clorídrico 5 N. A determinação do pH foi feita em potenciômetro Metrohm Herisau E-520. Os meios eram esterilizados em autoclave por 20 minutos a pressão de 1 atmosfera.

As fontes de carbono utilizadas foram esterilizadas separadamente em vapor fluente por 30 minutos, e adicionadas asepticamente ao meio de cultura. A D-glucose foi empregada a uma concentração final de 1,0 g% para o desenvolvimento do pré-inóculo e 0,2 g% para todos os outros experimentos.

O dicloreto de tiamina foi esterilizado separadamente, em autoclave por 20 minutos a 120 °C.

A solução de n-butilamina teve seu pH ajustado a 5,8 com ácido clorídrico 5 N e esterilizada a pressão de 1 atmosfera por 20 minutos, e foi adicionada asepticamente ao meio de cultura a uma concentração final de 0,1 g%.

2.4. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E CULTIVO DO Dactylium dendroides

2.4.1. Conservação das amostras

As amostras de D. dendroides foram cultivadas em meio ágar malte a 28°C por 4 dias e estocadas em geladeira a 4°C, fazendo-se transferências bimestrais.

2.4.2. Preparo do pré-inóculo

Pedaços de micélio cultivados em ágar malte foram transferidos assepticamente para um frasco erlenmeyer de 250 ml de capacidade contendo 50 ml de meio A com D-glucose a 1,0 g%. O crescimento se processou com agitação contínua em agitador rotatório (New Brunswick Scientific Co) a 110 rpm, 28°C por 48 horas. Numa segunda etapa, uma alíquota de micélio foi transferida, com auxílio de alça, para um erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml do mesmo meio, e o crescimento se processou com agitação contínua, nas condições anteriores, por 48 horas, obtendo-se assim o pré-inóculo.

2.4.3. Condições de crescimento

O crescimento do fungo foi efetuado utilizando-se 400 ml de diferentes meios de cultura, na presença ou ausência de 0,2 g% de D-glucose como fonte de carbono em erlenmeyers de 2 litros. O pré-inóculo foi homogeneizado a baixa velocidade do liquidificador Waring Blendor por 30 segundos. Uma alíquota de 2,5 ml da suspensão, equivalente em média, a 28 mg de peso seco, foi transferida assepticamente para cada frasco contendo meio de cultura. O crescimento foi efetuado por 24 horas em agitador rotatório a 110 rpm e 28 °C.

Uma relação de 1:5 entre volume de meio e do frasco foi mantida constante em todos os cultivos e experimentos realizados durante o trabalho.

Para a avaliação do crescimento foram coletados frascos em intervalos de 12 horas. De cada frasco foram retiradas alíquotas de 25 ml de meio de cultivo para a determinação do peso seco e o restante dos micélios foram colhidos por filtração e utilizados no preparo do extrato livre de células.

2.4.4. Pré-indução da amino oxidase em presença de íons amônio

Nos experimentos com a finalidade de realizar pré-indução da amino oxidase, foi adicionada n-butilamina a uma concentração final de 0,1 g% a células com 24 horas de crescimento em meio B contendo 0,2 g% de D-glucose, estendendo-se o cultivo por 9 horas.

2.5 PREPARO DA SUSPENSÃO DE MICÉLIOS

Micélios crescidos como descrito no item 2.4.3 em meio B contendo 0,2 g% de D-glucose foram colhidos por filtração, lavados com água destilada e re-suspensos a uma concentração final de 2 g de peso úmido de micélio por 100 ml de meio contendo diferentes fontes de carbono e de nitrogênio.

Os experimentos foram realizados, em duplicata, e incubados sob agitação contínua a 110 rpm e 28 °C. Ao final dos experimentos, alíquotas das culturas foram retiradas para a determinação do peso seco, e o restante dos micélios eram colhidos por filtração, lavados com água gelada e utilizados no preparo do extrato livre de células. Alíquotas do meio de cultura foram

conservadas a -17°C para a determinação de pH e do teor de D-glucose.

2.6. AJUSTE DA TENSÃO DE OXIGÊNIO NA FASE GASOSA

Nos experimentos realizados com variação da tensão de oxigênio na fase gasosa, os frascos contendo os micélios suspensos em meio de cultura como descrito no item 2.5, foram vedados com rolha de borracha e a fase gasosa substituída por oxigênio ou nitrogênio, monitorando-se a concentração dos gases por cromatografia gasosa. A operação de troca gasosa durava em média 30 minutos. A adição da fonte de carbono foi sempre a última etapa e correspondia ao início do experimento (tempo zero). Os experimentos foram realizados nas condições descritas no item 2.5.

A concentração de oxigênio na fase gasosa foi avaliada por cromatografia em fase gasosa utilizando-se cromatógrafo VARIAN 1240 com detetor de condutividade térmica, com coluna Molecular Sieve 5A (MS-5A), de 3 pés por 1,8 polegadas, tendo argônio como gás de arraste num fluxo de 25 ml/min. A temperatura do injetor era de 70°C , do detetor 120°C , e da coluna 70°C .

A concentração de oxigênio na fase gasosa foi calculada em comparação com a altura do pico dos padrões utilizados (oxigênio puro e ar atmosférico).

2.7. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA MASSA MICELIAL

A variação da massa micelial foi avaliada pela determinação do peso seco do micélio. Aliquota de 5 ml de meio de cultivo era filtrada através de papel Wheaton de peso conhecido adaptado a aparelho de filtração Milipore. O papel de filtro contendo os micélios era secado em estufa a 60°C até peso constante. O peso seco dos micélios foi calculado por diferença.

2.8. PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

Os micélios foram triturados em gral de porcelana, em banho de gelo, com igual peso em areia, e suspensos em dois volumes de tampão fosfato 10 mM pH 7,5 com EDTA 0,5 mM. A suspensão assim obtida foi centrifugada a 11.500 g (10.000 rpm) por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C (Beckman - Modelo J-21 B). O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima.

2.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMINO OXIDASE

A determinação da atividade da amino oxidase foi feita pelo método enzimático acoplado, medindo-se o peróxido de hidrogênio formado na reação pelo método de AISAKA & TERADA (3). Na técnica utilizada, o peróxido de hidrogênio é decomposto em presença de peroxidase, oxidando a 4-aminoantipirina e o fenol,

produzindo um composto colorido, a quinoneimina que apresenta absorção máxima a 500 nm. A conversão de absorbância em nmol de peróxido de hidrogênio foi realizada empregando uma curva padrão de peróxido de hidrogênio (10 a 260 nmoles H_2O_2), titulado previamente pelo método de VOGEL (58).

As condições ótimas para o ensaio da atividade enzimática foram determinadas previamente. O sistema de incubação continha 150 μ moles de tampão fosfato pH 7,1; 6 μ moles de n-butilamina; 1,2 μ moles de 4-aminoantipirina; 21 μ moles de fenol; 20 UI de peroxidase; extrato livre de células e completado para um volume de 3 ml com água destilada. A reação foi sempre iniciada pela adição da enzima. O sistema era incubado a 30°C e a coloração desenvolvida medida a 500 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU-2 em tempos variáveis, conforme a atividade enzimática da preparação, sendo a reação linear até 30 minutos.

Para a determinação da atividade enzimática foi feita curva de concentração de enzima para cada amostra em análise. Os controles sem enzima e os controles sem substrato foram realizados na determinação da atividade enzimática, não se observando em nenhum dos casos o desenvolvimento de reação colorida.

A unidade de amino oxidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de peróxido de hidrogênio por minuto. A atividade específica foi definida como a razão entre unidade de enzima e miligrama de proteína.

2.10. EFEITO DE INIBIDORES SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os efeitos do EDTA, semicarbazida, hidroxilamina, dietilditiocarbamato sobre a desaminação oxidativa da n-butilamina pela amino oxidase foram analisados. O ensaio controle era semelhante ao descrito no item anterior contendo 50 μ l de extrato livre de células obtido de micélios que sofreram indução por 6 horas em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina e 0,2 g% de D-glucose. A enzima era pré-incubada com o inibidor na mistura de reação por 10 minutos, e a reação iniciada pela adição de n-butilamina. Nos ensaios foram utilizadas concentrações variáveis de inibidores.

2.11. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação de proteínas foi feita pelo método proposto por LOWRY e colaboradores (33), utilizando-se como padrão a soroalbumina bovina. Todas as amostras (extratos livres de células) foram dialisadas contra água a 40C por 3 horas com agitação contínua antes da determinação.

2.12. DETERMINAÇÃO DE PEROXIDASE

A determinação de atividade de peroxidase foi feita pelo método de AISAHA & TERADA (3), utilizando-se peróxido de hidrogênio como substrato.

O sistema consistia de 50 μ moles de tampão fosfato pH 7,0; 1,2 μ moles de 4-aminoantipirina; 21 μ moles de fenol; 3,6 μ moles de peróxido de hidrogênio; extrato livre de células ou meio de cultura e completado para um volume de 3 ml com água destilada. O sistema era incubado a 30°C e após determinado tempo a coloração desenvolvida medida a 500 nm em fotocolorímetro Coleman Jr Modelo 6 A série N^o H-5527.

2.13. DETERMINAÇÃO DO pH DO MEIO DE CULTIVO

O pH final do meio de cultivo, livre de micélio, de todas as amostras, foi medido em potenciômetro Metrohm Herisau E 520.

2.14. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE D-GLUCOSE

O consumo de D-glucose como fonte de carbono e energia foi monitorado no meio de cultivo empregando-se o método da glucose-oxidase (14), sendo realizada como controle dos experimentos.

3. RESULTADOS

3.1. NÍVEIS DE AMINO OXIDASE EM FUNÇÃO DO CRESCIMENTO DE Dactylium dendroides EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

A atividade específica da amino oxidase em Dactylium dendroides em diferentes meios de cultura foi determinada, avaliando-se a variação de seus níveis em função do crescimento, e os dados obtidos estão apresentados nas figuras 1, 2, 3 e 4.

Os resultados mostram que os níveis da enzima, quando o fungo foi crescido em meio A (contendo 41 mM de íon amônio) e no meio B (contendo 11 mM de íon amônio) apresentaram valores bem próximos, mantendo-se em torno de $0,3 \text{ nmoles H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ durante o crescimento (figuras 1 e 2). Quando o fungo foi crescido em meio C, contendo 0,1 g% de n-butilamina como fonte única de nitrogênio, observou-se que o tempo de geração aumentou duas vezes enquanto que a atividade enzimática em 24 horas de crescimento cresceu 186 vezes (figura 3) sendo que no meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina como fonte de carbono e de nitrogênio houve um aumento do tempo de geração de três vezes e um aumento na atividade enzimática de 200 vezes em 24 horas de crescimento (figura 4) em comparação com os valores obtidos em meios com alto teor de íon amônio (figuras 1 e 2).

Em nenhuma condição experimental foi detectada a presença de amino oxidase extracelular.

3.2. EFEITO DE INIBIDORES SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMINO OXIDASE

Com a finalidade de caracterizar o tipo de amino oxidase que estava sendo estudada, foram realizados ensaios com diferentes inibidores observando-se que a enzima é sensível aos reagentes para grupos carbonílicos estudados: a hidroxilamina a $5 \cdot 10^{-6}$ M e a semicarbazida a $5 \cdot 10^{-4}$ M inibem 100 % da atividade enzimática.

Entre os agentes quelantes de metal, o dietilditio-carbato a $5 \cdot 10^{-4}$ M inibiu 96 % da atividade enzimática, enquanto que o EDTA a $5 \cdot 10^{-4}$ M não apresentou qualquer efeito inibitório sobre a enzima (tabela I).

3.3. EFEITO DA n-BUTILAMINA SOBRE OS NÍVEIS DA AMINO OXIDASE EM CÉLULAS EM FASE ESTACIONÁRIA DE CRESCIMENTO

Quando ao micélio em fase estacionária de crescimento em meio B adicionou-se n-butilamina a uma concentração final de 0,1 g%, verificou-se um aumento da massa micelial de 1,11 vezes nas 14 horas seguintes em relação ao controle, estabilizando-se posteriormente. A atividade enzimática aumentou 93 vezes em 14 horas após a adição da n-butilamina, diminuindo nas 12 horas seguintes e mantendo-se estável por 72 horas (figura 5).

3.4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE n-BUTILAMINA SOBRE A INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE

Como os dados em células em crescimento sugeriam que a enzima fosse induzida por n-butilamina, estudou-se o efeito da concentração de n-butilamina em células pré-crescidas em meio B. As células foram incubadas por 6 horas em meio C contendo 0,2 g% de D-glucose e concentrações variáveis de n-butilamina e os dados estão apresentados na tabela II. Verifica-se que concentrações da ordem de 0,01 g% são suficientes para induzir a enzima.

A transferência das células pré-crescidas em meio B para meio C sem fonte de nitrogênio, não resultou em aumento dos níveis da enzima.

3.5. EFEITO DA FONTE DE CARBONO SOBRE A INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE

O efeito da fonte de carbono sobre a indução da amino oxidase em células pré-crescidas em meio B é apresentado na tabela III, onde se pode verificar que não houve variação significativa nos níveis da enzima quando se variou a fonte de carbono e energia. Os níveis de enzima não variaram significativamente, quando o fungo foi crescido em presença de 0,4 g% de lactato, 0,4 g% de glicerol ou 0,2 g% de D-glucose.

Com a finalidade de determinar a concentração ótima da D-glucose como fonte de carbono e energia para a indução variou-

se a concentração de D-glucose de zero a 2,0 g% em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina por 8 horas, em células pré-crescidas em meio B contendo 0,2 g% de D-glucose. A atividade enzimática e a variação do peso seco foram avaliados (figura 6) observando-se que a concentração ótima para a indução da amino oxidase situa-se entre 0,2 e 0,5 g% de D-glucose.

O pH do meio de cultivo não sofreu alteração, mantendo-se entre 5,5 e 5,8.

3.6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE OS NÍVEIS DA AMINO OXIDASE

Com o propósito de comprovar se os íons amônio causam repressão enzimática da amino oxidase, retirou-se do meio B os sais de amônio e o extrato de levedura, sendo empregada n-butilamina como fonte única de nitrogênio. As células pré-crescidas em meio B foram re-suspensas no meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina e concentrações crescentes de sais de amônio (zero a 30 mM) e incubadas por 8 horas. A figura 7 mostra o efeito da concentração dos íons amônio sobre os níveis da enzima, diminuindo a atividade específica da enzima em 2,19 vezes quando a concentração do íon amônio variou de zero a 5 mM, e se mantendo aproximadamente nos mesmos níveis até 30 mM. Não se verificou variação da massa micelial, e o pH do meio de cultivo se manteve entre 5,4 e 5,6 durante o experimento. A adição de de 10 mM de sais de amônio na mistura de reação para a medida da atividade de amino oxidase não provocou inibição da atividade enzimática.

3.7. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA L-GLUTAMINA SOBRE OS NÍVEIS DA AMINO OXIDASE

Com a finalidade de verificar se a L-glutamina causa repressão da síntese da amino oxidase, as células pré-crescidas em meio B foram re-suspensas em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina e concentrações variáveis de L-glutamina (zero a 10 mM) e incubadas por 6 horas. A figura 8 mostra o efeito repressor da L-glutamina sobre a síntese da enzima, diminuindo a atividade específica da enzima 2,8 vezes quando a concentração varia de zero a 2 mM e 20 vezes quando varia de zero a 5 mM. Não foram observadas variações significativas da massa micelial e do pH do meio de cultivo. A concentração de D-glucose residual no final do experimento era de, em média, 30 mg%. A adição de 10 mM de L-glutamina na mistura de reação para a medida da atividade da amino oxidase não provocou inibição da atividade enzimática.

3.8. CINÉTICA DA INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE EM PRESENÇA DE ÍONS AMÔNIO NA AUSÊNCIA E EM PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA

A cinética de indução da amino oxidase foi realizada com células crescidas por 24 horas em meio B e re-suspensas no mesmo meio contendo 0,1 g% de n-butilamina. A indução da síntese de amino oxidase iniciou aproximadamente 6 horas após a adição do indutor (figura 9). A adição de 2 mg% de cicloheximida 3 horas após a adição da n-butilamina, impediu o aumento da atividade de

amino oxidase, sugerindo que a amino oxidase esteja sendo sintetizada "de novo".

3.9. INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE POR n-BUTILAMINA EM MEIO LIVRE DE ÍONS AMÔNIO

Como os íons amônio causaram repressão da síntese da enzima, foi estudada a cinética de indução em meio mínimo contendo n-butilamina como fonte única de nitrogênio. Na figura 10 verifica-se que a indução iniciou logo após a adição do indutor, atingindo nível máximo em 9 horas, diminuindo nas 3 horas seguintes e se mantendo estável até 24 horas. O pH do meio de cultivo diminuiu ligeiramente, sendo de 5,7 após três horas e 5,3 após 24 horas.

3.10. CINÉTICA DE INDUÇÃO DA AMINO OXIDASE EM 20 e 80 % DE OXIGÊNIO

A indução da síntese de amino oxidase por n-butilamina é alterada pela variação da concentração de oxigênio na fase gasosa. A figura 11 mostra a atividade específica da enzima nos micélios submetidos a indução em diferentes concentrações de oxigênio, bem como as variações no consumo de oxigênio e na massa micelial. Em 6 horas de indução observou-se um aumento de 4,5 vezes nos níveis de enzima e de 1,15 vezes na massa micelial quando a concentração de oxigênio foi aumentada de 20 a 80 %. A

variação do consumo de oxigênio foi proporcional à concentração de oxigênio. A concentração de D-glucose residual em 6 horas era de 10 mg% em ambas condições.

3.11. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIGÊNIO SOBRE OS NÍVEIS DA AMINO OXIDASE EM PRESENÇA DE ÍONS AMÔNIO E n-BUTILAMINA

O efeito do oxigênio sobre a síntese de amino oxidase em presença de íons amônio e n-butilamina é demonstrado na figura 12. Observou-se um aumento de 7,3 vezes na atividade enzimática quando a concentração do oxigênio variou de zero a 100 %, havendo um acréscimo de 1,3 vezes na massa micelial. Os níveis de atividade enzimática do sistema com zero % de oxigênio correspondem aos níveis atingidos durante a pré-indução, e foram da ordem de $5,4 \text{ nmoles H}_2 \text{ O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A D-glucose foi totalmente consumida nas condições do ensaio. O consumo de oxigênio aumentou com o aumento da concentração de oxigênio na fase gasosa até 53 %, diminuindo a 100 %. O pH do meio de cultivo sofreu pequena alteração, ficando os valores entre 5,4 e 5,7.

3.12. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIGÊNIO SOBRE OS NÍVEIS DA AMINO OXIDASE EM MEIO LIVRE DE ÍONS AMÔNIO E CONTENDO n-BUTILAMINA NA AUSÊNCIA E EM PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA

O efeito da concentração de oxigênio sobre a indução da enzima em condições de desrepressão, está apresentado na figura 13.

Quando os micélios com 24 horas de crescimento em meio B foram re-suspensos em meio C e expostos a concentrações de oxigênio que variaram de zero a 100 %, os resultados demonstraram que houve um aumento de 296 vezes nos níveis da enzima quando a concentração de oxigênio na fase gasosa variou de zero a 100 %, com uma variação de massa micelial correspondente de 1,35 vezes. O consumo de oxigênio aumentou 3,75 vezes com o aumento da concentração de oxigênio na fase gasosa de 20 a 80 %, diminuindo em 100 % de oxigênio. O pH se manteve entre 5,5 e 5,8 em todas as amostras.

A adição de cicloheximida aos sistemas com concentrações de oxigênio superiores a 20 % impediu a indução de atividade enzimática. Nestas condições, o consumo de oxigênio e o de D-glucose foram também afetados, tendo diminuído em relação ao controle (figura 13).

3.13. ATIVIDADE DE PEROXIDASE

A determinação de atividade de peroxidase foi realizada em todos os meios de cultivo e extratos livres de células, não se observando qualquer atividade nos sistemas ensaiados.

TABELA I - Efeito de inibidores sobre a atividade enzimática da amino oxidase

| INIBIDORES | CONCENTRAÇÃO (M) | INIBIÇÃO (%) |
|-----------------------|-------------------|--------------|
| Semicarbazida | 10^{-6} | 11 |
| | 10^{-5} | 50 |
| | $5 \cdot 10^{-4}$ | 97 |
| Hidroxilamina | 10^{-7} | 18 |
| | $5 \cdot 10^{-7}$ | 50 |
| | 10^{-6} | 79 |
| | $5 \cdot 10^{-6}$ | 100 |
| Dietilditioicarbamato | $5 \cdot 10^{-7}$ | 8 |
| | 10^{-6} | 12 |
| | $5 \cdot 10^{-6}$ | 16 |
| | 10^{-5} | 24 |
| | $5 \cdot 10^{-4}$ | 96 |
| EDTA | $5 \cdot 10^{-4}$ | zero |

Condições experimentais conforme descrito em Materiais e Métodos ítem 2.10.

TABELA II - Efeito da concentração de n-butilamina sobre a indução da amino oxidase

| Concentração de n-butilamina (g%) | atividade enzimática (nmoles H ₂ O ₂ .mg ⁻¹ .min ⁻¹) | massa micelial total (mg de peso seco) |
|-----------------------------------|---|--|
| nenhuma | 0,75 | 116,0 |
| 0,01 | 25,5 | 112,5 |
| 0,05 | 27,4 | 116,0 |
| 0,10 | 38,7 | 133,0 |

Condições experimentais conforme descrito no item 2.5 de Materiais e Métodos. Micélio suspenso em meio C contendo 0,2 g% de D-glucose e as concentrações indicadas de n-butilamina. Tempo de incubação: 6 horas.

Massa micelial inicial: 76,5 mg peso seco.

Atividade específica inicial: 0,31 nmoles H₂ O₂ .mg⁻¹.min⁻¹

TABELA III- Efeito da fonte de carbono sobre a indução da amino oxidase

| Fonte de carbono | atividade específica (nmoles $H_2O_2 \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$) | Massa micelial total (mg de peso seco) |
|-------------------|---|---|
| <u>D</u> -glucose | 43,5 | 104,5 |
| glicerol | 31,7 | 114,5 |
| lactato | 35,6 | 98,0 |

Condições experimentais conforme descrito no item 2.5 de Materiais e Métodos. Micélio suspenso em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina, e 0,2 g% de D-glucose ou 0,4 g% de glicerol ou 0,4 g% de lactato. Tempo de incubação: 6 horas.

Massa micelial inicial: 76,5 mg peso seco.

Atividade específica inicial: 0,31 nmoles $H_2O_2 \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$

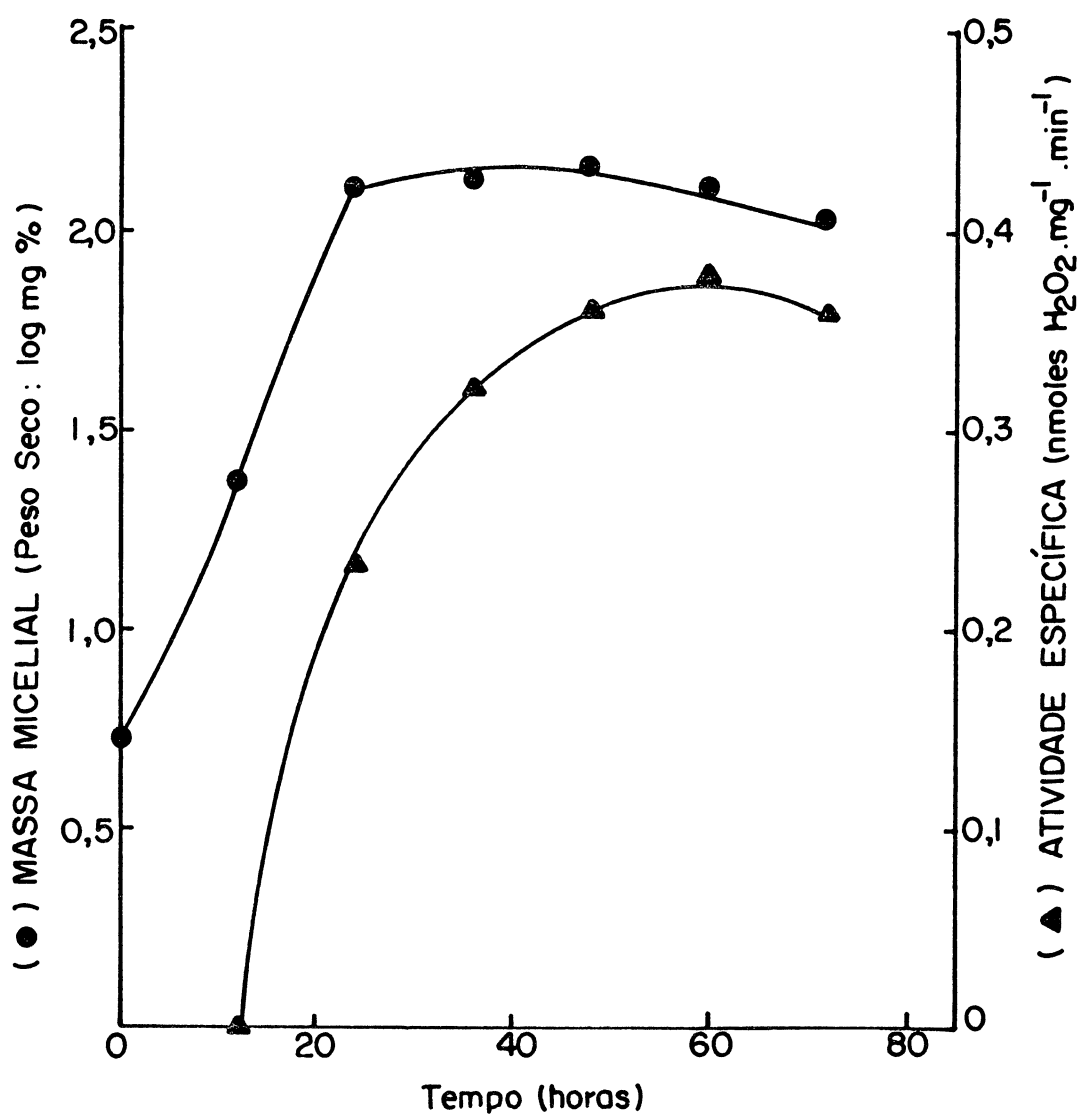


FIGURA 1 - Níveis de amino oxidase em função do crescimento em meio A (41 mM de íon amônio).

O fungo foi crescido como descrito em Materiais e Métodos item 2.4.3, em meio A contendo 0,2 g% de D-glucose como fonte de carbono e energia.

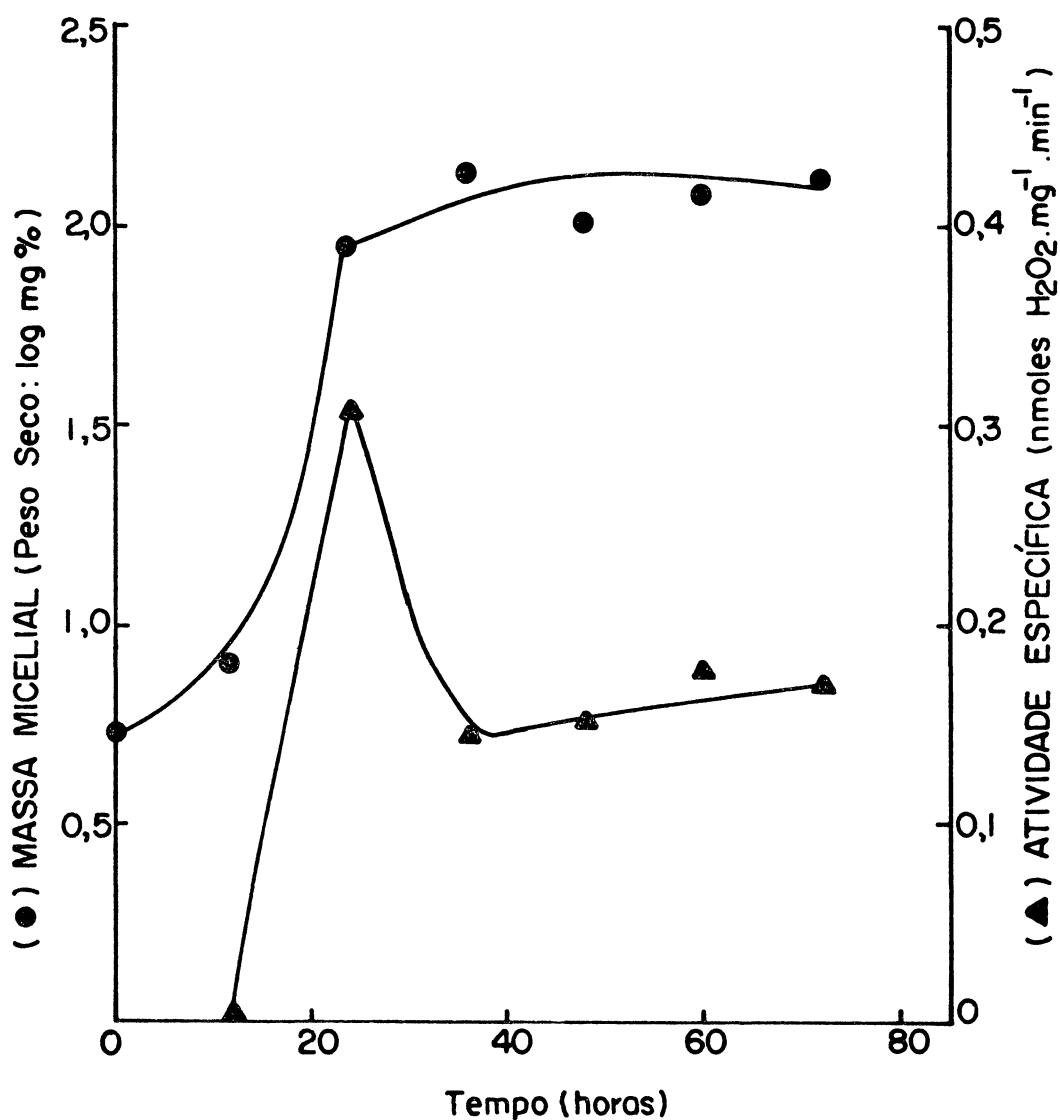


FIGURA 2 - Níveis de amino oxidase em função do crescimento em meio B (11 mM de íon amônio)

O fungo foi crescido como descrito no item 2.4.3 de Materiais e Métodos, em meio B contendo 0,2 g% de D-glucose como fonte de carbono e energia.

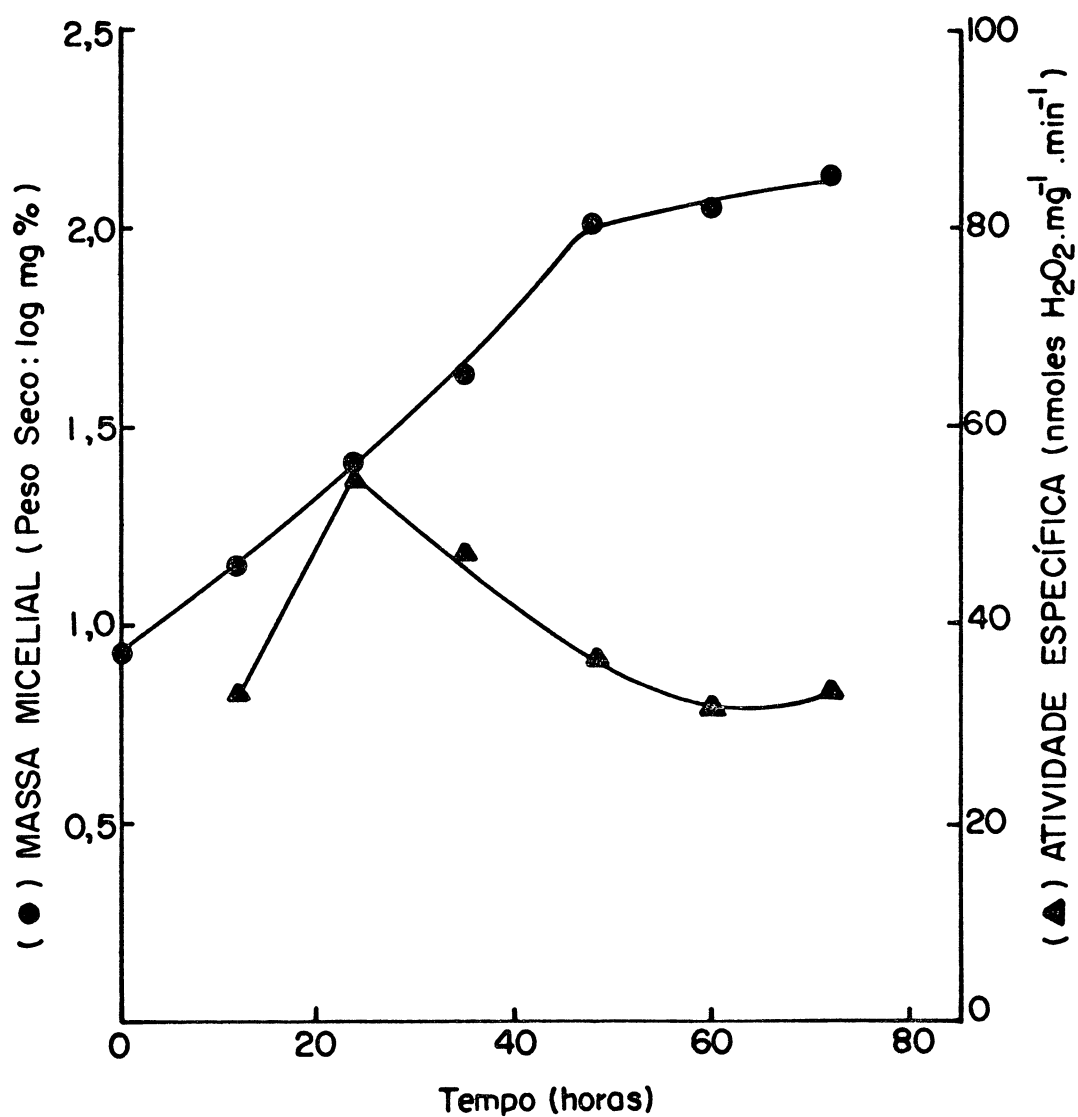


FIGURA 3 - Níveis de amino oxidase em função do crescimento em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina como fonte de nitrogênio.

O fungo foi crescido como descrito no item 2.4.3 de Materiais e Métodos, em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina como fonte de nitrogênio e 0,2 g% de D-glucose como fonte de carbono e energia.

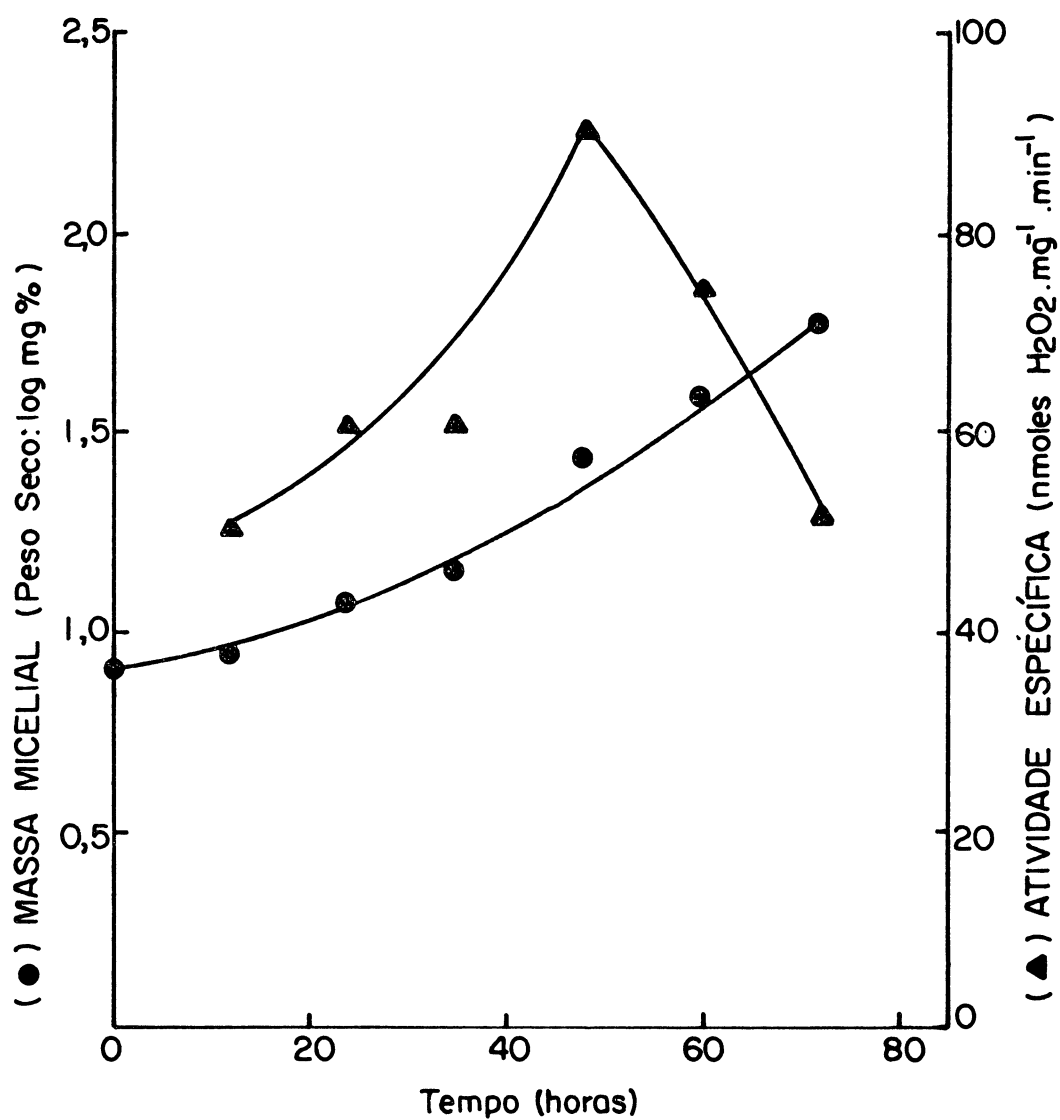


FIGURA 4 - Níveis de amino oxidase em função do crescimento em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina como fonte de carbono e de nitrogênio.

O fungo foi crescido como descrito no item 2.4.3 de Materiais e Métodos em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina como fonte única de nitrogênio, carbono e energia.

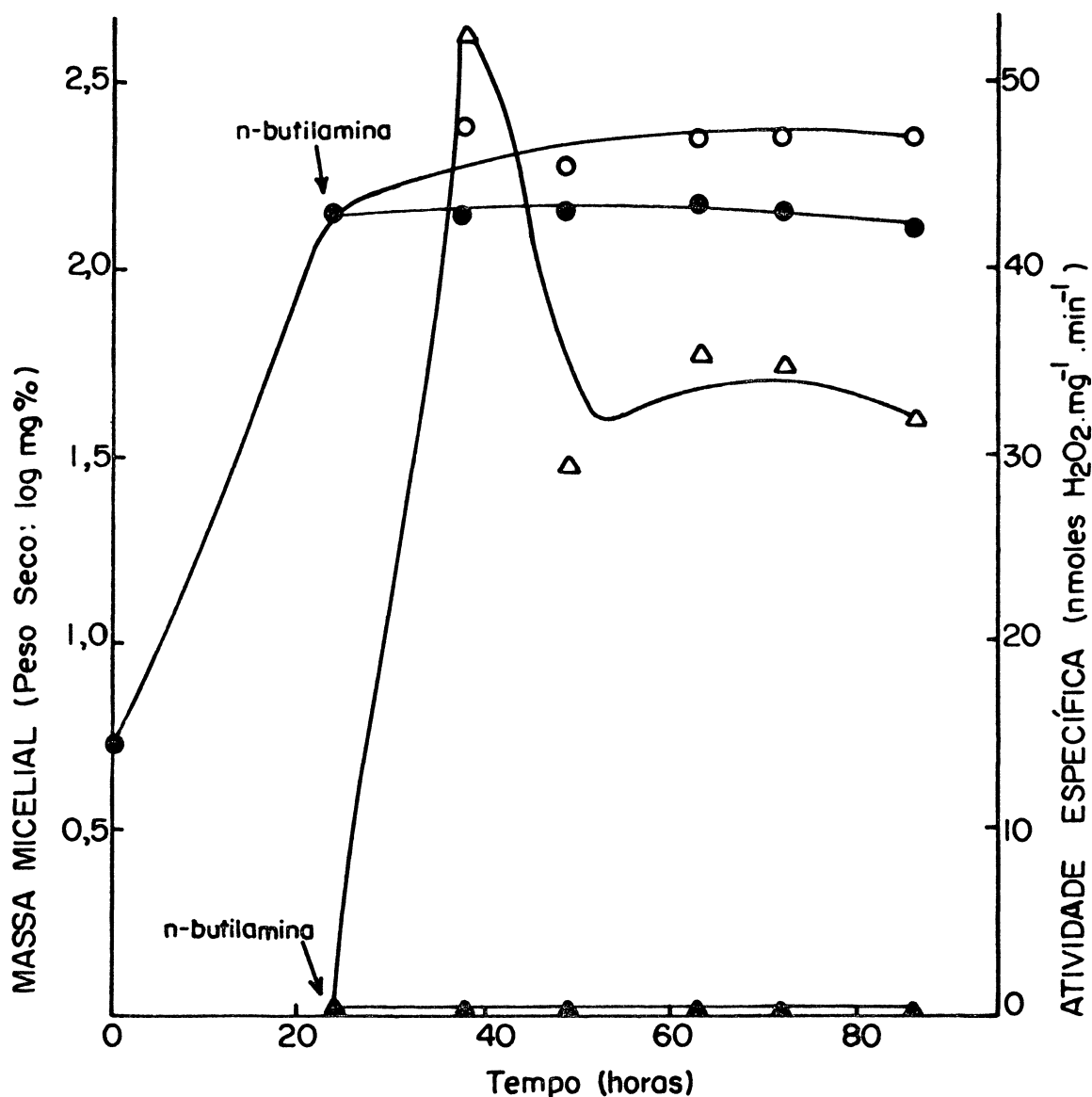


FIGURA 5 - Efeito da adição de n-butilamina em células em fase estacionária de crescimento

Ros micélios com 24 horas de crescimento em meio B contendo 0,2 g% de D-glucose foi adicionada n-butilamina a uma concentração final de 0,1 g%. Nos tempos indicados amostras foram coletadas para a determinação do crescimento das células na ausência (●) e em presença (○) de n-butilamina, e para a determinação de atividade da amino oxidase na ausência (▲) e em presença de n-butilamina (△).

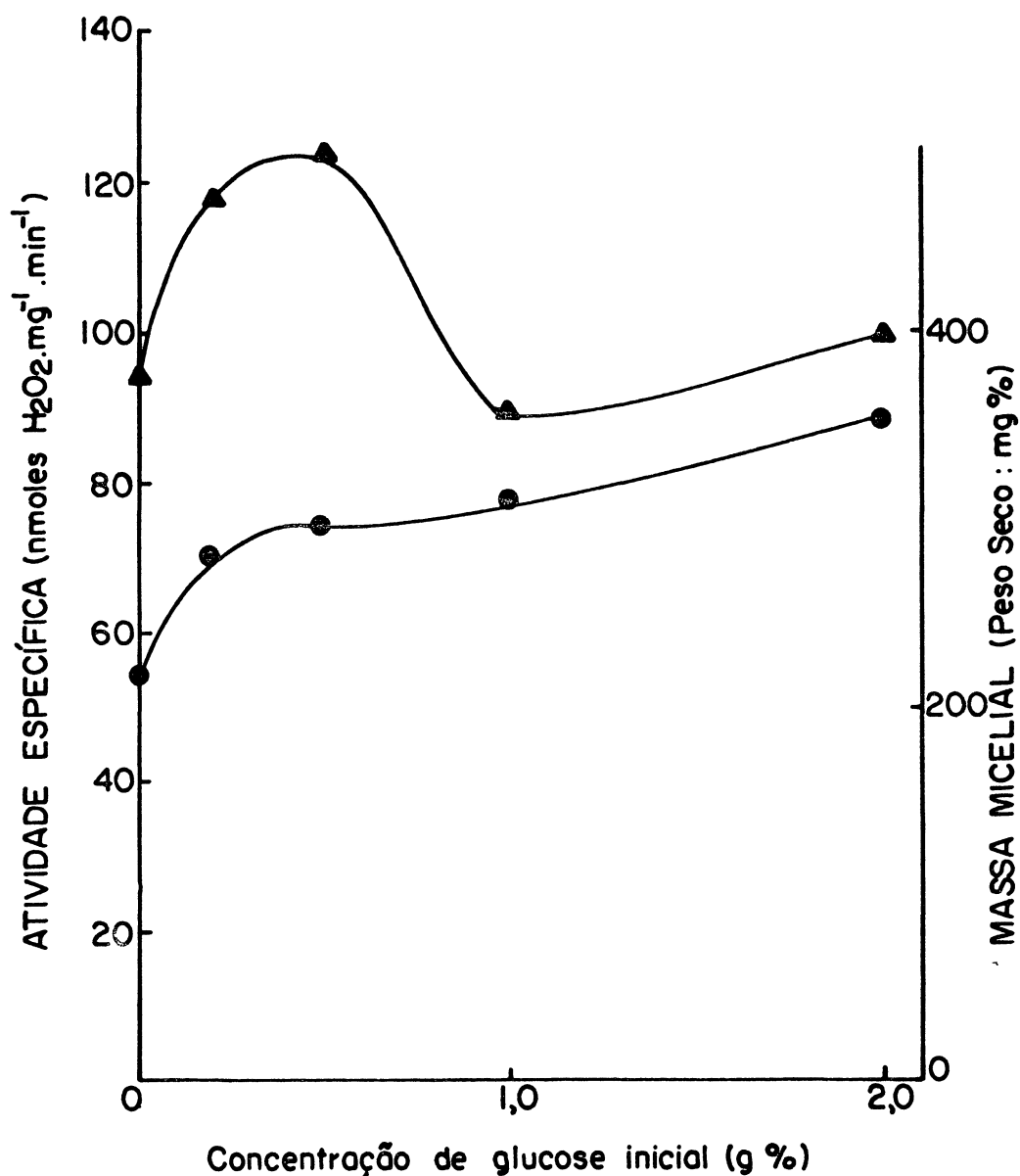


FIGURA 6 - Efeito da concentração de D-glucose na indução da amino oxidase

Micélios pré-crescidos como descrito em Materiais e Métodos ítem 2.5 foram re-suspensos em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina em presença de concentrações variáveis de D-glucose. Após 8 horas de experimento foram determinadas a atividade enzimática (▲), e a variação da massa micelial (●).

Massa micelial inicial: 126 mg% de peso seco

Atividade específica inicial: 0,30 nmoles H₂O₂.mg⁻¹.min⁻¹

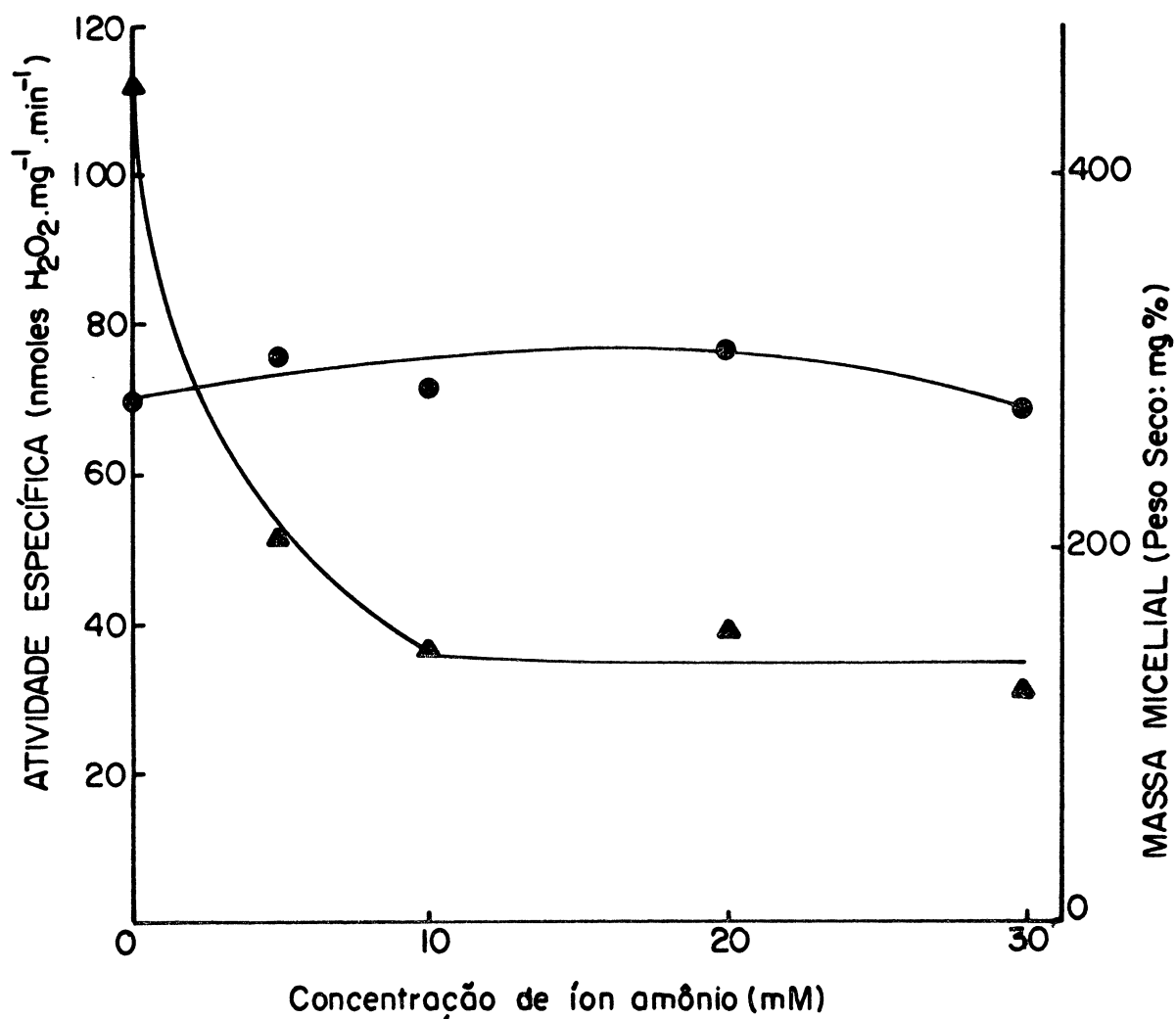


FIGURA 7 - Efeito da concentração de íons amônio sobre os níveis de amino oxidase

Micélios pré-crescidos como descrito no item 2.5 de Materiais e Métodos foram re-suspensos em meio C contendo 0,1 g% de n-butil-amina, 0,2 g% de D-glucose e sais de amônio em concentrações que variaram de zero a 30 mM de íon amônio. Após 8 horas, avaliaram-se a atividade enzimática (▲) e a variação da massa micelial (●).

Massa micelial inicial: 125 mg% de peso seco.

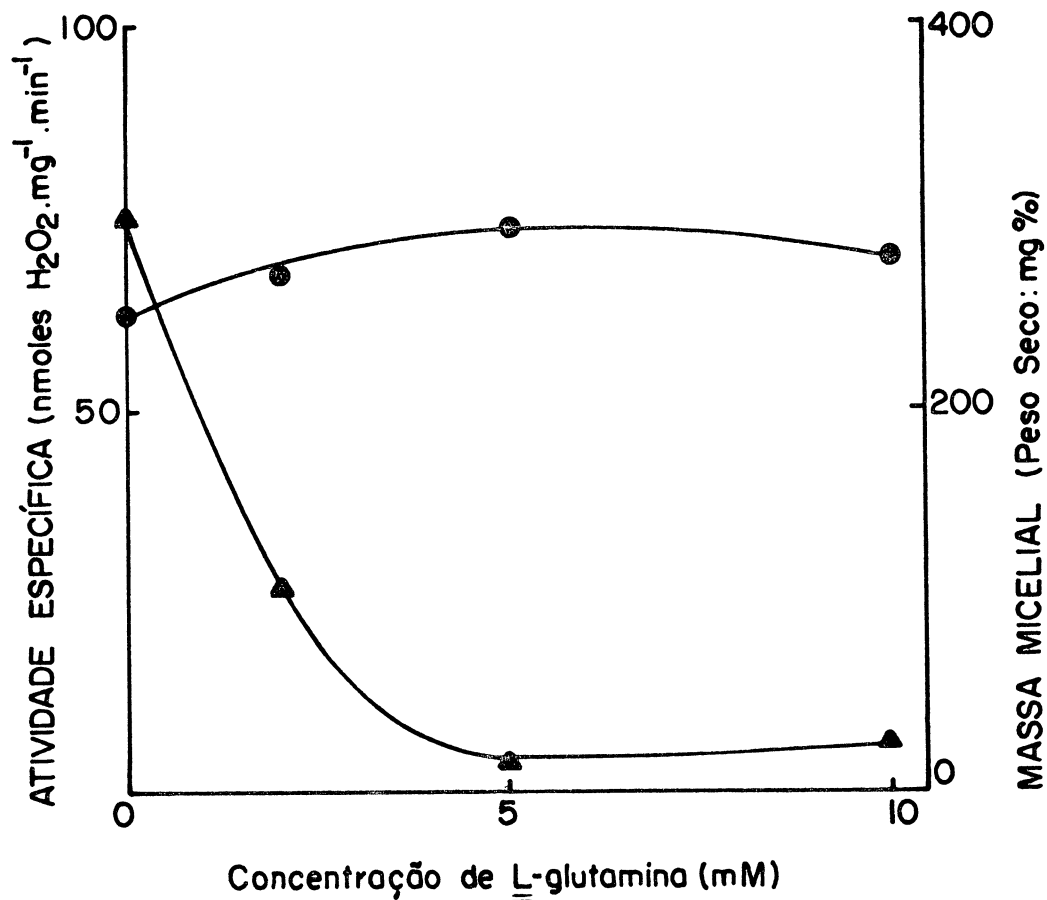


FIGURA 8 - Efeito da concentração da L-glutamina no meio de cultura sobre a expressão da amino oxidase

Micélios pré-crescidos conforme descrito em Materiais e Métodos item 2.5, foram re-suspensos em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina, 0,2 g% de D-glucose e L-glutamina em concentrações que variaram de zero a 10 mM. Após 6 horas, avaliaram-se a atividade enzimática (▲) e a variação da massa micelial (●). Massa micelial inicial: 141 mg% de peso seco.

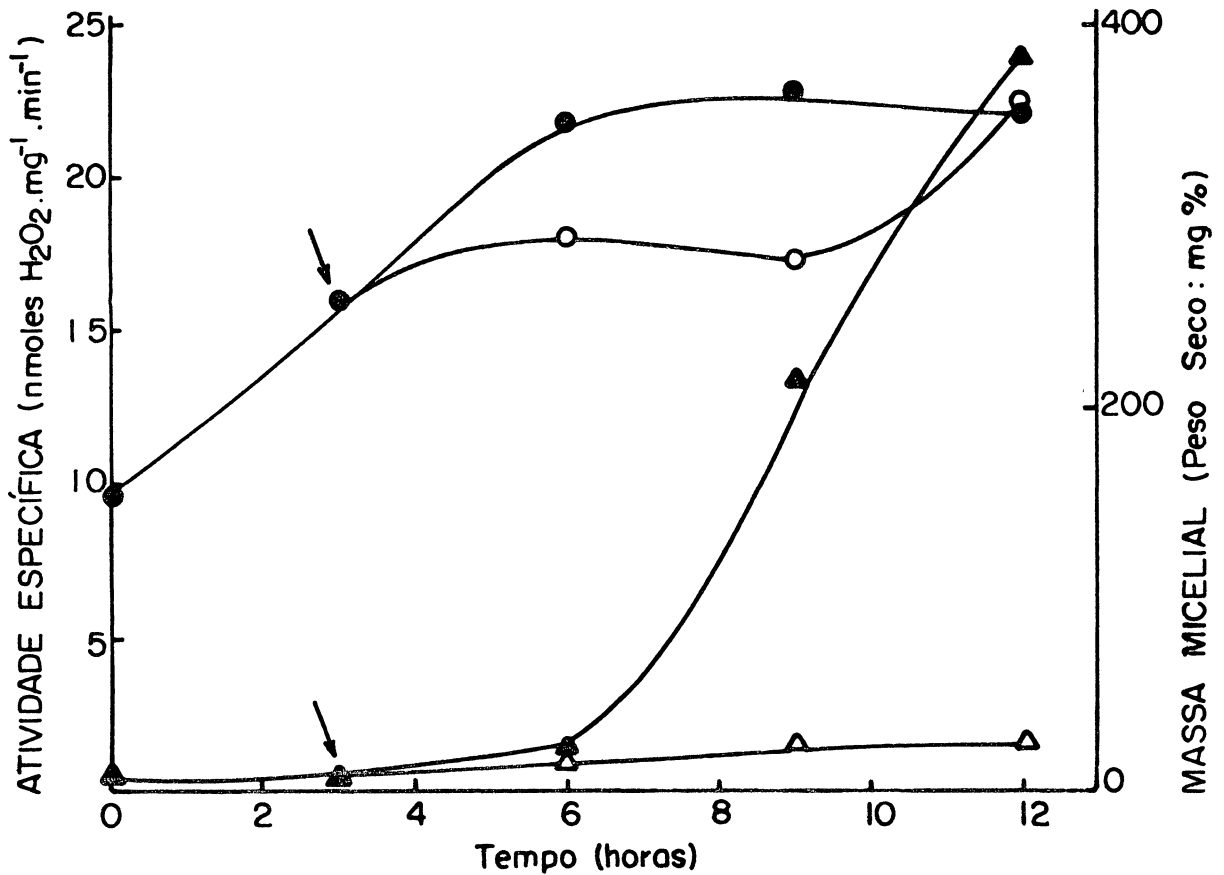


FIGURA 9 - Cinética da indução da amino oxidase em presença de íons amônio na ausência e em presença de cicloheximida

Micélios pré-crescidos como descrito no item 2.5 de Materiais e Métodos foram re-suspensos em meio B contendo 0,1 g% de n-butilamina e 0,2 g% de D-glucose (símbolos fechados). A seta indica a adição de cicloheximida a uma concentração final de 2 mg% (símbolos abertos). Nos tempos indicados foram coletadas amostras para a determinação da massa micelial (● ○) e para a determinação da atividade enzimática de amino oxidase (▲ △).

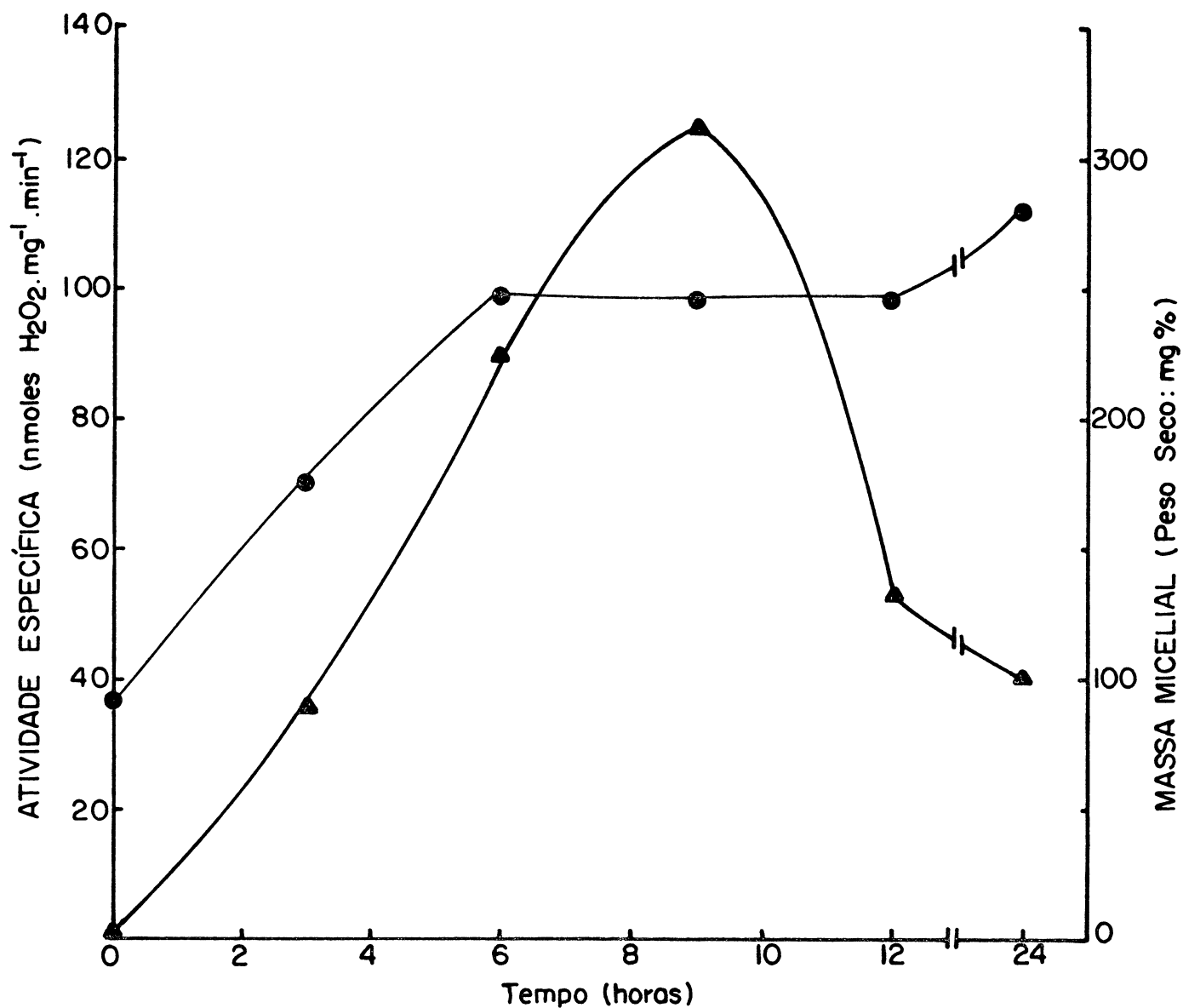


FIGURA 10 - Indução da amino oxidase por n-butilamina em meio livre de íons amônio

Micélios pré-crescidos como descrito no item 2.5 de Materiais e Métodos foram re-suspensos em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina e 0,2 g% de D-glucose. Nos tempos indicados, foram coletadas amostras para a determinação da massa micelial (●) e da atividade de amino oxidase (▲).

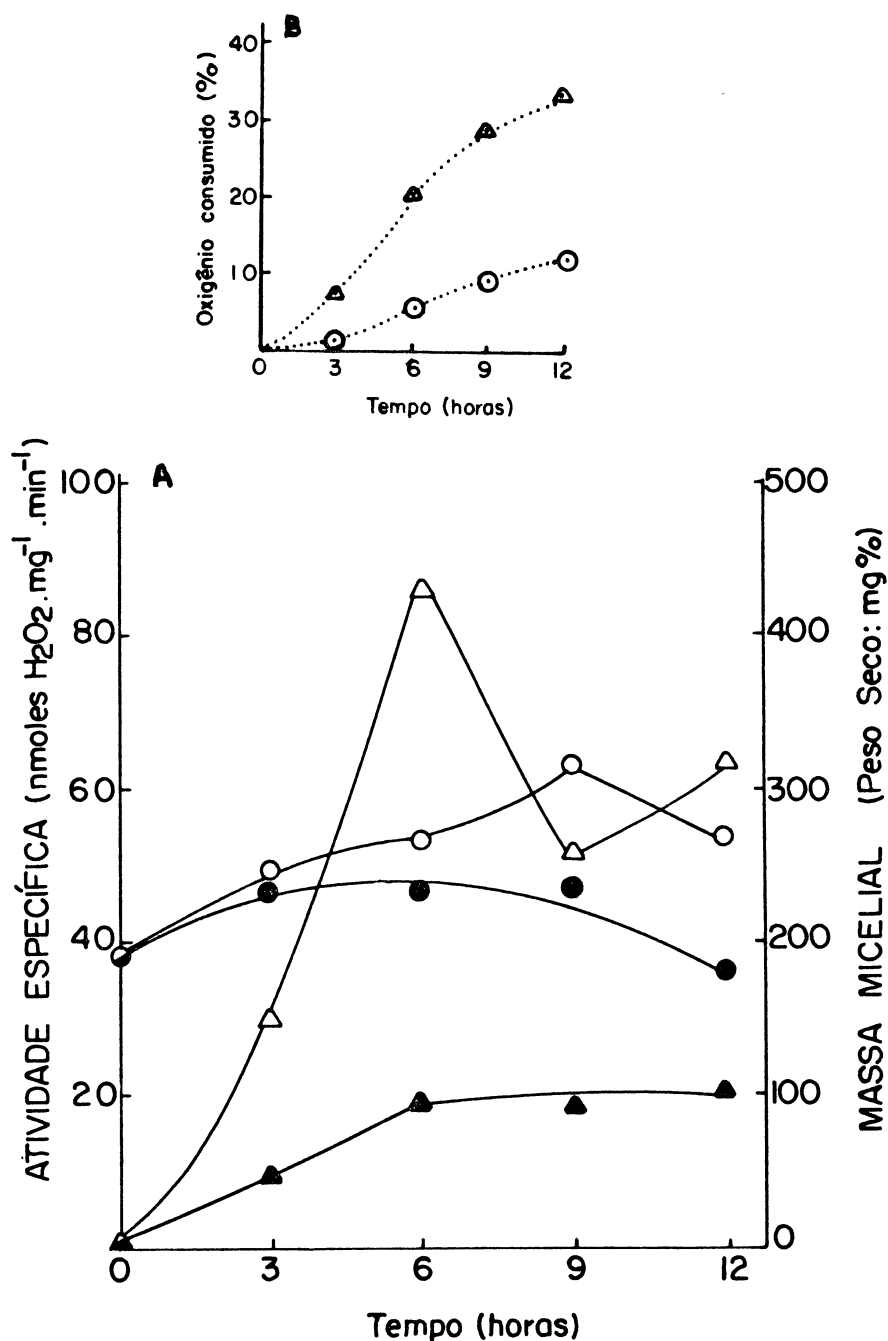


FIGURA 11 - Cinética de indução da amino oxidase em 20 % e 80 % de oxigênio

Micélios pré-crescidos como descrito no item 2.5 de Materiais e Métodos foram re-suspensos em meio C contendo 0,1 g% de n-butil-amina e 0,2 g% de D-glucose, e submetidos a 20 % de oxigênio (● ▲ ⊙) e a 80 % de oxigênio (○ △ △). Nos tempos indicados amostras foram coletadas para a determinação: (A) da variação da massa micelial (●○); da atividade enzimática (▲△); (B) do oxigênio consumido (⊙△).

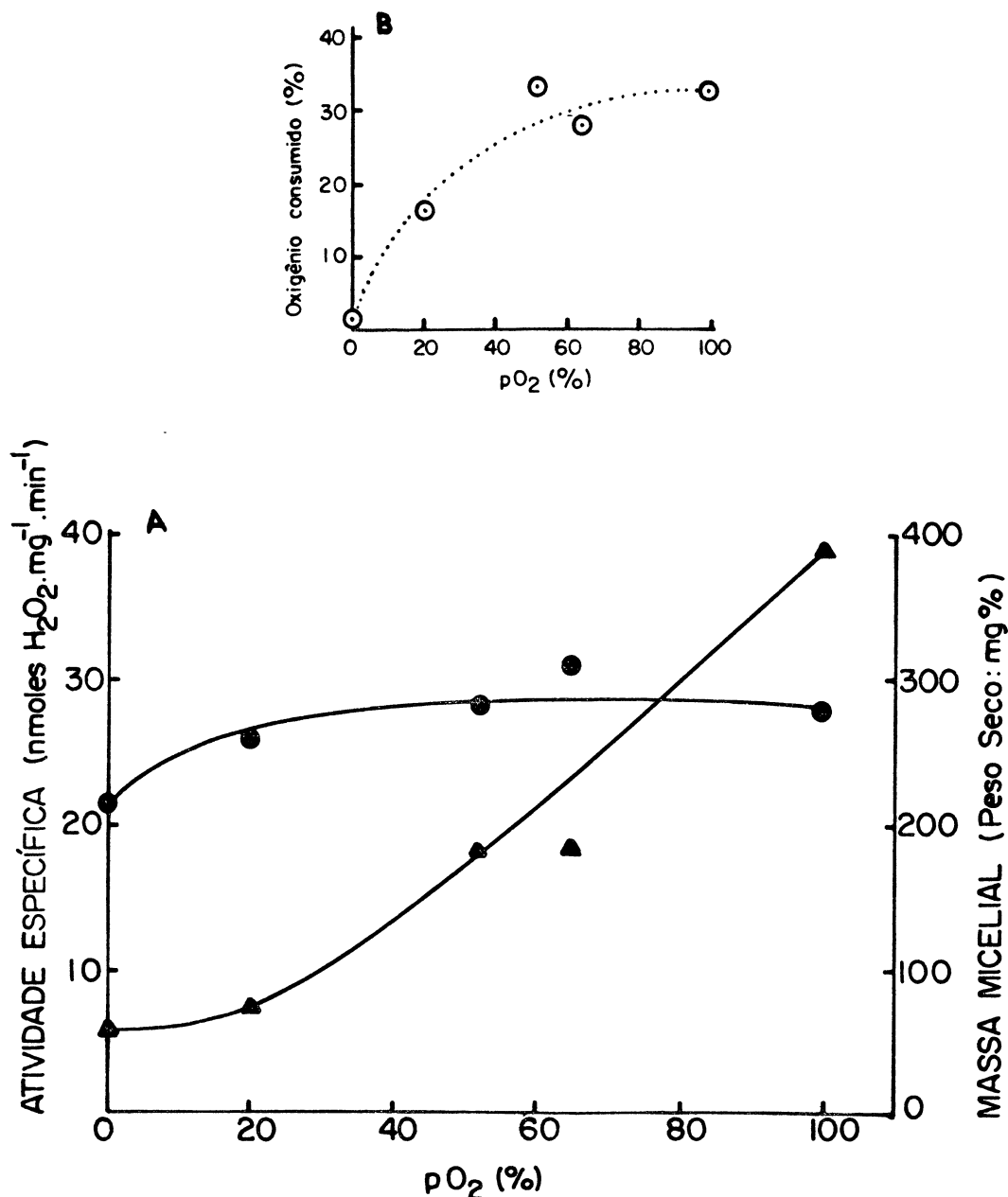


FIGURA 12 - Efeito da concentração do oxigênio sobre os níveis de amino oxidase em presença de íons amônio e n-butilamina em células pré-induzidas.

Micélios pré-crescidos como descrito do item 2.5 de Materiais e Métodos e que foram submetidos a pré-indução com 0,1 g% de n-butilamina em presença de 0,2 g% de D-glucose por 9 horas, foram colhidos e re-suspensos em meio B contendo 0,1 g% de n-butilamina e 0,2 g% de D-glucose e expostos a diferentes concentrações de oxigênio. Após 12 horas de experimento foram avaliadas: (A) atividade enzimática (▲), variação da massa micelial (●); (B) oxigênio consumido (⊙).

Atividade específica no tempo zero: 5,8 nmoles H₂O₂.mg⁻¹.min⁻¹.

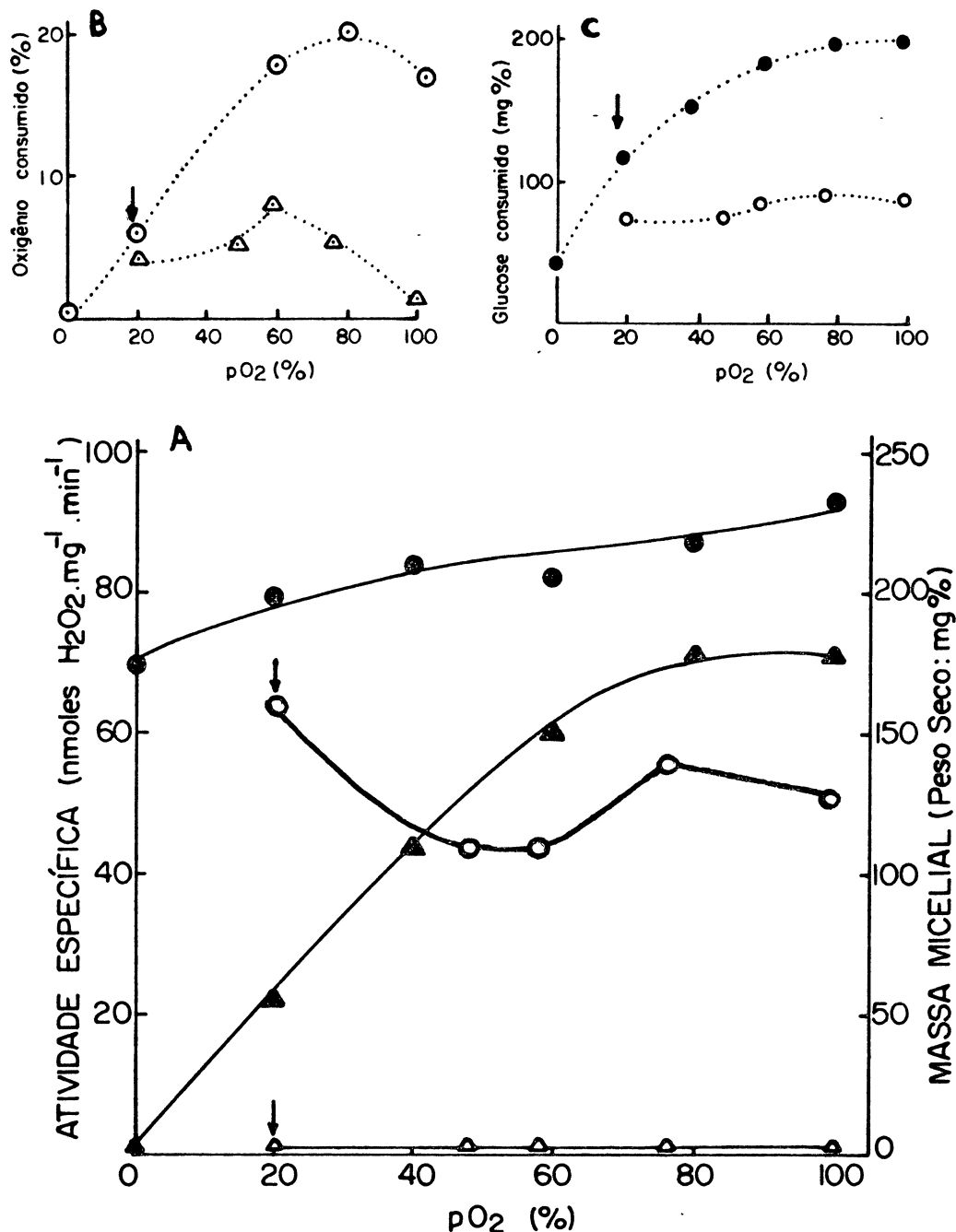


FIGURA 13 - Efeito da concentração do oxigênio sobre os níveis de amino oxidase em meio livre de íons amônio com n-butilamina na ausência e em presença de cicloheximida

Micélios pré-crescidos como descrito no item 2.5 de Materiais e Métodos, foram re-suspensos em meio C contendo 0,1 g% de n-butilamina e 0,2 g% de D-glucose, e expostos a diferentes concentrações de oxigênio (● ▲ ○ ●). A seta indica a adição de 2 mg% de cicloheximida no início do experimento (○ △ △ ○). Após 6 horas de experimento foram avaliados: (A) atividade enzimática(▲ △), a variação da massa micelial (● ○); (B) oxigênio consumido (○ △) e (C) D- glucose consumida (● ○).

4. DISCUSSÃO

A presença de amino oxidase foi demonstrada em micélio de Dactylium dendroides crescido em meio contendo diferentes teores de íons amônio. Com a finalidade de classificar a enzima foi estudado o efeito de inibidores sobre a sua atividade. A amino oxidase de D. dendroides sofreu inibição por dietilditiocarbamato, hidroxilamina e semicarbazida, não sendo sensível ao EDTA (tabela I). A enzima de D. dendroides apresentou a mesma sensibilidade frente a inibidores que a enzima de Aspergillus niger (64). Dos dados de inibição pode-se classificar a enzima em estudo como uma diamino oxidase (EC 1.4.3.6), já que apresentou sensibilidade a semicarbazida e hidroxilamina, pois as mono-amino oxidases não sofrem inibição por inibidores de grupos carbonílicos (9,34).

A sensibilidade da diamino oxidase a reagentes para grupos carbonílicos sugere a possibilidade de que o grupo carbonílico esteja presente no centro ativo da enzima. A inibição por dietilditiocarbamato, quelante específico para o cobre, sugere que este metal também esteja envolvido na atividade catalítica de enzima.

Os níveis de amino oxidase intracelular de Dactylium dendroides aumentaram durante a fase exponencial do crescimento em meio contendo íons amônio, mantendo-se constantes durante a fase estacionária do crescimento. A atividade enzimática foi

encontrada em níveis basais, da ordem de $0,3 \text{ nmoles H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ nestas condições (figura 1).

No meio de cultura contendo n-butilamina como fonte única de nitrogênio (figuras 3 e 4) o fungo apresentou tempo de geração maior do que nos meios contendo íons amônio e extrato de levedura (figuras 1 e 2), sugerindo que este meio contivesse fontes de nitrogênio mais eficientes do que a n-butilamina.

A formação da enzima se deu concomitantemente ao desenvolvimento do fungo em meio contendo n-butilamina como fonte única de nitrogênio, sendo que os níveis de enzima aumentaram em 186 vezes (figura 3), indicando que a amina provocou a indução da amino oxidase. Este fenômeno já havia sido registrado por YAMADA e colaboradores (61) em outros fungos. Entretanto, quando a n-butilamina foi empregada como fonte única de carbono e de nitrogênio observou-se indução a níveis mais altos (figura 4), podendo-se imaginar que a expressão da enzima estivesse sujeita a regulação por carbono e nitrogênio.

O estudo do emprego de fontes de carbono e energia mostrou que tanto a D-glucose como lactato e glicerol foram eficientes como fonte de carbono e energia para a indução da amino oxidase (tabela III). Além disso, a adição de concentrações crescentes de D-glucose ao meio de cultura em presença de n-butilamina não provocou variação significativa dos níveis da enzima (figura 6), sugerindo que não haja regulação da enzima por catabólitos do carbono, como ocorre em um grande número de enzimas catabólicas (17,19,26,37,41,42).

Quando os micélios pré-crescidos em meio contendo íons amônio foram transferidos para meio de cultura sem fonte de ni-

trogênio, não houve formação de amino oxidase em níveis maiores que os basais (tabela II), o que se esperaria caso houvesse desrepressão. Não foi também observado aumento dos níveis de nitrato redutase (15), nitrito redutase (20) e L-aminoácido oxidase (48) de Neurospora crassa na ausência de íons amônio.

A concentração de n-butilamina de 0,01 g% (1,37 mM) foi eficiente na indução da amino oxidase e um aumento de 10 vezes na concentração de amina provocou um aumento de apenas 1,52 vezes na atividade específica (tabela II), tendo sido observado efeito semelhante com a L-aminoácido oxidase de N. crassa (48).

A adição de n-butilamina a células em crescimento estacionário na presença de íons amônio, provocou aumento dos níveis da enzima, indicando que a indução da enzima ocorre mesmo em presença de íons amônio (figura 5).

A indução realizada em meio contendo íons amônio e extrato de levedura apresentou um período de latência de 6 horas (figura 9), enquanto que no meio contendo n-butilamina teve início logo após a adição do indutor (figura 10). O período de latência poderia ser explicado como o tempo necessário para que a concentração de íons amônio atingisse um valor suficientemente baixo para não provocar a repressão. Tendo em vista estes resultados poder-se-ia admitir que estivesse ocorrendo simultaneamente a liberação da repressão por íon amônio e indução por n-butilamina, a semelhança do que ocorre com várias enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio, como a amino oxidase de Aspergillus niger (61), nitrato redutase de Aspergillus nidulans (13,27), Ustilago maydis (32) e Neurospora crassa (15,44,45,49,

50,51), nitrito redutase de N. crassa (20), e L-aminoácido oxidase de N. crassa (12,48).

A adição de cicloheximida ao sistema impediu o aparecimento da atividade enzimática, sugerindo que ocorra síntese "de novo" da enzima (figura 9).

Quando o fungo foi crescido em meio de cultura em presença de sais de amônio e re-suspenso em meio contendo n-butilamina, ocorreu aumento dos níveis de amino oxidase (figura 10), que começaram a diminuir após 9 horas. Estes resultados sugerem que poderia estar havendo uma inativação da enzima, decorrente da diminuição da concentração de amina no meio de cultura, como foi registrado por YAMADA e colaboradores para a enzima de Aspergillus niger (61). A exaustão da fonte de nitrogênio poderia ser a causa responsável pela inativação da enzima, como foi observado com a nitrato redutase de Neurospora crassa (50).

Os níveis de amino oxidase diminuíram com o aumento da concentração de íons amônio no meio de cultura (figura 7), e mais marcadamente na presença de L-glutamina (figura 8). O fato da amino oxidase ser muito mais sensível à repressão por L-glutamina do que pelos íons amônio, estaria de acordo com a hipótese de MARZLUF (36), de que a L-glutamina seria o metabólito responsável pela repressão por catabólitos do nitrogênio. Como os íons amônio e a L-glutamina não provocaram inibição da atividade enzimática in vitro, acredita-se que a diminuição da atividade da enzima em presença de íons amônio ou L-glutamina pudesse ser resultante da interrupção da síntese seguida da perda de sua atividade, como foi descrito para a nitrato redutase de Ustilago maydis (32) e N. crassa (44,59).

Os níveis constantes de enzima em concentração de íons amônio superiores a 10 mM (figura 7) poderiam representar o estado de equilíbrio entre indução pela n-butilamina, repressão e/ou inativação da enzima pelos sais de amônio.

A síntese de amino oxidase em D. dendroides em presença de n-butilamina é afetada pela concentração de oxigênio na fase gasosa, seja na presença (figura 12) ou na ausência (figura 13) de íons amônio. Na presença de íons amônio o efeito do oxigênio foi retardado e ocorreu em menores níveis, sugerindo que os níveis de íon amônio devam diminuir a valores tais que possam provocar a liberação da repressão.

O fato de não haver síntese de amino oxidase além dos níveis basais no sistema contendo zero % de oxigênio e n-butilamina (figura 13) e no sistema contendo íon amônio, n-butilamina e zero % de oxigênio (figura 12), indica que não ocorreu síntese da enzima na ausência de oxigênio. Estes dados sugerem que a síntese da enzima seja dependente de oxigênio, tanto para o suprimento das necessidades energéticas do fungo, quanto como indutor da amino oxidase, a semelhança do proposto para as enzimas do sistema ligninolítico de Phanerochaete chrysosporium (5,18).

Como o consumo de oxigênio aumentou com o aumento da concentração de oxigênio na fase gasosa, poder-se-ia admitir que o aumento dos níveis da enzima fosse decorrente da melhoria nas condições fisiológicas do fungo, mas esta hipótese pode ser descartada quando se verifica que não houve variação significativa da massa micelial nestas condições (figuras 12 e 13).

A adição de cicloheximida ao sistema impediu o aparecimento da atividade enzimática, sugerindo que a enzima seja sin-

tetizada "de novo" durante a exposição ao oxigênio (figura 13). Como a adição da cicloheximida diminuiu o consumo de D-glucose e de oxigênio pelas células, poder-se-ia admitir que esta substância estivesse atuando em outros níveis do metabolismo celular, afetando o transporte de D-glucose e o consumo de oxigênio, e assim reduzindo o fornecimento de energia indispensável à síntese enzimática.

Os níveis de amino oxidase intracelular de Dactylium dendroides aumentaram 296 vezes quando a tensão de oxigênio na fase gasosa variou de zero a 100 %. O efeito do oxigênio sobre esta enzima é mais acentuado do que o verificado para a galactose oxidase intracelular e extracelular do mesmo microrganismo, onde se verificou um aumento de 10,4 e 39 vezes, respectivamente, quando a concentração do oxigênio na fase gasosa variou de zero a 100 %, sendo que a superóxido dismutase teve seus níveis aumentados em 2,4 vezes nas mesmas condições (43). É também superior aos níveis de superóxido dismutase em Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus que aumentaram em 6,5 vezes nas células em presença de 100 % de oxigênio em comparação com células em anaerobiose (23), sendo que em Streptococcus faecalis o aumento registrado foi de 16 vezes e em Escherichia coli B foi de 25 vezes (21). As enzimas que compõem o sistema ligninolítico de Phanerochaete chrysosporium tiveram seus níveis aumentados em 5 vezes quando a tensão de oxigênio variou de 0,2 a 0,8 atmosferas de oxigênio (5).

Dos dados obtidos é evidente que a semelhança do que ocorre com a galactose oxidase (43) os níveis de amino oxidase variaram em função da concentração de oxigênio. Como os estudos

envolveram a medida das atividades em extratos livres de células, e como a cicloheximida inibiu o metabolismo energético da célula, não se pode excluir a possibilidade de que o oxigênio estivesse afetando diferentes níveis de controle tais como transcrição, processamento e estabilidade dos RNAm, e a inativação das enzimas. Portanto será necessário aprofundar o estudo para que se possa explicar o papel do oxigênio na expressão das cobre-enzimas.

5. CONCLUSÕES

1. O fungo Dactylium dendroides possui uma amino oxidase inibida por reagentes para grupos carbonílicos.
2. Os níveis da amino oxidase aumentam quando n-butilamina é adicionada ao meio de cultura.
3. Em presença de n-butilamina os íons amônio e a L-glutamina afetam negativamente a expressão da amino oxidase.
4. A exposição dos micélios a tensões variáveis de oxigênio provoca um aumento nos níveis da amino oxidase.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADACHI, Osao & YAMADA, Hideaki. Amine oxidases of microorganisms. An Improved purification procedure and further properties of amine oxidase of Aspergillus niger. Agr. Biol. Chem., 33(12): 1707-1716, 1969.
2. ADACHI, Osao & YAMADA, Hideaki. Circular dichroism of amine oxidase from Aspergillus niger. J. Biochem., 65(4): 639-640, 1969.
3. AISAKA, Kazuo & TERADA, Osamu. Production of galactose oxidase by Gibberella fujikuroi. Agr. Biol. Chem., 45(10): 2311-2316, 1981.
4. BACHRACH, Uriel. Spermidine oxidase from Serratia marcescens. J. Biol. Chem., 237(11): 3443-3448, 1962.
5. BAR-LEV, S.S. & KIRK, T.K. Effects of molecular oxygen on lignin degradation by Phanerochaete chrysosporium. Biochem. Biophys. Res. Commun., 99(2): 373-378, 1981.
6. BEAMAN, Lovelle & BEAMAN, Blaine L. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. Ann. Rev. Microbiol., 38: 27-48, 1984.
7. BLASCHKO, H. & DUTHIE, Ruth. Substrate specificity of amine oxidases. Biochem. J., 39: 478-481, 1945.
8. BLASCHKO, H.; HOPE, D.B. Observations on the distribution of amine oxidase in invertebrates. Arch. Biochem. Biophys., 69: 10-15, 1957.

9. BLASCHKO, H. Amine oxidase. In: BOYER, Paul D.; LARDY, Henry; MYRBÄCK, Karl. The enzymes. 2ed. New York, Academic Press, 1963. v.8 p.337-351.
10. BULL, A.T. & BUSHELL, M.E. Environmental control of fungal growth. In: SMITH, J. & BERRY, B.R. The Filamentous fungi. London, Edward Arnold, 1976. v.2. p. 1-31.
11. BURKARD, W.P.; GEY, K.F.; PLETSCHER, A. Differentiation of monoamine oxidase and diamine oxidase. Biochem. Pharmacol., 11(3): 177-182, 1962.
12. CHAMBERS, John A.A.; GRIFFON, Sherri M.; MARZLUF, George A. Trans-nuclear action of the nit-2 regulatory gene product and study of two additional nitrogen control genes in Neurospora crassa. Current Genetics, 7: 51-56, 1983.
13. COVE, D.J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus Aspergillus nidulans. Biochim. Biophys. Acta, 113: 51-56, 1966.
14. DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. Biochem. J., 80: 547-551, 1961.
15. DANTZIG, Anne H.; ZUROWSKI, Wayne K.; BALL, Thomas M.; NASON, Alvin. Induction and repression of nitrate reductase in Neurospora crassa. J. Bacteriol., 133(2): 671-679, 1978.
16. EADY, R. R.; JARMAN, T. R.; LARGE, P. J. Microbial oxidation of amines. Biochem. J., 125: 449-459, 1971.

17. ENTIAN, Karl-Dieter & ZIMMERMANN, Friedrich K. New genes involved in carbon catabolite repression and derepression in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol., 151(3): 1123-1128, 1982.
18. FAISON, Brendlyn D. & KIRK, T. Kent. Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environm. Microbiol., 46(5): 1140-1145, 1983.
19. FRIEBE, Barbara & HOLLDORF, A. W. Control of extracellular β -1,3-glucanase activity in a basidiomycete species. J. Bacteriol., 122(3): 818-825, 1975.
20. GARRETT, Reginald H. The induction of nitrite reductase in Neurospora crassa. Biochim. Biophys. Acta, 264: 481-489, 1972.
21. GREGORY, Eugene & FRIDOVICH, Irwin. Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. J. Bacteriol., 114(2): 543-548, 1973.
22. GREGORY, Eugene M. & FRIDOVICH, Irwin. Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. J. Bacteriol., 114(3): 1193-1197, 1973.
23. GREGORY, Eugene M. & GOSCIN, Stephen A.; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote. J. Bacteriol., 117(2): 456-460, 1974.
24. HASSAN, H. Moustafa & FRIDOVICH, Irwin. Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in Escherichia coli. J. Bacteriol., 129(3): 1574-1583, 1977.

25. HAYWOOD, Geoffrey W.; LARGE, Peter J. Microbial oxidation of amines. Biochem. J., 199(1): 187-201, 1981.
26. HODGSON, David A. Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in Streptomyces coelicolor A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. J. Gen. Microbiol., 128(10): 2417-2430, 1982.
27. HYNES, M.J. Effects of ammonium, L-glutamate, and L-glutamine on nitrogen catabolism in Aspergillus nidulans. J. Bacteriol., 120(3): 1116-1123, 1974.
28. ISOBE, Kimiyasu; TANI, Yoshiki; YAMADA, Hideaki. Crystallization and characterization of polyamine oxidase from Penicillium chrysogenum. Agr. Biol. Chem., 44(11): 2651-2658, 1980.
29. ISOBE, Kimiyasu; TANI, Yoshiki; YAMADA, Hideaki. Differential determination procedure for putrescine, spermidine and spermine with polyamine oxidase from fungi and putrescine oxidase. Agric. Biol. Chem., 45(3): 727-733, 1981.
30. KEMMELMEIER, C. & ZANCAN, G.T. Studies on the taxonomy of a mold producing galactose oxidase II. Arq. Biol. Tecnol., 21: 75-85, 1978.
31. KUMAGAI, Hidehiko; KISHIMOTO, Noriaki; YAMADA, Hideaki. Subunit structure of amine oxidase from Aspergillus niger. Agr. Biol. Chem., 42(4): 893-894, 1978.
32. LEWIS, C.M. & FINCHAM, J.R.S. Regulation of nitrate reductase in the basidiomycete Ustilago maydis. J. Bacteriol., 103(1): 55-61, 1970.

33. LOWRY, O.R.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
34. MALMSTROM, B. G.; ANDRÉASSON, L. E.; REINHAMMAR, B.
Copper-containing oxidases and superoxide dismutase.
In: BOYER, Paul D. The enzymes. 3ed. New York,
Academic Press, 1975. v.12. p.507-579.
35. MARKUS, Z.; MILLER, G. & AVIGAD, G. Effect of culture
conditions on the production of D-galactose oxidase by
Dactylium dendroides. Appl. Microbiol., 13:686-693,
1965.
36. MARZLUF, George A. Regulation of nitrogen metabolism and
gene expression in fungi. Microbiol. Rev., 45(3):
437-461, 1981.
37. MICHELS, Corinne A. & ROMANOWSKI, Andrew. Pleiotropic
glucose repression-resistant mutation in Saccharomyces
carlesbergensis. J. Bacteriol., 143(2): 674-679, 1980.
38. MUROOKA, Yoshikatsu; DOI, Nobuyuki; HARADA, Tokuya.
Distribution of membrane-bound monoamine oxidase in
bacteria. Appl. Environm. Microbiol., 38(4): 565-569,
1979.
39. NATVIG, Donald D. Comparative biochemistry of oxygen
toxicity in lactic acid-forming aquatic fungi. Arch.
Microbiol., 132: 107-114, 1982.
40. OKAMURA, Haruki; MUROOKA, Yoshikatsu; HARADA, Tokuya.
Regulation of tyramine oxidase synthesis in Klebsiella
aerogenes. J. Bacteriol., 127(1): 24-31, 1976.
41. PRIGEN, Kenneth. Phenomenon of transient repression in
Escherichia coli. J. Bacteriol., 91(3): 1201-1209,
1966.

42. FAIGEN, Kenneth & WILLIAMS, Beverly. Catabolic repression and other control mechanisms in carbohydrate utilization. Adv. Microbiol. Physiology, 4: 251-324, 1970.
43. PEDROSA, Fabio O. & ZANCAN, Glaci T. Effect of oxygen on galactose oxidase synthesis and secretion in Dactylium dendroides. Experimental mycology, 10(2): 126-130, 1986.
44. PREMAKUMAR, Ramaswamy; SORGER, George J.; GOODEN, Dinsdale. Nitrogen metabolite repression of nitrate reductase in Neurospora crassa. J. Bacteriol., 137(3): 1119-1126, 1979.
45. PREMAKUMAR, Ramaswamy; SORGER, George J.; GOODEN, Dinsdale. Repression of nitrate reductase in Neurospora studied by using L-methionine-DL-sulfoximine and glutamine auxotroph gln-1b. J. Bacteriol., 143(1): 411-415, 1980.
46. ROULET, F. & ZELLER, E. A. Ueber die Diamin-oxydase der Smegmabazillen. Helv. Chim. Acta, 28: 1326-1354, 1945.
47. SATAKE, Kazuo, ANDO, Sohachi; FUJITA, Hisatoshi. Bacterial oxidation of some primary amines. J. Biochem., 40(4): 299-315, 1953.
48. SIKORA, Len & MARZLUF, George A. Regulation of L-amino acid oxidase and of D-aminoacid oxidase in Neurospora crassa. Mol. Gen. Genet, 186: 33-39, 1982.
49. SORGER, G.J. & DAVIES, J. Regulation of nitrate reductase of Neurospora at the level of transcription and translation. Biochem. J., 134: 673-685, 1973.

50. SORGER, George J.; DEBANNE, Maria Teresa; DAVIES, Jacqueline. Effect of nitrate on the synthesis and decay of nitrate reductase of Neurospora. Biochem. J., 140: 395-403, 1974.
51. SUBRAMANIAN, K.N.; PADMANABAN, G.; SARMA, P.S. The regulation of nitrate reductase and catalase by amino acids in Neurospora crassa. Biochim. Biophys. Acta, 151: 20-32, 1968.
52. SUZUKI, Haruo; OGURA, Yasuyuki; YAMADA, Hideaki. Stoichiometry of the reaction by amine oxidase from Aspergillus niger. J. Biochem., 69(6): 1065-1074, 1971.
53. SUZUKI, Haruo; OGURA, Yasuyuki; YAMADA, Hideaki. Kinetic studies on the amine oxidase reaction. J. Biochem., 72: 703-712, 1972.
54. SUZUKI, Haruo & OGURA, Yasuyuki. Mode of inhibition of the Aspergillus amine oxidase by 8-hydroxyquinoline. J. Biochem., 72: 833-839, 1972.
55. SUZUKI, Haruo; OGURA, Yasuyuki; YAMADA, Hideaki; ARIMA, Kei. Studies on sulfhydryl groups of Aspergillus niger amine oxidase. Biochim. Biophys Acta, 403: 23-31, 1975.
56. TORAYA, Tetsuo; FUJIMURA, Motoki; IKEDA, Seiichiro; FUKUI, Saburo; YAMADA, Hideaki; KUMAGAI, Hidehiko. Affinity chromatography of amine oxidase from Aspergillus niger. Biochim. Biophys. Acta, 420: 316-322, 1976.
57. TSURUSHIIN, Shigeko; HIRAMATSU, Akira; INAMASU, Melvin; YASUNOBU, Kerry T. The Essential histidine residues of bovine plasma amine oxidase. Biochim. Biophys. Acta, 400: 451-60, 1975.

58. VOGEL, A. I. Analysis of hydrogen peroxide. In: Quantitative Inorganic Analysis. 2ed. London, Richard Clay and Company, 1951. p.283.
59. WALLS, Sharon; SORGER, George, J.; GOODEN, Dinsdale; KLEIN, Virginia. The regulation of the decay of nitrate reductase. Biochim. Biophys. Acta, 540: 24-32, 1978.
60. YAMADA, Hideaki & YASUNOBU, Kerry. Monoamine oxidase. II. Copper, one of the prosthetic groups of plasma monoamine oxidase. J. Biol. Chem., 237(10): 3077-3082, 1962.
61. YAMADA, Hideaki; ADACHI, Osao; OGATA, Koichi. Amine oxidases of microorganisms. Part I. Formation of amine oxidase by fungi. Agr. Biol. Chem., 29(2): 117-123, 1965.
62. YAMADA, Hideaki; ADACHI, Osao; OGATA, Koichi. Amine oxidases of microorganisms. Part II. Purification and crystallization of amine oxidase of Aspergillus niger. Agr. Biol. Chem., 29(7): 649-654, 1965.
63. YAMADA, Hideaki; ADACHI, Osao; OGATA, Koichi. Amine oxidases of microorganisms. Part III. Properties of amine oxidase of Aspergillus niger. Agr. Biol. Chem., 29(9): 864-869, 1965.
64. YAMADA, Hideaki; ADACHI, Osao; OGATA, Koichi. Amine oxidases of microorganisms. Part IV. Further properties of amine oxidase of Aspergillus niger. Agr. Biol. Chem., 29(10): 912-917, 1965.
65. YAMADA, Hideaki; ISOBE, Kimiyasu; TANI, Yoshiki. Oxidation of polyamines by fungal enzymes. Agr. Biol. Chem., 44(10): 2469-2476, 1980.

66. ZELLER, E. A.; STERN, R.; WENK, M. Ueber die Diamin-Diamin-oxydase-Reaktion. Helv. Chim. Acta, 23(1): 3-17, 1940.
67. ZELLER, E. Albert. Oxidation of amines. In: SUMMER, James B. & MYRBÄCK, Karl. The enzymes: chemistry and mechanism of action. New York, Academic Press, 1951. v.2. p.536-558.
68. ZELLER, E. Albert. Diamine oxidases. In: BOYER, Paul D.; LARDY, Henry; MYRBÄCK, Karl. The enzymes. 2ed. New York, Academic Press, 1963. v.8. p.313-351.