

T-B10
YAM

CRISTINA YASSUKO YAMANAKA

ESTUDO DAS PROPRIEDADES E INDUÇÃO DA TREALASE DE
"SCOPULARIOPSIS BREVICAULIS"

Tese de mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica
da Universidade Federal do
Paraná.

CURITIBA

1984

Aos meus pais,
com carinho.

Tese orientada pela professora
Dr^a. Kazuko Hishida do Nascimento.

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dr^a. Kazuko H. do Nascimento pela orientação, dedicação e apoio demonstrados durante toda etapa de elaboração do trabalho e principalmente, pela sua amizade.

À Dr^a. Glaci T. Zancan, à Dr^a. Liu Un Rigo e ao Dr. Shigehiro Funayama pela correção científica e sugestões recebidas.

Ao prof. Dr. Aguinaldo J. do Nascimento pelo trabalho fotográfico, manifestação de apoio e amizade e pela revisão gramatical.

Ao prof. Bonifácio J. Gallotti, pela confiança que sempre depositou em mim e pela revisão gramatical da tese.

Ao prof. Dr. Annibal P. Campello, pelo empréstimo da máquina de escrever.

À Ruth L. dos Santos pela revisão das referências bibliográficas.

À dona Idalila B. Passamai pela calorosa acolhida em sua casa, durante a fase de redação da tese.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica pela sua valiosa contribuição na confecção desse trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos no período de março/81 a agosto/83.

Aos professores, funcionários e colegas do departamento de Bioquímica da UFPr, que prestaram colaboração.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	viii
Lista de figuras	ix
Resumo	xi
Abreviaturas	xii
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Trealose	1
1.1.1. Funções da trealose	1
1.1.2. Biossíntese da trealose	2
1.2. Trealase	3
1.2.1. Distribuição da trealase em animais e vegetais	4
1.2.2. Distribuição da trealase em microrganismos .	5
1.2.3. Funções da trealase	5
1.2.4. Trealase e trealose no processo de ger- minação de esporos	6
1.2.5. Localização celular da trealase e da trealose	7
1.2.6. Regulação da trealase	8
1.2.7. Inibidores da trealase	10
1.2.8. Outras vias de degradação da trealose ..	10
1.3. Estudos relacionados com o fungo <i>Scopulariopsis</i> <i>brevicaulis</i>	11
1.4. Objetivo	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. Reagentes	14
2.2. Microrganismo	14

2.3.	Meios de cultura	15
2.4.	Esporulação e conservação do microrganismo	15
2.5.	Obtenção de esporos	16
2.6.	Crescimento do fungo	16
2.6.1.	Efeito da fonte de carbono no crescimen- to e produção da trealase e maltase	16
2.7.	Obtenção da fonte de enzima	16
2.8.	Determinação do peso seco	17
2.9.	Determinação da atividade enzimática	17
2.10.	Determinação de proteínas	18
2.11.	Purificação da trealase	18
2.11.1.	Precipitação com sulfato de protamina	18
2.11.2.	Filtração em gel Sephadex G-100	19
2.11.3.	Cromatografia de troca iônica em DEAE- celulose I	19
2.11.4.	Cromatografia em DEAE-celulose II	20
2.12.	Eletroforese em gel de poliacrilamida	20
2.12.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.	20
2.13.	Determinação do peso molecular	21
2.14.	Determinação do ponto isoelétrico	21
2.15.	Especificidade da enzima	22
2.16.	Efeito do tempo de incubação e concentração de proteína na atividade da enzima	23
2.17.	Influência do pH na a atividade e estabilidade da enzima.	23
2.18.	Influência da temperatura na atividade e esta- bilidade da enzima	23
2.19.	Inativação térmica da trealase a 55°C	24
2.20.	Efeito da concentração do substrato	24
2.21.	Efeito dos cátions divalentes e outros compostos na atividade trealásica	24
2.22.	Efeito da glucose e amido na produção da trea- lase extracelular	25

2.23. Indução da trealase pelo amido ou maltose	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1. Efeito da fonte de carbono sobre a atividade da trealase e maltase	27
3.2. Efeito da concentração de amido na produção da trealase pelo fungo <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	29
3.3. Efeito de microelementos na produção da trealase	30
3.4. Purificação da trealase intracelular	30
3.5. Mobilidade eletroforética da trealase	32
3.6. Verificação do caráter glicosídico da trealase	33
3.7. Determinação do peso molecular	33
3.8. Determinação do ponto isoeletrico da trealase	34
3.9. Especificidade da trealase	35
3.10. Estequiometria da reação	35
3.11. Efeito da concentração de proteína e tempo de incubação na atividade enzimática	36
3.12. Efeito do pH na atividade e estabilidade da trealase intracelular	36
3.13. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da trealase	37
3.14. Determinação da energia de ativação	39
3.15. Efeito da concentração de substrato	39
3.16. Efeito dos cátions e outros compostos sobre a trealase	40
3.17. Efeito da glucose e amido na produção da trealase extracelular	43
3.18. Efeito da glucose e cicloheximida na indução da trealase	44
4. CONCLUSÕES	78
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE TABELAS

I	Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento do fungo <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> e a produção da trealase e maltase.....	49
II	Tabela de purificação da trealase micelial de <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	50
III	Especificidade da enzima.....	51
IV	Estequiometria da reação.....	52
V	Efeito dos cátions e outros compostos sobre a atividade trealásica.....	53

LISTA DE FIGURAS

1	Efeito da concentração de amido na produção da trealase pelo <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	54
2	Perfil de eluição da trealase na filtração em gel Sephadex G-100	55
3	Perfil de eluição da trealase em cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose I	56
4	Perfil de eluição da trealase em DEAE-celulose II ..	57
5	Cromatografia em DEAE-celulose - Eluição da trealase por etapas com concentração crescente de NaCl	58
6	Eletroforese em gel de poliacrilamida	59
7	Diagrama da eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção de glicoproteínas	60
8	Determinação do peso molecular da trealase intracelular de <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	61
9	Determinação do ponto isoelétrico da trealase ..	62
10	Efeito do tempo de incubação e concentração de proteína sobre a atividade trealásica	63
11	Efeito do pH na atividade e estabilidade da trealase	64
12	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da trealase	65
13	Inativação térmica da trealase	66
14	Determinação da energia de ativação da reação de hidrólise da trealose	67

15	Efeito da concentração do substrato na atividade da trealase	68
16	Inibição da trealase do fungo <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	69
17	Efeito da glucose, amido e cicloheximida no consumo de açúcar e crescimento do fungo previamente crescido em glucose	70
18	Efeito do amido, glucose e cicloheximida na produção da trealase extracelular em fungo previamente crescido em glucose	71
19	Efeito da glucose, amido e cicloheximida no consumo de açúcar e crescimento do fungo em microrganismo previamente crescido em amido	72
20	Efeito da glucose, amido e cicloheximida na produção da trealase extracelular em fungo previamente crescido em amido	73
21	Efeito da glucose e cicloheximida sobre o consumo de açúcar e crescimento durante a indução da trealase pelo amido em <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> ...	74
22	Indução da trealase pelo amido e efeito da glucose e cicloheximida sobre a produção da enzima ..	75
23	Efeito da glucose e cicloheximida sobre o consumo de açúcar e crescimento do fungo durante a indução da trealase pela maltose	76
24	Efeito da maltose, glucose e cicloheximida na produção da trealase	77

RESUMO

A trealase micelial de *Scopulariopsis brevicaulis* foi purificada 362 vezes com 51% de rendimento. A enzima mostrou ser altamente específica para a trealose com K_m de 0,48 mM. A atividade catalítica máxima foi observada pela incubação da enzima com a trealose em pH 6,0 - 6,2 a 45°C e apresentou energia de ativação de 12 kcal/mol. Trata-se de uma glicoproteína tetramérica com peso molecular estimado em 430.000. A enzima apresenta natureza acídica com pI em torno de 2,9. Constatou-se inibição do tipo competitiva pelo Tris ($K_i = 71$ mM) e PCMB ($K_i = 0,11$ mM) e não competitiva pelo Hg^{++} ($K_i = 0,016$ mM). Este fungo sintetiza grande quantidade de trealase em baixas concentrações de amido ou maltose. A síntese da trealase sofre o fenômeno da repressão pela glucose. Experimentos efetuados com a cicloheximida, um antibiótico conhecido por inibir a síntese protéica, indicaram que a produção da trealase em presença de amido ou maltose é decorrente da síntese "de novo". A trealase micelial possivelmente é a mesma daquela encontrada no meio de cultura, por apresentarem propriedades semelhantes.

ABREVIATURAS

ABF	- Azul de bromo fenol
ADPG	- Adenosina-5'-difosfato-D-glucose
AMPc	- Adenosina-3',5'-fosfato cíclico
ATP	- Adenosina-5'-trifosfato
CDPG	- Citidina-5'-difosfato-D-glucose
CMC	- Carboximetilcelulose sódica
DEAE	- Dietilaminoetano
EDTA	- Etilenodiamino tetracetato
GDPG	- Guanosina-5'-difosfato-D-glucose
GOP	- Glucose-oxidase- Peroxidase
PCMB	- p-Cloro-mercuribenzoato de sódio
PNPG	- p-Nitrofenil- α -D-glucosídeo
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
rpm	- Rotações por minuto
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
TDPG	- Timidina-5'-difosfato-D-glucose
UDPG	- Uridina-5'-difosfato-D-glucose

1. INTRODUÇÃO

1.1. TREALOSE.

A α,α -trealose é um dissacarídeo não redutor composto por duas unidades de glucose unidas por ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow1)$, isto é, o carbono anomérico de uma molécula de glucose está ligada à hidroxila do carbono anomérico da outra. Este açúcar se encontra largamente distribuído na natureza, particularmente nos fungos, leveduras, bactérias, plantas e invertebrados (7, 31), constituindo ainda a maior concentração de carboidratos no sangue de insetos (61).

Em microrganismos, têm sido relatados valores muito oscilantes para os teores de trealose por peso seco de célula. Em *Saccharomyces cerevisiae* ocorrem variações de 1 a 23%, dependendo das condições de cultivo e estágio do ciclo celular (63). Em diferentes espécies do gênero *Candida* a variação é de 1 a 6% (1).

Em fungos as concentrações desse dissacarídeo variam de 1,5 a 35%, sendo 1,5% em conídios de *Aspergillus oryzae* (57) e 30 a 35% em esporos de *Phycomyces blakesleeanus* (110, 114). Valores intermediários de 5% foram observados em esporos de *Dictyostelium discoideum* (15) e 15% em *Neurospora crassa* (54).

1.1.1. FUNÇÕES DA TREALOSE.

Por se tratar de um açúcar de ocorrência generalizada, várias funções lhe é atribuída:

- a) substância de reserva em plantas (98), insetos (61) e fungos e leveduras (14, 50, 57, 63, 76, 87-88, 108);
- b) fonte de energia para (i) divisão celular de leveduras (85), (ii) crescimento de *Bacillus popilliae* (6) e do esporozoário *Nosema apis* (112), (iii) germinação de leveduras (89) e esporos de *Streptomyces hygroscopicus* (53), *Dictyostelium discoideum* (16) e *Neurospora crassa* (50), (iv) vôo dos insetos (75);
- c) osmoregulação, desempenhando um papel como agente protetor na manutenção de estrutura das macromoléculas e do citoplasma no estado de "stress" em *Saccharomyces cerevisiae* (63), bem como da membrana plasmática durante a perda de água (anidrobiose) (26).

1.1.2. BIOSÍNTESE DA TREALOSE.

A biossíntese da trealose ocorre geralmente pela transferência de D-glucose da uridina 5'-di-fosfato-glucose para D-glucose-6-fosfato, catalisada pela trealose -6-fosfato sintase. O produto formado sofre ação posterior de uma fosfatase, dando origem a trealose pela remoção do grupamento fosfato, como foi descrito por CABIB & LELOIR em 1958 (11) para leveduras.

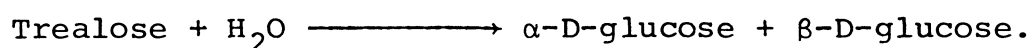
Excelentes revisões foram feitas por BIRCH (7), ELBEIN (31) e PANEK (88), onde são relatados estudos das enzimas envolvidas na biossíntese da trealose em leveduras de panificação, insetos e outros invertebrados. ELBEIN (31) menciona a variação da síntese da trealose durante a diferenciação morfológica de *Dictyostelium discoideum*. Foram descritas a utilização de outros ésteres de nucleotídeos fosfatados como doador de D-glucosila, tais como, GDP-D-glucose para *Streptomyces hygroscopicus* (52) e *Saccharomyces cerevisiae* (83) ou ADPG, CDPG e TDPG além de UDPG e GDPG em *Mycobacterium smegmatis* (31), porém, neste último caso, há diferença na eficiência entre os doadores de glucosila.

Outro mecanismo de síntese da trealose, independente da trealose-6-fosfato sintase, foi sugerido por OPERTI et al. (83) em 1982, ao estudar uma mutante de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente na atividade da trealose-6-fosfato sintase, portanto, incapaz de acumular a trealose durante o crescimento em meio contendo glucose ou galactose, ou em condições não proliferantes em presença de glucose. Esta cepa, no entanto, consegue acumular a trealose quando cultivada em meio contendo maltose como fonte de carbono. Isto demonstra que o acúmulo de trealose é regulado pelo produto do gene que governa a fermentação da maltose em leveduras. Tal afirmação foi comprovada pela introdução de um gene MAL constitutivo (capaz de fermentar a maltose) em cepa sst1 (trealose-6-fosfato sintase inativa). Isto resultou em cepa capaz de acumular trealose durante o crescimento em glucose, mas, não restaurou a capacidade de converter a glucose em trealose nas condições não proliferantes.

Em sua revisão, PANEK (88) mencionou que a pesquisa para isoenzimas de trealose-6-fosfato sintase, utilizando GDPG ou ADPG como doador de glucosila, foi negativa. Sugeriu então, uma possível reação do tipo descrita por MARECHAL & BELOCOPITOW (73) para *Euglena gracilis*, que pode catalisar a síntese da trealose no sentido reverso da reação fosforolítica. A síntese da trealose ocorre pela reação de α -D-glucose e β -D-glucose-1-fosfato.

1.2. TREALASE.

A etapa inicial do metabolismo da trealose depende da sua hidrólise a duas moléculas de glucose, pela reação catalisada pela enzima trealase, como segue:

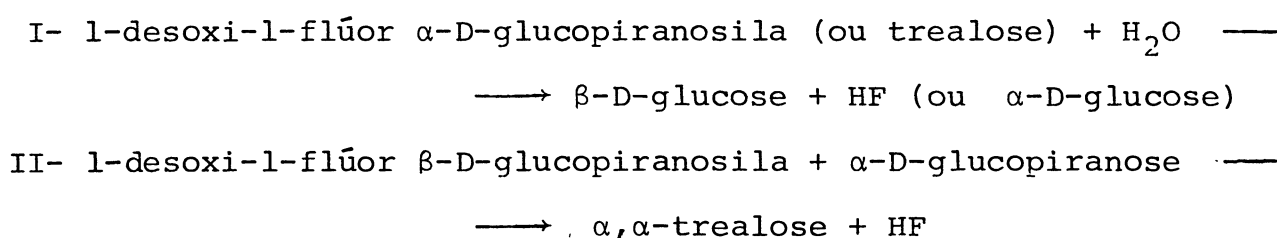


A análise cromatográfica dos produtos da reação da trealase renal de porco resultou em duas moléculas de α -D-glucose (67).

No entanto, com a trealase de *Sarcophaga barbata* foi verificada a inversão parcial de configuração, ou seja, ocorre a liberação de quantidade equimolecular de α -D-glucose e β -D-glucose (24). Resultado idêntico foi descrito com a enzima de levedura (51).

Embora a trealase seja conhecida como uma enzima estritamente específica para a hidrólise da trealose, HEHRE et al. (51), em 1982, relataram que a trealase isolada do córtex renal de coelho ou de *Candida tropicalis* parcialmente purificada pode hidrolisar 1-desoxi-1-flúor α -D-glucopiranosila ou 1-desoxi-1-flúor β -D-glucopiranosila, bem como catalisar a transferência do grupo glicosila de 1-desoxi-1-flúor β -D-glucopiranosila para o acceptor α -D-glucopiranosose, formando α,α -trealose como um intermediário que é rapidamente hidrolisado. O sítio ativo, responsável pela hidrólise desses substratos, parece ser o mesmo da trealose, uma vez que eles inibem a enzima competitivamente.

Assim, a trealase pode catalisar as duas reações:



1.2.1. DISTRIBUIÇÃO DA TREALASE EM ANIMAIS E VEGETAIS.

Os primeiros trabalhos com a trealase foram relatados por BOURQUELOT (10). Esta enzima hidrolítica tem sido isolada de diversos organismos, sendo caracterizada e purificada. Nos insetos, foi detectada no sistema circulatório (20, 38), nos músculos (40, 100), no intestino (4, 100) e em homogeneizados (21, 61, 75). Em mamíferos foram realizados estudos com as enzimas intestinais em ratos (79, 101), nos rins de camundongos (99, 106), homens (29, 99), porcos, macacos, ratos, gatos, cabras, etc. (99). É encontrada também em protozoários (112), plantas (98) e outros invertebrados (68).

1.2.2. DISTRIBUIÇÃO DA TREALASE EM MICRORGANISMOS.

A trealase é encontrada em grande número de microrganismos, dentre eles: *Aspergillus oryzae* (57), *Dictyostelium discoideum* (15, 65), *Neurospora crassa* (48, 50, 55, 77), *Neurospora tetrasperma* (49), *Pullularia pullulans* (14, 76), *Phycomyces blakesleeanus* (108, 110), *Saccharomyces cerevisiae* (51, 63, 64, 86, 115, 122), *Picchia pastoris* (107), *Schizosaccharomyces pombe* (58), *Candida tropicalis* (71), *Mycobacterium smegmatis* (91), *Streptomyces hygroscopicus* (52, 91), *Pseudomonas fluorescens* (44), *Humicola lanuginosa* (94), *Trichoderma reesei* (117) e *Sclerotinia sclerotiorum* (119).

1.2.3. FUNÇÕES DA TREALASE.

Diversas funções para a trealase foram descritas:

- a) a trealase exerce o principal papel no metabolismo da trealose (3);
- b) desempenha uma função muito importante no crescimento e formação de esclerócios em *Sclerotinia sclerotiorum* (119);
- c) desempenha função na germinação de *Neurospora crassa* (55), *Dictyostelium discoideum* (16) e *Phycomyces blakesleeanus* (108);
- d) a sua atividade é requerida para a mobilização da trealose armazenada em grande quantidade nas folhas de *Selaginella martensii* (98);
- e) promove a digestão da trealose ingerida, quando está presente em organismos que não acumulam tal substrato (31);
- f) participa do transporte de carboidratos, sugestão esta devida a sua presença na fração particulada das folhas de *Selaginella martensii* (98) ou ligada à membrana dos rins de coelho (99). Porém, MALATHI & CRANE (72) declararam que a trealase não deve estar envolvida no mecanismo de transporte de açúcares no intestino de

roedores devido a ausência de inibição pela florizina;
g) pode ser usada como instrumento para a determinação analítica da trealose (3, 38).

1.2.4. TREALASE E TREALOSE NO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS.

Estudos preliminares relacionados com a utilização da trealose no processo de ativação e germinação de esporos foram realizados em *Neurospora crassa* em 1964, onde foi observado um aumento de 4 vezes na atividade trealásica na germinação dos ascosporos (55).

Nos micélios vegetativos de cepas de *Neurospora crassa* altamente conidiantes, a atividade trealásica aumentou rapidamente e o acúmulo do seu substrato é reduzido com o início da germinação. No entanto, em conídios recém-formados, grande quantidade de trealose e trealase são encontradas (47).

CHAN & COTTER (19), estudaram a influência dos agentes utilizados para a ativação dos esporos de *Dictyostelium discoideum* e observaram que a mudança quantitativa e temporária da trealase dependia do tratamento usado para a sua ativação, sendo o choque térmico o mais eficiente.

CECCARINI (16), analisou a relação entre a trealase e trealose durante o crescimento e diferenciação celular de *Dictyostelium discoideum* e verificou que a enzima aparece durante a germinação e desaparece na agregação, sendo liberada ao meio de cultura.

VAN ASSCHE & CARLIER(111) reportaram que nos esporos dormentes de *Phycomyces blakesleeanus*, a trealase ocorre em forma de baixa atividade e que após a quebra de dormência provocada pelo choque térmico, surge uma forma ativa. Essas enzimas diferem entre si pela termoestabilidade e sensibilidade à inibição pelo ATP,

sendo a trealase menos ativa mais suscetível a esse efeito inibitório.

THEVELEIN et al. (108), utilizando os esporos deste mesmo fungo ativados pelo choque térmico, observaram que, no estágio inicial da germinação, ocorre o desdobramento da trealose mesmo sem a concomitante ativação da trealase. No entanto, no estágio subsequente há rápida ativação da enzima quando os esporos são colocados no meio de germinação e este aumento de atividade não é decorrente da síntese protéica, uma vez que não é inibida pela cicloheximida.

Em esporos dormentes de *Picchia pastoris* (107), a trealase encontra-se inibida pelo ATP nas concentrações fisiológicas, ocorrendo, como consequência, pouca mobilização da trealose. Nos esporos germinantes, porém, ocorre o oposto. A alta atividade da enzima e a baixa inibição parecem ser responsáveis pela quebra de dormência e rápido desdobramento da trealose.

O aumento da atividade trealásica durante a esporulação e a sua ausência nas células vegetativas, bem como a capacidade de acumular a trealose no meio isento de fonte de nitrogênio, foram observados somente em cepas esporulantes de *Schizosaccharomyces pombe*. No entanto, os autores sugeriram a possibilidade de que este acúmulo de trealose e a indução da atividade trealásica durante a esporulação, sejam etapas preparatórias para a germinação e não necessariamente um pré-requisito para a esporulação (58).

1.2.5. LOCALIZAÇÃO CELULAR DA TREALASE E DA TREALOSE.

A trealose é encontrada em grande quantidade como carboidrato de reserva em leveduras e esporos de fungos que normalmente apresentam atividade trealásica. Este fato sugere que a enzima e o substrato devam estar separados intracelularmente em compartimentos distintos e que durante os processos de ativação há

liberação destes componentes (3, 50, 55, 110).

A presença da trealase na fração solúvel e da trealose ligada à fração particulada dos protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* foi descrita por SOUZA & PANEK (104). Discordando destes resultados, KELLER et al. (63), em 1982, verificaram a localização vacuolar da trealase, enquanto que a trealose foi encontrada no citosol deste mesmo microrganismo. Estes autores atribuíram esta discrepância ao método empregado para o rompimento dos protoplastos. Assim, um tratamento suave deixaria os vacúolos intactos sedimentando consigo o seu conteúdo. Por outro lado, um método mais drástico poderia rompê-los liberando a enzima. No entanto, estes autores não conseguiram explicar a presença da trealose na fração particulada.

No mesmo ano, WIEMKEN & SCHELLENBERG (122) confirmaram a localização da trealase ativa nos vacúolos e uma forma de trealase zimogênio foi encontrada no citosol.

Em 1981, INOUE & SHIMODA relataram a presença de trealase ativa na parede celular dos esporos e trealose na fração citoplasmática em *Schizosaccharomyces pombe* (58).

Nos ascosporos dormentes de *Neurospora crassa*, a trealose é encontrada no citoplasma, enquanto que a trealase está possivelmente associada à parede celular, sendo assim protegida contra o aquecimento, necessário para a ativação (22, 50, 55).

A trealase de *Streptomyces hygroscopicus* (91), de micélios de *Neurospora crassa* (22, 54) e de *Aureobasidium pullulans* (14) tem sido encontradas na fração solúvel e (ou) ligada à parede celular.

1.2.6. REGULAÇÃO DA TREALASE.

O mecanismo de regulação da trealase parece envolver um processo de fosforilação e desfosforilação da enzima em um sistema

dependente de AMP cíclico (84, 114).

A primeira referência sobre o envolvimento deste nucleotídeo cíclico na ativação da trealase foi observado por VAN DER PLAAT & VAN SOLINGEN (113), em 1974, quando verificaram que a trealose era rapidamente desdobrada na fase lag que antecede o crescimento de leveduras. Nesta fase, a atividade trealásica era aumentada juntamente com a concentração de AMPc, sugerindo que o nível de trealose em leveduras é um processo controlado pela trealase e AMPc e que requer ATP e Mg^{++} . No ano seguinte, os mesmos autores (115) purificaram parcialmente a trealase "críptica" (inativa) e uma proteína ativante. Supõe-se que esta seja uma proteína quinase que perde a dependência pelo AMPc durante a purificação, talvez, em decorrência da perda da subunidade regulatória.

Com base no conhecimento da localização vacuolar (63) da trealase ativa em *Saccharomyces cerevisiae*, WIEMKEN & SCHELLENBERG (122), mostraram, em 1982, que a trealase "críptica" (zimogênio) era citosólica e que em presença de nucleotídeo cíclico era ativada pela fosforilação dependente de AMPc. Sugere-se então, que esta transformação pode iniciar um processo de transferência da trealase ativa do citosol para os vacúolos.

Recentemente (1983), ORTIZ et al. (84), deram prosseguimento aos estudos de ativação da trealase utilizando várias cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Em extrato de cepa de *Saccharomyces cerevisiae* S2886 (normal) foi encontrado uma proteína quinase dependente de AMPc que tem a capacidade de catalisar a incorporação de γ fosfato marcado do ATP para a trealase "críptica". Esta proteína quinase não tem efeito sobre a trealase ativa em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes, na capacidade de acumular trealose e glicogênio. Isto sugere que as mutantes apresentam uma proteína quinase anormalmente ativa por perda da sua dependência pelo AMPc, mantendo a trealase e a glicogênio sintase na forma fosforilada. A trealose não é acumulada em presença da forma

mais ativa da enzima responsável pela sua degradação, enquanto que a síntese do glicogênio é prejudicada pela baixa atividade da glicogênio sintase.

UNO et al. (109) demonstraram que a regulação da interconversão da forma ativa e inativa da trealase é resultante do mecanismo de fosforilação e desfosforilação. Esses autores mostraram que a trealase é um dos substratos da proteína quinase dependente de AMPc, portanto, a fosforilação é um processo de ativação da enzima. Além disso, a incubação da trealase previamente ativada em presença de fosfatase alcalina de origem bacteriana apresentou redução da atividade trealásica, indicando que a trealase fosforilada foi inativada pela desfosforilação.

1.2.7. INIBIDORES DA TREALASE.

A presença de inibidores da atividade trealásica tem sido descrita no sistema circulatório de *Panstrongylus megistus* (20), *Triatoma vitticeps* (12) e *Phormia regina* (39). Nos microrganismos, a existência de inibidores da trealase tem sido mencionada com pouca frequência. SUSSMAN et al. (105) encontraram um inibidor de natureza protéica, em mutantes de *Neurospora crassa*, que não apresentavam atividade trealásica e nem metabolizavam a trealose. Em 1980, foi isolada uma cepa de *Streptomyces lavandulae* que produzia grande quantidade de um composto com estrutura química idêntica ao da 1-desoxinojirimicina obtida quimicamente, designada de S-GI, que tem a capacidade de inibir a hidrólise enzimática da trealose (78). Inibidor semelhante foi encontrado em uma leguminosa, *Lonchocarpus sericeus* (33).

1.2.8. OUTRAS VIAS DE DEGRADAÇÃO DA TREALOSE.

Outros mecanismos de degradação da trealose são descritos

na literatura. Em 1972, MARÉCHAL E BELOCOPITOW (73) mencionaram uma clivagem fosforolítica da trealose em *Euglena gracilis* dando formação de glucose e β -glucose-1-fosfato, pela ação enzimática da trealose fosforilase. Mais tarde, um outro mecanismo diferente foi proposto por BHUMIRATANA et al.(6), utilizando enzimas de *Bacillus popilliae*. Neste caso, a trealose sofre inicialmente um processo de fosforilação dependente de fosfoenolpiruvato dando origem a trealose-6-fosfato, que é posteriormente hidrolisada pela fosfotrealase com formação de glucose e glucose-6-fosfato como produto.

1.3. ESTUDOS RELACIONADOS COM O FUNGO *Scopulariopsis brevicaulis*.

O *Scopulariopsis brevicaulis* é um epiparasita do corpo de frutificação de certos fungos presentes na madeira em decomposição. Secreta uma série de hidrolases, dentre elas a trealase, para a utilização da trealose (como fonte de carbono) presente, por exemplo, na orelha de pau.

Este fungo filamentososo tem sido isolado do solo, ar, esterco, queijos e outras fontes (60). É capaz de metabolizar a queratina (62) provocando onicomiose humana (36, 82). Quando inoculados em camundongos pode induzir atividade carcinogênica(9). O fungo tem a peculiaridade de produzir compostos organo-metálicos ao ser cultivado em meios contendo mercúrio(118), arsênio(17) e selênio ou telúrio(18). Esta propriedade é utilizada para a análise quantitativa do arsênio(60).

KISHIDA & YOSHIMURA (66) descreveram a presença de protease em *Scopulariopsis brevicaulis* capaz de hidrolisar a cadeia A e B da insulina. SINGH & VÉZINA (102), por sua vez, isolaram uma enzima proteolítica que hidrolisa a caseína, hemoglobina desnaturada com uréia, gelatina, fibrinogênio e insulina, porém, sem

efeito sobre a albumina do soro humano e ovoalbumina.

Pesquisas com este fungo vem sendo desenvolvido neste departamento, desde 1976. Entretanto, devido a uma classificação errônea, o microrganismo era denominado *Picnoporus cinnabarinus*. Foram realizados estudos relacionados com a composição da parede celular, onde a alteração morfológica resultante da relação entre a glucosamina e a galactosamina depende da fonte de carbono utilizada para o crescimento do fungo (27). Estudos subsequentes do metabolismo de aminoaçúcares foram efetuados por CARNIERI & AMARAL (13).

Foi constatada a presença de enzimas isocitrato liase e malato sintase pertencentes ao ciclo do ácido glicoxílico, que são induzidas quando o fungo é crescido em meio contendo acetato ou etanol (2).

Foi demonstrado, pela medida da atividade enzimática e por técnica de radiorespirometria que o metabolismo da glucose se dá através da via glicolítica e do ciclo das pentoses (56).

A análise das diferentes condições nutricionais sobre a síntese de enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, bem como o metabolismo de glutamato foram estudados por PETIZ & AMARAL (92).

Dentre as carboidrases de *Scopulariopsis sp* foi descrita a obtenção de β -galactosidase e sua imobilização em resina Duolite (fenol formaldeído), com a finalidade de promover a hidrólise da lactose presente no soro de leite (90).

CRAWFORD (25), por sua vez, relatou a presença de celulase no fungo *Scopulariopsis brevicaulis* e observou que a produção desta enzima estava relacionada, de modo inverso, à disponibilidade da concentração de nitrogênio.

1.4. OBJETIVO.

Em virtude do importante papel desempenhado pela trealose como carboidrato de reserva e também como agente protetor da membrana plasmática, parece-nos oportuno estudar as propriedades a trealase, o principal elemento envolvido na degradação desse açúcar.

O presente trabalho visa correlacionar as enzimas extracelular e a intracelular. Portanto, tornam-se necessárias a extração e a purificação da trealase micelial para a determinação de parâmetros cinéticos e das suas propriedades com a finalidade compará-los com os da enzima liberada ao meio de cultura, cujo estudo foi efetuado anteriormente (93).

O conhecimento do efeito indutor do amido sobre a produção da trealase extracelular (93), possibilita executar experimentos buscando esclarecer o efeito desse polissacarídeo, da glucose e da cicloheximida na síntese e secreção da enzima.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES.

"Blue Dextran", CMC, estaquiouse, gentiobiose, isomaltose, maltotriose, PNPG, rafinose, trealose, albumina do soro bovino, albumina e hemoglobina "cross linked", catalase, citocromo c, glucose-oxidase, peroxidase, tireoglobulina, tripsina, acrilamida, bis-acrilamida, o-dianisidina, SDS, TEMED, DEAE-celulose, NEM, PCMB, foram obtidos da Sigma Chemical Co.-USA.

Celobiose, maltose, melibiose, sacarose, obtidos da Calbiochem - USA.

Glucose, lactose, Tris, Merck - Alemanha .

Amido , etanol, Reagen - Brasil.

Trealose-6-fosfato, gentilmente cedida pela Prof^a.

Juliet K. Sugai.

Sephadex G-100 , Pharmacia - Suécia.

Biogel A 1;5m, Bio-Rad - USA.

As demais substâncias utilizadas são de alto grau de pureza, sendo consideradas produtos pró-análise.

2.2. MICRORGANISMO.

A cepa de *Scopulariopsis brevicaulis* IMI 239748 utilizada, gentilmente cedida pela Dra. Déa Amaral, foi isolada em Curitiba e classificada pela Commonwealth Mycological Institute, Surrey - Inglaterra.

2.3. MEIOS DE CULTURA.

2.3.1. O meio sólido utilizado foi ágar Malte que continha extrato de malte 3%, extrato de levedura 0,5% e ágar 1,5%. Após a esterilização em autoclave (30 minutos, 1 atm de pressão), os tubos foram inclinados.

2.3.2. O meio líquido de MARKUS et al. (74), continha os seguintes componentes:

KH_2PO_4 anidro	9,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	20,1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NH_4NO_3	1,0 g
Tiamina HCl	5,0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5 mg
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O pH do meio foi ajustado para 6,0 com ácido fosfórico diluído. O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão durante 30 minutos. Ao meio de MARKUS foram acrescentadas as fontes de carbono adequadas, previamente esterilizadas em vapor fluente durante 30 minutos.

2.4. ESPORULAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO MICRORGANISMO.

O fungo foi cultivado em tubo inclinado contendo 20 ml de ágar Malte, durante 6 dias, em estufa a 28°C e posteriormente deixado em presença de luz solar para completar a esporulação. A conservação da cepa foi feita fazendo-se repiques a cada três meses e mantendo-a em geladeira a 4°C, até o uso.

2.5. OBTENÇÃO DE ESPOROS.

Ao fungo cultivado em meio sólido foi adicionado 10 ml de água destilada estéril e as células foram removidas com auxílio de uma alça de platina filtradas através da lã de vidro estéril. Os micélios ficaram retidos e os esporos foram colhidos no filtrado. Essa suspensão de esporos foi inoculada em meio líquido de MARKUS com a fonte de carbono apropriada.

2.6. CRESCIMENTO DO FUNGO.

O cultivo do fungo foi efetuado em frascos Erlenmeyer contendo meio de MARKUS com a fonte de carbono adequada. A relação entre o volume de meio e do frasco foi de 1:2-5. A incubação foi feita em estufa a 28°C durante 48 horas (exceto quando especificado), em um sistema aeróbico obtido por agitação mecânica a 120 rotações por minuto em agitador rotatório New Brunswick.

2.6.1. EFEITO DA FONTE DE CARBONO NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DA TREALASE E MALTASE.

Os esporos (4×10^6 células) do fungo foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio, suplementados com diferentes fontes de carbono na concentração de 0,2%. Os mesmos foram incubados durante 60 horas, com exceção dos cultivos em etanol e carboximetilcelulose sódica (100 horas).

2.7. OBTENÇÃO DA FONTE DE ENZIMA.

O microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 2 litros contendo 600 ml de meio de MARKUS com 0,2% de amido. Os micélios (4 g) foram colhidos por filtração através de fibra

sintética com auxílio de uma bomba de vácuo. O filtrado (meio de cultura) dialisado foi utilizado para a análise da enzima extracelular. Os micélios foram lavados com água destilada (cerca de três vezes o volume do meio) e rompidos com areia do mar tratada (1:2 p/p) em gral de porcelana previamente gelado. O material foi extraído com tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 (3 vezes o peso micelial p/v). A suspensão foi centrifugada a 7800 x g durante 10 minutos em centrífuga refrigerada (BECKMAN - Modelo J-21 B). O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi dialisado durante uma noite em tampão fosfato 5 mM, pH 6,6 a 4°C.

2.8. DETERMINAÇÃO DO PESO SECO.

O crescimento do microrganismo foi monitorado pelo peso seco das células. Após a filtração em papel de filtro previamente pesado, os micélios foram submetidos a secagem em estufa a 60°C até a obtenção de peso constante. O valor do peso seco foi obtido pela extrapolação na curva de calibração previamente estabelecida pelo gráfico do peso seco versus peso úmido.

2.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

A atividade trealásica foi determinada pela dosagem do açúcar redutor liberado pela clivagem enzimática da trealose. Exceto quando mencionado, o sistema de incubação contendo tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, 5 μ moles de trealose (25 mM) e enzima em um volume final de 200 μ l, foi incubado a 40°C. A glucose liberada foi dosada pelo método colorimétrico de SOMOGYI (103) e NELSON (81) ou da Glucose-oxidase-Peroxidase (28), interrompendo-se a reação com H₂SO₄ a 25% p/v (123) e usando-se a glucose como padrão. A coloração desenvolvida foi medida espectrofotometricamente em Coleman Jr. a 540 e 515 nm respectivamente. O controle foi efetuado

utilizando as mesmas condições anteriormente descritas, porém, com a adição da enzima previamente inativada. A inativação da enzima foi feita pela adição do reativo de SOMOGYI ao sistema ou pelo aquecimento em banho de água fervente durante 5 minutos, antes da adição do substrato.

Uma unidade de trealase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de glucose por minuto nas condições de ensaio e a atividade específica (A.E.) como unidade de enzima por miligrama de proteína.

Os cálculos de todos os experimentos, exceto da curva de concentração de proteína foram efetuados para 1 ml de enzima.

2.10. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.

A determinação do teor protéico foi executada pelo método colorimétrico de LOWRY et al. (70) utilizando albumina do soro bovino como padrão ou pela técnica descrita por WARBURG & CHRISTIAN (120).

2.11. PURIFICAÇÃO DA TREALASE.

Todas as manipulações feitas com a enzima foram executadas em baixa temperatura, utilizando banho de gelo ou câmara fria a 4°C.

O extrato bruto (130 ml) obtido por trituração de 60 g de células foi submetido às seguintes etapas de purificação:

2.11.1. PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE PROTAMINA

O extrato bruto (130 ml) foi tratado com sulfato de protamina segundo HABA & RACKER (45). Após 30 minutos o material foi centrifugado a 7.800 x g por 10 minutos. O precipitado foi descar-

tado e uma alíquota do sobrenadante foi dialisado para se fazer o controle da atividade.

2.11.2. FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-100.

O sobrenadante (130 ml) da etapa anterior, foi fracionado em volume de 20 ml e passado através da coluna (3,5 x 21 cm) de Sephadex G-100 previamente equilibrada com tampão fosfato 5 mM, pH 6,6 e calibrada com "Blue Dextran". A eluição foi efetuada utilizando-se o tampão de equilíbrio com fluxo de 1 ml/min e 30 cm de pressão de operação. Foram colhidas amostras de 5 ml com o auxílio de um coletor de frações (Ultra-Rac-Fraction Collector LKB 7000). Cada fração foi analisada quanto ao teor protéico e atividade enzimática. Após cada passagem do material através da coluna, a mesma foi lavada com NaCl 0,1M em tampão de equilíbrio para remover os possíveis materiais adsorvidos.

2.11.3. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-CELULOSE I.

As frações do Sephadex G-100 que apresentaram maior atividade (100 ml) foram passadas através de uma coluna (1,9 x 11 cm) de DEAE-celulose, previamente equilibrada com tampão fosfato 5 mM, pH 6,6. Após a adsorção da proteína, a coluna foi lavada com 100 ml de tampão de equilíbrio e igual volume de NaCl 0,1 M no mesmo tampão. A eluição foi efetuada com fluxo de 0,4 ml/min com gradiente linear de NaCl (0,1 - 0,5 M) em tampão de equilíbrio (150 ml em cada frasco). O gradiente foi determinado pela condutividade elétrica (KONDUKTOMETER E 527 - Metrohn - Herisau - Switzeland). As frações mais ativas foram combinadas, concentradas pela ultrafiltração (AMICON com membrana Diaflo PM 10 sob pressão de N₂ de 1,5 Kg/cm²) e finalmente dialisadas contra o tampão de equilíbrio por uma noite.

2.11.4. CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE II.

O material dialisado da etapa anterior (2,3 ml) foi re-cromatografado em condições similares. A lavagem da coluna com o material foi efetuada com NaCl 0,15 M (150 ml) com posterior aplicação de gradiente de 0,15 - 0,4 M (150 x 150 ml). As frações com atividade enzimática mais elevadas foram combinadas, concentradas por ultrafiltração e dialisadas. Para a determinação das propriedades da trealase foi utilizada essa preparação purificada.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita utilizando-se gel a 7% (121) em tampão Tris - acetato 100 mM, pH 7,2, e corrente de 5 mA por gel (0,5 x 8,5 cm) durante 4 horas. O indicador de corrida empregado foi o Azul de Bromo fenol (ABF). A revelação das proteínas do gel foi feita com "Coomassie Brilliant Blue" G-250 (8). A atividade trealásica no gel foi observada pela incubação a 40°C durante 1-2 horas em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, contendo Glucose-oxidase-Peroxidase (28) e 10 µmoles de trealose. O controle foi efetuado pela incubação do gel na ausência de substrato. As glicoproteínas foram detectadas pela técnica descrita por RACUSEN (95) utilizando tireoglobulina, ovoalbumina e tripsina como referência.

2.12.1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS.

A trealase obtida pelo experimento da isoeletrofocalização (Ver MATERIAIS E MÉTODOS, item 2.14.) e os padrões de hemoglobina e albumina com ligações cruzadas, previamente tratados com mercaptoetanol e SDS a 1% e fervidos durante 15 minutos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% com 0,1% de SDS. A corrida eletroforética foi efetuada a temperatura ambiente

em tampão Tris -acetato 0,1 M pH 7,4 contendo 1 mM de EDTA e 0,1% de SDS durante 4 horas com corrente de 8 mA/gel (0,5 x 8,5 cm). A revelação de proteínas foi feita com "Coomassie Brilliant Blue" G-250 (8).

2.13. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR.

O peso molecular da enzima foi determinado através da filtração em gel utilizando coluna (1 x 62 cm) de Bio gel A 1,5m equilibrada e eluída com tampão fosfato 5 mM, pH 6,6 contendo 0,9% de NaCl. A coluna foi calibrada com os seguintes padrões: citocromo c (12.400), tripsina (23.800), ovoalbumina (45.000), hemoglobina (64.000), albumina do soro bovino (67.000), catalase (230.000-250.000), tireoglobulina (669.000) e "Blue Dextran" ($2 \cdot 10^6$). A trealase foi detectada pela atividade enzimática, a hemoglobina e o citocromo c pela medida espectrofotométrica a 425 nm; a catalase a 410 nm; a tripsina, a albumina bovina e a tireoglobulina pela absorbância a 280 nm e finalmente o "Blue Dextran" espectrofotometricamente a 625 nm.

2.14. DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO

A determinação do ponto isoelétrico (pI) da enzima foi efetuada utilizando-se a coluna de isoeletrofocalização (LKB Ampholine Electrofocusing Columns) com 110 ml de capacidade. O ensaio foi executado segundo VESTERBERG (116) substituindo o ácido fosfórico do anodo por ácido acético pH 2,0. A eletrofocalização foi efetuada utilizando anfolina a 1% com pH na faixa de 3,0 - 10 com 1 ml da enzima purificada (DEAE-II) durante 48 horas a 400V sob refrigeração a 4°C. O material foi retirado da coluna com auxílio de uma bomba peristáltica com fluxo de 30 ml/h, coletando-se frações de 1 ml. O pH, perfil protéico (120) e atividade da

trealase foram determinados em cada fração.

2.15. ESPECIFICIDADE DA ENZIMA.

Com a finalidade de se verificar a especificidade da enzima, o extrato bruto e as frações mais ativas da filtração em gel e DEAE-celulose foram ensaiados utilizando diversos substratos, tais como: sacarose, trealose, maltose, melibiose, celobiose, gentiobiose, lactose, isomaltose, maltotriose, estaquiose, rafinose, amido, carboximetilcelulose sódica, trealose-6-fosfato, p-nitrofenil- α -D-glucosídeo.

A enzima (0,07 μ g de proteína) foi incubada a 40°C durante 20 minutos no sistema convencional, contendo 12,5 mM de substrato, exceções feitas para trealose-6-fosfato (18,3 mM) e amido (0,5 mg) e CMC (0,5 mg). A atividade foi monitorada pela dosagem da glucose liberada pela clivagem enzimática dos substratos, utilizando o método da Glucose-oxidase-Peroxidase (28,123). A atividade sobre PNPG foi executada segundo HAN & SRINIVASAN (46).

2.16. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NA ATIVIDADE DA ENZIMA.

O sistema de 6 ml contendo 0,7 μ g de proteína, 25 mM de trealose em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 foi incubado a 40°C durante 180 minutos. Nos tempos determinados, foram colhidas amostras para a dosagem do açúcar redutor liberado.

O efeito da concentração de proteínas foi verificado incubando-se um sistema de 200 μ l contendo tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, 25 mM de trealose e quantidade crescente de proteína (8,5-170 ng), a 40°C durante 15 minutos, com posterior dosagem da glucose liberada.

2.17. INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA ENZIMA.

O pH em que ocorre a máxima atividade da enzima foi determinado, incubando-se 0,6 µg de proteína (50 µl), 50 µl de trealose 0,1 M e 50 µl de tampões de diferentes pHs (2,6 - 10,4) durante 30 minutos a 40°C. Após a incubação, o pH de uma alíquota de 10 µl foi ajustado para 6,0, com tampão fosfato 0,2 M em um volume final de 200 µl. O açúcar redutor liberado pela hidrólise da trealose foi dosada pelo método de SOMOGYI (103) e NELSON (81).

Para a averiguação da estabilidade da enzima em função da variação de pH, foi feita uma pré-incubação de 0,6 µg de proteína em 50 µl de tampões de diversos pHs em um sistema de 150 µl durante 17 horas a 4°C.

Após este período de incubação, o pH de uma alíquota de 10 µl foi ajustado para 6,0 com tampão fosfato 0,2 M e a atividade trealásica foi então determinada utilizando o método convencional (Ver MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.9). Foram executados controles em todas as variações de tampão e pH para eliminar qualquer interferência na determinação do açúcar redutor.

2.18. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA ENZIMA.

Para a determinação da temperatura onde a atividade da enzima é máxima, foi efetuada incubação de 0,03 µg de proteína no sistema convencional (Ver MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.9) durante 30 minutos em temperaturas variáveis (0-94°C).

Na verificação da estabilidade térmica, 0,03 µg de proteína foi pré-incubada com 100 µl de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 em um volume de 150 µl, durante 30 minutos em diferentes temperaturas. Posteriormente o substrato foi adicionado e a atividade enzimática foi determinada conforme ítem 2.9 de MATERIAIS E MÉTODOS.

2.19. INATIVAÇÃO TÉRMICA DA TREALASE A 55°C.

Para a avaliação da inativação térmica da enzima a 55°C, um sistema de 3ml de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 contendo 10,2 µg de proteína foi pré-incubado a 55°C durante 2 horas. Nos tempos determinados, a atividade hidrolítica sobre a trealose (25 mM) e maltose (25 mM) foram ensaiadas com 20 e 200 µl respectivamente. Após a incubação a 40°C com o substrato, a glucose liberada foi dosada pelo método da Glucose-oxidase-Peroxidase (28, 123).

2.20. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO.

A enzima foi incubada no sistema convencional, com a concentração variável de trealose (0,2 - 10 mM). O Km e a Vmax foram calculados pelo gráfico duplo-recíproco de LINEWEAVER-BURK. Para cada concentração de substrato foi feita uma curva de tempo de incubação para a avaliação da velocidade inicial.

2.21. EFEITO DOS CÂTIONS DIVALENTES E OUTROS COMPOSTOS NA ATIVIDADE TREALÁSICA.

Foi analisado o efeito provocado por diversos cátions divalentes (Zn^{++} , Co^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} e Hg^{++}), Tris(hidroximetil)amino metano (Tris), N-etilmaleimida(NEM) e p-cloro-mercuribenzoato de sódio (PCMB) sobre a atividade da trealase.

A enzima foi pré-incubada sem o substrato, em presença destes compostos durante 10 minutos. Após a adição do substrato, a atividade enzimática foi determinada pelo método convencional, utilizando a Glucose-oxidase-Peroxidase (28, 123) para a dosagem da glucose liberada.

O tipo de inibição causada por Tris, Hg^{++} e PCMB, foi

ensaiado adicionando-se diferentes concentrações de inibidores ao sistema convencional, porém, contendo quantidade crescente de substrato (0,5 - 5 mM). A atividade trealásica foi determinada pela dosagem da glucose liberada pelo método da Glucose-oxidase-Peroxidase ((28, 123) para os dois primeiros compostos e pelo SOMOGYI (103) e NELSON (81) para o caso de PCMB. O K_i foi calculado utilizando-se o método gráfico de LINEWEAVER-BURK. O pH de todos os compostos ensaiados foram ajustados para 6,0.

2.22. EFEITO DA GLUCOSE E AMIDO NA PRODUÇÃO DA TREALASE EXTRA-CELULAR.

Os esporos (8×10^4 células/ml de meio) do fungo *Scopulariopsis brevicaulis* foram inoculados em 600 ml de meio líquido de MARKUS, contendo 0,2% de glucose ou amido, como fonte de carbono. Após 48 horas, os micélios foram coletados, lavados com pelo menos três vezes o volume do meio com água destilada estéril e transferidos assepticamente para frascos de 2 litros contendo 600 ml de meio mineral. Após 12 horas sob agitação a 120 rpm e 28°C, os micélios coletados como foi descrito acima, foram transferidos para frascos de 1 litro com 300 ml de meio contendo: a) 0,2% de amido; b) 0,2% de amido + 30 µg/ml de cicloheximida; c) 0,2% de glucose; d) 0,2% de glucose + 30 µg/ml de cicloheximida.

Nos tempos indicados, foram colhidos 10 ml do meio de cultura para a avaliação do crescimento, determinação da atividade trealásica, conteúdo de proteínas e carboidrato residual.

De todas as amostras coletadas, uma alíquota foi dialisada em tampão fosfato 5 mM, pH 6,6 durante uma noite.

2.23. INDUÇÃO DA TREALASE PELO AMIDO OU MALTOSE.

O inóculo inicial foi efetuado em glucose a 0,2% ou 1%.

Após o tratamento como descrito no ítem anterior, as células foram transferidas para frascos de 2 litros contendo 1000 ml de meio com amido ou maltose a 0,2% respectivamente. Após 12 a 15 horas do início da indução, o material foi dividido em três partes iguais:

- a) controle - sem adição;
- b) adição de 0,2% de glucose;
- c) adição de 30 µg/ml de cicloheximida.

Nos tempos determinados, foram colhidas amostras (2x 10 ml) para a avaliação do crescimento do fungo, determinação da atividade trealásica, teor protéico e carboidrato residual. A trealase intracelular foi obtida pelo rompimento das células conforme ítem 2.7 de MATERIAIS E MÉTODOS, porém utilizando 1 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 para a extração. Todo material, exceto aquele utilizado para a dosagem do açúcar residual, foi dialisado contra tampão fosfato 5 mM, pH 6,6 durante uma noite, com a finalidade de eliminar compostos que interferem na determinação de proteínas e na atividade enzimática.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. EFEITO DA FONTE DE CARBONO SOBRE A ATIVIDADE DA TREALASE E MALTASE.

O fungo foi cultivado em meio líquido de MARKUS contendo acetato, etanol, mono, oligo ou polissacarídeos para a determinação da melhor fonte de carbono para a síntese da trealase e da maltase.

A Tabela I mostra o efeito das fontes de carbono e energia. Foi observado que o comportamento geralmente é similar, ou seja, quando um determinado composto induz a síntese da trealase, há um aumento correlato com a maltase, exceto quando o fungo foi cultivado em etanol.

Em presença de trealose e maltose a quantidade das enzimas produzidas foram bastante elevadas. Esse resultado era esperado, uma vez que é conhecido o fenômeno da indução de carboidratos pelos seus substratos (59, 69, 77).

A maltose e a trealose afetaram a secreção das enzimas extracelulares produzindo efeito na mesma ordem de grandeza, enquanto que para as duas hidrolases intracelulares, a maltose mostrou ser indutor mais eficiente. No entanto, a maior produção das duas enzimas ocorreu quando o amido foi utilizado como fonte de carbono para o crescimento do fungo, possivelmente pela liberação gradual da maltose no meio de cultura. A atividade mais baixa em fungo cultivado em presença de maltose ou trealose poderia ser devido a adição de dissacarídeos, em uma única etapa, que leva à rápida

hidrólise desses compostos, elevando a concentração de glucose, que por sua vez pode provocar o fenômeno da repressão (77, 97).

Quando o microrganismo foi cultivado em glucose ou Dextrosol, produto comercial constituído exclusivamente de glucose (determinada pela Glucose-oxidase-Peroxidase), a produção destas hidrolases foi reduzida de 3 a 6 vezes em relação ao do amido. O Karo (produto comercial constituído predominantemente de açúcares redutores, onde apenas 44% corresponde a glucose), produziu, por sua vez, quantidade de trealase similar ao do amido, porém, a produção da maltase foi menor.

O fungo *Scopulariopsis brevicaulis* apresentou melhor crescimento em presença de dextrina (Nidex), amido e dissacarídeos, com exceção da maltose que teve um comportamento similar ao da glucose. O microrganismo apresentou crescimento muito pobre em acetato, etanol e CMC sódico. Esse fungo mostrou melhor crescimento em trealose do que em glucose, o que não ocorre em determinados microrganismos como em leveduras híbridas (3) e *Neurospora crassa* (48), onde foi verificado um crescimento de 5% e 32% respectivamente.

O estímulo na produção da trealase observado em *Scopulariopsis brevicaulis* difere dos resultados obtidos por AVIGAD et al. (3), onde a fonte de carbono utilizada no cultivo de leveduras híbridas não afetou na atividade trealásica (U/g de células secas).

METZENBERG (77) observou, em 1962, que a *Neurospora* produzia maior quantidade de trealase, invertase e maltase, quando o fungo era cultivado em galactose, enquanto que na mutante VI-178, a produção de trealase foi mais elevada com o crescimento do microrganismo em xilose. Em *Scopulariopsis brevicaulis*, o cultivo em presença de galactose produziu somente 1/3 da atividade comparado ao de amido (dados não mostrados).

Em *Candida tropicalis* (71) cultivado em 5% de trealose como única fonte de carbono, a atividade trealásica foi aumentada

de 8,5 vezes em relação aquela observada com o cultivo das leveduras em 5% de glucose.

HANKS & SUSSMAN (48) estudaram o efeito da fonte de carbono na produção da trealase por peso micelial em cepas de *Neurospora crassa* não conidiante e verificaram que o meio contendo arabinose, ácido glutâmico ou glicina, onde o crescimento era mais restrito, favorecia a atividade, o que era decorrente da síntese "de novo" e não da remoção de algum inibidor. Quando o fungo foi cultivado em presença de maltose, sacarose ou glucose, houve um bom desenvolvimento, porém, a atividade trealásica, por peso micelial, foi baixa.

3.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO NA PRODUÇÃO DA TREALASE PELO FUNGO *Scopulariopsis brevicaulis*.

No trabalho anterior (93) foi demonstrado que o nível de trealase extra e intracelular do fungo *Scopulariopsis brevicaulis* aumenta paralelamente com o crescimento do microrganismo, que atinge o máximo em 60 horas. Após esse tempo, as células entram em fase autolítica, reduzindo a massa micelial. Nessa fase, a trealase extracelular continua se elevando. No entanto, a enzima intracelular é rapidamente inativada. Por esta razão, os cultivos do fungo para a obtenção da trealase micelial, foram efetuados durante 48 horas.

A produção e a secreção da trealase mostraram ser mais eficientes quando o microrganismo foi cultivado em meio contendo amido como fonte de carbono e energia (tabela I).

Com a finalidade de se determinar a concentração ideal de amido na produção da trealase, o fungo foi cultivado em meio contendo quantidades crescentes (0,05 - 1,5%) desse polissacarídeo (Fig. 1).

A preparação enzimática obtida das células cultivadas em baixas concentrações de amido (0,05 - 0,1%) apresentou atividade

específica mais elevada, enquanto que a sua liberação foi favorecida com 0,2%. Em concentrações superiores, ocorreu a queda da atividade trealásica, provavelmente ocasionada pela repressão da síntese (77) pela glucose liberada em grande quantidade (resultante da degradação do amido) ou inativação proteolítica pelo efeito da glucose (23).

Em virtude da pequena massa micelial obtida com 0,1% de amido e pelo fato da atividade específica da trealase extracelular ser maior em 0,2%, o crescimento do microrganismo nos experimentos subsequentes foi efetuado com 0,2% de amido. O aumento no fornecimento da fonte de carbono provocou uma elevação na massa micelial, atingindo o crescimento máximo a 0,6%. Em concentrações superiores o crescimento ficou estacionário.

3.3. EFEITO DE MICROELEMENTOS NA PRODUÇÃO DA TREALASE.

Com o propósito de melhorar o crescimento do fungo, bem como a produção da enzima, o meio de MARKUS et al. (74) foi alterado na concentração de fosfato (15 - 120 mM) e teor de nitrogênio ou então suplementado com íons metálicos que são micronutrientes (Fe^{++} , Ca^{++} e Zn^{++}) na concentração final de 11 μM . As alterações introduzidas resultaram na redução do crescimento e da atividade enzimática. O extrato obtido das células cultivadas no meio original apresentou atividade específica 3 vezes maior do que aquela do meio enriquecido com os micronutrientes.

3.4. PURIFICAÇÃO DA TREALASE INTRACELULAR.

A trealase obtida do rompimento das células de *Scopulariopsis brevicaulis* cultivado em meio de MARKUS et al. (74), contendo 0,2% de amido durante 48 horas, foi purificada com a finalidade de se obter uma preparação enzimática isenta de inibidores ou

ativadores que possam interferir nos experimentos posteriores.

O procedimento mais adequado se encontra resumido na Tabela II. A trealase foi purificada 362 vezes com 51% de rendimento. O tratamento inicial foi com sulfato de protamina a fim de eliminar os ácidos nucléicos (45). A tentativa de utilizar $MnCl_2$ (91) para a remoção do ácidos nucléicos não foi satisfatória devido a precipitação parcial da trealase e seu efeito inibitório sobre a atividade da enzima (Tabela V).

O fracionamento com sulfato de amônio (3, 54, 64, 76, 86, 91, 119), acetona (57, 86, 117) ou etanol (15, 64, 71, 86) foi descrito por muitos autores. No presente caso, esses procedimentos resultaram na precipitação parcial da trealase.

Quando o material foi submetido a filtração em gel Sephadex G-100, a trealase foi eluída em um único pico de atividade no volume morto da coluna (Fig. 2), sugerindo apresentar um peso molecular superior a 150.000. Nesta etapa, os pigmentos foram retardados pelo gel possibilitando a obtenção de uma fração enzimática despigmentada.

A cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose I (Fig. 3), possibilitou a eliminação da grande maioria das proteínas contaminantes. Nesta etapa de purificação houve a separação da trealase e da maltase em picos bem distintos, sendo a primeira eluída com a concentração salina entre 0,18 - 0,27 M e a outra com 0,27 - 0,40 M.

Com intuito de se obter uma preparação mais purificada, as frações mais ativas da etapa anterior foram dialisadas e recromatografadas em DEAE-celulose II (Fig. 4), onde apresentaram-se como um único pico de atividade. Boa parte das proteínas foi eliminada com a lavagem da coluna.

3.5. MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DA TREALASE.

O material resultante das etapas de tratamento efetuado para a purificação da trealase intracelular, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 6). Os géis foram corados com "Coomassie Brilliant Blue" G-250 para revelar as proteínas (Fig. 6E, 6S, 6D), enquanto que a atividade trealásica foi revelada pela Glucose-oxidase-Peroxidase (Fig. 6E', 6S', 6D').

Pode se observar ainda que a maioria das proteínas foram eliminadas durante os processos de purificação. No entanto, a preparação enzimática final não se mostrou homogênea, apresentando três bandas de proteínas (Fig. 6D), das quais duas foram coincidentes com a banda difusa de atividade enzimática (Fig. 6D').

A presença de duas bandas de atividade no extrato bruto (Fig. 6E') e nas frações do Sephadex G-100 (Fig. 6S') mostram a existência de mais de uma forma de trealase com mobilidade eletroforética distintas. A forma que apresentou menor migração poderia apresentar menor carga ou peso molecular mais elevado. Neste último caso, poder-se-ia sugerir que esta proteína seria uma forma recém-sintetizada da trealase e que sofreria posterior clivagem proteolítica removendo certos fragmentos protéicos (96). Com relação à carga, esta proteína realmente deve apresentar-se menos carregada em pH 6,6, uma vez que foi eluída com força iônica inferior ao pico da trealase em coluna de DEAE-celulose (Fig. 5A). Esta fração apresentava baixa atividade enzimática (cerca de 5%) e elevado teor de proteínas, sendo, por esta razão descartada nos procedimentos posteriores.

Os géis da Fig 6D e 6D' da fração de DEAE-celulose II, podem sugerir a presença de isoenzimas, cujas propriedades parecem ser muito semelhantes, uma vez que aparece apenas uma única banda de atividade (Fig. 6D'). A existência de outras formas de trealase foi descrita em *Melolontha vulgaris* (43), *Bombyx mori* (100) e

Neurospora crassa (54). Resultado semelhante ao do presente trabalho foi encontrado em *Humicola lanuginosa* (94), onde a trealase purificada não era homogênea, porém, a maior banda de proteína coincidia com a da atividade enzimática. A purificação da trealase até a homogeneidade foi obtida em mixamoeba de *Dictyostelium discoideum* (65), trealase renal de camundongos (106) e da mucosa intestinal de ratos (101).

3.6. VERIFICAÇÃO DO CARÁTER GLICOSÍDICO DA TREALASE.

A natureza glicosídica da trealase foi demonstrada pela eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 7), seguida de coloração específica para revelar as glicoproteínas (96). As bandas de glicoproteínas (Fig. 7C) coincidiram com as duas bandas superiores de proteínas (Fig. 7E) e conseqüentemente, com a da atividade trealásica (Fig. 7D).

KILLICK (65), em 1983, sugeriu uma associação da proteína ao carboidrato, em virtude da adsorção da trealase de *Dictyostelium discoideum* em concanavalina A sepharose e eluída com metilmanosídeo. Esta hipótese foi confirmada com a coloração específica com "Alcian Blue" e reagente de SCHIFF, após a eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.7 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR.

O peso molecular da trealase determinado pela filtração em coluna de Bio gel A-1,5m, foi de 430.000 (Fig. 8A). Quando a enzima dissociada com SDS foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentou uma única banda de proteína, cujo comportamento mostrou apresentar um monômero com peso molecular em torno de 107.000 (Fig. 8B). Esses valores sugerem que a trealase intracelular do fungo *Scopulariopsis brevicaulis* seja uma proteína

oligomérica constituída de 4 subunidades idênticas. A natureza tetramérica da trealase com peso molecular de 320.000 foi sugerida por UNO et al. (109) em enzimas de leveduras.

A trealase de várias procedências tem sido relatada na literatura apresentando os mais diversos pesos moleculares, tais como: 60.000 - 107.000 em insetos (21, 43); 73.000 - 240.000 em mamíferos (79, 101, 106); 90.000 em bactérias (44); 100.000 - 400.000 em fungos (49, 65, 94, 111).

HECKER & SUSSMAN (49), observaram que o peso molecular da trealase de *Neurospora crassa* variava de 105.000 a 400.000 dependendo da força iônica do tampão utilizado para a eluição da coluna de gel.

Valores semelhantes ao da subunidade da trealase de *Scopulariopsis brevicaulis* foram encontrados em *Dictyostelium discoideum* (65) e mucosa intestinal de rato (101). No entanto, nos dois últimos casos, o peso molecular da enzima não dissociada é semelhante, sugerindo a natureza monomérica destas enzimas. Valores baixos de 88.000 daltons foram relatados para a unidade monomérica da trealase de *Trichoderma reesei* (117) e de 30.000 daltons para a subunidade da enzima da mucosa intestinal de rato (79).

3.8. DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DA TREALASE.

A trealase do fungo *Scopulariopsis brevicaulis*, quando foi submetida à isoeletrofocalização, mostrou um único pico de atividade em pH 2,9 (fig. 9). Este resultado sugere que esta enzima deve apresentar grande quantidade de aminoácidos de natureza acídica.

A preparação enzimática parcialmente purificada (DEAE-celulose II) quando submetida à eletrofocalização, promoveu melhor purificação da enzima, obtendo-se uma fração homogênea. Porém, como o pH no qual a enzima é focalizada é muito ácido, ocorre a rápida inativação da trealase, não compensando esta operação como etapa de

purificação.

Trealase com ponto isoelétrico ácido foi observado em *Melolontha vulgaris* (4), que apresentou pI de 3,95. Valores elevados de 5,7 foram reportados para a enzima de *Trichoderma reesei* (117) e de 7,2 a 7,3 para *Dictyostelium discoideum* (65).

3.9. ESPECIFICIDADE DA TREALASE.

Quando o extrato livre de células obtido do fungo *Sco-pulariopsis brevicaulis* foi ensaiado com vários substratos, a maior atividade foi observada quando a maltose era o substrato (Tabela III). Porém, essa atividade maltásica foi totalmente eliminada durante os processos de purificação, quando o material foi submetido à cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (Fig. 3). Nas condições de ensaio, a preparação enzimática mostrou-se altamente específica para a trealose como fora relatado para fungos (16, 54, 57, 65), leveduras (3, 64), bactérias (52), insetos (21, 38, 61, 100) e mamíferos (101, 106).

Como mostra a Tabela III, a enzima não apresentou atividade sobre trealose-6-fosfato, concordando com os resultados para a trealase de *Saccharomyces cerevisiae* (86) e *Humicola lanuginosa* (94). A hidrólise desse substrato é catalisada por uma fosfotrealase que foi encontrada em *Bacillus popilliae* (6).

Tem sido descrita a existência de preparações enzimáticas de trealase com atividade sobre 6-desoxi-trealose (44) e trealosamina e maltose (91). No entanto, a homogeneidade dessas preparações não foram demonstradas.

3.10. ESTEQUIOMETRIA DA REAÇÃO.

A análise dos dados da Tabela IV, mostra que a hidrólise enzimática de um mol de trealose, produz 2 moles de glucose, dosada

pelo método específico utilizando glucose oxidase e peroxidase. Resultados idênticos foram observados por vários autores em diferentes organismos, tais como: *Streptomyces hygroscopicus* (52), *Aspergillus oryzae* (57), *Saccharomyces cerevisiae* (86), *Humicola lanuginosa* (94) e invertebrados (61, 68, 100).

3.11. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

Conforme ilustra o gráfico da Fig. 10, a atividade trealásica é diretamente proporcional à quantidade de proteína existente no sistema de incubação, indicando ausência de inibidores ou ativadores na preparação enzimática. Nas condições experimentais, não ocorreu inibição pelo produto, o que pode ser visto pela linearidade da reação durante o decorrer de um longo tempo de incubação.

3.12. EFEITO DO PH NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA TREALASE INTRACELULAR.

Quando a trealase intracelular do fungo *Scopulariopsis brevicaulis* foi mantida em diferentes pHs, durante 17 horas a 49°C, a atividade enzimática permaneceu estável somente na faixa de pH entre 5,0 e 7,2. Em pH ácido (inferior a 5,0), a enzima sofreu inativação mais acentuada do que em pH alcalino (superior a 7,2). Quando pré-incubada em pH 10,4, cerca de 60% da sua atividade permanecia, ao passo que em pH 3,0 era de somente 30% (Fig. 11).

A enzima apresentou maior atividade catalítica sobre a trealose quando o sistema de reação continha tampão com pH entre 6,0 e 6,2 (Fig.11).

O pH ótimo, encontrado neste trabalho, possui um valor intermediário quando comparado com os dados citados na literatura,

para a trealase de microrganismos. Na maioria dos casos, a atividade máxima é atingida na faixa de pH que oscila entre 4,0 a 6,5 (15, 44, 53, 54, 64, 65, 71, 76, 86, 94, 117). Valores elevados (6,8 - 7,0) foram descritos para as leveduras híbridas (3) e de 7,5 para *Phycomyces blakesleeanus* (110) e *Mycobacterium smegmatis* (91).

São raros na literatura, os relatos da estabilidade da trealase frente a variação de pH. A enzima de *Candida tropicalis* (71) manteve-se com alta atividade na faixa de pH entre 4,5 e 5,3, sofrendo rápida inativação em pH alcalino. A trealase de *Trichoderma reesei* também sofreu inativação em pH 8,0. Em contraste, a trealase de leveduras híbridas (3) perdeu atividade em pH ácido e manteve-se estável na faixa de pH entre 7,0 e 8,0.

3.13. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA TREALASE.

A hidrólise enzimática da trealose aumentou gradativamente com a elevação da temperatura de incubação, atingindo um valor máximo em torno de 45°C (Fig. 12). Temperaturas superiores a 45°C levaram à inativação e, nas condições experimentais, a trealase perdeu cerca de 10% da sua atividade a 50°C e foi totalmente inativada a 70°C. A temperatura ótima calculada pela intersecção das duas retas do gráfico de ARRHENIUS foi de 46°C (Fig. 14). A atividade da trealase permaneceu constante, quando a enzima foi mantida entre 0 a 40°C na ausência do substrato e ocorreu a perda total de atividade quando a enzima foi mantida a 60°C durante 30 minutos (Fig. 12). Isto sugere um possível efeito protetor exercido pelo substrato (49), quando o mesmo está presente durante a incubação.

Toda a preparação enzimática foi mantida congelada e a enzima purificada não perdeu atividade durante os processos de congelamento e descongelamento, mantendo-se ativa pelo menos durante

o período de um ano.

A temperatura de máxima atividade observada no presente trabalho, é semelhante aos resultados descritos para *Dictyostelium discoideum* (16), *Saccharomyces cerevisiae* (86) e *Sclerotinia sclerotiorum* (119). Em leveduras híbridas (3) e *Pseudomonas fluorescens* (44), a temperatura ótima encontrada foi de 30°C com rápida inativação acima de 40°C. No entanto, foi verificado que em temperatura de 50°C a atividade trealásica de *Dictyostelium discoideum* (65), *Humicola lanuginosa* (94) e *Trichoderma reesei* (117) era favorecida. A trealase de camundongo (106) apresentou máxima atividade a 60°C. Porém, nesta temperatura 75% da atividade trealásica de *Dictyostelium discoideum* (15) foi perdida em 15 minutos. Em *Trichoderma reesei* (117) verificou-se a redução de 50% da atividade em menos de 2 minutos. A trealase de *Sclerotinia sclerotiorum* (119) era rapidamente inativada em temperatura superior a 50°C e inferior a 10°C. A enzima de *Pseudomonas fluorescens* (44) tem baixa estabilidade mesmo a 4°C.

Nas condições experimentais, quando a trealase de *Scopulariopsis brevicaulis* (fração de DEAE-celulose II) foi submetida a incubação a 55°C, apresentou um tempo de meia vida de 82 minutos. Em duas horas, 65% da sua atividade foi perdida (Fig. 13). Esta preparação não apresentou nenhuma atividade quando foi incubada em presença de maltose como substrato.

A inativação da trealase a 55°C tem sido descrita para *Dictyostelium discoideum* (15), *Saccharomyces cerevisiae* (86), *Phormia regina* (38), *Sclerotinia sclerotiorum* (119) e *Nosema apis* (112), cuja perda de atividade foi de 36, 40, 50, 60 e 100% respectivamente. Em 1963, HILL & SUSSMAN (54) sugeriram que a resistência da trealase de *Neurospora crassa* a temperatura de 60°C, poderia ser atribuída ao envolvimento da enzima na germinação, uma vez que a quebra de dormência pelo choque térmico requer temperatura elevada, na qual a enzima deve sobreviver. HECKER & SUSSMAN (49), em

1973, verificaram que a estabilidade da trealase a 65°C poderia ser aumentada, elevando-se a concentração da proteína-enzima, ou pela adição de polióis (glicerol, inositol, manitol, glucose e trealose) à preparação enzimática. Estes autores observaram ainda que a presença de parede de ascosporos, parede micelial purificada, glucanas ou poligalactosaminas ou ainda albumina do soro bovino protegem a trealase contra inativação térmica (50).

3.14. DETERMINAÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA TREALASE.

A velocidade da reação enzimática foi determinada em diferentes temperaturas. A energia de ativação, calculada pela representação gráfica de ARRHENIUS, foi de 12 kcal/mol (Fig. 14). O coeficiente de temperatura (Q_{10}) observado foi de 2,1 entre 27 e 37°C e 2,0 entre 30 e 40°C. Resultado idêntico de energia de ativação foi encontrado em trealase de *Dictyostelium discoideum* por KILLICK em 1983 (65). Outros autores reportaram valores entre 7,9 e 9,7 kcal/mol para leveduras híbridas (3), bactérias (44) e bicho-da-sêda (100). Energia de ativação mais elevada de 16,4 kcal/mol foi observada em *Melolontha vulgaris* (43)

3.15. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO.

A trealase intracelular do fungo *Scopulariopsis brevicaulis*, apresentou um comportamento cinético de Michaelis-Menten com K_m na ordem de 0,48 mM para a trealose e a sua velocidade máxima foi calculada em 48 μ mol de glucose liberada em um minuto (Fig. 15).

Valores semelhantes de K_m foram observados em micélios de *Neurospora crassa* (54), em *Saccharomyces cerevisiae* (64, 86), em *Humicola lanuginosa* (94) e em insetos (4, 38). Em microrganismos, são reportados valores de K_m que variam de 0,15 a 55 mM para

a trealase de *Neurospora tetrasperma* (49) e *Phycomyces blakesleeanus* (111) respectivamente. Valores intermediários de 1,2 mM foi encontrado em *Dictyostelium discoideum* (15, 65); em torno de 3,0 mM em *Aspergillus oryzae* (57), *Pullularia pullulans* (76) e *Trichoderma reesei* (117); 10,2 mM em leveduras híbridas (3); em torno de 20 mM em *Pseudomonas fluorescens* (44) e *Streptomyces hygroscopicus* (91).

3.16. EFEITO DOS CATIONS E OUTROS COMPOSTOS SOBRE A TREALASE.

Na Tabela V está sumarizado o efeito provocado pelos compostos iônicos, Tris e bloqueadores do grupamento sulfidril a sobre a atividade da trealase do fungo *Scopulariopsis brevicaulis*. Com exceção do Mg^{++} , todos os cations divalentes ensaiados apresentaram influência negativa e o grau de inibição foi crescente na seguinte ordem: Ca^{++} , Co^{++} ; Mn^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} e Hg^{++} .

Em virtude da interferência da maioria destes metais e do Tris no método de SOMOGYI & NELSON, a atividade enzimática foi determinada pela dosagem da glucose liberada, pelo método da Glucose-oxidase-Peroxidase, onde o efeito é praticamente nulo.

A ausência de inibição com o NEM e inibição do tipo não competitiva com Hg^{++} ($K_i=0,016$ mM), ambos conhecidos como bloqueadores do grupamento sulfidril a, podem indicar a ausência desse grupamento no sítio catalítico da enzima (41). No entanto, foi verificada inibição competitiva com PCMB ($K_i=0,11$ mM), outro composto com a capacidade de se ligar ao grupamento SH. Segundo a literatura (124), no centro catalítico da trealase, existe um sítio de ligação para o grupamento glucosil e outro para fenil. É possível que nesta trealase, o PCMB esteja ligado ao sítio de encaixe de fenil, impedindo dessa maneira, a complexação da enzima com o seu substrato sem nenhum envolvimento direto com o grupamento sulfidril a. NAKANO et al. (79) sugeriram uma mudança conformacional da trealase em presença

de bloqueadores do grupamento sulfidrila e que este grupo SH é importante na atividade e conformação da molécula da enzima.

BAR-GUILLOUX et al.(4) e SASAJIMA et al.(101) verificaram que nenhum grupamento sulfidrila está diretamente envolvido no sítio catalítico da trealase de *Melolontha vulgaris* e da enzima intestinal de rato.

O grau de inibição observado na trealase de *Scopulariopsis brevicaulis* com Tris é semelhante ao resultado descrito para *Dictyostelium discoideum* (65), onde foi constatada 28% de inibição com 100 mM desse composto. Em leveduras híbridas (3) foi observada inibição de 20% com a mesma concentração.

A inibição do tipo competitiva provocada em altas concentrações de Tris, apresentando K_i de 71 mM (Fig. 16B), difere dos resultados obtidos por SASAJIMA et al.(101), onde observaram inibição total com 10 mM em trealase de rato.

NAKANO et al.(79) afirmaram que os bloqueadores do grupamento SH inibem competitivamente a trealase e que pode ser desinibida em presença de ânions cloreto, brometo, iodeto e tiocianato (80).

Os compostos iônicos ou os bloqueadores de SH produzem efeito variável dependendo da procedência da enzima em estudo. A atividade da trealase de leveduras híbridas (3) não foi afetada pelo NaF (10 mM) e pelos cátions Fe^{++} , Fe^{+++} , Mg^{++} , Mn^{++} e Ca^{++} na concentração de 1 mM. Porém, totalmente inibida pelo Hg^{++} , Ag^{++} e Cu^{++} na mesma concentração.

O N-etilmaleimida (1 mM), iodoacetato de sódio (5 mM), PCMB (0,1 mM) e Hg^{++} (0,1 mM) não afetaram apreciavelmente a atividade trealásica de *Sclerotinia sclerotiarum* (119). No entanto, o N-etilmaleimida inibiu 50% da atividade em leveduras híbridas (3) com 0,5 mM e houve inativação total da enzima com PCMB a 0,2mM.

Discordando com os resultados do presente trabalho, há relatos em que o Mg^{++} atua como inibidor da enzima de leveduras

(86), ou que o Zn^{++} e o Ca^{++} tem pouco ou nenhum efeito sobre a trealase intestinal de rato (101), enquanto que o Mg^{++} , Mn^{++} e o Ca^{++} promoveram a ativação da trealase de *Phycomyces blakesleeanus* (110).

A análise das propriedades da trealase extracelular(93) e micelial de *Scopulariopsis brevicaulis* mostraram resultados semelhantes em relação ao K_m , estabilidade térmica, temperatura ótima, comportamento frente a variação de pH, especificidade, produtos da reação e efeito da fonte de carbono na produção da enzima.

Valores diferentes de ponto isoelétrico e de peso molecular foram observados entre as duas enzimas. A trealase extracelular foi focalizada em pH de aproximadamente 4,2. É possível que a variação no ponto isoelétrico seja em decorrência das técnicas empregadas para a sua determinação. O pI da enzima micelial foi obtido em coluna de meio líquido "LKB Ampholine Electrofocusing" e daquela liberada ao meio, pela eletroforese em gel de poliacrilamida (menos precisa).

O peso molecular de 590.000 encontrado para a trealase extracelular talvez seja resultante do elevado grau de glicosilação, uma vez que este fenômeno parece estar envolvido no processo de secreção de enzimas.

Além disso, a eletroforese em gel de poliacrilamida da preparação bruta micelial, mostrou duas bandas de atividade, sugerindo a existência de duas isoenzimas; o que não ocorre com a trealase extracelular (dados não mostrados).

É possível que a trealase micelial isolada, purificada e estudada no presente trabalho, que foi encontrada em maior quantidade durante a passagem em DEAE-celulose (Fig. 5), seja uma forma da enzima que após sofrer um processo de glicosilação poderia ser secretada, como ocorre com a invertase em leveduras (5).

É admissível que a forma da trealase que apresentou menor mobilidade eletroforética seja a verdadeira trealase intracelular. A sua detecção talvez tenha sido dificultada durante os processos de purificação, uma vez que se apresentava com pouca atividade trealásica. É possível ainda, que esta seja uma forma de baixa atividade que sofreria posteriormente algum processo de ativação, envolvendo talvez, uma fosforilação da proteína. A elucidação desta suposição requer estudos mais aprofundados, inclusive com a fração protéica que fora descartada em razão da ausência de atividade da mesma na última etapa de purificação (DEAE-celulose II).

3.17. EFEITO DA GLUCOSE E AMIDO NA PRODUÇÃO DA TREALASE EXTRACELULAR.

Os resultados da Tabela I sugerem que a síntese da trealase pode ser induzida, quando o fungo é cultivado em meio contendo amido como fonte de carbono e energia.

Com a finalidade de verificar o efeito indutor deste polissacarídeo, o microrganismo previamente crescido em glucose a 0,2% foi submetido a diferentes condições de cultivo.

As fontes de carbono como acetato e glicerol, que aparentemente não apresentam efeito repressor sobre a síntese de enzimas, não foram utilizadas para a pré-cultura do microrganismo, pois resultaram em crescimento muito pobre.

A Fig. 17A mostra que a velocidade de degradação do açúcar é dependente da condição experimental. Assim, em 8 horas, quando toda glucose é consumida, cerca de 25% do amido permanece no meio. A adição de cicloheximida juntamente com os açúcares levou à redução da velocidade de metabolização, possivelmente pela inibição da síntese das enzimas responsáveis pela degradação desses carboidratos.

Resultado semelhante foi observado em *Saccharomyces cerevisiae*, quando a liberação de dióxido de carbono foi reduzida em presença de cicloheximida no metabolismo de glucose (35) ou maltose (42).

Na fase inicial do experimento, onde se verificou maior consumo da fonte de carbono (Fig. 17A), notou-se o crescimento do fungo, porém, no período subsequente o peso da massa micelial manteve-se constante (Fig. 17B).

Observa-se na Fig. 18, que a atividade específica da trealase em presença de amido aumentou em função do tempo de incubação da cultura, tornando-se mais evidente após 12 horas, quando grande parte do polissacarídeo foi consumido (Fig. 17A).

A atividade trealásica do fungo cultivado em amido aumentou 35 vezes em relação ao nível inicial. Na presença de glucose não houve a elevação da atividade enzimática, porque não havia indutor no sistema. A adição da cicloheximida juntamente com o amido levou à redução da atividade trealásica, sugerindo a inibição da biossíntese protéica.

Em 24 horas, a atividade específica da trealase obtida do fungo cultivado em amido foi cerca de 14 vezes maior em relação àquela da glucose e de 6 a 7 vezes, quando a cicloheximida estava presente juntamente com estes carboidratos.

Quando o fungo foi cultivado em meio contendo glucose e cicloheximida, poder-se-ia esperar a redução mais acentuada do nível de trealase, uma vez que é conhecida a participação destes elementos impedindo a síntese protéica. No entanto, um fato curioso foi notado no sistema contendo os dois compostos, onde se observou ligeira elevação da atividade em relação àquele que continha apenas a glucose. Este fenômeno poderia sugerir a inibição de algum fator protéico responsável pelo efeito repressor da glucose.

Quando a pré-cultura do fungo foi efetuada em 0,2% de amido (substituindo a glucose) e transferidas para as mesmas condições

do experimento descrito anteriormente, foi observado um comportamento semelhante quanto ao perfil de consumo de açúcares (Fig.19A) e crescimento do microrganismo (Fig. 19B). Com relação a atividade específica (Fig. 20), em 24 horas, houve menor acréscimo (6 vezes) comparado ao nível inicial, em decorrência do sistema ter sido pré-induzido. Assim, a variação de atividade entre a enzima produzida em amido e em glucose foi de somente 3 vezes.

Em um sistema pré-induzido é de se supor que os RNAm responsáveis pela síntese da trealase já estejam sintetizados. Portanto, a adição de glucose ou de cicloheximida não deveria provocar efeitos muito significativos.

Na Fig. 20, pode-se observar que a adição de glucose parece ter um efeito repressor, uma vez que a atividade enzimática foi baixa, porém esse efeito poderia ser resultante da inibição do processo de secreção. A elucidação deste fenômeno requer estudos com a trealase intracelular.

Quando o amido foi adicionado juntamente com a cicloheximida, verificou-se a redução do consumo do polissacarídeo (Fig. 19A), talvez pela inibição da síntese das enzimas degradativas do amido, levando à limitação da fonte de energia para a liberação da trealase. Consequentemente, a atividade da enzima foi menor em presença do antibiótico.

O efeito da cicloheximida em presença da glucose, mostrou resultado contrastante, promovendo a liberação acentuada da enzima ao meio. Isto sugere, a utilização da glucose como fonte de energia para a secreção da enzima e o efeito inibitório da cicloheximida sobre a síntese de alguma proteína que impede a liberação da trealase.

FERGUSON et al.(35) observaram o fenômeno da inativação da malato desidrogenase em leveduras, quando a glucose foi adicionada ao sistema induzido. A adição simultânea de cicloheximida e a glucose, impediu esta inativação. No entanto, a adição posterior

do antibiótico, levou à redução da atividade enzimática. Fenômeno semelhante de redução da inativação provocado pela glucose, foi observado no sistema de consumo de maltose (42).

Um ligeiro aumento na atividade trealásica observado no presente trabalho, quando o fungo foi incubado com glucose, ocorreu após o esgotamento do açúcar. Fenômeno semelhante foi verificado com α -galactosidase de *Saccharomyces carlsbergensis* (69).

3.18. EFEITO DA GLUCOSE E CICLOHEXIMIDA NA INDUÇÃO DA TREALASE

De posse dos resultados obtidos na Fig. 18 e 20, com a trealase extracelular, novos experimentos foram programados com a finalidade de observar o fenômeno da repressão pela glucose e efeito da cicloheximida sobre a síntese e secreção da trealase pelo fungo *Scopulariopsis brevicaulis*.

Quando o fungo cultivado em glucose a 0,2% foi transferido para o meio contendo amido, ocorreu um aumento da trealase extra (Fig. 22A) e intracelular (Fig. 22B). A produção da enzima tornou-se mais evidente após 15 horas, quando cerca de 75% do indutor foi consumido (Fig. 21A). Neste período, o crescimento do microrganismo entrou na fase estacionária, porém, a adição de glucose provocou o desenvolvimento do fungo conforme esperado (Fig. 21B).

A adição de glucose na concentração de 0,2%, no sistema induzido, interrompeu a síntese da trealase seguido de uma fase em que a enzima foi sintetizada com velocidade inferior ao do controle (Fig. 22A). Este fenômeno é conhecido como repressão "transiente" e foi observado na síntese de α -galactosidase em *Saccharomyces carlsbergensis* (69). A síntese e a secreção dessa α -galactosidase foi reprimida com 0,045% de glucose (69).

A síntese da invertase em *Saccharomyces cerevisiae* foi reprimida catabolicamente pela glucose ao nível de transcrição, tradução e pelo aumento da velocidade de degradação do RNAm sem

interferir com a glicosilação e secreção da enzima (32). Em contradição, outros trabalhos indicam que a glucose controla o nível intracelular dessa enzima, pela limitação de glicosilação, tornando-a mais suscetível à inativação proteolítica (23).

A redução da atividade da α -glucosidase de leveduras, observada pela adição da glucose, parece ser também ocasionada pela inativação da enzima (37). A completa inibição pela hexose na síntese da maltase em *Saccharomyces carlsbergensis*, ocorreu ao nível de transcrição e da estabilidade do RNAm, sem afetar no entanto, a atividade da enzima (34).

A substituição do amido pela maltose como fonte de carbono, na indução da síntese da trealase pelo *Scopulariopsis brevicaulis*, resultou em comportamento semelhante ao do amido quanto aos perfis de consumo de açúcares (Fig. 23A), de crescimento (Fig. 23B) e de produção enzimática (Fig. 24).

Quando a pré-cultura do microrganismo foi feita em glucose a 1%, foi observado menor aumento na massa micelial no início da indução. Porém, a produção da enzima foi prejudicada.

A análise destes resultados reforça as observações da Tabela I, onde foi verificada a maior eficiência do amido como indutor da síntese da trealase. No entanto, a menor atividade específica observada, quando o microrganismo foi cultivado em maltose (Fig. 24), talvez seja decorrente do sistema que se encontrava reprimido, em virtude da elevada concentração de glucose utilizada na pré-cultura.

Uma vez que a cicloheximida bloqueou o aumento da trealase intracelular, pode indicar que a produção da enzima em presença de amido (Fig. 22B) ou maltose (Fig. 24B) é dependente da síntese "de novo" e não da ativação de uma proteína pré-existente.

Partindo da premissa de que o amido é um composto inacessível como indutor, é provável que algum produto da sua degra-

dação seja responsável pelo estímulo na produção da trealase.

A análise da Tabela I, mostrou que a utilização da dextrina (Nidex) como fonte de carbono, resultou no aumento da síntese da trealase, porém, a quantidade de enzima produzida foi maior em presença de amido. A maltose, mostrou ser bastante eficiente na produção dessa enzima, podendo sugerir dessa maneira, ser essa hexose, um possível oligossacarídeo responsável pelo estímulo na síntese da trealase quando o microrganismo é cultivado em meio contendo amido. Porém, a elucidação do verdadeiro indutor da síntese da trealase, requer melhores estudos.

O estudo comparativo das propriedades da trealase intracelular e extracelular, bem como o perfil de atividade das duas enzimas durante o processo de indução da síntese enzimática, mostraram ser semelhantes. A existência de uma mesma enzima dentro da célula e no meio de cultura, possibilita o melhor aproveitamento da fonte de enzima, proporcionando maior rendimento na obtenção da trealase. Essa enzima purificada, pode ser utilizada como instrumento para a determinação quantitativa do teor de trealose bem como na determinação estrutural de carboidratos.

Tabela I - EFEITO DA FONTE DE CARBONO SOBRE O CRESCIMENTO DO FUNGO *Scopulariopsis brevicaulis* E A PRODUÇÃO DA TREALASE E MALTASE.

FONTE DE CARBONO	PESO SECO (mg/50ml)	ATIVIDADE ESPECÍFICA			
		TREALASE		MALTASE	
		Intra-celular	Extra-celular	Intra-celular	Extra-celular
Acetato	12,0	0,20	0,08	0,25	0,43
CMC	0,7	0,01	0,13	0,14	0,43
Etanol	17,0	0,02	0,21	0,01	0,00
Celobiose	54,0	0,30	0,03	0,25	0,33
Melibiose	54,0	0,12	0,27	0,57	1,40
Trealose	52,0	0,68	1,12	0,58	4,12
Sacarose	50,0	0,88	0,80	0,98	2,13
Glucose	43,0	0,57	0,36	0,57	0,71
Dextrosol*	45,0	0,54	0,50	0,51	1,00
Karo*	39,0	1,48	1,00	1,85	2,46
Maltose	40,0	1,45	1,07	2,96	4,00
Maltose*	47,0	1,54	0,86	3,50	2,90
Nidex*	54,0	0,84	1,21	2,54	5,00
Amido	48,0	1,58	1,73	3,30	6,33

* - Produto comercial

* - Grau prático

O crescimento do fungo foi efetuado pela incubação de 4×10^6 esporos em 50 ml de meio líquido contendo 0,2% de diversas fontes de carbono a 28°C com agitação de 120 rpm durante 60 horas, exceto a cultura em etanol e CMC(100 horas). A atividade enzimática foi determinada pela dosagem da glucose liberada pela hidrólise da trealose e maltose respectivamente pelo método de SOMOGYI & NELSON e Glucose-oxidase-Peroxidase.

Tabela II - TABELA DE PURIFICAÇÃO DA TREALASE MICELIAL DE *Scopulariopsis brevicaulis*

ETAPAS DE PURIFICAÇÃO	U* ml ENZ.	PROTEÍNAS (mg/ml)	ATIVIDADE ESPECIFICA	U* TOTALIS	PURIFI- CAÇÃO	RENDI- MENTO (%)
Extrato bruto	4,3	8,36	0,5	559	1	100
Sulfato de protamina	4,2	1,35	3,1	538	6	96
Sephadex G-100	2,3	0,39	5,9	494	12	88
DEAE-celulose I	69,0	0,70	98,6	338	197	60
DEAE-celulose II	67,0	0,37	181,1	288	362	51

U* - Unidades de Enzima (μmol de glucose liberada.min⁻¹)

Atividade específica - Unidades de enzima/mg de proteína

Tabela III - ESPECIFICIDADE DA ENZIMA

SUBSTRATO	ATIVIDADE RELATIVA (%)			
	E. bruto	S. G-100	DEAE I	DEAE II
Trealose	100	100	100	100
Celobiose	5	0,8	0	0
Isomaltose	71	48	0	0
Sacarose	4	0	0	0
Maltotriose	34	23	4	0
Gentiobiose	20	6	0	0
Estaquiose	0	0	0	0
Maltose	122	222	3	0
Melibiose	4	0	0	0
Rafinose	2	0	0	0
Lactose	0,8	0	0	0
Amido	33	83	0	0
Trealose-6-fosfato	-	-	-	0
PNPG	-	-	-	0
CMC	0,6	0	0	0

PNPG - p-Nitrofenil- α -D-glucosídeo

CMC - Carboximetil celulose sódico

O sistema de reação contendo 0,07 μ g de proteína, 12,5 mM de substrato com exceção de trealose-6-fosfato (18,3 mM), amido (0,5 mg) e CMC (0,5 mg) em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 em um volume de 200 μ l foi incubado a 40°C. A glucose liberada foi medida pelo método da Glucose-oxidase-Peroxidase, exceto para o PNPG (46).

Tabela IV- ESTEQUIOMETRIA DA REAÇÃO

TREALOSE (μmol)	GLUCOSE LIBERADA (μmol)	
	30 min	60 min
1,1	2,1	2,1
2,1	4,0	4,1
3,1	6,1	6,0

O sistema de reação de 0,5 ml que continha 1 unidade de enzima e diferentes concentrações de trealose em 50 mM de tampão fosfato pH 6,0 foi incubado a 40°C. Nos tempos determinados, uma alíquota foi coletada e a trealose foi medida pela técnica de dosagem de açúcares totais (30) e a glucose liberada pelo método da Glucose-oxidase-Peroxidase.

Tabela V - EFEITO DOS CATIONS E OUTROS COMPOSTOS SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO (mM)	% INIBIÇÃO
Controle	-	0
Zn ⁺⁺	5	60
Co ⁺⁺	5	55
Mn ⁺⁺	5	56
Ca ⁺⁺	5	43
Fe ⁺⁺	5	76
Mg ⁺⁺	5	0
Cu ⁺⁺	5	85
Hg ⁺⁺	0,05	100
NEM	10	0
PCMB	1	58
Tris	50	16

NEM- N-etilmaleimida

PCMB- p-cloro-mercuribenzoato de sódio

Tris- Tris(hidroximetil)aminometano

A enzima foi previamente incubada em presença destes compostos durante 10 minutos em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Posteriormente 5 mM de trealose foi adicionada e incubada a 40°C. A glucose liberada foi medida pelo método da Glucose-oxidase-Peroxidase.

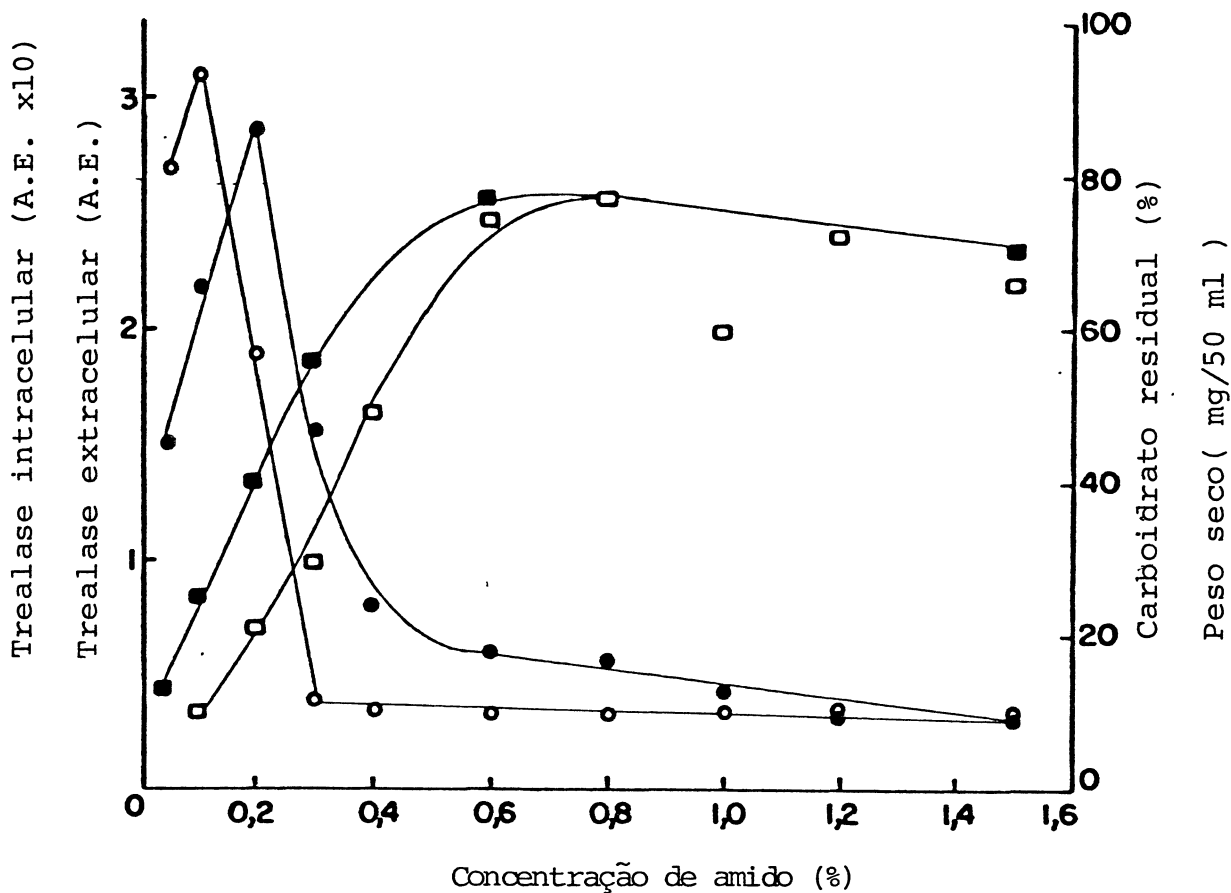


Fig. 1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO NA PRODUÇÃO DA TREALASE PELO *Scopulariopsis brevicaulis*.

Os esporos do fungo *Scopulariopsis brevicaulis* (4×10^6 células) foram crescidos durante 48 horas em meio de MARKUS contendo diferentes concentrações de amido. A atividade enzimática foi determinada pela incubação da enzima a 40°C em tampão fosfato 50mM pH 6,0 com 25 mM de trealose em um sistema de $200\mu\text{l}$. O açúcar reductor liberado foi dosado pelo método de SOMOGYI & NELSON e a proteína pelo de LOWRY et al.

Símbolos: ■-■ - peso seco; ○-○ - trealase intracelular; ●-● - trealase extracelular; □-□ - carboidrato residual.

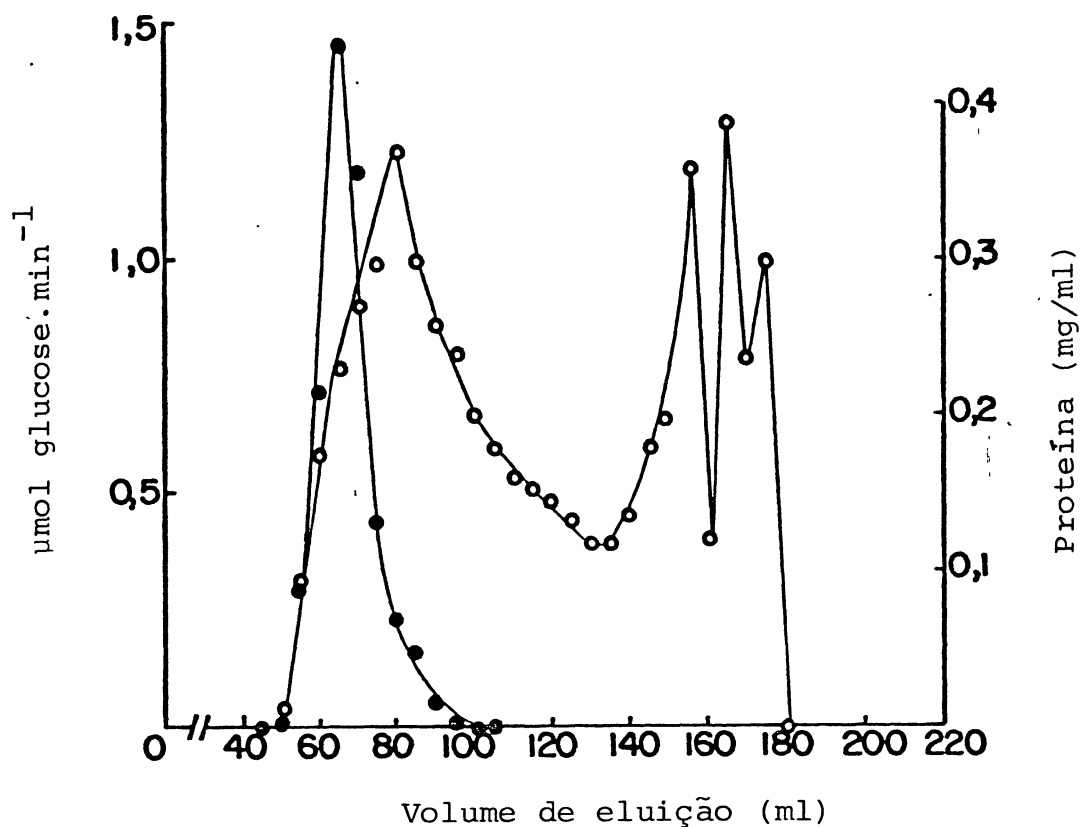


Fig. 2 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA TREALASE NA FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-100.

O extrato bruto (130ml) tratado com sulfato de protamina foi aplicado (20ml) em uma coluna de Sephadex G-100 (3,5 x 21cm) previamente equilibrada com tampão fosfato 5mM, pH 6,6. A eluição foi efetuada com tampão de equilíbrio. Aliquota de 25 μ l de cada fração foi incubada em presença de 2,5mM de trealose em 50mM de tampão fosfato pH 6,0 em um sistema de 200 μ l a 40°C. A glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI & NELSON e as proteínas pelo de WARBURG & CHRISTIAN. Símbolos: ●—● - trealase intracelular; ○—○ - proteínas.

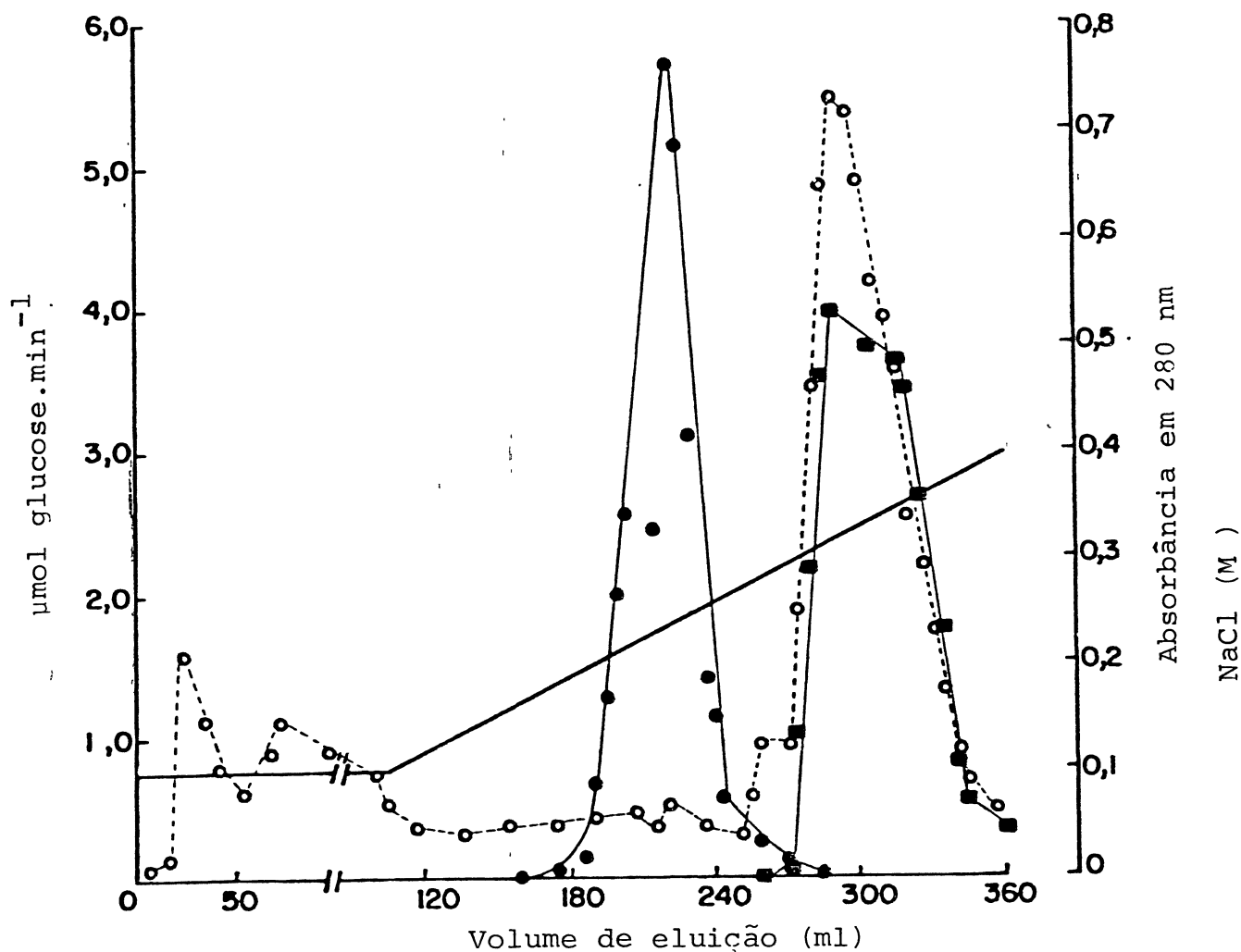


Fig. 3 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA TREALASE EM CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-CELULOSE I.

A preparação enzimática obtida da filtração em gel (100 ml) foi aplicada em coluna de DEAE-celulose (1,9 x 11 cm) e eluída com gradiente linear de NaCl conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. A-líquota de 10 µl da enzima foi incubada com 2,5 mM de trealose ou 10 mM de maltose em 50 mM de tampão fosfato pH 6,0. A glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI & NELSON ou da Glucose-oxidase-Peroxidase respectivamente. Simbolos: — - Gradiente de NaCl; O-O - proteínas; ●-● trealase; ■-■ maltase.

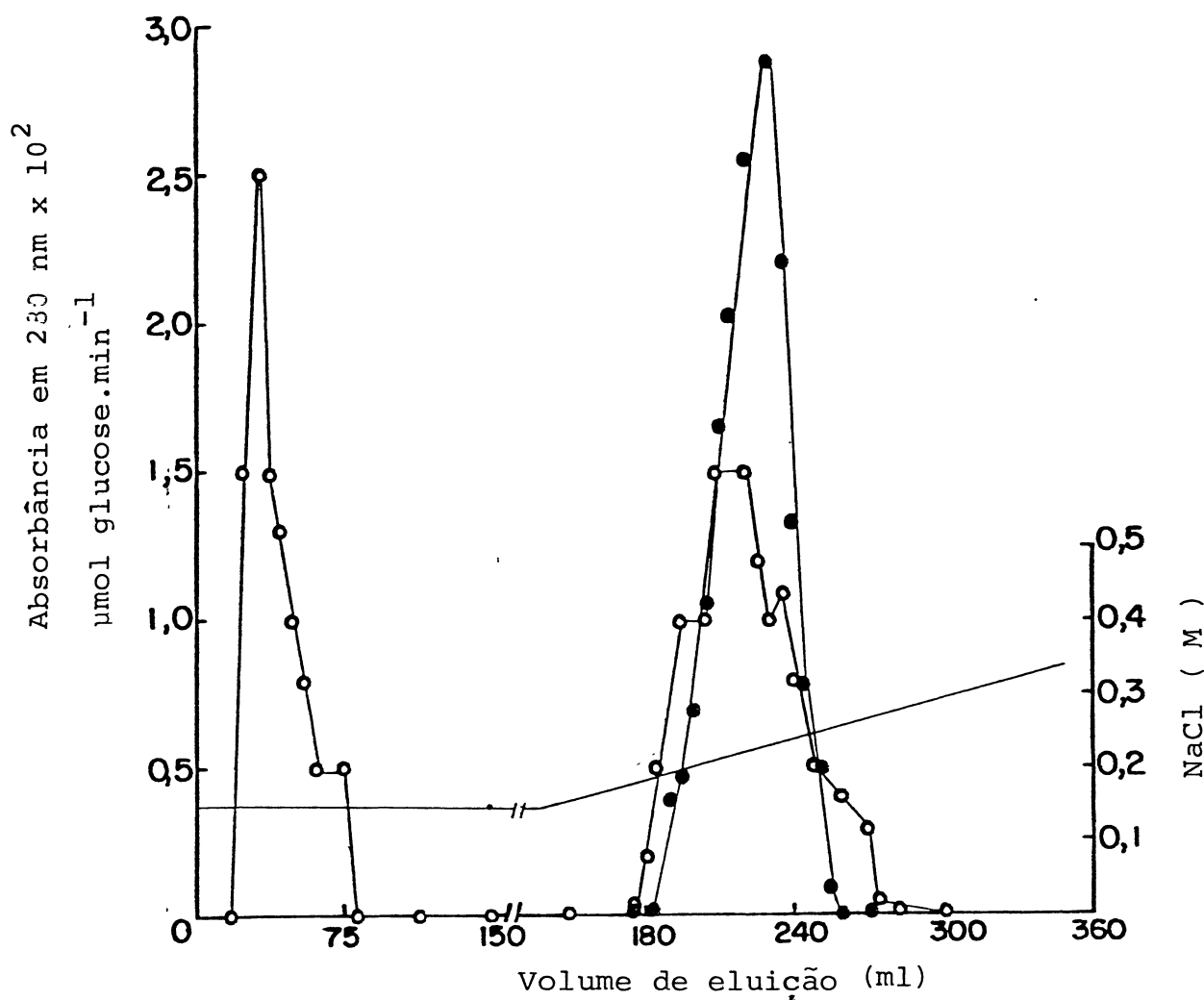


Fig. 4 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA TREALASE EM DEAE-CELULOSE II.

A fração enzimática obtida de DEAE-celulose I(2,3ml) foi recromatografada em DEAE-celulose, efetuando-se a lavagem da coluna(1,9x 11cm) com tampão fosfato 5mM, pH 6,6 contendo 0,15M de NaCl. A eluição foi feita com gradiente de NaCl de 0,15 a 0,4M no mesmo tampão. A atividade enzimática foi determinada pela incubação de 10µl da enzima com 2,5mM de trealose em tampão fosfato 50mM pH 6,0 em um volume final de 200µl a 40°C. A glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI & NELSON. Simbolos: — - gradiente de NaCl; ○ — proteínas; ● — trealase.

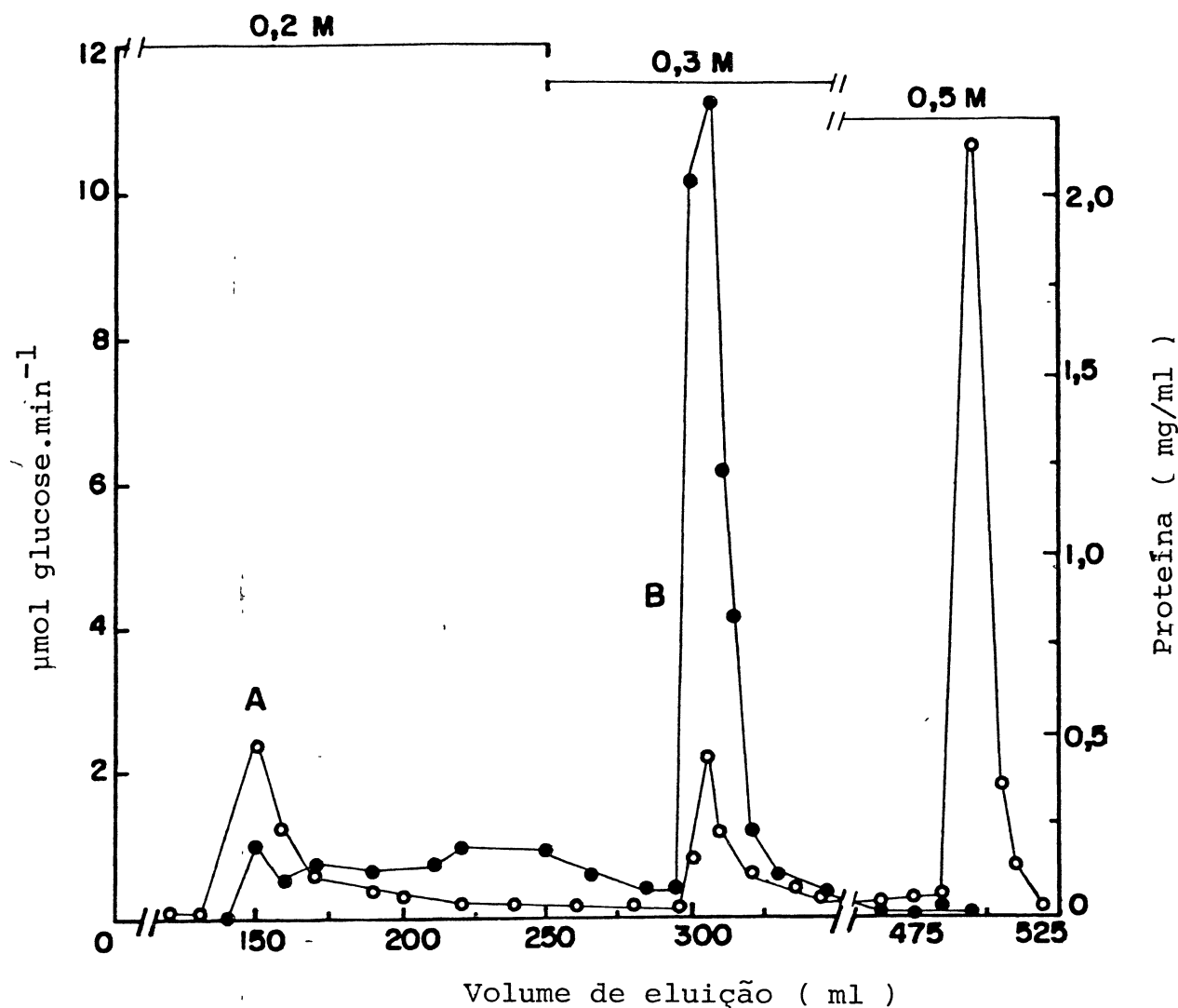


Fig. 5 - CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE. ELUIÇÃO DA TREALASE POR ETAPAS COM CONCENTRAÇÃO CRESCENTE DE NaCl.

Em uma coluna de DEAE-celulose (1,8 x 27cm) previamente equilibrada com tampão fosfato 5mM, pH 6,6, foi aplicada 420 unidades de trealase parcialmente purificada em Sephadex G-100. Após a lavagem da coluna com tampão de equilíbrio, foi efetuada a eluição da trealase por etapas utilizando concentração crescente de NaCl (0,2-0,5 M) no mesmo tampão (200 ml). Foram coletadas frações de 5 ml que foram analisadas quanto ao teor protéico pelo método de WARBURG & CHRISTIAN e a atividade trealásica pelo método convencional conforme descrito no item 2.9 de MATERIAIS E MÉTODOS.

Símbolos: ●—● - trealase micelial; ○—○ - proteínas.

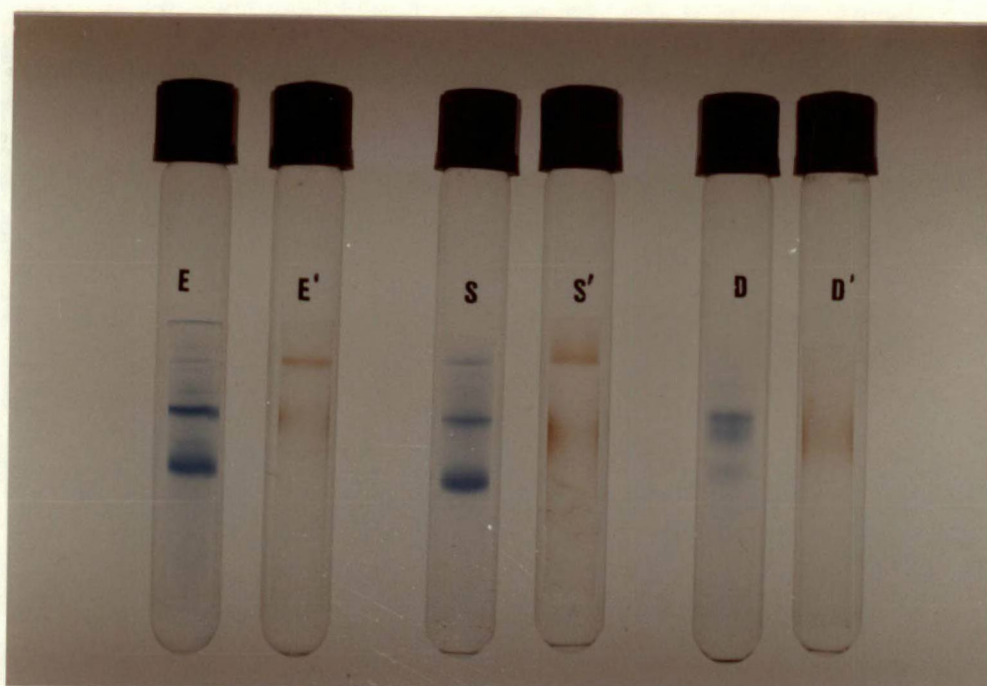


Fig. 6 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

A eletroforese foi efetuada em gel a 7% em tampão Tris-acetato 100 mM, pH 7,2 durante 4 horas a 4°C com 5 mA/gel. A revelação das proteínas foi feita com "Coomassie Brilliant Blue"G-250 e a atividade trealásica pela incubação do gel com Glucose-oxidase-Peroxidase contendo 10 μ moles de trealose a 40°C.

E e E' - Extrato bruto - 400 μ g de proteína;

S e S' - Sephadex G-100 - 40 μ g de proteína;

D e D' - DEAE-celulose II - 19 μ g de proteína.

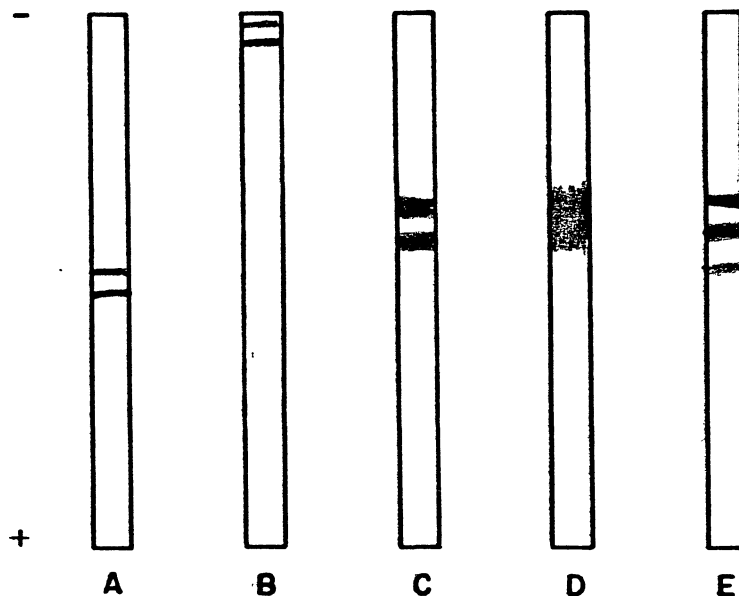


Fig 7 - DIAGRAMA DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA A DETECÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS.

A eletroforese foi executada em gel a 7% utilizando tampão is-acetato 100 mM, pH 7,2 durante 4 horas com 5mA/gel. As glicoproteínas foram reveladas utilizando timol e ácido sulfúrico(96).

- A- Ovoalbumina - 50 µg de proteína;
- B- Tireoglobulina - 50 µg de proteína;
- C- Trealase micelial (DEAE-celulose II)- 19 µg de proteína;
- D- Trealase micelial (DEAE II) - 19 µg, revelado com GOP;
- E- Trealase micelial (DEAE II) - 19 µg, revelado com "Coomassie Brilliant Blue" G-250.

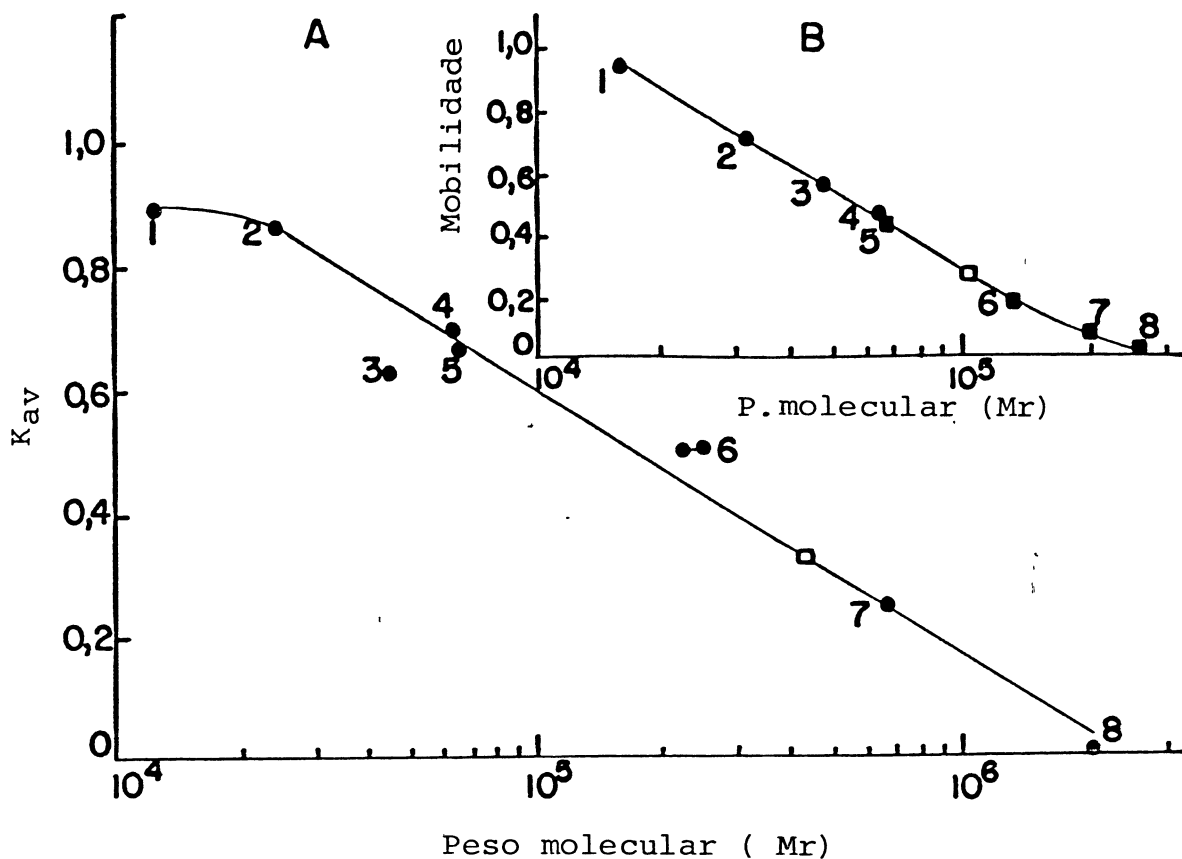


Fig. 8 - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA TREALASE INTRACELULAR DE *Scopulariopsis brevicaulis*.

A - Filtração em coluna (1 x 62 cm) de Bio-gel A-1,5 m e equilibrada e eluída com tampão fosfato 5 mM, pH 6,6 contendo 0,9% de NaCl. Padrões utilizados: 1- Citocromo c (12.400); 2- Tripsina (23.800); 3- Ovoalbumina (45.000); 4- Hemoglobina (64.000); 5- Albumina do soro bovino (67.000); 6- Catalase (230.000 - 250.000); 7- Tireoglobulina (669.000) e "Blue Dextran" ($2 \cdot 10^6$).

B - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS empregando a proteína dissociada. A trealase utilizada foi obtida da isoeletrofocalização, que se mostrou homogênea quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida. Padrões empregados: ● - Hemoglobina (1- 16.000; 2- 32.000; 3- 48.000; 4- 64.000); ■ - Albumina do soro bovino (5- 66.000; 6- 132.000; 7- 198.000; 8- 264.000).

□ - Trealase micelial purificada.

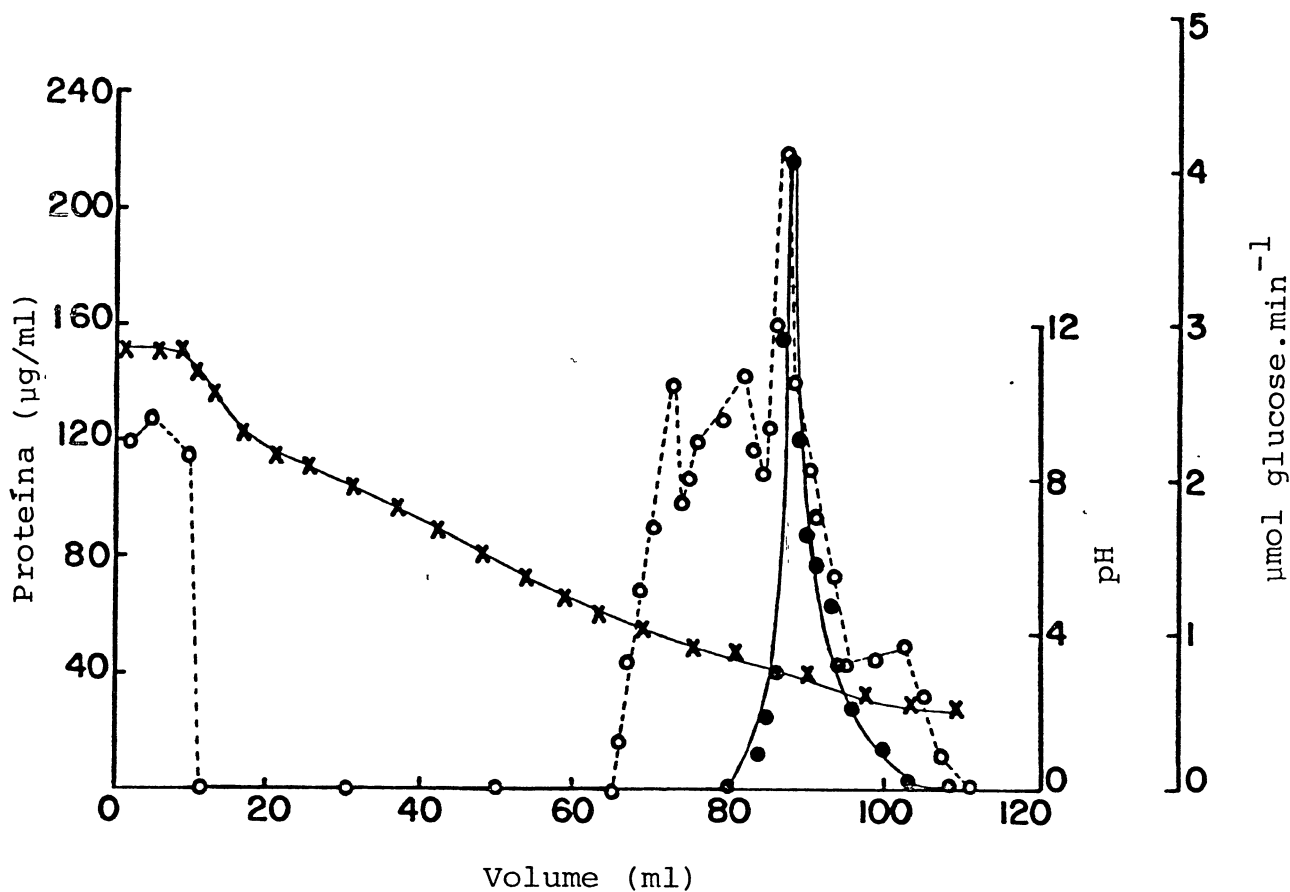


Fig. 9 - DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DA TREALASE.

A isoeletrofocalização foi efetuada em coluna (LKB) com 110 ml de capacidade durante 48 horas a 4°C a 400 V, utilizando anfolina na concentração de 1% com pH na faixa de 3,0 a 10,0. A atividade enzimática foi determinada pelo método convencional e a proteína pela técnica descrita por WARBURG & CHRISTIAN.

Símbolos: ●-● - trealase; O-O - proteínas; x-x - pH.

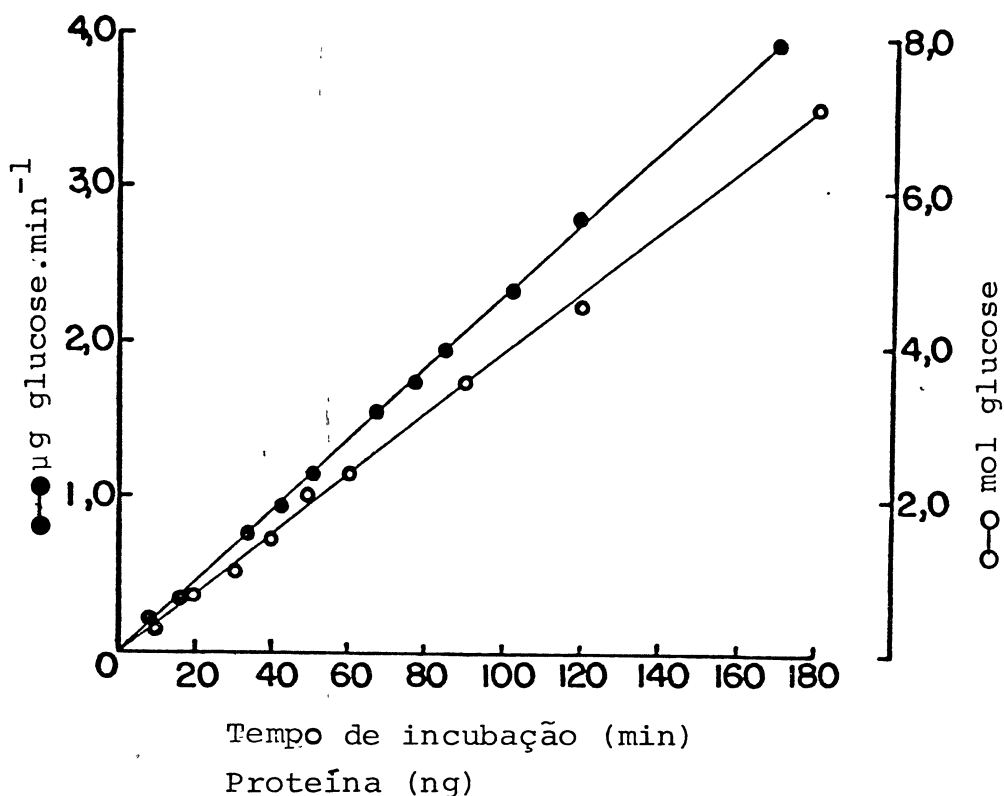


Fig. 10 - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA.

O sistema de reação de 6 ml contendo 0,7 µg de proteína em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 com 25 mM de trealose foi incubado a 40°C durante 180 minutos. Nos tempos indicados, amostras foram coletadas e a atividade trealásica foi determinada.

O efeito da concentração de proteína foi verificada pela incubação de quantidade crescente de proteína em um sistema de 200 µl contendo 25 mM de trealose e 50 mM de tampão fosfato pH 6,0 durante 15 minutos a 40°C. A glucose liberada foi dosada pelo método de SOMOGYI & NELSON. Símbolos: ●-● - efeito da concentração de proteína; ○-○ - efeito do tempo de incubação.

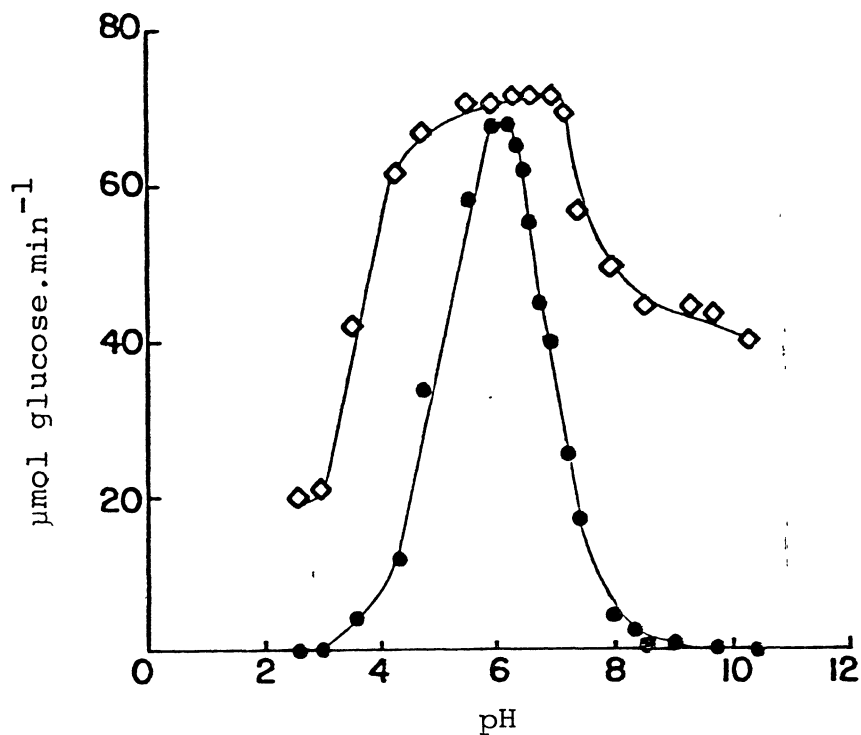


Fig. 11 - EFEITO DO PH NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA TREALASE.

A estabilidade da trealase à variação de pH foi verificada incubando-se 0,6 μg de enzima durante 17 horas a 4°C com 50 μl de tampões (0,1 M) com diferentes pHs (2,6 - 10,4) em um volume de 150 μl . O pH de uma alíquota foi ajustado para 6,0 com tampão fosfato 0,2 M, com subsequente adição do substrato para a determinação da atividade. O pH ótimo foi determinado pela incubação de 0,6 μg de proteína, 5 μmoles de trealose e 50 μl de tampão 0,1 M (pH 2,6-10,4) em um volume final de 150 μl a 40°C durante 30 minutos. O pH de uma alíquota foi ajustado para 6,0 e o açúcar redutor liberado foi medido pelo método de SOMOGYI & NELSON.

Tampões utilizados: t. McIlvaine(2,6-7,0); t. fosfato(7,0-8,0); t. ácido bórico/bórax(8,0-8,6) e t. glicina/NaOH (8,6-10,4).

Símbolos: ●—● - curva de pH; ◇—◇ - curva de estabilidade

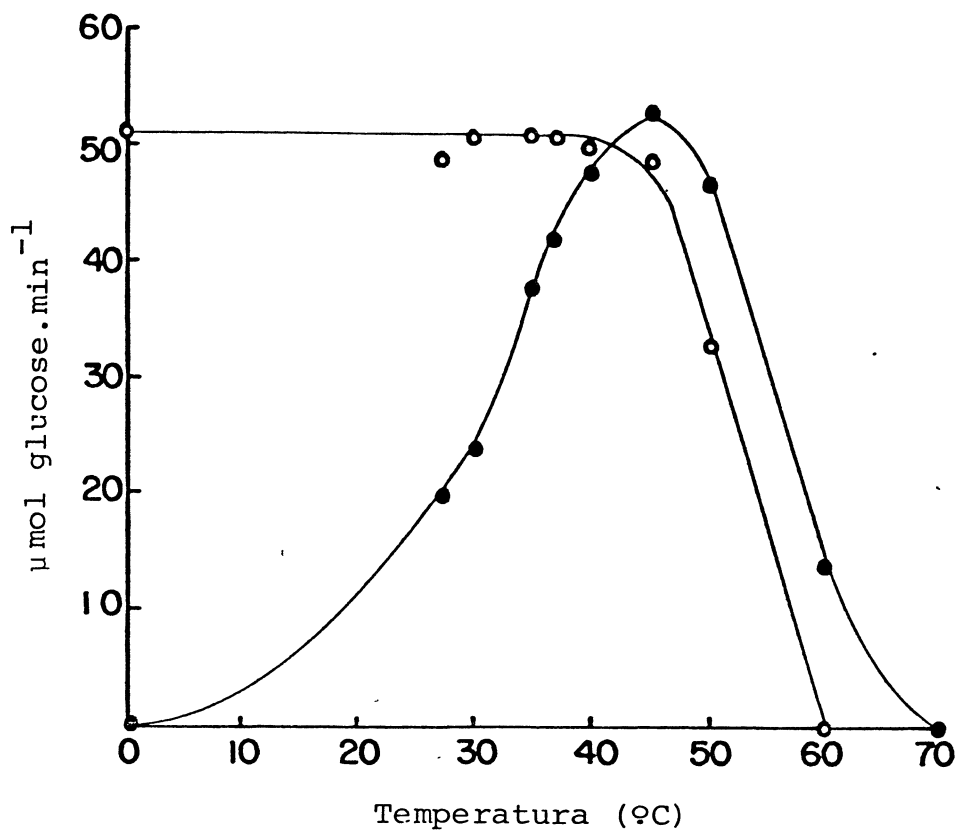


Fig. 12 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA TREALASE.

A enzima (0,03 µg) foi incubada durante 30 minutos em diferentes temperaturas em um sistema de 200 µl contendo 25 mM de trealose e 50 mM de tampão fosfato pH 6,0.

A estabilidade da enzima foi determinada fazendo-se uma pré-incubação de 0,03 µg de proteína com 50 µl de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 em um volume de 150 µl durante 30 minutos em diferentes temperaturas antes da adição de 5 µmoles de substrato. O açúcar redutor liberado foi medido pelo método de SOMOGYI & NELSON.

Símbolos: ●-● - curva de temperatura; ○-○ - curva de estabilidade enzimática.

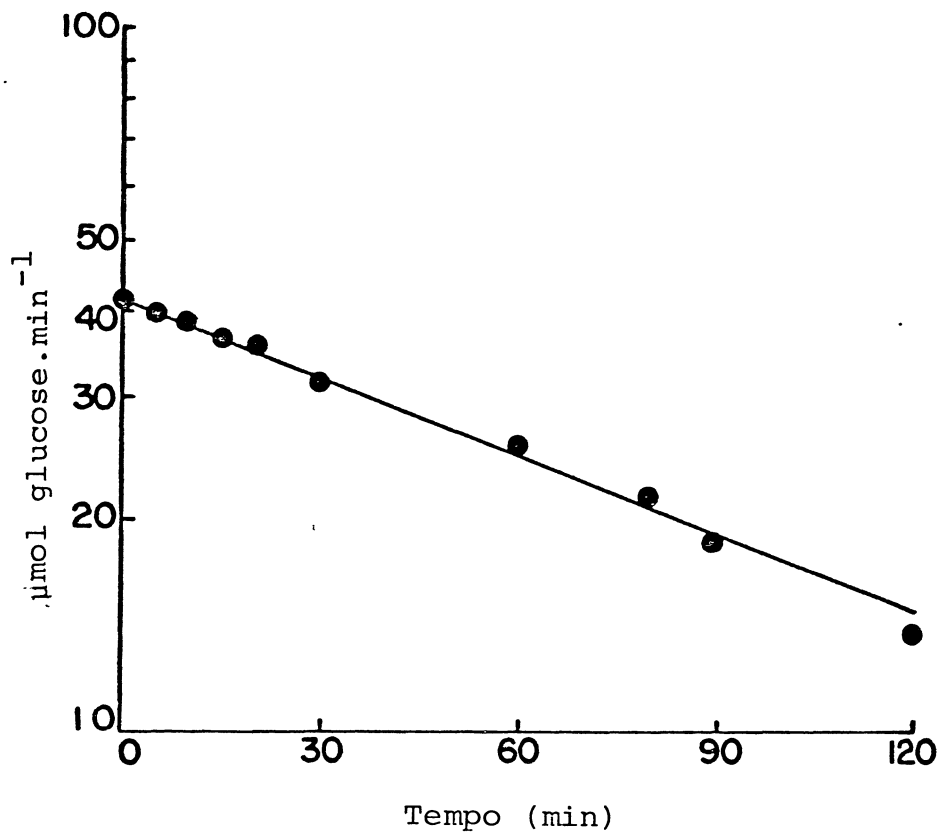


Fig. 13 - INATIVAÇÃO TÉRMICA DA TREHALASE.

A enzima (10 µg) foi incubada a 55°C durante duas horas em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 em um volume de 3 ml. Nos tempos especificados, uma alíquota foi retirada para se determinar a atividade enzimática sobre 25 mM de trealose e maltose. A glucose liberada após a incubação a 40°C foi medida pelo método da Glucose-oxidase.

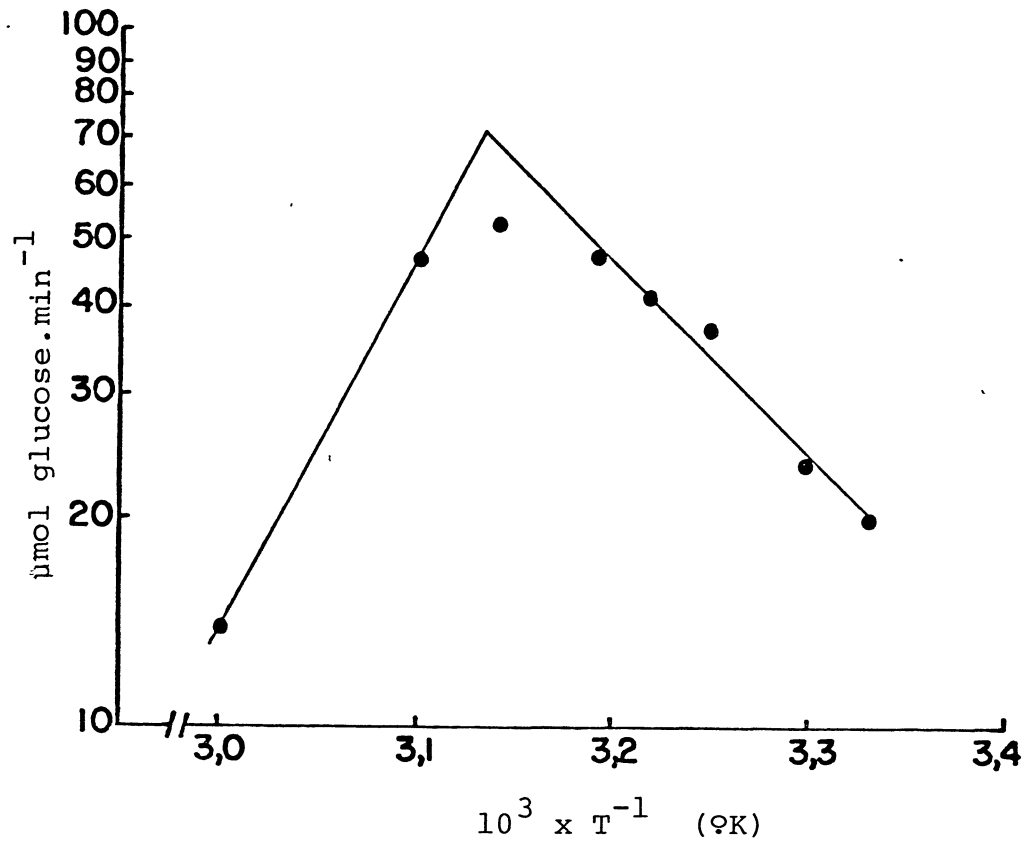


Fig. 14 - DETERMINAÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA TREALOSE.

A enzima (0,03 μg) foi incubada com 25 mM de trealose em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 (200 μl) em diferentes temperaturas durante 30 minutos. A glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI & NELSON. A energia de ativação foi calculada pelo gráfico de ARRHENIUS.

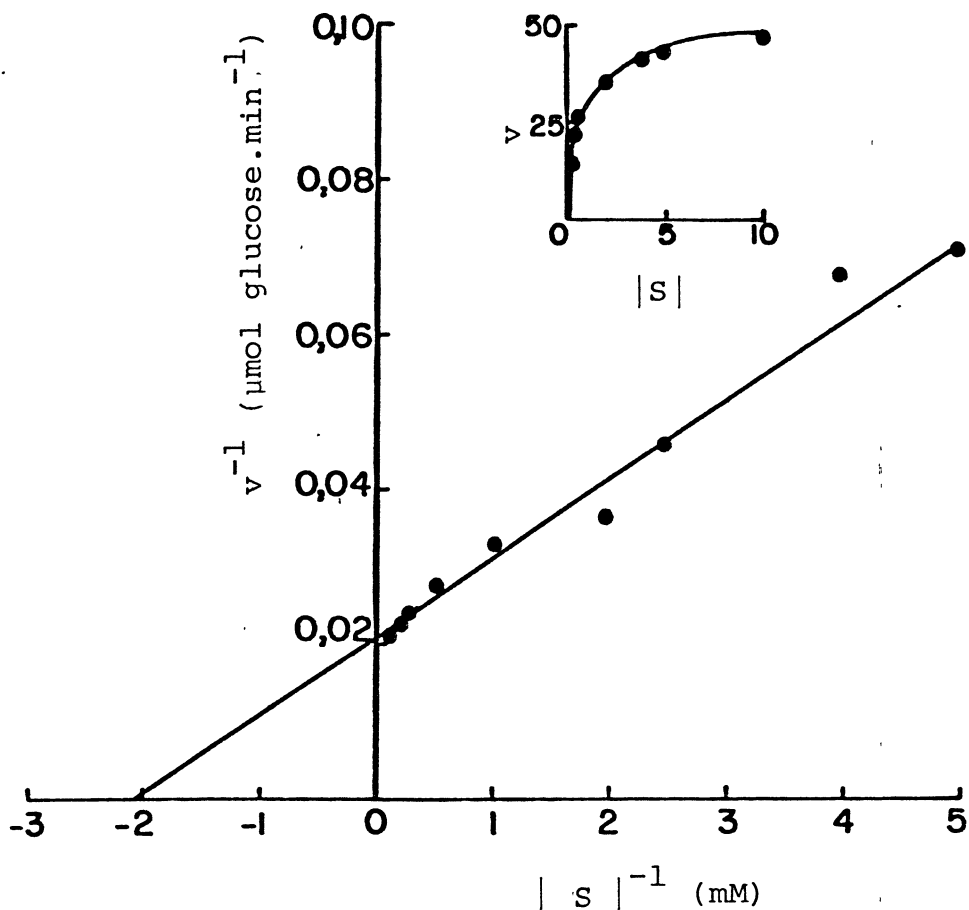


Fig. 15 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA TREALASE.

A enzima (0,05 μg de proteína) foi incubada a 40°C em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 contendo concentração variável de trealose (0,2 - 10 mM) em um volume total de 200 μl . O açúcar redutor liberado foi dosado pelo método de SOMOGYI & NELSON. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima foram calculadas pela representação gráfica de LINEWEAVER-BURK.

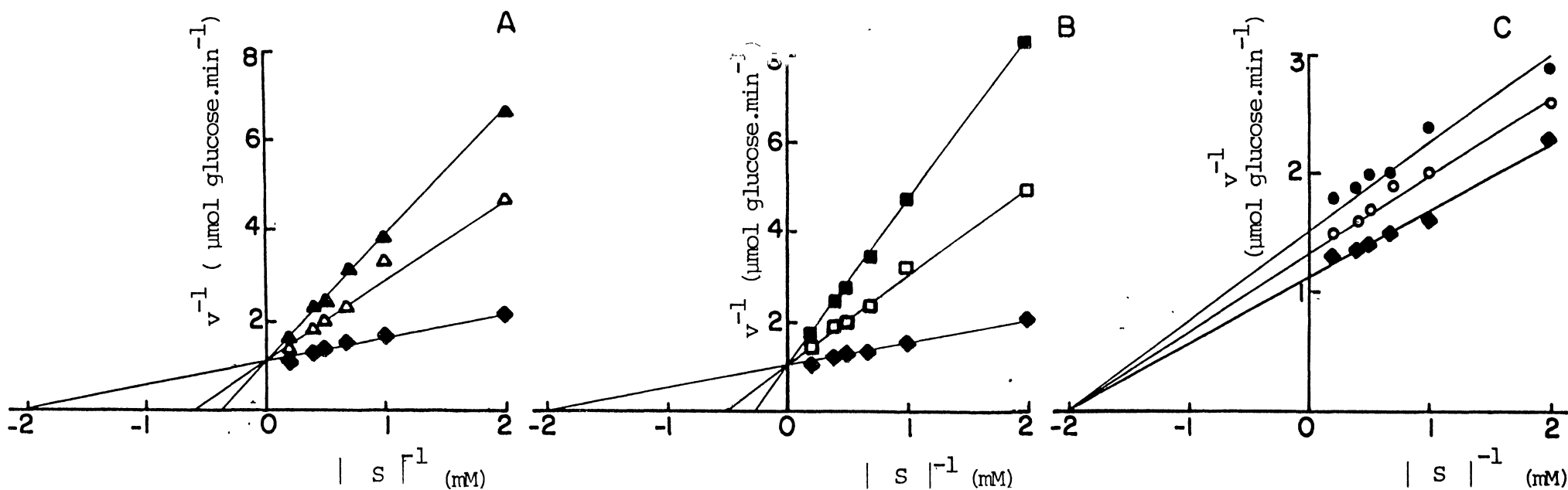


Fig. 16 - INIBIÇÃO DA TREALASE DO FUNGO *Scopulariopsis brevicaulis*.

Após a pré-incubação da enzima durante 10 minutos com os inibidores, a atividade trealásica foi determinada utilizando concentração variada de substrato (0,5 - 5,0 mM).

Símbolos: A- PCMB 0,25 mM Δ - Δ ; 0,50 mM \blacktriangle - \blacktriangle ; B- Tris 0,2M \square - \square , 0,5 M \blacksquare - \blacksquare ; C- Hg^{++} 2,5 μM \circ - \circ , 4,0 μM \bullet - \bullet ; Sem adição do inibidor \blacklozenge - \blacklozenge .

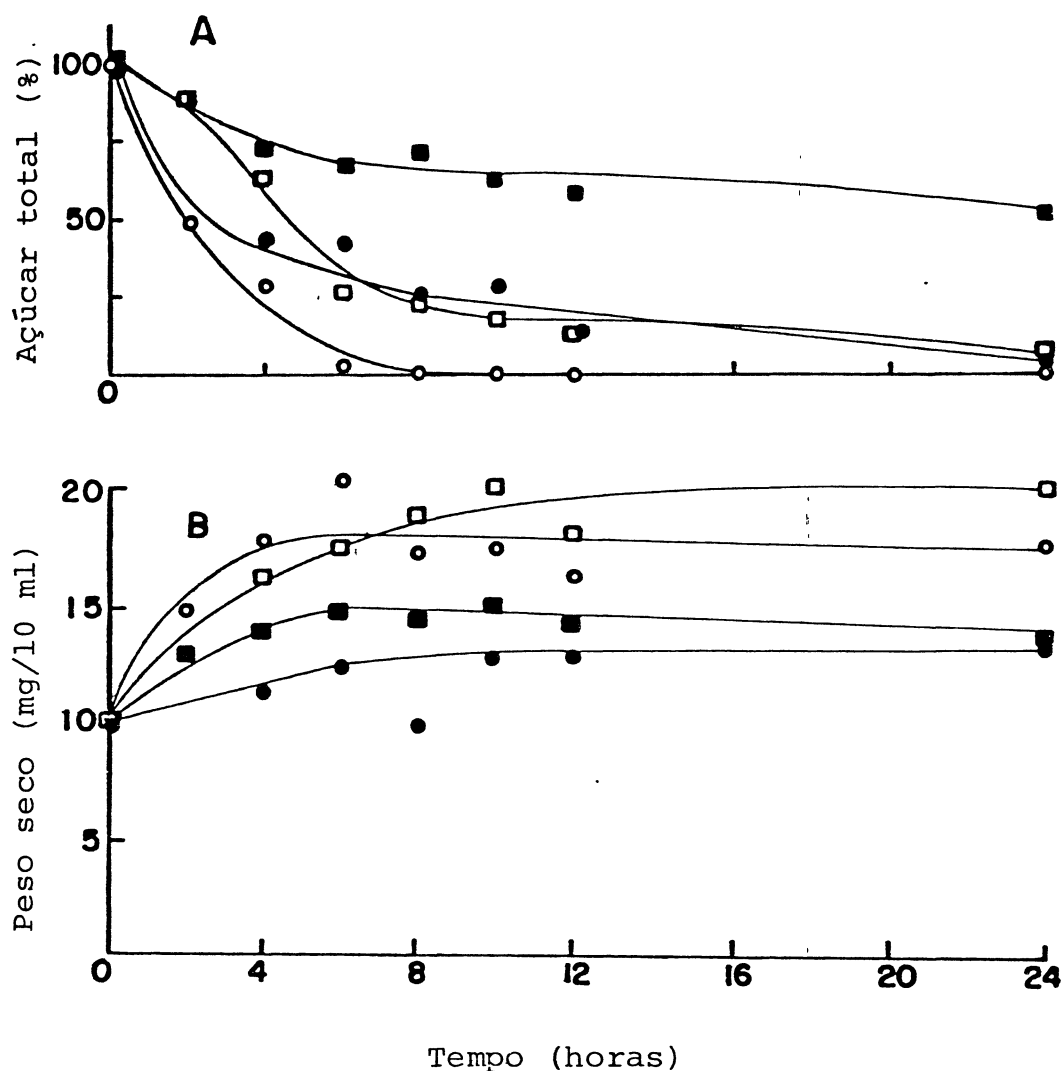


Fig. 17 - EFEITO DA GLUCOSE, AMIDO E CICLOHEXIMIDA NO CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO DO FUNGO EM MICRORGANISMO PREVIAMENTE CRESCIDO EM GLUCOSE.

Os micélios do fungo (2 g) previamente crescido em glucose a 0,2% foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 1 litro contendo 300 ml de meio com: amido a 0,2% (□-□); amido a 0,2% + 30 µg/ml de cicloheximida (■-■); glucose a 0,2% (○-○); glucose 0,2% + 30 µg/ml de cicloheximida (●-●).

A- Carboidrato residual

B- Crescimento do microrganismo

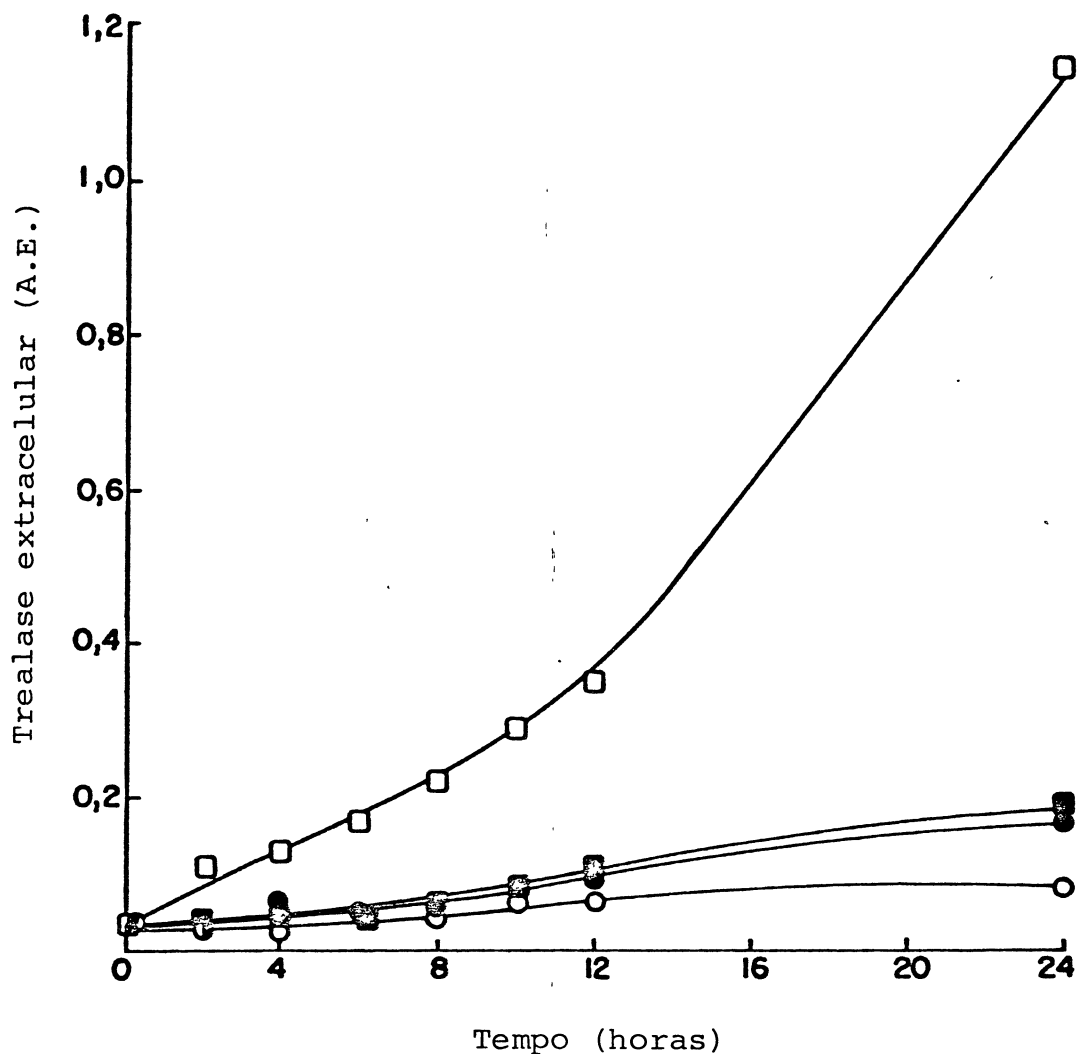


Fig. 18 - EFEITO DO AMIDO, GLUCOSE E CICLOHEXIMIDA NA PRODUÇÃO DE TREALASE EXTRACELULAR EM FUNGO PREVIAMENTE CRESCIDO EM GLUCOSE.

Os micélios do fungo (2 g) previamente crescido em glucose a 0,2% foram transferidos para frasco Erlenmeyer de 1 litro contendo 300 ml de meio com: amido a 0,2% (□-□); amido a 0,2% + 30 µg/ml de cicloheximida (■-■); glucose a 0,2% (○-○) e glucose a 0,2% + 30 µg/ml de cicloheximida (●-●).

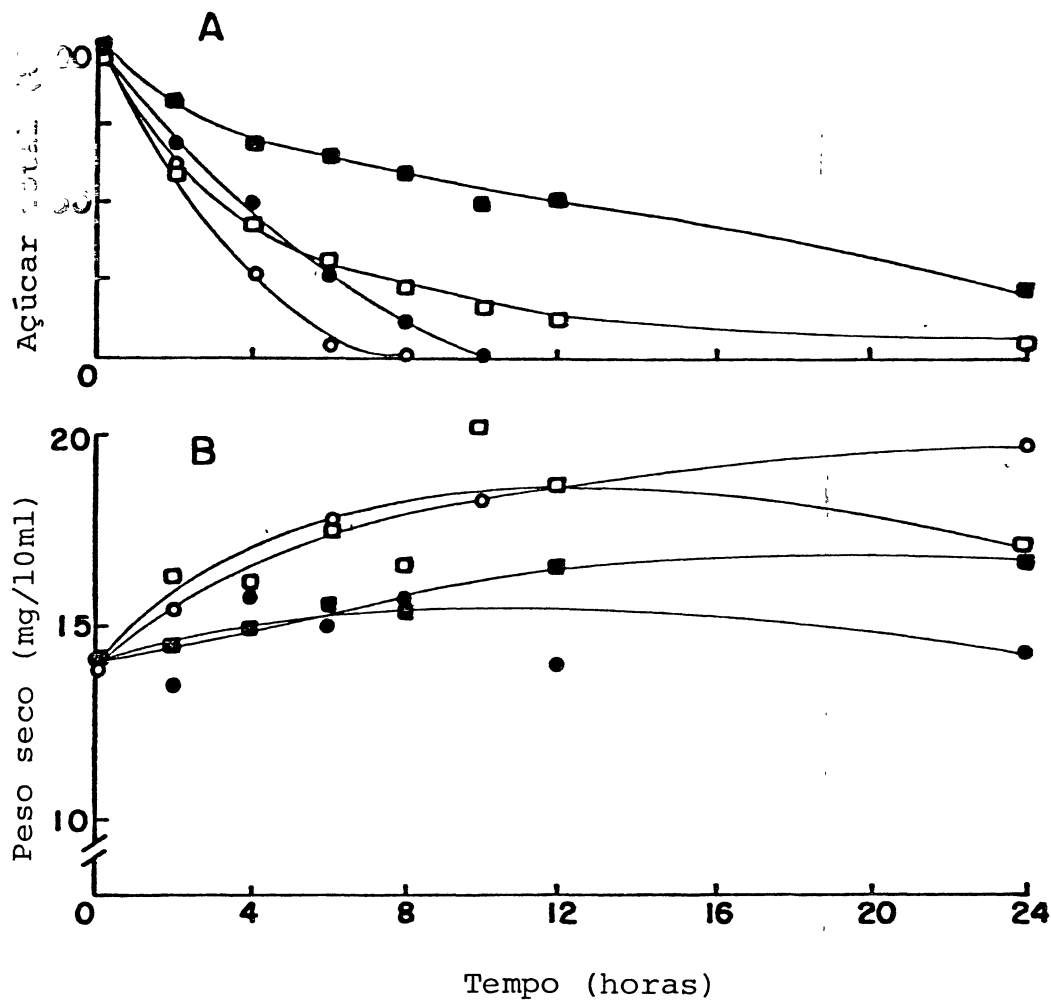


Fig. 19 - EFEITO DA GLUCOSE, AMIDO E CICLOHEXIMIDA NO CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO DO FUNGO EM MICRORGANISMO PREVIAMENTE CRESCIDO EM AMIDO.

Os micélios (3 g) previamente crescido em amido a 0,2% foram transferidos para frasco Erlenmeyer de 1 litro contendo 300ml de meio com: amido a 0,2% (□-□); amido a 0,2% + 30 µg/ml de cicloheximida (■-■); glucose a 0,2% (○-○); glucose a 0,2% + 30 µg/ml de cicloheximida (●-●).

A- Carboidrato residual

B- Crescimento do microrganismo

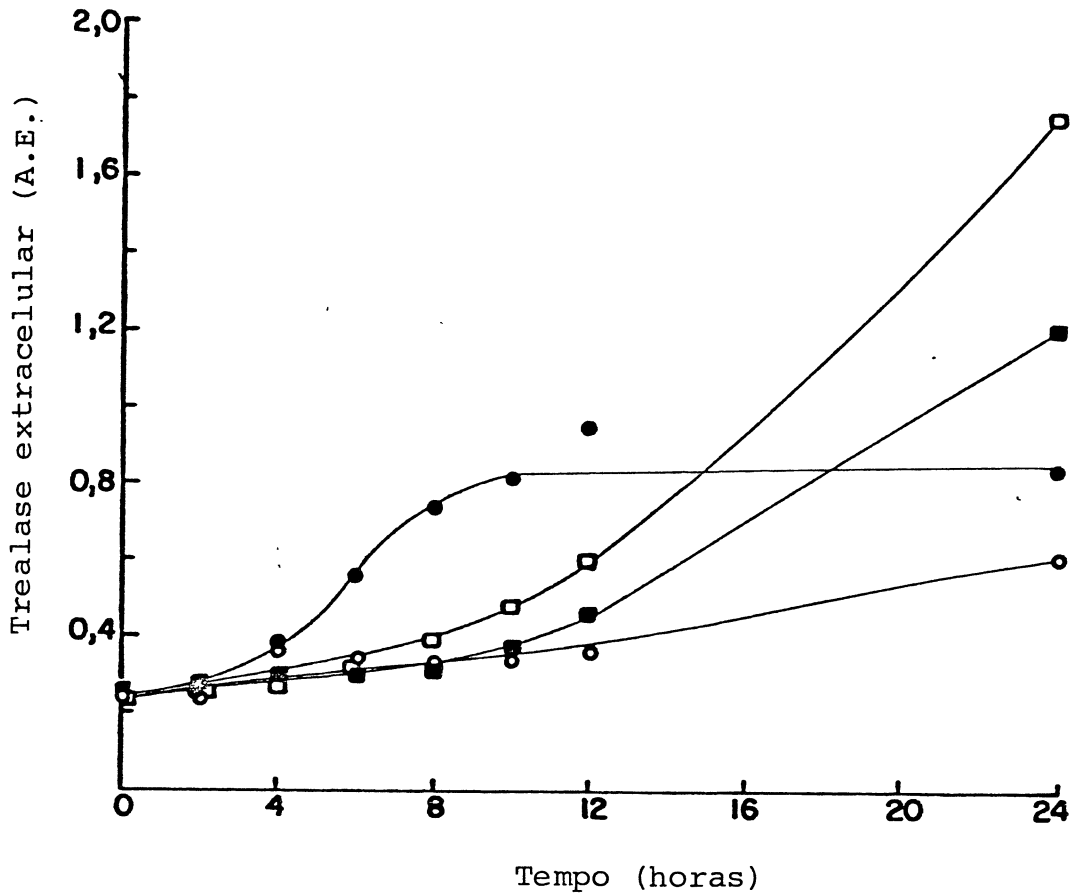


Fig. 20 - EFEITO DA GLUCOSE, AMIDO E CICLOHEXIMIDA NA PRODUÇÃO DA TREALASE EXTRACELULAR EM FUNGO PREVIAMENTE CRESCIDO EM AMIDO.

Os micélios (3g) do fungo previamente crescido em amido a 0,2% foram transferidos para frascos de 1 litro contendo 300 ml meio com: amido a 0,2% (□-□); amido a 0,2% + 30 µg/ml de cicloheximida (■-■); glucose a 0,2% (○-○) e glucose a 0,2% + 30 µg/ml de cicloheximida (●-●).

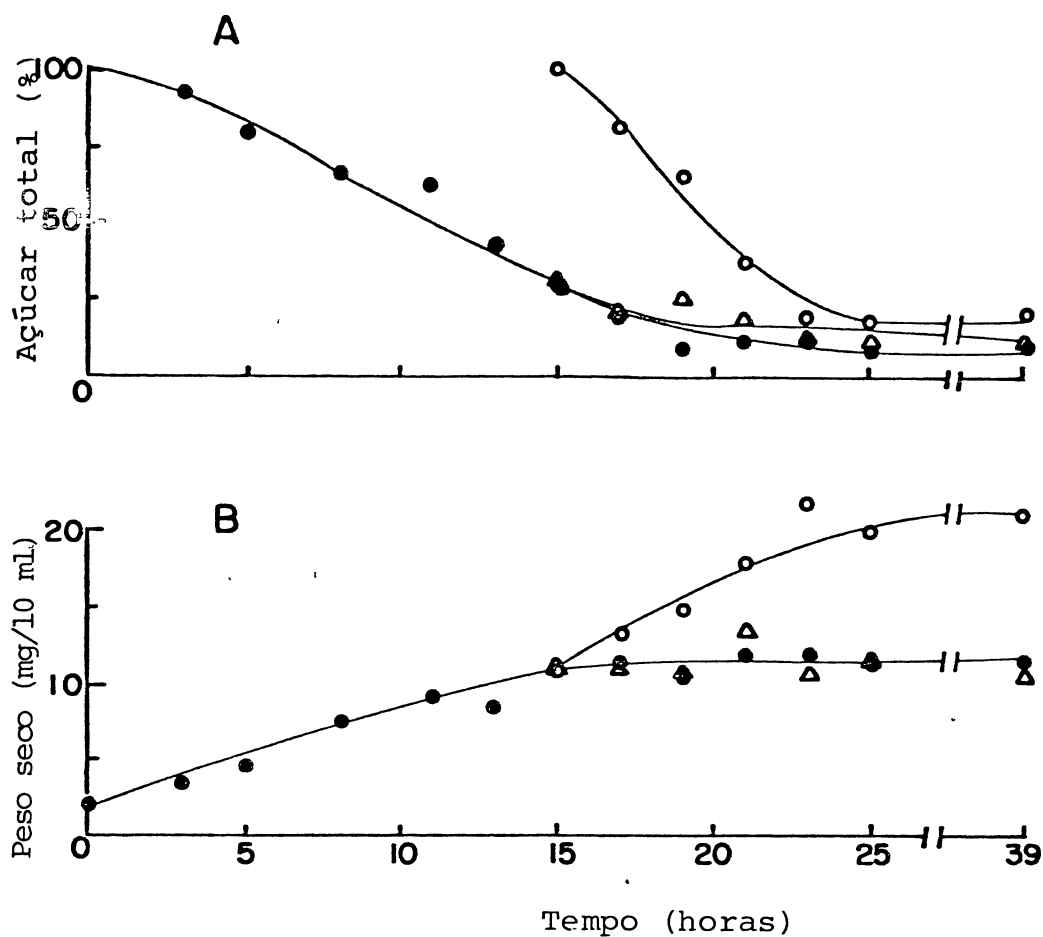


Fig. 21 - EFEITO DA GLUCOSE E CICLOHEXIMIDA SOBRE O CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO DURANTE A INDUÇÃO DA TREALASE PELO AMIDO EM *Scopulariopsis brevicaulis*.

O fungo previamente crescido em glucose a 0,2% e após 12 horas de jejum foi transferido para frasco de 2 litros contendo 1 litro de meio com 0,2% de amido (2 g de célula/ l). Depois de 15 horas de incubação o material foi dividido em três partes iguais. Um deles serviu de controle (●—●) e nos demais foi acrescentado 0,2% de glucose (○—○) e 30 µg/ml de cicloheximida (△—△).

A- Carboidrato residual

B- Crescimento do microrganismo

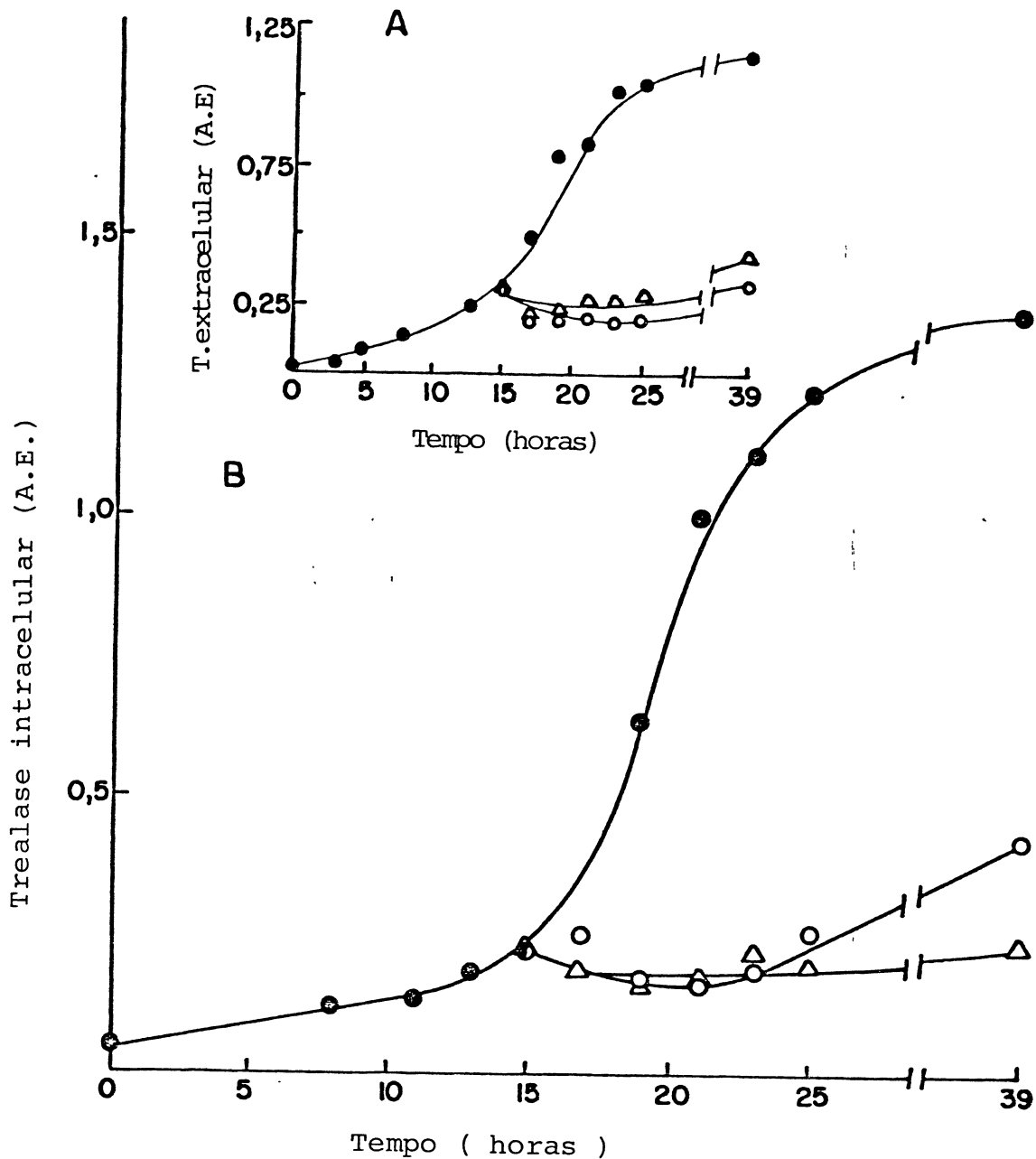


Fig. 22 - INDUÇÃO DA TREALASE PELO AMIDO E EFEITO DA GLUCOSE E CICLOHEXIMIDA SOBRE A PRODUÇÃO DA ENZIMA.

Os micélios (2 g) do fungo previamente crescido em glicose a 0,2% e após jejum de 12 horas foram transferidos para frasco de 2 litros contendo 1 litro de meio de MARKUS com 0,2% de amido. Após 15 horas de incubação, o material foi dividido em 3 partes iguais. Um deles serviu de controle (●-●) e nos outros foi acrescentado 0,2% de glicose (○-○) ou 30 µg/ml de cicloheximida (Δ-Δ).

A- Trealase extracelular

B- Trealase intracelular

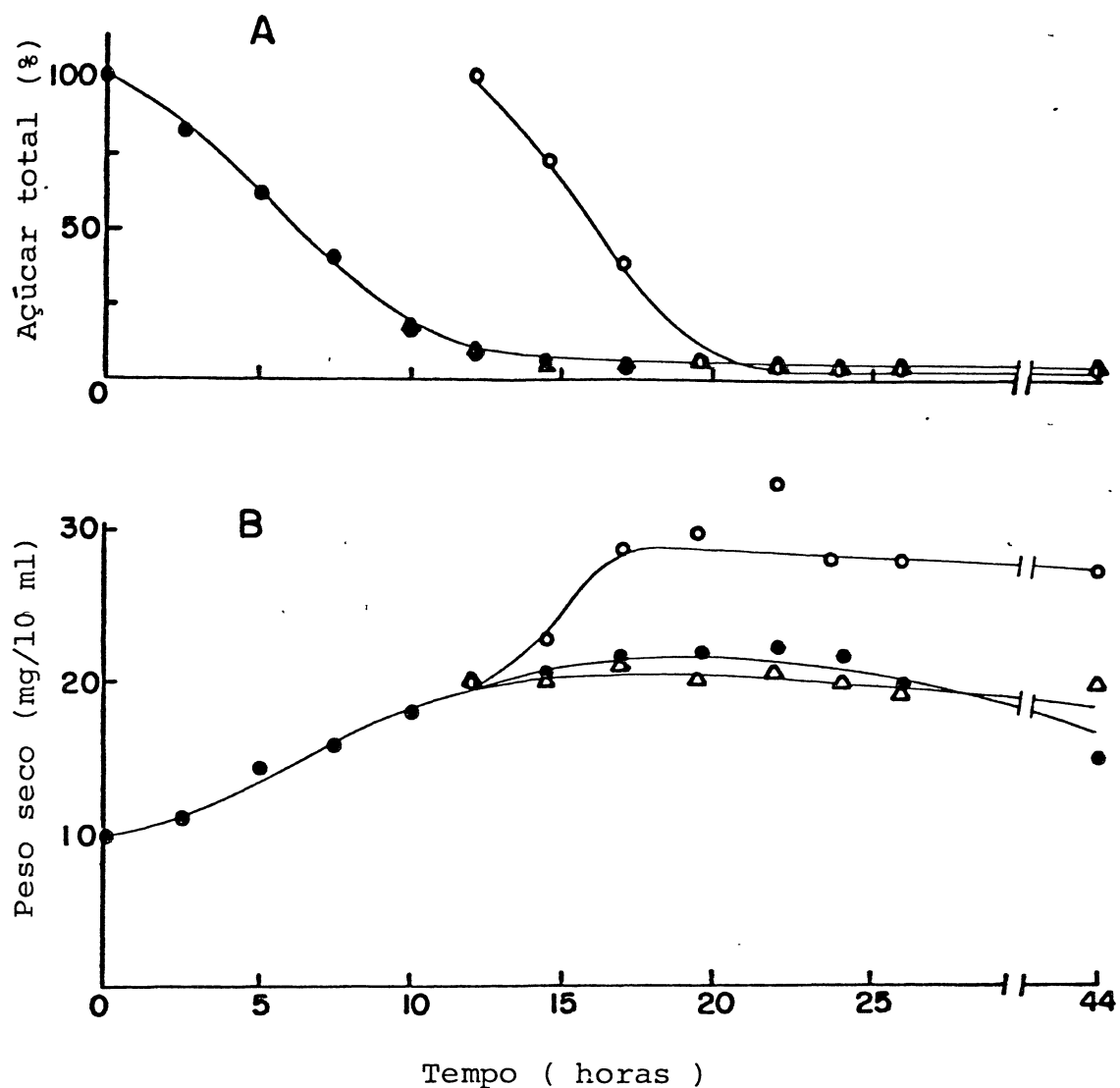


Fig. 23 - EFEITO DA GLUCOSE E CICLOHEXIMIDA SOBRE O CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO DO FUNGO DURANTE A INDUÇÃO DA TREALASE PELA MALTOSE.

O fungo foi previamente crescido em glucose a 1% e após 12 horas em jejum, as células (4 g) foram transferidas para o meio contendo maltose a 0,2%. Após 12 horas de incubação, o material foi dividido em três partes iguais. Um deles serviu de controle (●-●) e nos demais foi adicionado 0,2% de glucose (○-○) e 30 µg/ml de cicloheximida (Δ-Δ).

A- Carboidrato residual

B- Crescimento do microrganismo

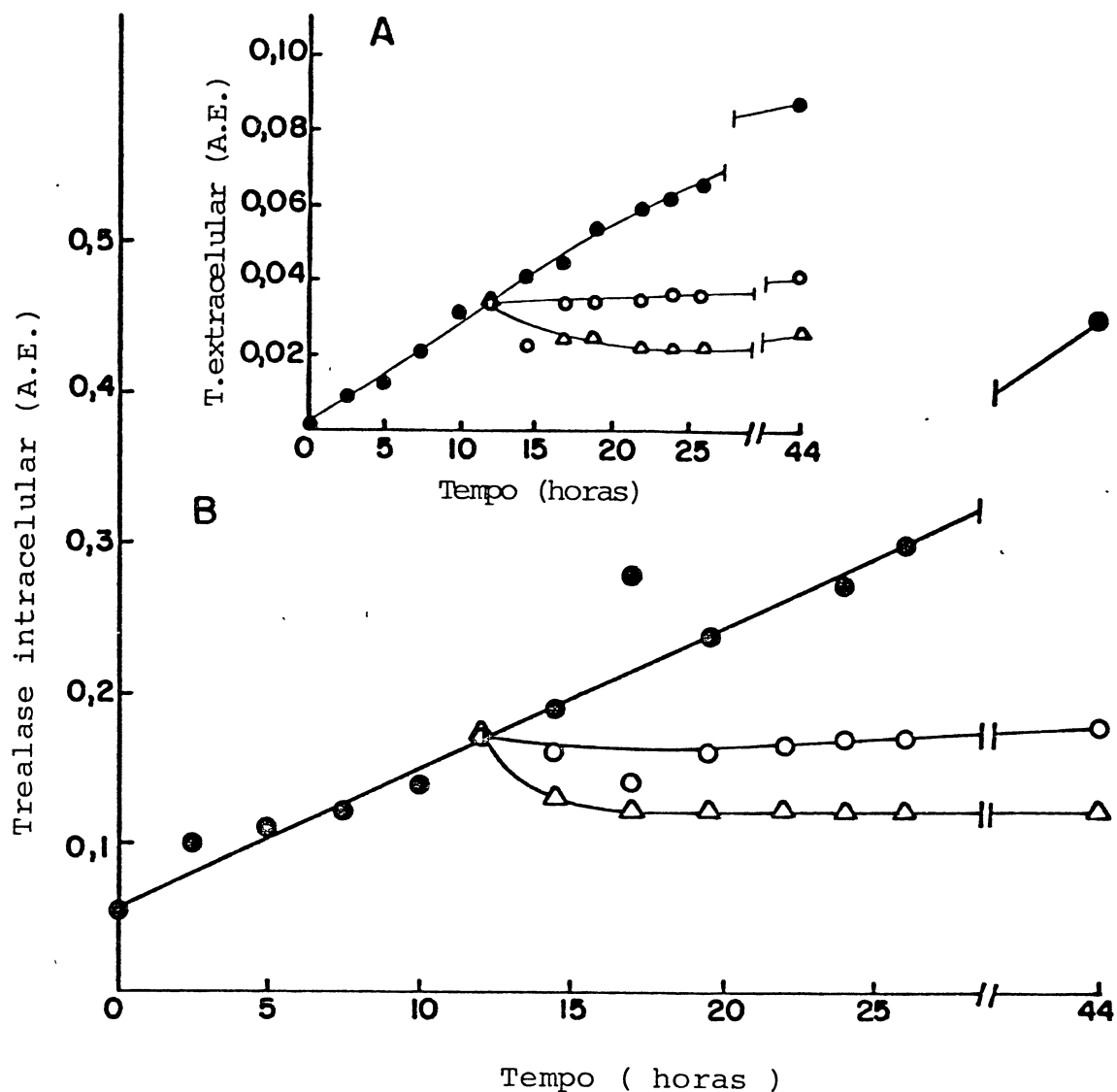


Fig. 24 - EFEITO DA MALTOSE, GLUCOSE E CICLOHEXIMIDA
NA PRODUÇÃO DA TREALASE.

O fungo previamente crescido em glucose a 1% foi transferido para frasco de 2 litros contendo 1 litro de meio com 0,2% de maltose. Após 12 horas de incubação foi dividido em três partes iguais:

●● - controle; ○○ - adição de 0,2% de glucose; △△ - adição de 30 µg/ml de cicloheximida.

A- Trealase extracelular

B- Trealase intracelular

4. CONCLUSÕES

- 1 A trealase micelial do fungo *Scopulariopsis brevicaulis* foi purificada 362 vezes com 51% de rendimento.
- 2 A enzima é específica para a trealose com Km de 0,48mM.
- 3 A maioria dos cátions divalentes testados apresentaram efeito inibitório sobre a atividade da enzima.
- 4 A enzima foi inibida competitivamente pelo Tris (Ki=71mM) e PCMB (Ki=0,11 mM) e não competitivamente pelo Hg⁺⁺ (Ki= 0,016 mM).
- 5 A enzima mostrou máxima atividade catalítica em pH 6,0 - 6,2 a 45°C e apresentou energia de ativação de 12 kcal/mol.
- 6 A trealase é uma glicoproteína tetramérica com 430.000 de peso molecular.
- 7 A enzima apresentou ponto isoelétrico em torno de 2,9.
- 8 A trealase micelial apresentou a maioria das propriedades, semelhantes à da enzima liberada ao meio de cultura, exceto o ponto isoelétrico e o peso molecular. Sugerindo a presença de uma enzima dentro da célula que após um processo de glicosilação seria secretada.
- 9 A adição da glucose em um sistema induzido, levou à redução da atividade trealásica, demonstrando a existência do fenômeno da repressão da síntese protéica por esta hexose.

10 Os experimentos executados com a cicloheximida sobre a indução da trealase, resultaram na redução da velocidade de síntese da enzima, sugerindo que o estímulo na produção da enzima em presença de amido é decorrente da síntese "de novo" e não da remoção de um inibidor ou da ativação de uma proteína pré-existente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANGELIS, D.F.; OLIVEIRA, M.C.F.L.; FURLETTI, M.E.M. Teor de glicídios totais e trealose em algumas espécies do gênero *Candida*. Rev.Microbiol., 10:153-6, 1979.
- 2 ASSIS, J.S. & AMARAL, D. Study on the glyoxilic cycle in the basidiomycete *Picnoporus cinnabarinus*. Arq.Biol. Tecnol., 19:43-7, 1976.
- 3 AVIGAD, G.; ZIV, O.; NEUFELD, D. Intracellular trehalase of a hybrid yeast. Biochem.J., 97:715-22, 1965.
- 4 BAR-GUILLOUX, E.; ROBIC, D.; COURTOIS, J.E. A purified trehalase from may-bug (*Melolontha vulgaris*). Biochimie. 62:719-22, 1980.
- 5 BETETA, P. & GASCÓN, S. Localization of invertase in yeast vacuoles. FEBS Lett., 13:297-300, 1971.
- 6 BHUMIRATANA, A.; ANDERSON, R.L.; COSTILOW, R.N. Trehalose metabolism by *Bacillus popilliae*. J.Bacteriol., 119: 484-93, 1974.
- 7 BIRCH, G.G. Trehaloses. Adv.Carbohydr.Chem., 18:201-25, 1963.
- 8 BLAKESLEY, R.W. & BOEZI, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G-250. Anal.Biochem., 82:580-2, 1977.
- 9 BLANK, F.; CHIN, O.; JUST, G.; MERANZE, D.R.; SHIMKIN, M.B.; WIEDER, R. Carcinogens from fungi pathogenic for man. Cancer.Res., 28:2276-81, 1968.

- 10 BOURQUELOT, M.E. Transformation du tréhalose en glucose dans les champignons par un ferment soluble: la tréhalase. Bull.Soc.Mycol.France., 9:189-94, 1893.
- 11 CABIB, E. & LELOIR, L.F. The biosynthesis of trehalose phosphate. J.Biol.Chem., 231:259-75, 1958.
- 12 CANDIDO, L.M.; MARECHAL, L.R.; VEIGA, L.A. Trehalase inhibitor present in the hemolymph of *Triatoma vitticeps*. Arq.Biol.Tecnol., 24:231-9, 1981.
- 13 CARNIERI, E.G.S. & AMARAL, D. Influência das condições de cultivo no metabolismo de aminoaçúcares em *Picnoporus cinnabarinus*. Ciência e Cultura., 30:1245, 1978.
- 14 CATLEY, B.J. & KELLY, P.J. Metabolism of trehalose and pullulan during the growth cycle of *Aureobasidium pullulans*. Biochem.Soc.Trans., 3:1079-81, 1975.
- 15 CECCARINI, C. Trehalase from *Dictyostelium discoideum*: Purification and properties. Science., 151:454-6, 1966.
- 16 CECCARINI, C. The biochemical relationship between trehalase and trehalose during growth and differentiation in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. Biochim. Biophys.Acta., 148:114-24, 1967.
- 17 CHALLENGER, F.; HIGGINBOTTOM, C.; ELLIS, L. The formation of organo-metalloidal compounds by microorganisms. Part I. Trimethylarsine and dimethylarsine. J.Chem.Soc., :95-101, 1933.
- 18 CHALLENGER, F. & NORTH, H.E. The production of organo-metalloidal compounds by microorganisms. Part II. Dimethyl selenide. J.Chem.Soc., :68-71, 1934.
- 19 CHAN, A.H. & COTTER, D.A. Spore activating agents influence the temporal and quantitative activity of β -glucosidase and trehalase during *Dictyostelium discoideum* germination. Exp. Mycol., 6:77-83, 1982.

- 20 CHANDELIER, E.L.; MARECHAL, L.R.; VEIGA, L.A. Trehalase activity of *P. megistus* haemolymph. Arg.Biol.Tecnol., 19:91-4, 1976.
- 21 CHANDELIER, E.L.; MARECHAL, L.R.; VEIGA, L.A. Soluble trehalase from *Panstrongylus megistus* Burm. (Reduviidae, Triatominae). Rev.Bras.Biol., 39:267-74, 1979.
- 22 CHANG, P.L.Y. & TREVITHICK, J.R. Release of wall-bound invertase and trehalase in *Neurospora crassa* by hydrolytic enzymes. J.Gen.Microbiol., 70:13-22, 1972.
- 23 CHU, F.K. & MALEY, F. The effect of glucose on the synthesis and glycosylation of the polypeptide moiety of yeast external invertase. J.Biol.Chem., 255:6392-7, 1980.
- 24 CLIFFORD, K.H. Stereochemistry of the hydrolysis of trehalose by the enzyme trehalase prepared from the flesh fly *Sarcophaga barbata*. Eur.J.Biochem., 106:337-40, 1980.
- 25 CRAWFORD, J.H. Cellulase production by *Scopulariopsis brevicaulis* isolates obtained from composting broiler litter. In: BIODETERIOR.PAP.INTER.BIODETERIOR.SYMP.5th. 1981. OXLEY, T.A. & BARRY, S. Wiley, Chichester, UK. 1983. p.621-6. Chemical Abstracts, 99(21): 341, 1983. Ref.172460k. Resumo.
- 26 CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. Science., 223:701-3, 1984.
- 27 CURY, J.A. & AMARAL, D. Carbon source dependent differences in the composition of the cell walls basidiomycete *Picnoporus cinnabarinus*. Can.J.Microbiol., 23:1313-7, 1977.
- 28 DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. Biochem.J., 80:547-51, 1961.

- 29 DEMELIER, J.F. & COURTOIS, J.E. Séparation et propriétés de la tréhalase rénale humaine. Bull.Soc.Chim.Biol., 50:2553-60, 1968.
- 30 DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal.Chem., 28:350-6, 1956.
- 31 ELBEIN, A.D. The metabolism of α,α -trehalose. Adv.Carbohydr.Chem.Biochem., 30:227-56, 1974.
- 32 ELORZA, M.V.; VILLANUEVA, J.R.; SENTANDREU, R. The mechanism of catabolite inhibition of invertase by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim.Biophys.Acta., 475:103-12, 1977.
- 33 EVANS, S.V.; FELLOWS, L.E.; BELL, E.A. Glucosidase and trehalase inhibition by 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-Mannitol, a cyclic amino alditol from *Lonchocarpus sericeus*. Phytochemistry., 22:768-70, 1983.
- 34 FEDEROFF, H.J.; ECCLESHALL, T.R.; MARMUR, J. Carbon catabolite repression of maltase synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. J.Bacteriol., 156:301-7, 1983.
- 35 FERGUSON Jr, J.J.; BOLL, M.; HOLZER, H. Yeast malate dehydrogenase: Enzyme inactivation in catabolite repression. Eur.J.Biochem., 1:21-5, 1967.
- 36 FONVIEILLE, J.L.; TOUZÉ-SOULET, J.M.; DARGENT, R.; MONTANT, C. Etude préliminaire de la composition chimique des membranes "brutes" de *Scopulariopsis brevicaulis* (Bainier). Mycopathologia., 80:165-70, 1982.
- 37 FREY, J. & RÖHM, K.H. The glucose-induced inactivation of aminopeptidase I in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett., 100:261-4, 1979.

- 38 FRIEDMAN, S. The purification and properties of trehalase isolated from *Phormia regina*, Meig. Arch.Biochem.Biophys., 87:252-8, 1960.
- 39 FRIEDMAN, S. Inhibition of trehalase activity in the hemolymph of *Phormia regina* Meig. Arch.Bochem.Biophys., 93: 550-4, 1961.
- 40 FRIEDMAN, S. & ALEXANDER, S. Multiple forms of trehalase in *Phormia regina*. Biochem.Biophys.Res.Comm., 42:818-23, 1971.
- 41 GIUDICELLI, J.; EMILIOZZI, R.; VANNIER, C.; BURLET, G. de; SUDAKA, P. Purification by affinity chromatography and characterization of a neutral α -glucosidase from horse kidney. Biochem.Biophys.Acta., 612:85-96, 1980.
- 42 GÖRTS, C.P.M. Effect of glucose on the activity and the kinetics of the maltose-uptake system and of α -glucosidase in *Sacchaormyces cerevisiae*. Biochem.Biophys.Acta., 184: 299-305, 1969.
- 43 GUILLOUX, E.; COURTOIS, J.E.; PERCHERON, F. Étude d'une tréhalase purifiée extraite du hanneton (*Melolontha vulgaris*). Bull.Soc. Chim.Biol., 50:1915-31, 1968.
- 44 GUILLOUX, E.; ARCILLA, M.A.; COURTOIS, J.E.; MOUMRIKOFF, V. La tréhalase de *Pseudomonas fluorescens*. Biochimie., 53: 853-7, 1971.
- 45 HABA, G.de la & RACKER, E. Crystalline transketolase from baker's yeast. In: COLLOWICK, S.P. & KAPLAN, O. éd. Preparation and assay of enzymes. New York, Academic, 1955. p.378. (Methods in Enzymology, 1).
- 46 HAN, Y.W. & SRINIVASAN, V.R. Purification and characterization of β -glucosidase of *Alcaligenes faecalis*. J. Bacteriol, 100:1355-63, 1969.

- 47 HANKS, D.L. & SUSSMAN, A.S. The relation between growth, conidiation and trehalase activity in *Neurospora crassa*. Amer.J.Bot., 56:1152-9, 1969.
- 48 HANKS, D.L. & SUSSMAN, A.S. Control of trehalase synthesis in *Neurospora crassa*. Amer.J.Bot., 56:1160-6, 1969.
- 49 HECKER, L.I. & SUSSMAN, A.S. Activity and heat stability of trehalase from the mycelium and ascospores of *Neurospora*. J.Bacteriol., 115:582-91, 1973.
- 50 HECKER, L.I. & SUSSMAN, A.S. Localization of trehalase in the ascospores of *Neurospora*: Relation to ascospore dormancy and germination. J.Bacteriol., 115:592-9, 1973.
- 51 HEHRE, E.J.; SAWAI, T.; BREWER, C.F.; NAKANO, M.; KANDA, T. Trehalase: Stereocomplementary hydrolytic and glucosyl transfer reactions with α - and β -D-glucosyl fluoride. Biochemistry., 21:3090-7, 1982.
- 52 HEY, A.E. & ELBEIN, A.D. Partial purification and properties of a trehalase from *Streptomyces hygroscopicus*. J. Bacteriol., 96:105-10, 1968.
- 53 HEY-FERGUSON, A.; MITCHELL, M.; ELBEIN, A.D. Trehalose metabolism in germinating spores of *Streptomyces hygroscopicus*. J.Bacteriol., 116:1084-5, 1973.
- 54 HILL, E.P. & SUSSMAN, A.S. Purification and properties of trehalase(s) from *Neurospora*. Arch.Biochem.Biophys. 102:389-96, 1963.
- 55 HILL, E.P. & SUSSMAN, A.S. Development of trehalase and invertase activity in *Neurospora*. J.Bacteriol., 88:1556-66, 1964.
- 56 HIRONO, E.; ZANCAN, G.T.; AMARAL, D. Glucose metabolism in *Pycnoporus cinnabarinus*. Can.J.Microbiol., 24:620-2, 1978.

- 57 HORIKOSHI, K. & IKEDA, Y. Trehalase in conidia of *Aspergillus oryzae*. J.Bacteriol., 91:1883-7, 1966.
- 58 INOUE, H. & SHIMODA, C. Induction of trehalase activity on a nitrogen-free medium: A sporulation-specific event in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. Mol. Gen. Genet., 183:32-6, 1981.
- 59 JACOB, F. & MONOD, J. Mécanismes Biochimiques et génétiques de la régulation dans la cellule bactérienne. Bull.Soc. Chim.Biol., 46:1499-1532, 1964.
- 60 JÖRGENSEN, A. & HANSEN, A. Hongos filamentosos en general y utilizados en la industria. In: _____. Microbiología de las fermentaciones industriales. Zaragoza, Acribia, 1959. p.232-3.
- 61 KALF, G.F. & RIEDER, S.V. The purification and properties of trehalase. J.Biol.Chem., 230:691-8, 1958.
- 62 KAPICA, L. & BLANK, F. Formation of ammonium magnesium phosphate crystals in cultures of fungi growing on keratin. Mycopathol.Mycol. Appl., 18:119-21, 1962.
- 63 KELLER, F.; SCHELLENBERG, M.; WIEMKEN, A. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Arch.Microbiol., 131:298-301, 1982.
- 64 KELLY, P.J. & CATLEY, B.J. A purification of trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. Anal.Biochem., 72:353-8, 1976.
- 65 KILLICK, K.A. Trehalase from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*: purification and characterization of the homogeneous enzyme from myxamoebae. Arch.Biochem. Biophys., 222:561-73, 1983.

- 66 KISHIDA, T. & YOSHIMURA, S. On the mode of action of *Scopulariopsis brevicaulis* proteinase (Prot.II) on oxidized insulin. Agr.Biol.Chem., 29:503-7, 1965.
- 67 LABAT, J.; BAUMANN, F.; COURTOIS, J.E. Hydrolyse du Tréhalose par la tréhalase du rein de porc: configuration anomérique α du D-glucose libéré. Carbohydr.Res., 26:341-9, 1973
- 68 LAPP, D.F. & MASON, S.L. Isolation and partial characterization of trehalase from *Ascaris* muscle. J.Parasitol., 64:645-50, 1978.
- 69 LAZO, P.S.; FLÓREZ, I.G.; OCHOA, A.G.; GASCÓN, S. Induction and catabolite repression of α -galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. Cell.Mol.Biol., 27:615-22, 1981.
- 70 LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.R.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol.Chem., 193:265-75, 1951.
- 71 LUKES, T.M. & PHAFF, H.J. Characteristics of trehalase *Candida tropicalis*. Antonie van Leeuwenhoek J.Microbiol. Serol., 18:323-35, 1952.
- 72 MALATHI, P. & CRANE, R.K. Spatial relationship between intestinal disaccharidases and the active transport system for sugars. Biochim.Biophys. Acta., 163:275-7, 1968.
- 73 MARÉCHAL, L.R. & BELOCOPITOW, E. Metabolism of trehalose in *Euglena gracilis*. J.Biol.Chem., 247:3223-8, 1972.
- 74 MARKUS, Z.; MILLER, G.; AVIGAD, G. Effect of culture conditions on the production of D-galactose-oxidase by *Dactylium dendroides*. Appl.Microbiol., 13:686-93, 1965.
- 75 MARZLUF, G.A. Studies of trehalase and sucrase of *Drosophila melanogaster*. Arch.Biochem.Biophys., 134:8-18, 1969.

- 76 MERDINGER, E.; LANGE, C.F.; BOOKER, B.F. Isolation and identification of trehalase from *Pullularia pullulans*. J.Bacteriol., 106:1034-5, 1971.
- 77 METZENBERG, R.L. A gene affecting the repression of invertase and trehalase in *Neurospora*. Arch.Biochem. Biophys., 96:468-74, 1962.
- 78 MURAO, S. & MIYATA, S. Isolation and characterization of a new trehalase inhibitor, S-GI. Agr.Biol.Chem., 44:219-21, 1980.
- 79 NAKANO, M.; SUMI, Y.; MIYAKAWA, M. Purification and properties of trehalase from rat intestinal mucosal cells. J. Biochem., 81:1041-9, 1977.
- 80 NAKANO, M. Effect of inorganic anions on the inhibition of trehalase activity by mercuric chloride. Biochim. Biophys. Acta., 707:115-20, 1982.
- 81 NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J.Biol.Chem., 153:375-80, 1944.
- 82 ONSBERG, P. *Scopulariopsis brevicaulis* in nails. Dermatologica., 161:259-64, 1980. Biological Abstracts, 70(12):8662, 1980. Ref.79178. Resumo.
- 83 OPERTI, M.S.; OLIVEIRA, D.E.; FREITAS-VALLE, A.B.; OESTREICHER, E.G.; MATTOON, J.R.; PANEK, A.D. Relationships between trehalose metabolism and maltose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. III. Evidence for alternative pathways of trehalose synthesis. Curr.Genet., 5:69-76, 1982.
- 84 ORTIZ, C.H.; MAIA, J.C.C.; TENAN, M.N.; BRAZ-PADRÃO, G.R.; MATTOON, J.R.; PANEK, A.D. Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation dephosphorylation cascade system. J.Bacteriol., 153:644-51, 1983.

- 85 PANEK, A. Function of trehalose in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Arch.Biochem.Biophys., 100:422-5, 1963.
- 86 PANEK, A.D. & SOUZA, N.O. Purification and properties of bakers' yeast trehalase. J.Biol.Chem., 239:1671-3, 1964.
- 87 PANEK, A.D. & MATTOON, J. R. Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: relationships between catabolite repression, trehalose synthesis and mitochondrial development. Arch.Biochem.Biophys., 183:306-16, 1977.
- 88 PANEK, A.D. Trehalose metabolism in yeast: an overview. Arq.Biol.Tecnol., 25:261-71, 1982.
- 89 PANEK, A.D. & BERNARDES, E.J. Trehalose: its role in germination of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr.Genet., 7: 393-7, 1983.
- 90 PASTORE, G.M. & PARK, Y.K. β -Galactosidase de *Scopulariopsis* sp: imobilização em resina fenol-formaldeído (Duolite) e sua eficiência na hidrólise de lactose em soro de leite. Cienc.Tecnol.Aliment., 1:65-72, 1981.
- 91 PATTERSON, B.W.; HEY-FERGUSON, A.; MATULA, M.; ELBEIN, A.D. Trehalase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Mycobacterium smegmatis*. In: GINBURG, V. ed. Complex Carbohydrates. New York, Academic, 1972. p.996-1000. (Methods in Enzymology, 28).
- 92 PETIZ, A.L. & AMARAL, D. Efeito das diferentes condições nutricionais, sobre a síntese de enzimas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos e do metabolismo do glutamato em *Picnoporus cinnabarinus*. Ciência e Cultura., 30:1244-5, 1978.
- 93 PRAÇA, E.F. Trealase extracelular de *Scopulariopsis brevicaulis*. Curitiba, 1981. 63p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.

- 94 PRASAD, A.R.S. & MAHESHWARI, R. Purification and properties of trehalase from the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. Biochem.Biophys.Acta., 525:162-70, 1978.
- 95 RACUSEN, D. Glycoprotein detection in polyacrylamide gel with thymol and sulfuric acid. Anal.Biochem., 99:474-6, 1979.
- 96 RAMALEY, R.F. Molecular biology of extracellular enzymes. Adv.Appl.Microbiol., 25:37-55, 1980.
- 97 REESE, E.T.; LOLA, J.E.; PARRISH, F.W. Modified substrates and modified products as inducers carbohydrases. J. Bacteriol., 100:1151-4, 1969.
- 98 ROBERTS, R.M. & TOVEY, K.C. Trehalase activity in *Selaginella martensii*. Arch.Biochem.Biophys., 133:408-12, 1969.
- 99 SACKTOR, B. Trehalase and the transport of glucose in the mammalian kidney and intestine. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 60:1007-14, 1968.
- 100 SAITO, S. Trehalase of the silkworm, *Bombyx mori*: purification and properties of the enzyme. J.Biochem., 48: 101-9, 1960.
- 101 SASAJIMA, K.; KAWASHI, T.; SAITO, S.; SUGIMURA, T. Purification and properties of α, α -trehalase from the mucosa of rat small intestine. Biochim.Biophys.Acta., 403:139-46, 1975.
- 102 SINGH, K. & VEZINA, C. An extracellular proteolytic enzyme from *Scopulariopsis brevicaulis*. 1. Purification and properties. Can.J.Microbiol., 17:1029-42, 1971.
- 103 SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. J.Biol.Chem., 160:61-8, 1945.

- 104 SOUZA, N.O. & PANEK, A.D. Location of trehalase and trehalose in yeast cells. Arch.Biochem.Biophys., 125:22-8, 1968.
- 105 SUSSMAN, A.S.; GARRETT, M.K.; SARGENT, M.; YU, S.A. Isolation, mapping and characterization of trehalaseless mutants of *Neurospora crassa*. J.Bacteriol., 108:59-68, 1971.
- 106 TENAN, M.N.; OLIVEIRA, C.P.H.; PANEK, A.D. Mouse kidney trehalase: purification and properties. An.Acad.Brasil.Cienc., 51:151-8, 1979.
- 107 THEVELEIN, J.M.; DEN HOLLANDER, J.A.; SHULMAN, R.G. Changes in the activity and properties of trehalase during early germination of yeast ascospores: correlation with trehalose breakdown as studied by in vitro ¹³C NMR. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 79:3503-7, 1982.
- 108 THEVELEIN, J.M.; VAN LAERE, A.J.; BEULLENS, M.; VAN ASSCHE, J.A.; CARLIER, A.R. Glucose-induced trehalase activation and trehalose mobilization during early germination of *Phycomyces blakesleeanus* spores. J.Gen.Microbiol., 129:719-26, 1983.
- 109 UNO, I.; MATSUMOTO, K.; ADACHI, K.; ISHIKAWA, T. Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast. J.Biol.Chem., 258:10867-72, 1983.
- 110 VAN ASSCHE, J.A.; CARLIER, A.R.; DEKEERSMAEKER, H.I. Trehalase activity in dormant and activated spores of *Phycomyces blakesleeanus*. Planta., 103:327-33, 1972.
- 111 VAN ASSCHE, J.A. & CARLIER, A.R. Some properties of trehalase from *Phycomyces blakesleeanus*. Biochim.Biophys.Acta., 391:154-61, 1975.
- 112 VANDERMEER, J.W. & GOCHNAUER, T.A. Trehalase activity associated with spores of *Nosema apis*. J.Invertebr.Pathol., 17:38-41, 1971.

- 113 VAN DER PLAAT, J.B. & VAN SOLINGEN, P. Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. Biochem.Biophys.Res.Comm., 56:580-7, 1974.
- 114 VAN LAERE, A.J. & HENDRIX, P. Cyclic AMP-dependent in vitro activation of trehalase from dormant *Phycomyces blakesleeanus* spores. J.Gen.Microbiol., 129:3287-90, 1983.
- 115 VAN SOLINGEN, P. & VAN DER PLAAT, J.B. Partial purification of the protein system controlling the breakdown of trehalose in baker's yeast. Biochem.Biophys.Res.Comm., 62:553-60, 1975.
- 116 VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins. In: JACOBY, W.B. ed. Enzyme purification and related techniques, New York, Academic, 1971. p.389-412. (Methods in Enzymology, 22).
- 117 VIJAYAKUMAR, P.; ROSS, W.; REESE, E.T. α,α -Trehalase of *Trichoderma reesei*. Can.J.Microbiol., 24:1280-3, 1978.
- 118 VONK, J.W. & SIJPESTEIJN, A.K. Studies on methylation of mercuric chloride by pure cultures of bacteria and fungi. Antonie van Leeuwenhoek J.Microbiol.Serol., 39:505-13, 1973.
- 119 WANG, S.C. & LE TOURNEAU, D. Trehalase from *Sclerotinia sclerotiorum*. Arch.Microbiol., 87:235-41, 1972.
- 120 WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem.Z., 310:384-421, 1941.
- 121 WEBER, K.; PRINGLE, J.R.; OSBORN, M. Measurement of molecular weights by electroforesis on SDS-acrylamide gel. In: HIRS, C.H.W. & TIMASHEFF, S.N. ed. Enzyme structure Part c, New York, Academic, 1972. p.3-27. (Methods in Enzymology, 26).

- 122 WIEMKEN, A. & SCHELLENBERG, M. Does a cyclic AMP-dependent phosphorylation initiate the transfer of trehalase from the cytosol into the vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*? FEBS.Lett., 150:329-31, 1982.
- 123 WOOD, T.M. The cellulase of *Fusarium solani*. Resolution of the enzyme complex. Biochem.J., 115:457-64, 1969.
- 124 NAKANO, M. Two sub-sites at the substrate-binding site of kidney brush border membrane trehalase. Fed.Proc., 40: 1612, 1981.