

LIU UN RIGO

METABOLISMO DE L-RHAMNOSE EM **Pullularia pullulans**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

CURITIBA
1983

Orientador:

Dr. Luiz Alberto Silva Veiga

Co-orientador:

Dr. Luiz Ramon Maréchal

Ao *Cláudio*,

Louise e

Camille

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. LUIZ ALBERTO SILVA VEIGA e ao Dr. LUIZ RAMON MARÉCHAL pe la orientação deste trabalho.
- À Dra. GLACI T. ZANCAN pela amizade, incentivo e revisão da tese.
- À Dra MOMOYO NAKANO pelo auxílio na realização da purificação e estudos cinéticos da L-rhamnose desidrogenase.
- À Professora MURIEL MOURÃO VIEIRA pelo auxílio na realização dos estudos sobre a indução das enzimas da via.
- À Professora SUNG LIE BRUEL e ao Professor MANOEL FRANCISCO GUI MARÃES pelo apoio e colaboração.
- Ao Dr. PHILIP A. J. GORIN pela elaboração dos estudos de Ressonância Nuclear Magnética.
- Ao Dr. MARCO AURÉLIO LACOMBE FEIJÓ pela colaboração.
- À Dra. KAZUKO HISHIDA DO NASCIMENTO e ao Dr. JOSÉ DOMINGOS FONTANA pela leitura crítica da tese.
- À Sra. MARIA HELENA B. IMAYUKI pela revisão das referências bibliográficas.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.
- Ao CNPq e FINEP pelo apoio financeiro durante o período de desenvolvimento deste trabalho.
- As demais pessoas que colaboraram na elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	<i>i</i>
AGRADECIMENTOS	<i>ii</i>
SUMÁRIO	<i>iii</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>vi</i>
LISTA DE TABELAS	<i>viii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>ix</i>
RESUMO	<i>x</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	5
2.1 - Síntese de ácido <u>L</u> -rhamnônico	5
2.2 - Síntese de <u>D</u> e <u>L</u> -lactaldeídos	5
2.3 - Enzimas	6
2.4 - Reagentes químicos.....	6
2.5 - Microrganismo.....	6
2.6 - Manutenção das culturas.....	6
2.7 - Meio de cultura líquido (DPE).....	7
2.8 - Preparação do pré-inóculo	7
2.9 - Método de cultivo.....	8
2.10- Método de indução	8
2.11- Permeabilização de células com tolueno	9
2.12- Medida do consumo de oxigênio	10
2.13- Preparação do extrato livre de células	10
2.14- Medida das atividades enzimáticas	10
2.14.1 - Determinação da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase...	10
2.14.2 - Determinação da atividade da lactonase.....	11
2.14.3 - Determinação da atividade da desidratase...	11
2.14.4 - Determinação da atividade da KDR aldolase.	11
Sentido da síntese.....	12
2.14.5 - Determinação da atividade da KDR aldolase.	
Sentido da clivagem.....	12
2.15- Purificação da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase	13
2.15.1 - Preparação do extrato bruto.....	13
2.15.2 - Tratamento com cloreto de manganês.....	13
2.15.3 - Tratamento com sulfato de amônio.....	13
2.15.4 - Filtração em Sephadex G-50.....	13
2.15.5 - Cromatografia em DEAE - celulose.....	14

2.16-	Isolamento dos produtos	14
2.16.1	- Isolamento do produto da reação da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase	14
2.16.2	- Isolamento do produto da reação da <u>L</u> -rhamnono- γ -lactonase	14
2.16.3	- Isolamento do produto da reação da <u>L</u> -rhamnonato desidratase	15
2.16.4	- Isolamento do produto da reação da KDR aldolase	15
2.17-	Métodos Analíticos	16
3.	RESULTADOS	18
3.1	- Crescimento de <i>Pullularia pullulans</i>	18
3.2	- Utilização da <u>L</u> -rhamnose por células intactas de <i>Pullularia pullulans</i>	18
3.3	- Crescimento, utilização de <u>L</u> -rhamnose e síntese da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> previamente crescidas em <u>L</u> -rhamnose	18
3.4	- Efeito da <u>L</u> -rhamnose sobre a síntese de <u>L</u> -rhamnose desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em crescimento	23
3.5	- Efeito da <u>L</u> -rhamnose sobre a síntese da <u>L</u> -rhamnonato desidratase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em crescimento	23
3.6	- Efeito da <u>L</u> -rhamnose sobre a síntese da KDR aldolase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em crescimento...	23
3.7	- Caracterização da <u>L</u> -rhamnono- γ -lactonase em células de <i>Pullularia pullulans</i> crescidas em <u>L</u> -rhamnose.....	27
3.8	- Purificação da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase de <i>Pullularia pullulans</i>	27
3.8.1	- Estabilidade da enzima	27
3.8.2	- Efeito da variação do pH	27
3.8.3	- Efeito da concentração do substrato	31
3.8.4	- Especificidade pelo substrato	31
3.8.5	- Ativadores e inibidores	31
3.8.6	- Reversibilidade e equilíbrio	31
3.8.7	- Identificação dos produtos das reações da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase e da <u>L</u> -rhamnono- γ -lactonase	36

3.9 - Identificação do produto da <u>L</u> -rhamnonato desidratase..	36
3.10- Identificação dos produtos da KDR aldolase	39
3 10.1 - Sentido da clivagem	39
3.10.2 - Sentido da síntese	42
3.10.3 - Especificidade da KDR aldolase para aldeídos .	42
3.10.4 - Reversibilidade e equilíbrio da reação da KDR aldolase	42
3.11- Efeito da fonte de carbono sobre a indução da síntese da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i>	47
3.12- Efeito da adição de cicloheximida sobre a síntese da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em repouso	47
3.13- Efeito de diferentes monossacarídeos na repressão da síntese da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase de <i>Pullularia pullulans</i>	47
3.14- Cinética da indução e repressão da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase	47
3.15- Efeito da fonte de carbono na indução da <u>L</u> -rhamnonato desidratase em células de <i>Pullularia pullulans</i> ...	51
3.16- Efeito da fonte de carbono na indução da KDR aldolase em células de <i>Pullularia pullulans</i>	51
3.17- Repressão da síntese da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase, <u>L</u> -rhamnonato desidratase e KDR aldolase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em repouso,por D-glucose.....	51
3.18.- Repressão da síntese da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase, <u>L</u> -rhamnonato desidratase e KDR aldolase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em crescimento,por <u>D</u> -glucose..	57
4. DISCUSSÃO	59
5. CONCLUSÕES	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

1. Curvas de crescimento de *Pullularia pullulans* em presença de diferentes fontes de carbono 19
2. Utilização de D-glucose e L-rhamnose por células intactas de *Pullularia pullulans* crescidas na presença de D-glucose 20
3. Utilização de D-glucose e L-rhamnose por células intactas de *Pullularia pullulans* crescidas na presença de L-rhamnose 21
4. Crescimento, utilização de L-rhamnose e síntese de L-rhamnose desidrogenase em função do tempo, por células de *Pullularia pullulans* previamente crescidas em L-rhamnose..... 22
5. Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da L-rhamnose desidrogenase em células de *Pullularia pullulans* em crescimento 24
6. Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da L-rhamnonato desidratase em células de *Pullularia pullulans* em crescimento 25
7. Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase em células de *Pullularia pullulans* em crescimento 26
8. Atividade da L-rhamnono- γ -lactonase em função do tempo..... 28
9. Purificação de L-rhamnose desidrogenase de *Pullularia pullulans* por DEAE-celulose..... 30
10. Efeito do pH na atividade da L-rhamnose desidrogenase de *Pullularia pullulans* 32
11. Efeito da concentração de L-rhamnose sobre a atividade da L-rhamnose desidrogenase. Determinação da constante de Michaelis-Menten 33
12. Efeito da concentração de NAD^+ sobre a atividade da L-rhamnose desidrogenase. Determinação da constante de Michaelis-Menten 34

13. Espectro infravermelho comparativo das lactonas do ácido <u>L</u> -rhamnônico	37
14. Espectro de absorção do derivado obtido a partir do produto da <u>L</u> -rhamnonato desidratase	40
15. Espectro de absorção do derivado obtido a partir do produto da 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -rhamnonato aldolase (sentido da síntese)	44
16. Reversibilidade e equilíbrio da reação da 2-ceto-3-desoxi <u>L</u> -rhamnonato aldolase	46
17. Efeito de cicloheximida na indução da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase	49
18. Cinética da indução e repressão da síntese da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase	52
19. Repressão da síntese da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase por <u>D</u> -glucose 2%	53
20. Efeito da <u>D</u> -glucose sobre a indução da síntese das enzimas: (A) <u>L</u> -rhamnose desidrogenase, (B) <u>L</u> -rhamnonato desidratase e (C) 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -rhamnonato aldolase, por <u>L</u> -rhamnose em células de <i>Pullularia pullulans</i> em repouso	56
21. Efeito da <u>D</u> -glucose sobre a indução da síntese das enzimas: (A) <u>L</u> -rhamnose desidrogenase, (B) <u>L</u> -rhamnonato desidratase e (C) 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -rhamnonato aldolase, por <u>L</u> -rhamnose em células de <i>Pullularia pullulans</i> em crescimento.....	58

LISTA DE TABELAS

I	Purificação da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase de <i>Pullularia pululans</i>	29
II	Efeito de vários reagentes na atividade da <u>L</u> -rhamnose de desidrogenase	35
III	Valores de Rfs dos produtos enzimáticos da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase e <u>L</u> -rhamnono- γ -lactonase	38
IV	Determinação do produto da desidratase por diferentes métodos	41
V	Valores de Rfs dos produtos da <u>L</u> -rhamnonato desidratase e da 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -rhamnonato aldolase (sentido da síntese)	43
VI	Especificidade da 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -rhamnonato aldolase para aldeídos (sentido da síntese)	45
VII	Efeito de diferentes monossacarídeos como fontes de carbono na indução da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase	48
VIII	Efeito de diferentes monossacarídeos na repressão da síntese de <u>L</u> -rhamnose desidrogenase	50
IX	Efeito de diferentes monossacarídeos como fontes de carbono na indução da <u>L</u> -rhamnonato desidratase	54
X	Efeito de diferentes monossacarídeos como fontes de carbono na indução da 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -rhamnonato aldolase	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	- Adenosina trifosfato
AMP _c	- Adenosina monofosfato cíclico
DPE	- Divisão de Patologia Experimental
EDTA	- Etileno diamino tetraacetato-sal dissódico
FDH	- <u>L</u> -Fucose desidrogenase
K _m	- Constante de Michaelis-Menten
KDR	- 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -rhamnonato
KDF	- 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -fuconato
LDH	- Desidrogenase lática
NAD	- β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	- β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	- β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	- β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
P.M.R.	- Ressonância nuclear magnética de proton
p.p.m.	- Parte por milhão
P.F.	- Ponto de fusão
SH	- Grupos sulfidrílicos
TMS	- Tetrametilsilano
Tris	- Tris(hidroximetil)aminometano

RESUMO

A presença de L-rhamnose como única fonte de carbono no meio de cultura de *Pullularia pullulans*, induz a síntese de enzimas específicas que degradam L-rhamnose até piruvato e L-lactaldeído. Extratos de células de *Pullularia pullulans* crescidas em L-rhamnose, contêm uma desidrogenase NAD⁺-dependente que catalisa a oxidação do desoxiaçúcar à sua correspondente γ -lactona. Esses extratos contêm também uma lactonase que converte L-rhamnono- γ -lactona à L-rhamnonato, uma desidratase que catalisa a transformação de L-rhamnonato a 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato (KDR). Este último composto (KDR) sofre uma clivagem a piruvato e L-lactaldeído em reação catalisada por uma aldolase. Os produtos das reações enzimáticas dessa via metabólica de degradação de L-rhamnose foram isolados e caracterizados. Não foram constatados intermediários fosforilados. Foram demonstradas a indução e também a repressão por catabólitos das enzimas da via em células de *Pullularia pullulans*, em repouso e em crescimento. A caracterização destas enzimas e seus respectivos produtos de catálise evidencia uma via oxidativa, ainda não descrita, para a degradação de L-rhamnose.

1. INTRODUÇÃO

A rhamnose, uma metilpentose, na sua configuração L, está largamente distribuída na natureza, sendo a forma D mais rara.

Uma grande variedade de microrganismos utiliza L-rhamnose como única fonte de carbono. Encontramos L-rhamnose (6-desoxi-L-manose) em produtos naturais como Quercitrina (66), em certos glicosídeos cardiotônicos e saponinas (39), em pigmentos de plantas como o pó de "Quercitron", extrato "Quercitron", "Flavina" e "Flavina limão", que são usados nas indústrias de corantes (66) e em gomas e mucilagem de plantas (47). Foi determinada ainda a presença de L-rhamnose em polissacarídeos (23,93) e lipopolissacarídeos de origem bacteriana (39).

A presença de L-rhamnose não tem sido comprovada em tecidos animais. Aparentemente também não ocorre em substâncias de grupos sanguíneos, como acontece com a L-fucose.

O metabolismo de L-rhamnose por bactérias e fungos representa um vasto campo de pesquisa, bem como a caracterização e purificação das enzimas responsáveis pelos diferentes passos tanto de sua síntese como da degradação.

Os primeiros trabalhos sobre a utilização dessa 6-desoxihexose por bactérias foram realizados por Englesberg (30,31) em *Pasteurella pestis*. Nas experiências, a forma selvagem de *Pasteurella pestis* demonstrou incapacidade de utilizar L-rhamnose como fonte de carbono, mas ao sofrer mutação a cepa adquiriu capacidade em oxidar L-rhamnose quando crescida em presença deste açúcar. Duas enzimas foram detectadas neste mutante de *Pasteurella pestis*: L-rhamnose isomerase e L-rhamnulose quinase. A L-rhamnose isomerase catalisa a reação de isomerização de L-rhamnose à ceto-hexose correspondente e a L-rhamnulose quinase fosforila a L-rhamnulose formada à L-rhamnulose 1-fosfato em presença de ATP.

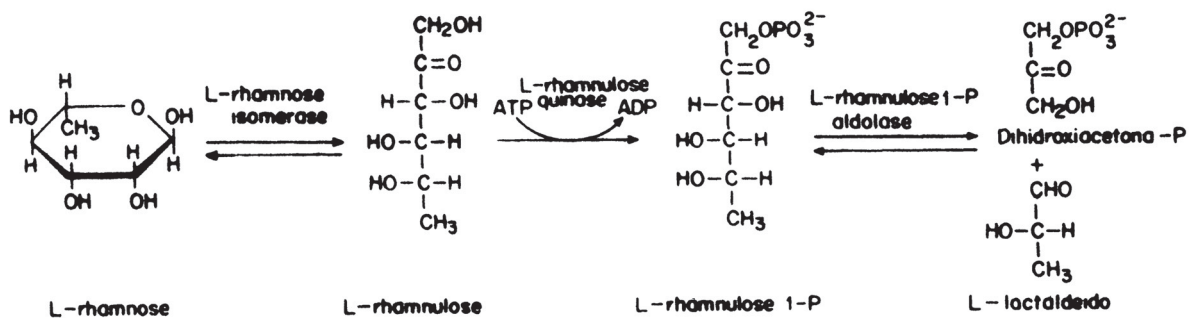
Em 1957, Wilson & Ajl (90) verificaram que suspensões de células de *Escherichia coli* B ou extratos dessas mesmas células isomerizavam L-rhamnose à L-rhamnulose. Essa reação foi confirmada mais tarde como sendo o primeiro passo na degradação de L-rhamnose em *Escherichia coli* com a purificação parcial e a determinação das propriedades da L-rhamnose isomerase.

Em extratos livres de células de *Escherichia coli*, Wil-

son & Ajl (91) e Takagi & Sawada (82) obtiveram a primeira evidência de uma enzima que fosforilava L-rhamnulose. Em 1964, Takagi & Sawada (83) e Chiu & Feingold (10) evidenciaram a presença de L-rhamnulose quinase em células de *Escherichia coli* crescidas em L-rhamnose, usando preparações parcialmente purificadas.

A L-rhamnulose 1-fosfato aldolase que catalisa a clivagem de L-rhamnulose 1-P à L-lactaldeído e dihidroxiacetona - fosfato, foi estudada por Sawada & Takagi (74) e Chiu & Feingold (11) em *Escherichia coli* e por Domagk & Heinrich (27) em células de *Lactobacillus plantarum*.

Até aqui, portanto, era conhecida apenas uma via de degradação de L-rhamnose, envolvendo ésteres fosfóricos, descrita para *Escherichia coli* (10,11,74,82,83,84), *Lactobacillus plantarum* (27) e *Arthrobacter pyridinolis* (49) que metabolizam a L-rhamnose através das seguintes reações:



Quando se refere ao metabolismo de desoxihexoses, não se pode deixar de lado a L-fucose (6-desoxi-L-galactose), que de fato é a que acumula maior quantidade de trabalhos publicados, tanto em microrganismos (35,36,40,43) como em mamíferos (59, 63, 75, 94).

Em *Escherichia coli* (33,35,40,43), da mesma forma, L-fucose é isomerizada à L-fuculose, fosforilada à L-fuculose 1-fosfato e clivada em dihidroxiacetona fosfato e L-lactaldeído. Ocorrem intermediários fosforilados em todos os casos citados.

Em 1961, Eagon (28) propôs um mecanismo de utilização de 6-desoxihexoses, L-fucose e L-rhamnose. Foi demonstrado que 18 espécies bacterianas têm a capacidade de utilizar ou uma das metilpentoses L-fucose e L-rhamnose ou ambas. A maioria dessas espécies u-

utiliza essas metilpentoses por isomerização, às suas correspondentes cetoses. Entretanto, a existência de uma segunda via foi sugerida com os resultados obtidos com *Sarcina lutea*, *Gaffkya tetragena*, *Bacillus megaterium* e *Rhizobium leguminosarum*, nas quais não foram detectadas isomerases nem quinases.

Mais tarde, Dahms & Anderson (18,21) encontraram uma via de oxidação direta para D-fucose, sem formação de intermediários fosforilados. Essa via não fosforilativa envolveria inicialmente a ação de duas desidrogenases solúveis: uma D-aldose desidrogenase NAD⁺-dependente, específica para D-aldoses que catalisa a oxidação às δ -lactonas correspondentes e uma L-arabino D-aldose desidrogenase NAD⁺(P)-dependente, que catalisa a oxidação de aldoses que apresentam a mesma configuração da L-arabinose formando γ -lactonas. Ambos os produtos das desidrogenases são hidrolisados ao ácido hexônico correspondente, por ação de lactonases ou espontaneamente em pHs alcalinos. A desidratação enzimática do ácido hexônico e a clivagem por ação de uma 2-ceto-3-desoxi-D-fuconato aldolase resulta na formação de piruvato e D-lactaldeído.

Pullularia pullulans (de Bary*) Berkhout - 1923 (**)também conhecido como *Aureobasidium pullulans* (13), *Dematium pullulans* (de Bary) Loew - 1868 (***) é um fungo amplamente distribuído na natureza e se caracteriza por ser leveduriforme. Pertence a classe dos Fungos Imperfeitos. Sua ocorrência não se restringe a locais ou materiais específicos. Também lhe tem sido atribuída a deterioração de pinturas e produtos de madeira.

A utilização de açúcares simples como fonte de carbono por fungos de gênero *Pullularia* foi descrita por Clark & Wallace (12). Os referidos pesquisadores verificaram que *Pullularia pullulans* possui enzimas constitutivas para a degradação da maioria dos mono e dissacarídeos mais comuns. Os estudos com extratos livres de células indicaram a presença de enzimas como a fosfoglucomutase, glucose 6-fosfato desidrogenase, frutose 1-6-difosfato aldolase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e de um sistema que o

* De BARY, H.A. Morphologie und Physiologie der Pilze Flechten und Myxomyceten. Leipzig, Engelmann, 1866, 316 p.

** BERKHOUT, M. Die Schimmelgeschlechter Monilia, Oidium, Oospora en Torula, Thesis, Utrecht. 1923. p. 54-55.

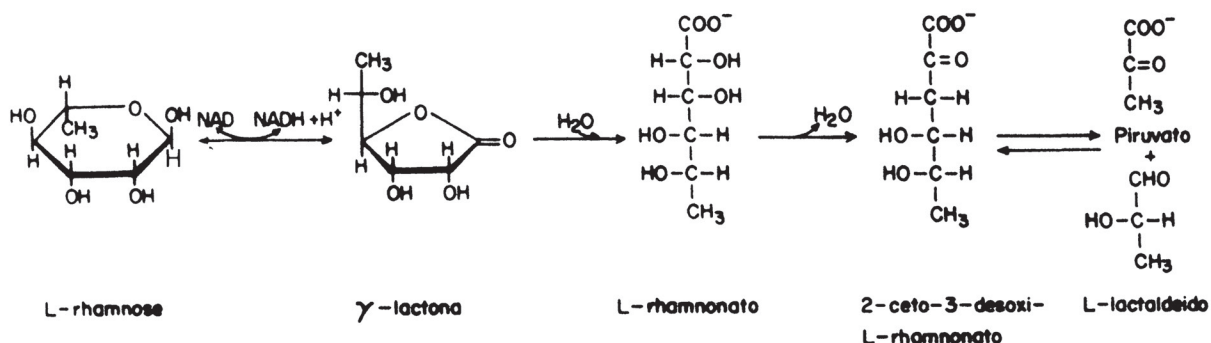
*** LOEW, E. Jb.Wiss.Bot, 6: 467, 1868.

xida a ribose 5-fosfato, indicando que tanto a via glicolítica de Embden-Meyerhoff como a via das pentoses-fosfato são operantes. Sugai & Veiga (80) encontraram uma xilitol desidrogenase em células de *Pullularia pullulans*.

Estudos realizados em nossos laboratórios (61,68) demonstraram que *Pullularia pullulans* utiliza adaptativamente a 6-desoxihexose, L-rhamnose como única fonte de carbono. Em experimentos com extratos livres de células não foram observadas reações de isomerização ou epimerização ensaiadas por vários métodos químicos e cromatográficos. No entanto, extratos de células crescidas em meio contendo L-rhamnose catalizavam especificamente a oxidação desse açúcar em presença de NAD^+ , sugerindo um mecanismo de utilização semelhante ao proposto por Eagon (28).

Guimarães & Veiga (37), em 1973, isolaram uma L-fucose desidrogenase (FDH) de *Pullularia pullulans*. A FDH de *Pullularia pullulans* oxida a L-fucose em presença de NAD^+ que funciona como receptor de eletrons; forma-se L-fucono- δ -lactona, que, por ser altamente instável sofre hidrólise espontânea e origina o ácido correspondente.

Esta tese tem por objetivo estudar o metabolismo de L-rhamnose por *Pullularia pullulans* através de uma via oxidativa direta ainda não conhecida. Esta via, diferente daquela descrita para *Escherichia coli* (10,11,74,82,90,91) e outras bactérias (27,30,31,49), envolveria uma oxidação à L-rhamnono- γ -lactona, a qual seria hidrolisada ao L-rhamnonato que seria desidratado ao ácido 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato e clivado ao piruvato e L-lactaldeído.



Serão estudadas, portanto, a indução e a caracterização das enzimas envolvidas nesta nova via de degradação de L-rhamnose, assim como os produtos formados nas reações catalisadas por estas enzimas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - SÍNTESE DE L-RHAMNÔNICO

O ácido L-rhamnônico foi preparado pelo método de Moore & Link (60): 8 ml de uma solução de L-rhamnose a 50% foram adicionados a 50 ml de metanol e misturados a 160 ml de solução metanólica de iodo a 7,12%. A mistura foi aquecida a 40°C e foram adicionados 230 ml de KOH 4% em metanol, gota a gota, durante 20 minutos, com agitação constante. A solução foi concentrada e o pH ajustado para 7,0 com ácido fórmico 0,25 M. Os cations desta solução foram removidos passando por uma coluna (3 x 40 cm) de Bio-Rad AG-50W x 8(20-50 mesh), forma H⁺. A coluna foi lavada com 600 ml de água destilada. O ácido L-rhamnônico foi detectado como L-rhamnonolactona no eluato, pelo método de Hestrin (41) e recuperado por liofilização. O resíduo seco foi dissolvido em 15 ml de água e passado por uma coluna (3 x 40 cm) de Bio-Rad-AG-2 x 4 (200-400 mesh), forma formiato; a coluna foi lavada com 1 litro de ácido fórmico 0,25 M e as frações contendo L-rhamnono- γ -lactona foram concentradas sob pressão reduzida, até xarope. O xarope foi dissolvido em mistura contendo 50 ml de metanol, 40 ml de dietiléter e 10 ml de clorofórmio e mantido a 4°C, por 24 horas. Os cristais de L-rhamnono- γ -lactona foram removidos por filtração e secos a vácuo. Rendimento = 2,0 g; P.F. = 149,5°C.

O espectro infravermelho do composto em pastilhas de KBr mostrou uma banda de absorção de grupo carbonílico no número de onda de 1 777 cm⁻¹ (3).

A preparação de sais de sódio de ácido L-rhamnônico foi efetuada mantendo-se a solução de L-rhamnono- γ -lactona em pH 9,0 com NaOH 2N à temperatura ambiente e, após 10 minutos, o pH foi ajustado para 7,0 com HCl 2N.

2.2 - SÍNTESE DE D E L-LACTALDEÍDOS

O L-lactaldeído foi sintetizado pela desaminação oxidativa de D-treonina conforme o método de Huff & Rudney (45): foram adicionados 9,75 g de ninhidrina à uma solução de 7 g de D-treonina dissolvida em 550 ml de água destilada e aquecida a 95°C. A reação procedeu-se a 95°C por 5 minutos. A solução, esfriada a tem

peratura ambiente, foram adicionados 13,7 g de bicarbonato de sódio. O precipitado floculento marrom foi removido por centrifugação e o sobrenadante foi tratado com 35,2 g de carvão ativado (Norit A) para remover a ninhidrina e o produto colorido. O carvão foi retirado por filtração e o filtrado foi passado através de uma coluna de Dowex 50- x 8 forma H^+ (3 x 50 cm) para remover os íons sódio e o excesso de D-treonina. O eluato (400 ml) foi concentrado, tratado com NaOH 0,1 N até obter pH 7,0 e usado para as reações da aldolase no sentido da síntese. D-lactaldeído foi preparado da mesma maneira que L-lactaldeído a partir de L-treonina. D e L-lactaldeídos foram demonstrados ser cromatograficamente puros. Metil glioxal (piruvaldeído), acetaldeído e formaldeído usados nas experiências foram obtidos comercialmente.

2.3 - ENZIMAS

Desidrogenase láctica de músculo de coelho, D-glucose-oxidase tipo II de *Aspergillus niger* e peroxidase de "horseradish" foram obtidas da Sigma Chemical Co., Louisiana, U.S.A.

2.4 - REAGENTES QUÍMICOS

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e sua forma reduzida (NADH), ácido 2-tiobarbitúrico, etileno diamino tetracetato (EDTA) e soro albumina bovina cristalina, foram fornecidos pela Sigma, enquanto que L-rhamnose, piruvato de sódio, Tris (hidroximetil) aminometano e cisteína foram adquiridos da Merck. Os demais reagentes usados foram também pró análise provenientes de várias fontes, todos tidos como puros.

2.5 - MICRORGANISMO

A cepa de *Pullularia pullulans*, isolada dos frutos de sapoti, foi cedida pelo Instituto Zimotécnico de Piracicaba, S.P.

2.6 - MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

A manutenção das cepas foi feita através de repiques periódicos em ágar Sabouraud-dextrose e também no "Meio de cultura

líquido (DPE)" cuja composição está descrita no ítem 2.7, acrescido de 1,75% de ágar e 0,5% de açúcar; os meios foram distribuídos em tubos e esterilizados. Os tubos foram inclinados e os repiques foram feitos na superfície dos meios sólidos com a utilização de alças de platina.

2.7 - MEIO DE CULTURA LÍQUIDO (DPE)

Pullularia pullulans foi crescido em meio líquido com a seguinte composição:

$(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$	1 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
KH_2PO_4	1,25 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,35 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0144 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0088 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,004 g
KCl	0,75 g
NaCl	0,25 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,000064 g
CaCl_2	0,1 g
CuCl_2	0,003 g
Extrato de levedura (Difco)	1 g
H_2O destilada q.s.p.	1 litro

O pH foi ajustado para 5,6 pela adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. O meio foi esterilizado a 1 atm (121°C) durante 20 minutos. As soluções dos açúcares a 25% foram esterilizados, separadamente, em vapor fluente durante 30 minutos e adicionadas assepticamente ao meio na concentração final de 0,2% ou 0,5% no caso da L-rhamnose e 1% no caso do glicerol. D-glucose foi adicionada nas concentrações de 0,2%, 1% ou 2%, dependendo do experimento.

2.8 - PREPARAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO

As cepas mantidas no meio ágar Sabouraud-dextrose fo-

ram repicadas para meio de cultura sólido DPE. As células leveduriformes de *Pullularia pullulans* foram inoculadas inicialmente em 100 ml de meio de cultura contendo 0,5 g ou 1 g de glicerol, em frascos Erlenmeyer de 500 ml. As incubações foram feitas a 28°C por 40 horas com agitação (120 rotações por minuto).

2.9 - MÉTODO DE CULTIVO

Quando as culturas do pré inóculo alcançavam uma leitura de 0,4 de densidade ótica a 660 nm, alíquotas de 30 ml eram retiradas e transferidas para frascos Erlenmeyer de 2 litros contendo 500 ml de meio de cultura mais o açúcar utilizado como fonte de carbono nas concentrações indicadas nas experiências.

Os crescimentos foram feitos por 28 horas, num agitador rotativo a 120 rotações por minuto e à temperatura de 28°C. Ao atingir a fase logarítima de crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g, por 15 minutos, em centrífuga refrigerada (0-4°C) e lavadas 2 vezes com KCl 0,154 M. Rendimentos de 5 g (pêso úmido/l) foram obtidos. As células foram conservadas a -15°C até sua utilização.

No caso de curvas de crescimento, foram acompanhados por turbidimetria determinando-se a 660 nm, no espectrofotômetro Coleman Junior, em intervalos de tempo. Nas experiências de repressão da síntese enzimática, o cultivo foi realizado como acima, com adição simultânea de L-rhamnose 0,5% e de 0,2% ou 2% de D-glucose.

2.10 - MÉTODO DE INDUÇÃO

O método de indução da síntese enzimática em células após crescimento prévio foi o seguinte: 10 ml de meio foram adicionados a culturas sólidas (meio DPE) de 48 horas e 3 a 5 ml da suspensão de células leveduriformes de *Pullularia pullulans* foram inoculados em 800 ml de meio contendo 1% de glicerol em frascos Erlenmeyer de 2 litros. A incubação foi a 28°C em agitador rotatório a 120 rotações por minuto e o crescimento controlado seguindo o aumento de turbidez a 660 nm, usando um espectrofotômetro Coleman Jr.

Curvas de calibração foram obtidas "plotando" a densidade ótica contra o número de células contadas em câmara Neubauer.

Depois de 40 horas, as células foram colhidas assepticamente por centrifugação a 3.000 x g por 15 minutos e lavadas 2 vezes com uma solução estéril de KCl 0,154 M. As células lavadas foram ressuspensas em uma quantidade apropriada de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2 contendo 0,5% de L-rhamnose, até uma densidade final de 2×10^8 a $2,5 \times 10^8$ células por mililitro. Esta suspensão foi incubada com agitação (120 rpm) a 28°C nos tempos indicados nas experiências.

Nos experimentos de repressão da síntese de L-rhamnose desidrogenase foram designadas de "condições não repressoras" quando as células de *Pullularia pullulans* foram pré-crescidas, por 40 horas, em meio contendo glicerol 1%, colhidas, lavadas e suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2, contendo L-rhamnose 0,5%; de "condições de mínima repressão" quando as células pré - crescidas por 40 horas, em glicerol 1% foram suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2, contendo L-rhamnose 0,5% e D-glucose 0,2% e de "condições de repressão máxima" quando as células foram pré-crescidas em D-glucose 0,5% e suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2, contendo L-rhamnose 0,5% e D-glucose 2%.

Para o teste de atividade de L-rhamnose desidrogenase foram colhidas amostras, nos tempos indicados nas experiências, usando-se células permeabilizadas com tolueno (ítem 2.11) ou extra^{tos} livres de células (ítem 2.13).

2.11 -. PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS COM TOLUENO

Amostras de 4 a 10 ml de suspensão de células de *Pullularia pullulans* obtidas conforme 2.9 ou 2.10, foram retiradas em intervalos de tempo, esfriadas em banho de gelo e centrifugadas por 5 minutos a 10.000 x g. O sedimento foi lavado com 5 a 7 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, centrifugado e suspenso em 1 a 2 ml do mesmo tampão. Amostras foram retiradas para medir a absor^bância a 660 nm. Foi adicionado tolueno (concentração final de 1%) à suspensão e a mistura foi vigorosamente agitada em um mistu^rador Vortex por 10 segundos e incubada por 20 minutos a 37°C.

Amostras (0,01 a 0,02 ml) destas células tratadas por tolueno foram utilizadas para a determinação da atividade da L-rhamnose desidrogenase.

2.12 - MEDIDA DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

O consumo de oxigênio por células intactas de *Pullularia pullulans* foi medido manometricamente em aparelho de Warburg. Células de 24 horas crescidas em D-glucose ou L-rhamnose foram lavadas 2 vezes com KCl 0,154 M e suspensas em tampão 0,1M, pH 5,6, para obter uma suspensão com uma leitura de 530 no fotocolorímetro Klett (filtro 42). D-glucose e L-rhamnose foram os substratos empregados. O sistema de incubação continha 2,5 ml de suspensão de células (33 mg em peso seco de células crescidas em D-glucose e 33 mg de células em peso seco crescidas em L-rhamnose) e 20 μ moles de substrato. O sistema foi incubado a 28°C em condições aeróbicas e com agitação constante de 90 oscilações por minuto. O CO₂ liberado foi retido em 0,15 ml de NaOH a 15%. O coeficiente respiratório (QO₂) foi definido como microlitro de oxigênio consumido por mg de células (peso seco) por hora.

2.13 - PREPARAÇÃO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

Células congeladas de *Pullularia pullulans* (1 g) foram maceradas, por 10 minutos, em gral, com 3 g de alumina. A pasta obtida foi suspensa em 3 ml de tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0, contendo EDTA na concentração de 1×10^{-3} M e centrifugada a 17.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi empregado como fonte de enzima. Todas as operações foram realizadas à temperatura de 0-4°C. Para os ensaios da L-rhamnonato desidratase e 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase, o extrato livre de células foi dialisado contra tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0, por uma noite, a 4°C.

2.14 - MEDIDA DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

2.14.1 - Determinação da atividade da L-rhamnose desidrogenase

A atividade da L-rhamnose desidrogenase foi medida seguindo a velocidade de redução de NAD⁺ a 340 nm em Espectrofotômetro Varian Techtron, modelo 635-D, acoplado a um registrador e termostatisado a 30°C. Em 1 ml do sistema de incubação continha 15 μ moles de tampão Tris-HCl, pH 9,0, 5 μ moles de L-rhamnose, 0,5 μ mol de NAD⁺, 1 μ mol de EDTA e enzima suficiente para produzir u-

ma variação de D.O. de $0,01 - 0,03 \text{ min}^{-1}$. Sob as condições do ensaio a velocidade da reação era proporcional à concentração enzimática em função do tempo.

A atividade específica foi expressa com μmoles de NADH formados por miligrama de proteína, por minuto. Foram feitos controles em que se omitiu a L-rhamnose.

2.14.2 - Determinação da atividade da lactonase

Para a medida da atividade da lactonase, o sistema de incubação (0,3 ml) continha 40 μmoles de tampão fosfato, pH 7,0, 10 μmoles de L-rhamnono- γ -lactona e enzima em quantidades apropriadas. A mistura foi incubada a 30°C . Nos tempos determinados a reação foi interrompida pela adição de 2,0 ml de reagente Hidroxilamina-NaOH e, após 5 minutos, o volume foi completado a 3,0 ml com H_2O e a cor desenvolvida com HCl-FeCl_3 (41).

A absorbância foi medida a 540 nm. Os controles, para hidrólise não enzimática, continham enzima desnaturada pelo calor. Como padrão foi utilizado a L-rhamnono- γ -lactona sintetizado quimicamente. A atividade específica foi expressa como μmoles de lactona hidrolisada por minuto, por miligrama de proteína.

2.14.3 - Determinação da atividade da desidratase

A atividade da L-rhamnonato desidratase que catalisa a formação do ácido 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnônico a partir de L-rhamnonato, foi evidenciada pelo método de Weissbach & Hurwitz (89), para compostos 2-ceto-3-desoxi. Esse método é muito sensível para a determinação de compostos que podem formar β -formilpiruvato sob oxidação com periodato, que reage com ácido 2-tiobarbitúrico para formar um cromogênio cuja absorção máxima está entre 549 a 550nm.

Para a medida da atividade da L-rhamnonato desidratase o sistema de incubação (1,0 ml) continha 40 μmoles de tampão fosfato pH 7,0, 10 μmoles de sulfato de magnésio, 10 μmoles de L-rhamnonato de sódio e enzima em quantidades apropriadas. A mistura foi incubada por uma hora e interrompida por aquecimento a 100°C por 3 minutos. Alíquotas de 0,2 ml foram submetidas ao teste, pela adição de 0,25 ml de HIO_4 0,025 N em H_2SO_4 0,125 N. Depois de 20 minutos à temperatura ambiente, 0,5 ml de arsenito de

sódio 2% em HCl 0,5 N foi adicionado com agitação. Após 2 minutos, 2 ml de ácido 2-tiobarbitúrico (pH 2,0) foram adicionados e após agitação, a mistura foi aquecida a 100°C por 10 minutos. A cor desenvolvida foi medida a 550 nm em espectrofotômetro Varian. Os controles não continham L-rhamnonato, que foi adicionado após a desnaturação da enzima.

A atividade específica foi expressa em μ moles de KDR produzido por hora, usando um valor de coeficiente de extinção molar de 20.000 a 550 nm seguindo o método de Weissbach & Hurwitz (89), por miligrama de proteína.

2.14.4 - Determinação da atividade da 2-ceto-3-desoxi- L - rhamnonato aldolase - Sentido da síntese

Para a determinação da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase no sentido da síntese, o sistema de incubação (1 ml) continha 46 μ moles de tampão fosfato, pH 7,4, 10 μ moles de sulfato de magnésio, 5 μ moles de piruvato de sódio, 2 μ moles de L-lactaldeído e quantidades apropriadas de enzima. A mistura foi incubada a 30°C. Após uma hora de incubação, a reação foi interrompida por aquecimento a 100°C por 3 minutos. A proteína desnaturada foi removida por centrifugação e alíquotas (0,2 ml) foram tomadas para a dosagem de 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato pelo método de Weissbach & Hurwitz (89). O teste de atividade foi realizado da mesma maneira que para L-rhamnonato desidratase. Foram feitos os seguintes tipos de controles: a - sem ambos os substratos (piruvato e L-lactaldeído); b - somente com piruvato; c - somente com L - lactaldeído. Após a desnaturação da enzima foram adicionados os substratos omitidos.

A atividade específica foi expressa em μ moles de KDR produzido por hora, usando um valor de coeficiente de extinção molar de 20.000 a 550 nm, seguindo o método de Weissbach e Hurwitz (89), por mg de proteína.

2.14.5 - Determinação da atividade da 2-ceto-3-desoxi- L - rhamnonato aldolase - Sentido da clivagem

A atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase foi determinada no sentido da clivagem por um método indireto baseado

na determinação do piruvato formado. O sistema de incubação continha 0,2 μ mol de substrato (KDR) isolado da reação da desidratase, 40 μ moles de tampão fosfato, pH 7,0, 5 μ moles de sulfato de magnésio, extrato bruto de *Pullularia pullulans*, dialisado (0,8 mg de proteína) 0,2 μ mol de NADH e desidrogenase láctica (0,48 U). A oxidação de NADH foi seguida no espectrofotômetro Varian, a 340 nm. Foram feitos controles ou sem KDR ou sem enzima.

A atividade específica foi expressa em μ moles de NADH formados por minuto por mg de proteína.

2.15 - PURIFICAÇÃO DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE

2.15.1 - Preparação do extrato livre de células (Extrato bruto) - Aproximadamente 15 g de células congeladas de *Pullularia pullulans*, crescidas em L-rhamnose, foram trituradas em gral de porcelana com 15 g de "glass beads" (tipo 909-5005 Minnesota Mining Mineral Corp.). O macerado foi suspenso em 30 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, contendo 1 mM de EDTA. A suspensão foi centrifugada por 30 minutos a 17.000 x g; o sobrenadante foi guardado e o precipitado foi suspenso em 20 ml do mesmo tampão e recentrifugado. Os dois sobrenadantes foram reunidos constituindo - se no extrato livre de células que foi utilizado nas etapas de purificação. As etapas da purificação foram todas realizadas entre 0 e 4°C.

2.15.2 - Tratamento com cloreto de manganês - Ao extrato bruto (40 ml) foi adicionado $MnCl_2$ na concentração final de 2 μ moles/ml. A mistura permaneceu por 15 minutos em banho de gelo e o precipitado formado foi removido por centrifugação a 3.000 x g.

2.15.3 - Tratamento com sulfato de amônio - Ao sobrenadante (42 ml) obtido da última centrifugação foi adicionada uma solução saturada de sulfato de amônio, pH 7,0 (18 ml), até 30% de saturação. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi saturado até 60% com solução saturada de sulfato de amônio. O precipitado foi dissolvido em 7,0 ml de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0, contendo EDTA na concentração de 1 mM (Fração $(NH_4)_2SO_4$).

2.15.4 - Filtração em Sephadex G-50 - A fração $(NH_4)_2SO_4$

foi "dessalificada" em coluna (1 x 34 cm) de Sephadex G-50, equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0. A eluição foi realizada com o mesmo tampão e frações de 2,5 ml foram coletadas em coletor Beckman, automático, refrigerado, modelo 132. As frações de atividade específica mais altas foram reunidas: Filtrado Sephadex G-50.

2.15.5 - Cromatografia em DEAE - celulose - O filtrado Sephadex G-50 foi adsorvido em uma coluna (1,6 x 40 cm) de DEAE-celulose equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0. A eluição foi realizada com um gradiente linear de pH e força iônica, usando um recipiente contendo 200 ml de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,0 e uma câmara de mistura contendo 200 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 9,0. Foram coletadas frações de 3,0 ml a uma velocidade de fluxo de 18 ml por hora. As frações com maior atividade enzimática foram reunidas (frações 60-64).

2.16 - ISOLAMENTO DOS PRODUTOS

2.16.1 - Isolamento do produto da reação da L-rhamnose desidrogenase - O produto da reação da L-rhamnose desidrogenase foi preparado incubando 450 μ moles de tampão Tris-maleato, pH 6,8, 300 μ moles de L-rhamnose, 250 μ moles de piruvato de sódio (pH 6,5), 0,48 U de desidrogenase láctica, 5 μ moles de NAD^+ e 1,4 unidades de L-rhamnose desidrogenase em um volume total de 8,5 ml. A reação foi seguida pela formação de lactona (41). Após incubação a 25°C por 2 horas a reação foi interrompida pela passagem da mistura de reação em coluna de Dowex 50 (200-400 mesh), forma H^+ , e o eluato foi concentrado a 37°C. O xarope obtido foi dissolvido com uma mistura de metanol, dietiléter e clorofórmio a 4°C da mesma maneira como para a obtenção da L-rhamnono- γ -lactona sintetizada quimicamente. Os cristais isolados da reação da desidrogenase foram submetidos aos processos de identificação.

2.16.2 - Isolamento do produto de L-rhamnono- γ -lactonase. O produto da reação da L-rhamnono- γ -lactonase foi isolado de um sistema de incubação de 1,0 ml contendo 30 μ moles de L-rhamnono- γ -lactona, 120 μ moles de tampão fosfato, pH 7,0 e extrato livre de células de *Pullularia pullulans* (2,0 mg de proteína). Foi incuba-

do por uma noite a 30°C. A mistura foi aplicada em coluna Dowex 1- x 8 forma formiato. A coluna foi lavada com água destilada e L-rhamnonato foi eluído com ácido fórmico 0,25 M. O eluato foi concentrado a 37°C e submetido a diferentes métodos de identificação.

2.16.3 - Isolamento do produto da reação da L-rhamnonato desidratase - O produto da reação da L-rhamnonato desidratase foi preparado incubando-se 500 μ moles de L-rhamnonato de sódio, 150 μ moles de tampão fosfato, pH 7,0, 50 μ moles de $MgSO_4$, extrato livre de células de *Pullularia pullulans* (24 mg de proteína), dialisado, num volume total de 10 ml. A mistura foi incubada à 30°C por 5 horas. A reação foi interrompida pela adição de 2 volumes de álcool etílico e centrifugada. O sobrenadante foi passado em uma coluna de Dowex 50 W- H^+ e o material isento de cations foi eluído da coluna com 500 ml de água desionizada. O eluato foi concentrado e o produto foi purificado por cromatografia em uma coluna de Dowex 1- x 8 forma formiato (200 - 400 mesh), usando gradiente linear de ácido fórmico de 0 a 1 M (1.000 ml). As frações contendo o produto de desidratação da L-rhamnonato (entre 0,8N - 0,9N de ácido fórmico) foram reunidas e concentradas a 30°C à vácuo, para remover o ácido fórmico. O xarope foi dissolvido em água e o pH ajustado para 6,0. Essa solução foi liofilizada para formar um sólido amorfo, que foi submetido a processos de identificação.

2.16.4 - Isolamento do produto da reação da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato - Aldolase. Sentido da síntese - Foi empregado um sistema de incubação (2,0 ml) que continha 80 μ moles de tampão fosfato pH 7,4, 30 μ moles de piruvato de sódio, 20 μ moles de L-lactaldeído, 20 μ moles de $MgSO_4$ e extrato livre de células de *Pullularia pullulans* (3,0 mg de proteína), dialisado. A mistura foi incubada a 30°C por 5 horas. A reação foi interrompida pela adição de 2 volumes de álcool etílico e centrifugada. A purificação do produto da reação da aldolase no sentido da síntese foi realizada da mesma maneira que para o produto obtido da L-rhamnonato desidratase. O material amorfo foi submetido a diferentes métodos de identificação.

2.17 - MÉTODOS ANALÍTICOS

A concentração de NADH foi determinada a 340 nm usando-se um coeficiente de extinção molar de $6\ 220\ \text{M}^{-1}/\text{cm}$ (5). L-rhamnono- γ -lactona foi determinada como ácido hidroxâmico pelo método de Hestrin (41). Os ácidos aldônicos foram determinados como lactonas pelo mesmo método, após lactonização por fervura em HCl 0,1 M por 5 minutos (18). L-rhamnose presente no meio de cultura foi determinada pelos métodos de Dische & Shettles (25) e também enzimaticamente pela L-rhamnose desidrogenase de *Pullularia pullulans*. As propriedades da L-rhamnose desidrogenase foram estudadas (69) e adaptadas para o desenvolvimento de um método espectrofotometricamente simples para a determinação de L-rhamnose (8). O extrato livre de células de *Pullularia pullulans* foi utilizado como fonte de enzima. Amostras e soluções padrões contendo de 0,05 a 0,2 μmol de L-rhamnose foram pipetadas para tubos contendo 10 μmoles de tampão Tris-HCl. pH 9,0 com 1 mM de EDTA, 4 μmoles de NAD^+ , e 10 mU de L-rhamnose desidrogenase. As misturas foram incubadas 20 minutos a 20°C, completadas para 1 ml com água, transferidas para uma cubeta espectrofotométrica e ensaiada a 340 nm.

Açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi (79) & Nelson (62), usando D-glucose como padrão.

A D-glucose do meio de cultura foi determinada pela glucose oxidase, peroxidase e O-anisidina em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 (16). A medida da densidade ótica foi feita a 420 nm em espectrofotômetro Coleman Jr., sendo usado α -D-glucose como padrão.

A determinação dos compostos 2-ceto-3-desoxi foi efetuada pelo método da semicarbazona de McGee & Doudoroff (54) e também pela técnica do periodato-tiobarbiturato de Weissbach & Hurwitz (89).

O piruvato foi determinado pela desidrogenase láctica de músculo de coelho, seguindo-se a oxidação do NADH espectrofotometricamente a 340 nm, num espectrofotômetro Varian Techtron, modelo 635-D. O sistema de incubação continha amostra com até 1 μmol de piruvato, 0,28 μmol de NADH, 8,3 μmoles de tampão fosfato pH 7,4 e 0,48 U de desidrogenase láctica. O volume final foi de 1 ml (15).

A proteína foi determinada pelo método de Lowry et al (53), tendo soro albumina como padrão, e também pelo método de Warburg & Christian (88).

L-lactaldeído foi determinado espectrofotometricamente pelo método de Barker & Summerson (4).

Os ácidos aldônicos e suas lactonas foram caracterizados por cromatografia ascendente em papel Whatman nº 1. Os solventes empregados nas corridas cromatográficas foram: a(I) n-propanol: ácido fórmico: água (6:3:1), b(II) n-butanol:piridina:água (6:4:3) e c(III) etanol: clorofórmio:amônia concentrado:água (70:40:20:2).

Os eletroforetogramas foram efetuados em tampão acetato de amônio, 0,2 M, pH 5,8 a 24 V/cm, utilizando como suporte papel Whatman nº 1.

Os açúcares foram detectados nos cromatogramas e nos eletroforetogramas com nitrato de prata (85) e p-anisidina (42); as lactonas foram visualizadas pela formação de ácidos hidroxâmicos (1); os ácidos aldônicos foram detectados pelo mesmo método depois de lactonização "in situ" com HCl 0,2 N e aquecendo a 100°C por quinze minutos; os ácidos aldônicos também foram visualizados usando uma solução de azul de bromofenol 0,04% em etanol (6); os ceto-ácidos foram detectados utilizando O-fenilenodiamina 0,05% em ácido tricloroacético 10% (6); os ácidos 2-ceto-3-desoxi-aldônicos foram visualizados usando o reativo periodato-tiobarbitúrico de Warren (9).

A espectroscopia de ressonância nuclear magnética de proton (P.M.R.) foi realizada em espectrômetro Varian XLFT-100 a 33°C, sendo a amostra de 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato (40 mg) dissolvida em D₂O. Os deslocamentos químicos (38) foram baseados no deslocamento químico do TMS contido num capilar coaxial ao tubo da amostra (TMS externo). Os espectros incorporaram 4.096 "data points" com "sweep width" de 1000 Hz, "acquisition time" de 2,05 s e "pulse width" 38,22 µs, em experimento de "one pulse sequence".

3. RESULTADOS

3.1 - Crescimento de *Pullularia pullulans*

Pullularia pullulans utiliza L-rhamnose como fonte de carbono conforme se pode observar da curva de crescimento (Figura 1). No entanto, apresenta um tempo de geração maior (5 horas) quando comparado àquele da D-glucose (3 horas). O crescimento observado em meio contendo glicerol apresentou um tempo de geração de 7,0 horas.

3.2 - Utilização de L-rhamnose por células intactas de *Pullularia pullulans*

A capacidade de células intactas de *Pullularia pullulans* cultivadas em D-glucose (Figura 2) e em L-rhamnose (Figura 3) oxidarem L-rhamnose foi avaliada pela medida de consumo de oxigênio. Os valores de QO_2 para as células crescidas em D-glucose foram: endógeno 0,75, D-glucose 6,5 e L-rhamnose 2,3. Em L-rhamnose foram: endógeno 0,75, D-glucose 8,1 e L-rhamnose 7,5. Foi observado que as células crescidas em D-glucose oxidaram D-glucose imediatamente, mas a L-rhamnose somente após um período de lag de 1 hora, enquanto que as células crescidas em L-rhamnose oxidam ambos, D-glucose e L-rhamnose, imediatamente.

3.3 - Crescimento, utilização de L-rhamnose e síntese da L-rhamnose desidrogenase, em células de *Pullularia pullulans* previamente crescidas em L-rhamnose.

Os extratos livres de células de *Pullularia pullulans* cultivadas em L-rhamnose apresentaram uma atividade de L-rhamnose desidrogenase NAD^+ -dependente. O experimento designado para determinar a relação entre velocidade de crescimento, utilização da L-rhamnose e síntese da L-rhamnose desidrogenase está mostrado na Figura 4. Pode-se observar que as células alcançaram a fase estacionária quando a maior parte do açúcar foi metabolizado. A atividade enzimática, expressa como miliunidades por mililitro de extrato livre de células, aumentou em função da massa celular, enquanto que a atividade específica permaneceu constante. Este re-

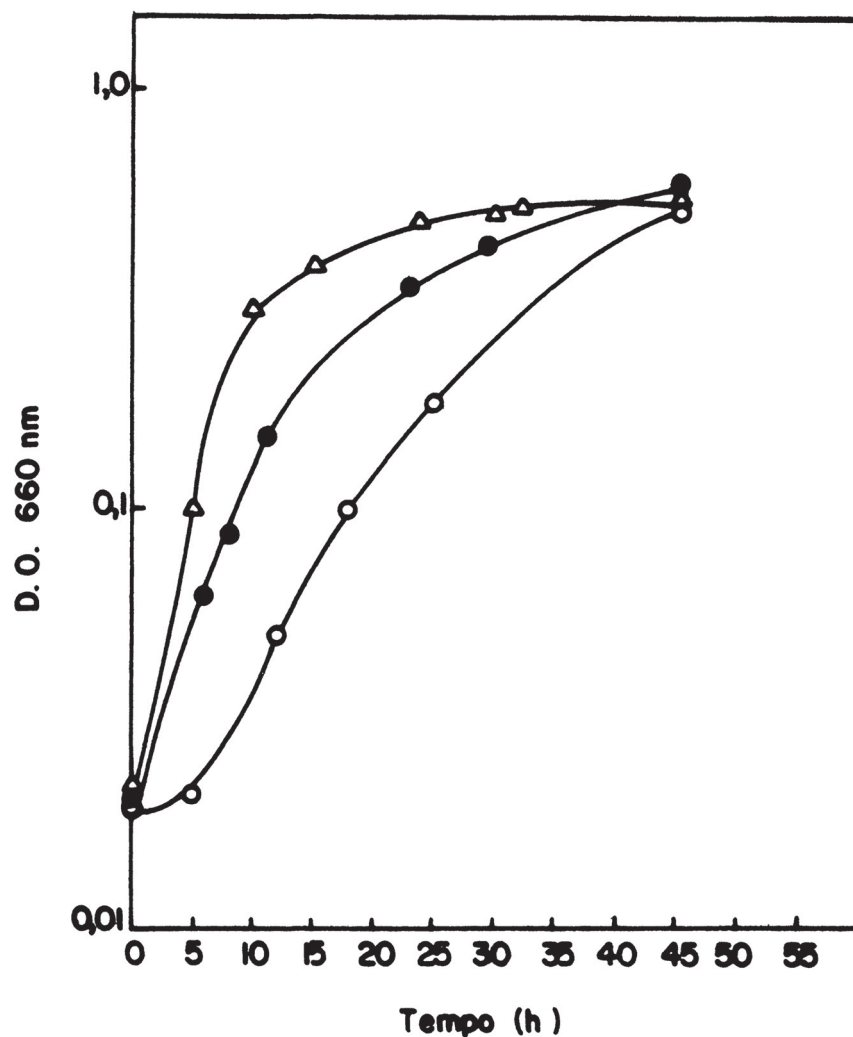


FIGURA 1 - Curvas de crescimento de *Pullularia pullulans* em presença de diferentes fontes de carbono.

O crescimento das células foi realizado conforme Materiais e Métodos utilizando-se frascos de 2 l com 500 ml de meio. O meio foi suplementado com 1% de: (Δ) D-glucose, (\bullet) L-rhamnose e (\circ) glicerol, como única fonte de carbono. Foram retiradas alíquotas de 3 ml para se proceder à leitura da densidade ótica, que foi realizada à 660 nm em espectrofotômetro Coleman Junior.

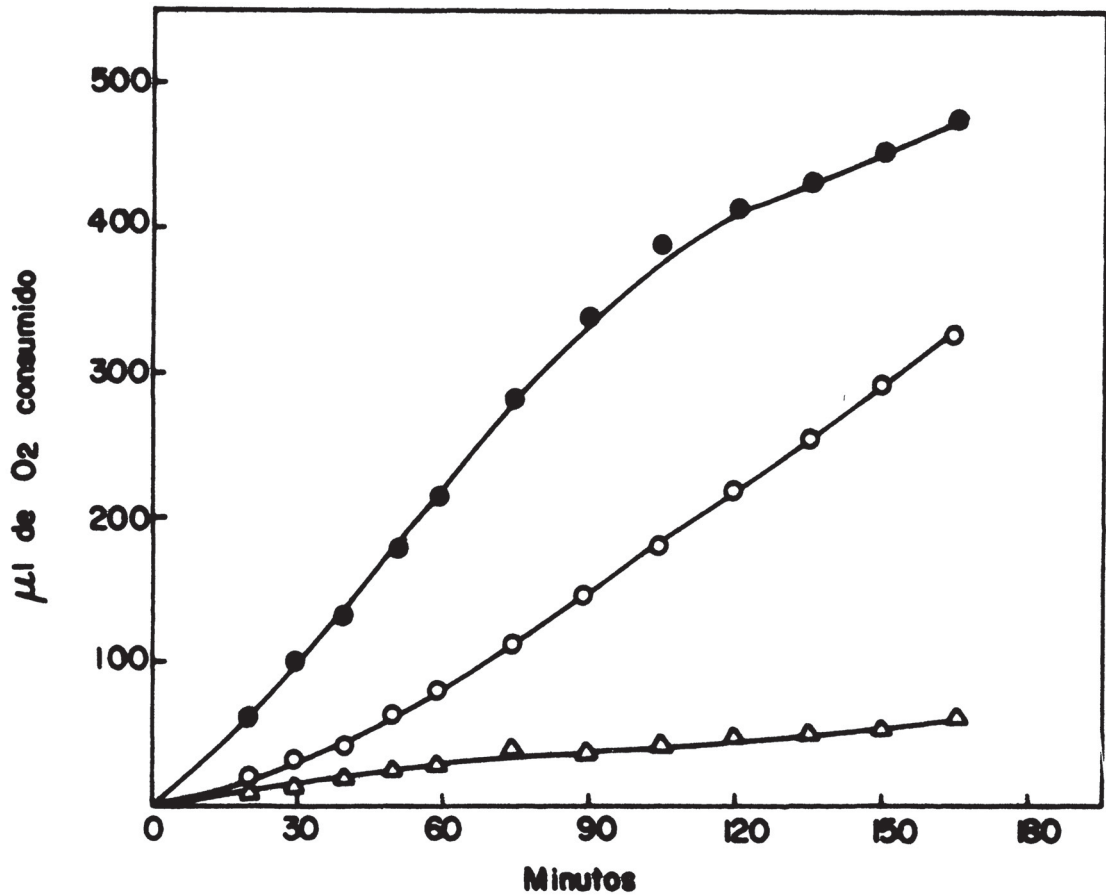


FIGURA 2 - Utilização de D-glucose e L-rhamnose por células intactas de *Pullularia pullulans* crescidas na presença de D-glucose.

Sistema de incubação: a mistura continha 2,5 ml de uma suspensão de *Pullularia pullulans* em tampão fosfato 0,1 M, pH 5,6 (33 mg de células em peso seco) e 20 µmoles de substrato. O sistema foi incubado a 28°C sob agitação constante de 90 oscilações/minuto. O CO₂ liberado foi retido em 0,15 ml de NaOH a 15%.

- (-●-) D-glucose
- (-○-) L-rhamnose
- (-△-) Endógeno

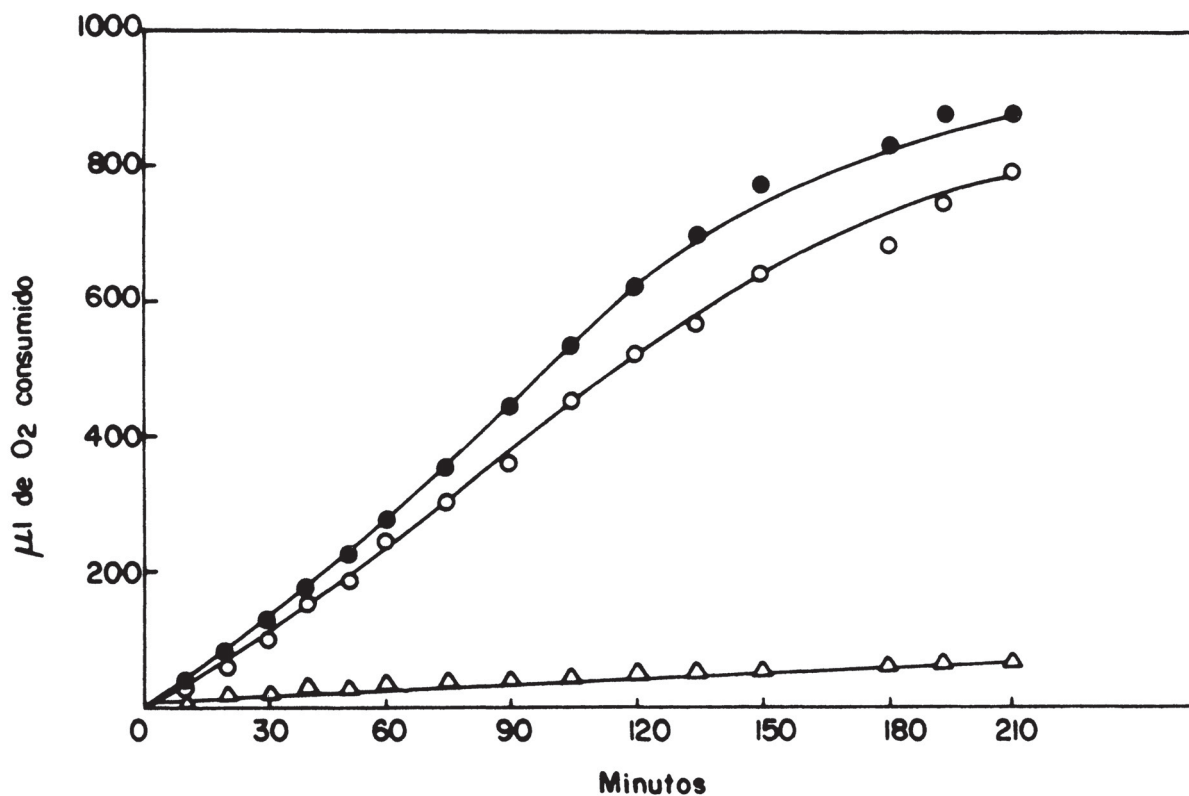


FIGURA 3 - Utilização de D-glucose e L-rhamnose por células intactas de *Pullularia pullulans* crescidas na presença de L-rhamnose.

Sistema de incubação: a mistura de incubação continha 2,5 ml de uma suspensão de *Pullularia pullulans* em tampão fosfato 0,1 M, pH 5,6 (33 mg de células em peso seco) e 20 μmoles de substrato. O sistema foi incubado a 28°C sob agitação constante de 90 oscilações/minuto. O CO₂ liberado foi retido em 0,15 ml de NaOH a 15%.

- (-●-) D-glucose
- (-○-) L-rhamnose
- (-Δ-) Endógeno

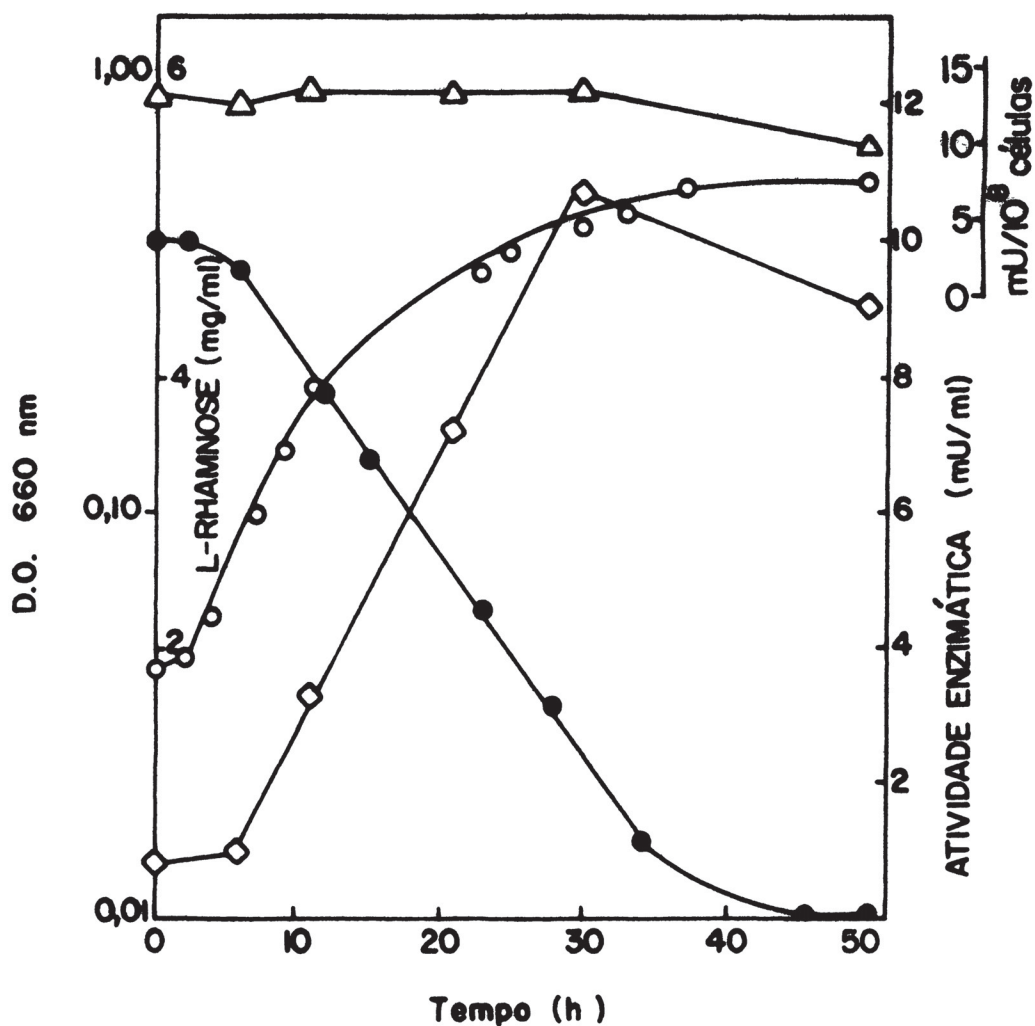


FIGURA 4 - Crescimento, utilização de L-rhamnose e síntese de L-rhamnose desidrogenase em função do tempo, por células de *Pullularia pullulans* previamente crescidas em L-rhamnose.

As células de *Pullularia pullulans* pré-crescidas em L-rhamnose foram inoculadas na concentração de $5,24 \times 10^6$ células/ml, em meio líquido com L-rhamnose 0,5%. As condições de agitação e temperatura foram realizadas conforme Materiais e Métodos. Nos tempos indicados o crescimento foi seguido pelas leituras de densidade ótica a 660 nm. Amostras foram coletadas para a determinação do consumo de L-rhamnose (8,25) e das unidades de L-rhamnose desidrogenase no extrato bruto ou em células toluenizadas. L-rhamnose desidrogenase (mU/ml) (-o-); L-rhamnose desidrogenase (mU/10⁸ células) (-Δ-); L-rhamnose no meio (-●-); absorbância a 660 nm (-o-).

sultado foi observado porque o inóculo inicial foi crescido em L-rhamnose e portanto a síntese da enzima estava totalmente expressa no início da experiência.

Nenhuma evidência foi encontrada que indicasse atividade de L-rhamnulose quinase quando se incubou o extrato livre de células com L-rhamnose ou L-rhamnulose e ATP. Este mesmo extrato não foi capaz de catalisar a isomerização de L-rhamnose e L-rhamnulose, em diferentes pHs.

3.4 - Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da L-rhamnose desidrogenase em células de *Pullularia pullulans* em crescimento.

A Figura 5 mostra o aumento de atividade específica da L-rhamnose desidrogenase nos extratos livres de células, obtidas durante 24 horas de crescimento do fungo em L-rhamnose. O pré-inóculo nesta experiência foi crescido em glicerol 1%.

3.5 - Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da L-rhamnonato desidratase em células de *Pullularia pullulans* em crescimento.

A Figura 6 mostra que a cultura crescida em presença de L-rhamnose induz a síntese de uma L-rhamnonato desidratase, que catalisa a desidratação de L-rhamnonato. Neste experimento as células de *Pullularia pullulans* utilizadas como pré-inóculo foram crescidas em glicerol 1%.

3.6 - Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase em células de *Pullularia pullulans* em crescimento.

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que o crescimento das células de *Pullularia pullulans* em meio contendo L-rhamnose induz a síntese de uma aldolase que catalisa a clivagem de 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato. O inóculo inicial foi crescido em glicerol 1%.

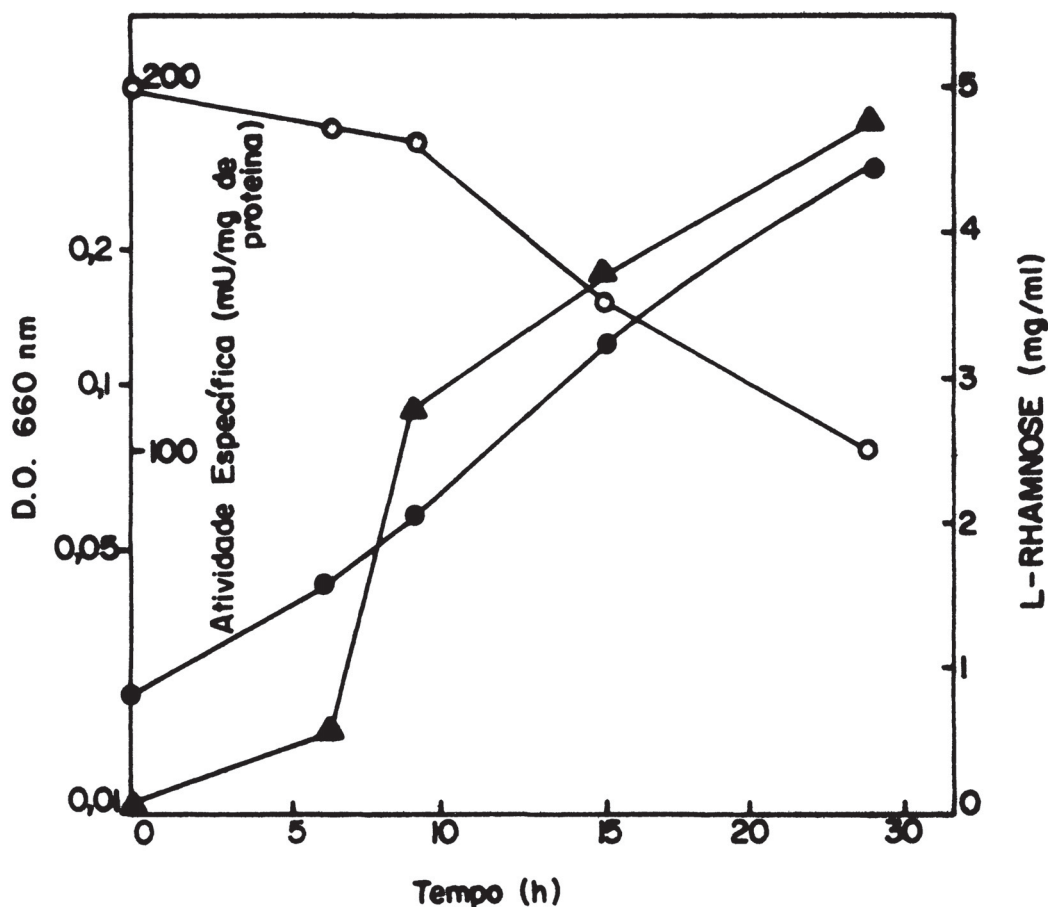


FIGURA 5 - Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da L-rhamnose desidrogenase em células de *Pullularia pullulans* em crescimento.

As células de *Pullularia pullulans* foram pré-crescidas em glicérol 1% e foram inoculadas na concentração de $2,4 \times 10^5$ células/ml, em meio líquido com L-rhamnose 0,5%. As condições de crescimento foram realizadas conforme Materiais e Métodos. Nos tempos indicados amostras foram coletadas para a determinação do consumo de L-rhamnose (8,25) e das atividades específicas da L-rhamnose desidrogenase. O crescimento foi seguido pelas leituras de densidade óptica a 660 nm. A atividade específica da L-rhamnose desidrogenase (mU/mg proteína) (-▲-); L-rhamnose do meio (-o-); absorvância a 660 nm (-●-).

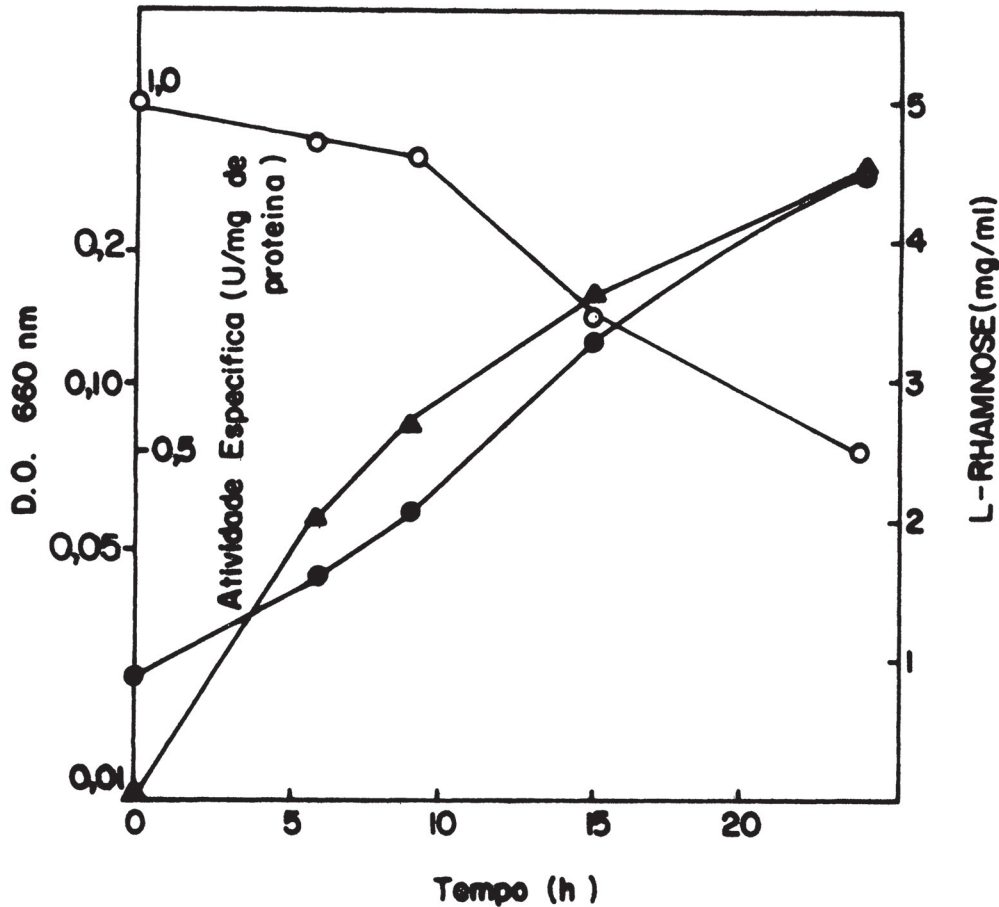


FIGURA 6 - Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da L-rhamnonato desidratase em células de *Pullularia pullulans* em crescimento.

As células de *Pullularia pullulans* pré-crescidas em glicerol 1%, foram inoculadas na concentração de $2,4 \times 10^5$ células/ml, em meio líquido contendo L-rhamnose 0,5%. As condições de crescimento foram realizadas conforme Materiais e Métodos. Nos tempos indicados o crescimento foi seguido pela leituras de densidade ótica a 660 nm e amostras foram coletadas para a determinação das unidades de L-rhamnonato desidratase e do consumo de L-rhamnose (8, 25). L-rhamnonato desidratase (U/mg proteína) (-▲-); L-rhamnose no meio (-●-);absorbância a 660 nm (-○-). A atividade de L-rhamnonato desidratase foi expressa em μ moles de KDR produzido, usando um valor de coeficiente de extinção molar de 20.000 à 550 nm, seguindo o método de Weissbach & Hurwitz (89).

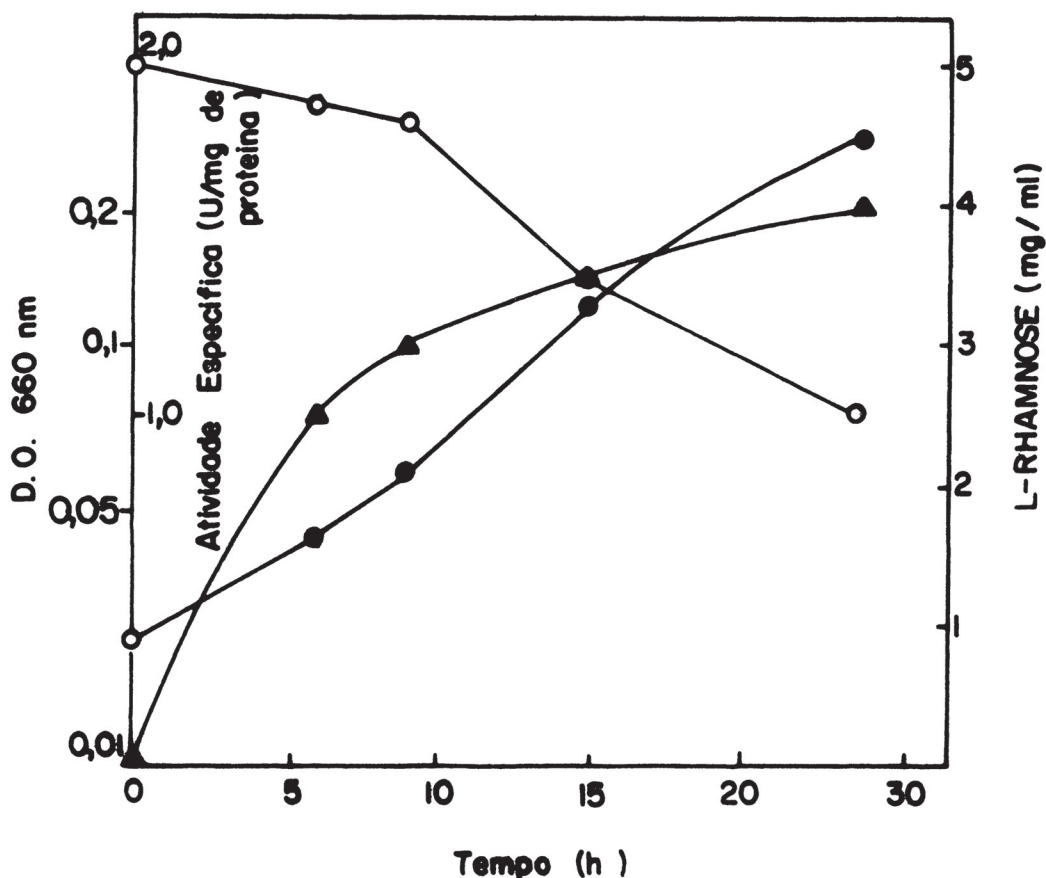


FIGURA 7 - Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase em células de *Pullularia pullulans* em crescimento.

As células de *Pullularia pullulans*, pré-crescidas em glicerol 1%, foram inoculadas na concentração de $2,4 \times 10^5$ células/ml, em meio líquido com L-rhamnose 0,5%. As condições de crescimento foram realizadas conforme Materiais e Métodos. Nos tempos indicados o crescimento foi seguido pela leituras de densidade ótica a 660 nm. Amostras foram coletadas para a determinação das unidades de 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase e do consumo de L-rhamnose (8, 25). 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase (U/mg proteína) (-▲-); L-rhamnose no meio (-●-); absorvância a 660 nm (-○-). A atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase, no sentido da síntese, foi expressa em μ moles de KDR produzido usando um valor de coeficiente de extinção molar de 20.000 \AA 550 nm, seguindo o método de Weissbach & Hurwitz (89).

3.7 - Caracterização da L-rhamnono- γ -lactonase em células de *Pullularia pullulans* crescidas em L-rhamnose.

No extrato livre de células de *Pullularia pullulans* crescidas em L-rhamnose, foi encontrada uma atividade de L-rhamnono- γ -lactonase que catalisa a delactonização de L-rhamnono- γ -lactona em L-rhamnonato, como se pode verificar na figura 8. Esta atividade de lactonase foi proporcional ao tempo. A atividade específica foi igual a 0,2 μ mol de L-rhamnono- γ -lactona hidrolisada por miligrama de proteína por minuto.

3.8 - Purificação da L-rhamnose desidrogenase de *Pullularia pullulans*.

As etapas de purificação da L-rhamnose desidrogenase estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados do processo total de purificação estão expressos na Tabela I. A enzima foi purificada 75 vezes em relação ao extrato livre de células e com um rendimento de 9%. A Figura 9 mostra o perfil de eluição da L-rhamnose desidrogenase em coluna de DEAE-celulose. Como se pode observar apareceu somente um pico com atividade enzimática entre as frações 60 a 64. A fração 61 foi a mais ativa com uma purificação de 100 vezes em relação ao extrato bruto.

As frações de maior atividade específica foram reunidas e utilizadas como fonte de enzima para os testes de caracterização.

3.8.1 - Estabilidade da enzima

A atividade da L-rhamnose desidrogenase no extrato livre de células permanece estável pelo menos 6 meses a -20°C . A fração DEAE-celulose perde mais de 50% de sua atividade a 4°C em uma semana.

3.8.2 - Efeito da variação do pH

O efeito da variação do pH com respeito à atividade da L-rhamnose desidrogenase está mostrada na Figura 10. Pode-se verificar que existe uma forte dependência da atividade enzimática com a variação do pH de incubação e que a atividade ótima da enzima

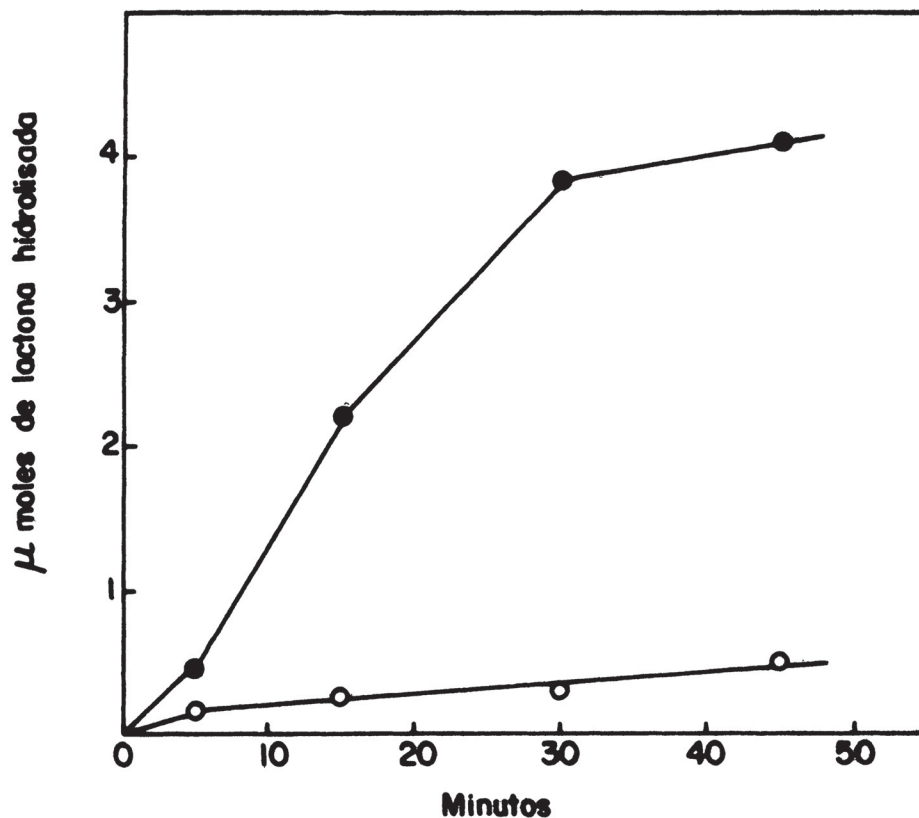


FIGURA 8 - Atividade da L-rhamnono- γ -lactonase em função do tempo.

O sistema de incubação (0,3 ml) continha 40 μ moles de tampão Tris-HCl pH 7,0, 10 μ moles de L-rhamnono- γ -lactona e enzima (1 mg de proteína) para a curva de tempo (-●-). A mistura foi incubada a 30°C. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 ml de hidroxilamina-NaOH (41). Os controles continham enzima desnaturada pelo calor.

(-●-) Atividade da L-rhamnono- γ -lactonase
 (-○-) Controle

TABELA I - Purificação da L-rhamnose desidrogenase de *Pullularia pullulans*.

Etapa	Volume (ml)	Proteína total (mg)	Atividade total (unidades)	Atividade específica (unid/mg prot.)	Rendi- mento (%)	Purifi- cação
Extrato bruto	40	1400	28,0	0,02	100	-
MnCl ₂	42	1010	29,4	0,03	105	1,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,2	360	27,7	0,08	99	4,0
Sephadex G-50	11,8	194	15,3	0,08	55	4,0
DEAE-celulose frações 60-64	15	1,78	2,6	1,5	9	75,0

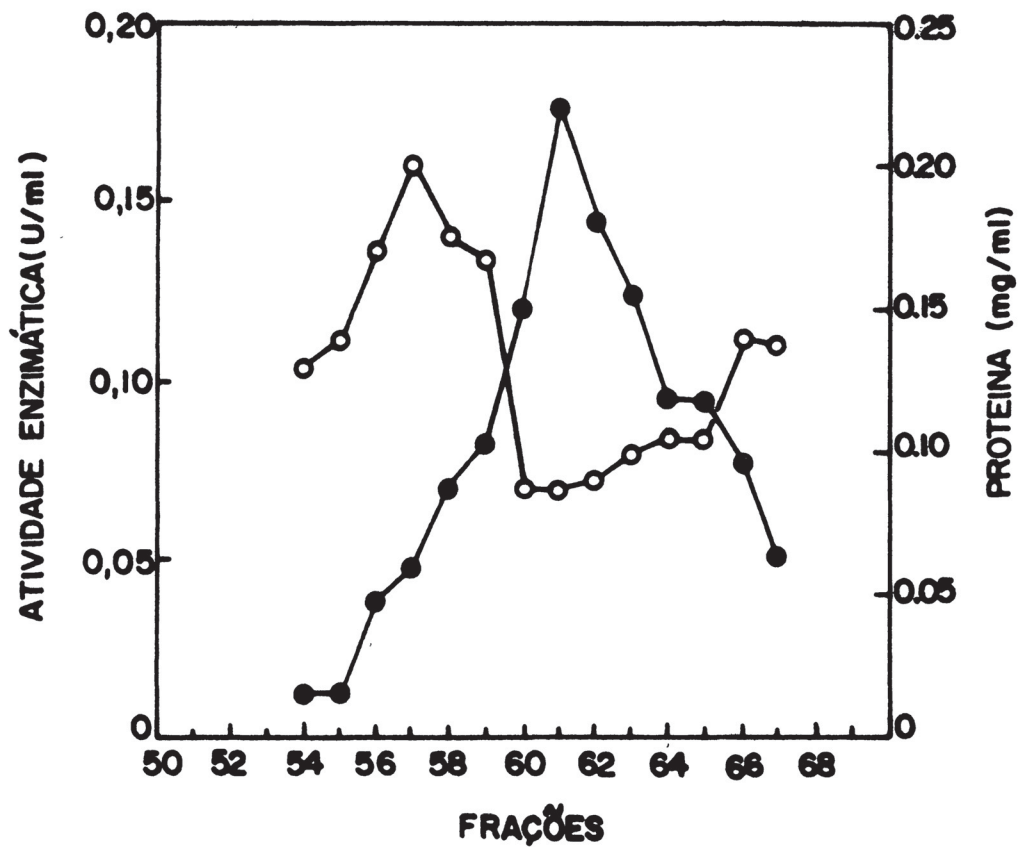


FIGURA 9 - Purificação da L-rhamnose desidrogenase de *Pullularia pullulans* por DEAE-celulose.

A atividade enzimática (-●-) da L-rhamnose desidrogenase foi determinada espectrofotometricamente seguindo a velocidade de redução de NAD^+ . A mistura de reação foi a mesma descrita em Materiais e Métodos com 50 μl de cada fração enzimática. Proteína (mg/ml) (-○-).

se encontra em torno de pH 9,0 no sentido da oxidação.

3.8.3 - Efeito da concentração do substrato

O efeito da concentração de L-rhamnose e NAD^+ , respectivamente, na velocidade da reação está mostrado nas Figuras 11 e 12. Os valores de K_m à 28°C, determinados pelos métodos de Lineweaver e Burk (51) são 2×10^{-4} M para L-rhamnose e 2×10^{-5} M para NAD^+ .

3.8.4 - Especificidade pelo substrato

Foi estudada a especificidade da enzima, substituindo-se L-rhamnose no sistema de incubação padrão por uma série de D- e L-aldoses. Os seguintes compostos, na concentração de 5 mM, não foram substratos quando utilizados na mistura de incubação: D e L-arabinose, D e L-fucose, D-galactose, D e L-manose, D e L-xilose e D-glucose.

Com relação ao cofator, a L-rhamnose desidrogenase é estritamente dependente de NAD^+ . Nenhuma atividade foi observada quando NADP era adicionada à mistura de incubação mesmo na concentração de 20 mM. Também não foi observada nenhuma atividade combinando-se as D e L-aldoses com NADP .

3.8.5 - Ativadores e inibidores

A Tabela II mostra que a L-rhamnose desidrogenase não depende da presença de cátions divalentes; pelo contrário, diversos íons metálicos divalentes causaram inibição. O envolvimento de grupos sulfidrílicos na atividade enzimática foi mostrado pelo efeito do ácido p-mercuribenzoato, o qual inibia 90% da atividade enzimática na concentração de 2 mM. A mesma concentração de ácido iodoacetato inibia 40% da atividade enzimática.

3.8.6 - Reversibilidade e equilíbrio

A oxidação de L-rhamnose é uma reação reversível. Esta reversibilidade pode ser demonstrada medindo-se a oxidação de NADH na presença de L-rhamnono- γ -lactona sintetizado, quimicamente, se

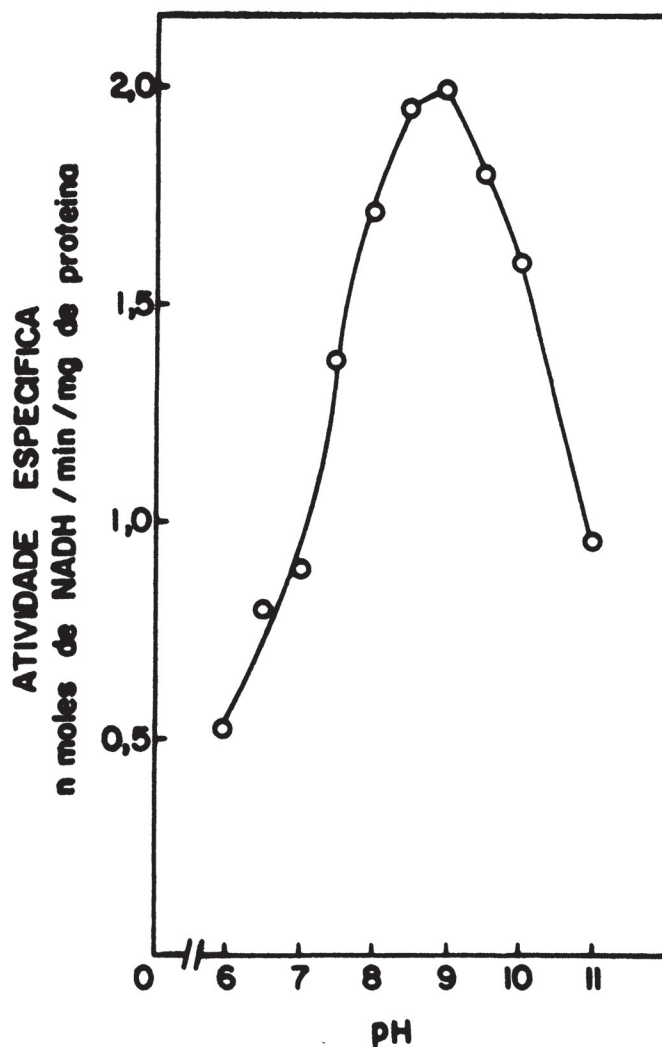


FIGURA 10 - Efeito do pH na atividade da L-rhamnose desidrogenase de *Pullularia pullulans*.

Sistema de incubação (1,0 ml): 15 μ moles de tampão fosfato entre pH 6,0 e pH 7,0, 15 μ moles de tampão Tris-HCl entre 7,0 e pH 9,0 e 15 μ moles de tampão glicina-NaOH entre pH 9,0 e pH 11,0, 5 μ moles de L-rhamnose, 0,5 μ mol de NAD^+ , 1 μ mol de EDTA e 0,2 unidade de enzima.

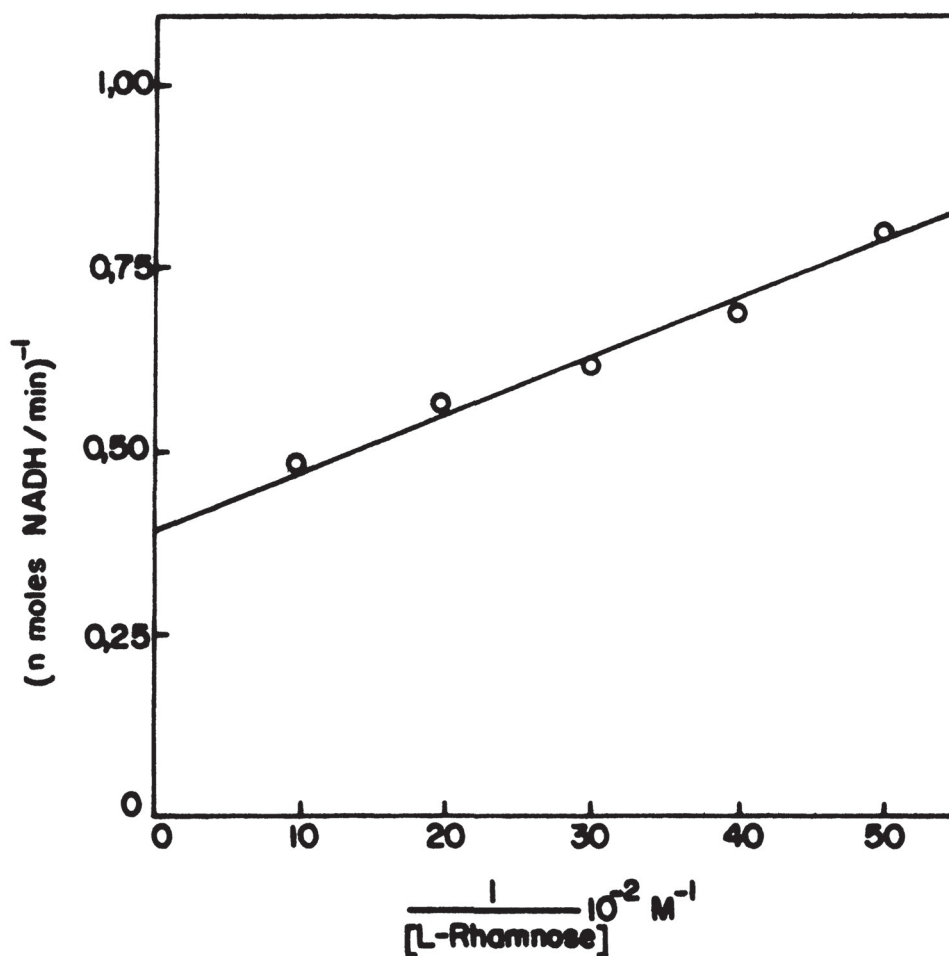


FIGURA 11 - Efeito da concentração de L-rhamnose sobre a atividade da L-rhamnose desidrogenase. Determinação da constante de Michaelis-Menten.

Sistema de reação (1,0 ml): 15 μ moles de tampão Tris - HCl, pH 9,0, 0,5 μ mol de NAD^+ , 1 μ mol de EDTA, 4,3 μ g de proteína e as quantidades indicadas de L-rhamnose. A temperatura de reação foi de 28°C.

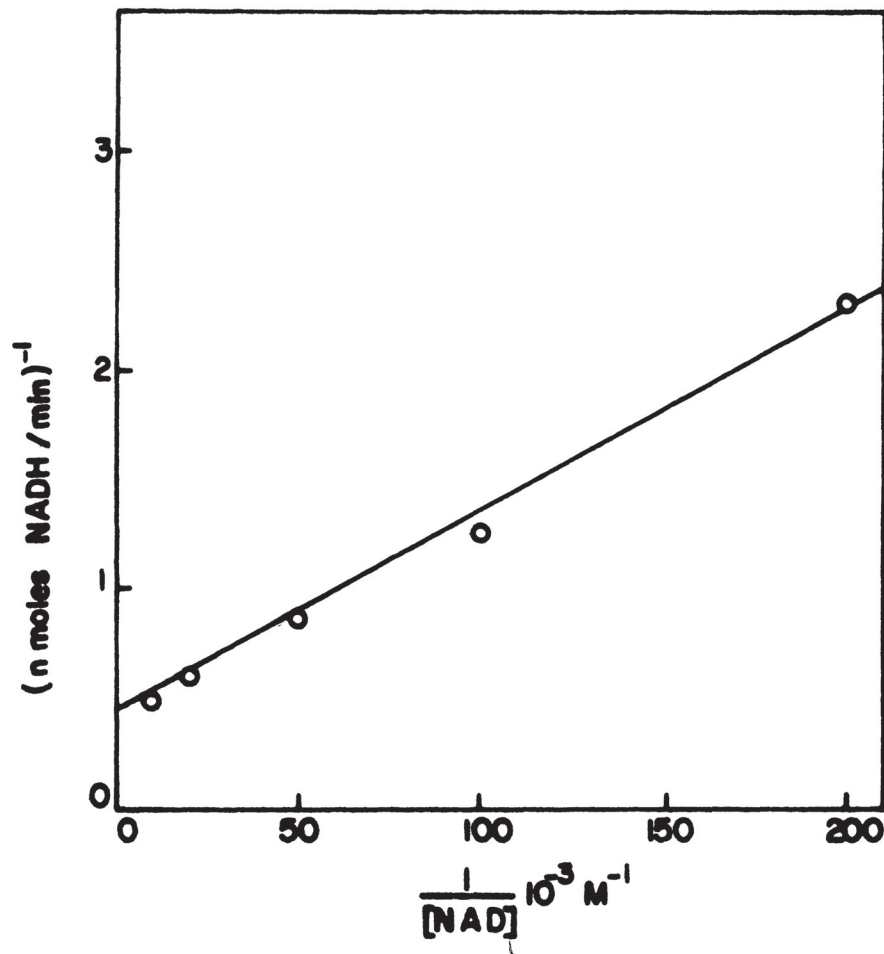


FIGURA 12 - Efeito da concentração de NAD^+ sobre a atividade da L-rhamnose desidrogenase. Determinação da constante de Michaelis-Menten.

Sistema de incubação (1,0 ml): 15 μmoles de tampão Tris-HCl, pH 9,0, 1,0 μmol de EDTA, 5 μmoles de L-rhamnose e as quantidades indicadas de NAD^+ . A temperatura da reação foi de 28°C.

TABELA II - Efeito de vários reagentes na atividade da L-rhamnose desidrogenase.

Reagente	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)
Sem adição	-	100
MgCl ₂	6,7	100
CoSO ₄	6,7	50
ZnCl ₂	6,7	25
CuSO ₄	6,7	20
EDTA	20,0	63
p-Mercuribenzoato	2,0	10
Iodoacetato de sódio	2,0	60

A mistura de reação com volume final de 1,0 ml, continha 15 μ moles de tampão Tris-HCl pH 9,0, 5 μ moles de L-rhamnose, 0,5 μ mol de NAD⁺, 0,2 unidade de enzima e as respectivas concentrações de cada reagente.

gundo técnica descrita em **Materiais e Métodos**. Nem D-galactono- γ -lactona nem D-glucono- γ -lactona serviram como substratos para a enzima ou inibiram a oxidação do NADH na presença de L-rhamnono- γ -lactona. O sistema de incubação (3 ml) continha: 50 μ moles de Tris/maleato (pH 6,8), 0,6 μ mol de NADH, 10 μ moles de L-rhamnono- γ -lactona e 0,64 unidade de L-rhamnose desidrogenase. No equilíbrio a concentração de NADH era 0,126 mM.

A constante de equilíbrio para a reação: L-rhamnose + NAD⁺ \rightleftharpoons L-rhamnono- γ -lactona + NADH⁺ + H⁺, em ambas as direções foi de 12 μ M.

3.8.7 - Identificação dos produtos das reações da L-rhamnose desidrogenase e da L-rhamnonolactonase.

O produto da reação da L-rhamnose desidrogenase foi isolado conforme descrito em **Materiais e Métodos**. Os cristais obtidos na purificação foram submetidos às técnicas de identificação. O referido composto deu reação positiva com os reativos do método de Hestrin para lactonas (41) e foi visualizado nos solventes a e b pelo método de Abdel-Akher & Smith como ácidos hidroxâmicos (1), tendo como padrão uma autêntica L-rhamnono- γ -lactona. O espectro infra vermelho dos cristais coincidiu com aquele do L-rhamnono- γ -lactona sintetizado quimicamente, conforme mostra a Figura 13. Este composto apresenta a absorção característica de grupo carbonílico no número de onda de 1777 cm^{-1} (3). O espectro foi feito no espectrofotômetro Beckman IR-18. O produto da reação da lactonase foi cromatografado nos solventes a e b e migrou como o ácido L-rhamnônico sintetizado quimicamente. O ácido L-rhamnônico foi lactonizado "in situ" e revelado como lactona pelo método de Abdel-Akher & Smith (1). Os valores de Rfs dos produtos enzimáticos e dos padrões de L-rhamnono- γ -lactona e de ácido L-rhamnônico estão apresentados na Tabela III. Como pode ser observado os Rfs dos produtos das reações da desidrogenase e da lactonase são coincidentes com os padrões de L-rhamnono- γ -lactona e ácido L-rhamnônico sintetizados quimicamente.

3.9 - Identificação do produto da L-rhamnonato desidratase.

O produto da reação da L-rhamnonato desidratase isolado

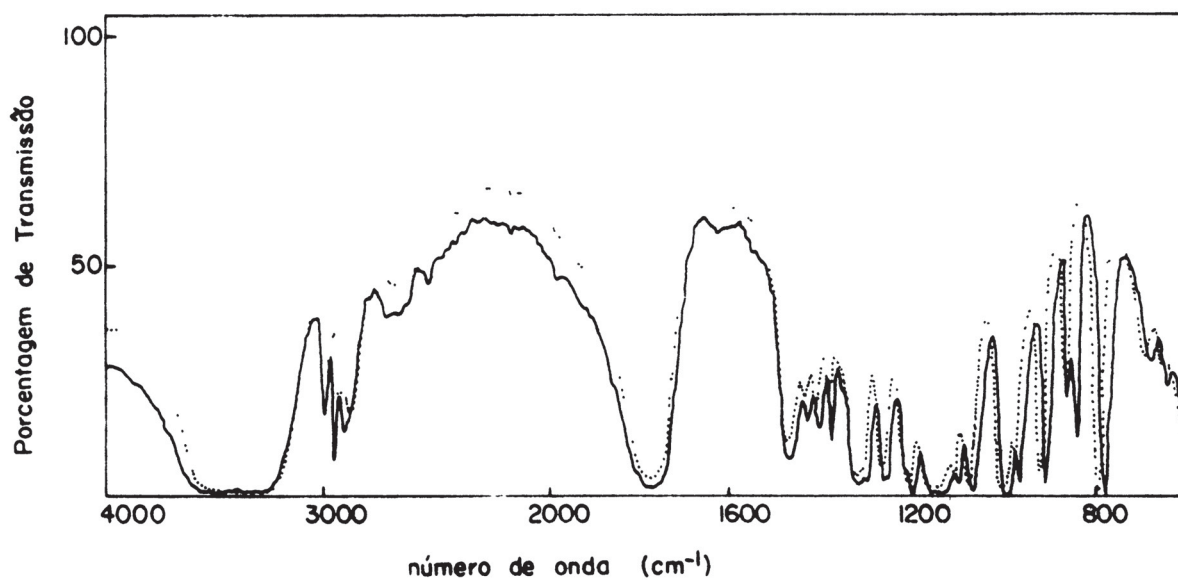


FIGURA 13 - Espectro infravermelho comparativo das lactonas do ácido L-rhamnônico.

..... lactona sintetizada enzimaticamente por L-rhamnose desidrogenase de *P. pullulans*.

— γ -lactona do ácido L-rhamnonico, sintetizada quimicamente.

TABELA III - Valores dos Rfs dos produtos enzimáticos da L-rhamnose desidrogenase e L-rhamnono- γ -lactonase.

Composto	Valores de Rfs	
	Solvente a	Solvente b
<u>L</u> -rhamnose	0,43	0,59
<u>L</u> -rhamnono- γ -lactona*	0,68	0,78
Ácido <u>L</u> -rhamnônico*	0,25	0,12
Produto da desidrogenase	0,65	0,77
Produto da lactonase	0,25	0,11

Os produtos enzimáticos foram isolados, cromatografados e revelados conforme descrito em Materiais e Métodos.

* Padrões sintetizados quimicamente.

conforme Materiais e Métodos, foi comparado com o comportamento de outros ácidos 2-ceto-3-desoxi-L-aldônicos (17, 24, 65). O composto foi eluído como único pico em coluna de Dowex 1-x 8, forma formiato, cromatografado nos solventes a, b e c e visualizado com o revelador periodato-tiobarbitúrico de Warren (9). Os valores de R_f para solvente a foram 0,75 e solventes b e c 0,37. Os compostos que reagem com α -cetoácidos formam cromógenos com espectro de absorção característicos. A reação da produto da desidratase com semicarbazida (54) resultou um composto com λ máxima em 250 nm e a reação com O-fenilenodiamina (48) produziu um composto com absorção máxima em 330 nm: 360 nm. Com periodato e ácido 2-tiobarbitúrico resultou um composto colorido com uma absorção máxima em 550 nm, como mostra a Figura 14, que é instável em álcali. Esta é uma característica do complexo ácido 2-tiobarbitúrico- β -formilpiruvato; β -formilpiruvato é um produto da reação do periodato com ácidos 2-ceto-desoxi-aldônicos. A redução com NaBH_4 produziu compostos ácido-tiobarbitúrico negativos como era de se esperar, uma vez que formil-lactato, resultante da oxidação pelo periodato dos ácidos metassacarínicos (produto de redução do 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato), não reage com ácido 2-tiobarbitúrico para formar um cromógeno. A Tabela IV mostra a determinação quantitativa do produto de reação pelos métodos de semicarbazida (54), periodato-tiobarbitúrico (89) e o piruvato resultante da clivagem do produto formado foi determinado com desidrogenase láctica. O produto da reação catalisada pela desidratase foi submetido a espectroscopia de ressonância nuclear magnética de próton (P.M.R.). A análise desse composto apresentou um sinal de δ 1,68, outro com δ 2,71 e 2 "doublet" a δ 7,3 e δ 6,58.

3.10 - Identificação dos produtos da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase

3.10.1 - Sentido da clivagem - A clivagem de 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato pela aldolase pode ser demonstrada pela caracterização dos produtos da reação, piruvato e L-lactaldeído. Para demonstrar a ação da aldolase no sentido da clivagem, foi utilizado o KDR isolado biologicamente como substrato da reação da aldolase (Materiais e Métodos), uma vez que não foi possível a síntese química desse composto. O piruvato foi evidenciado pela reação com

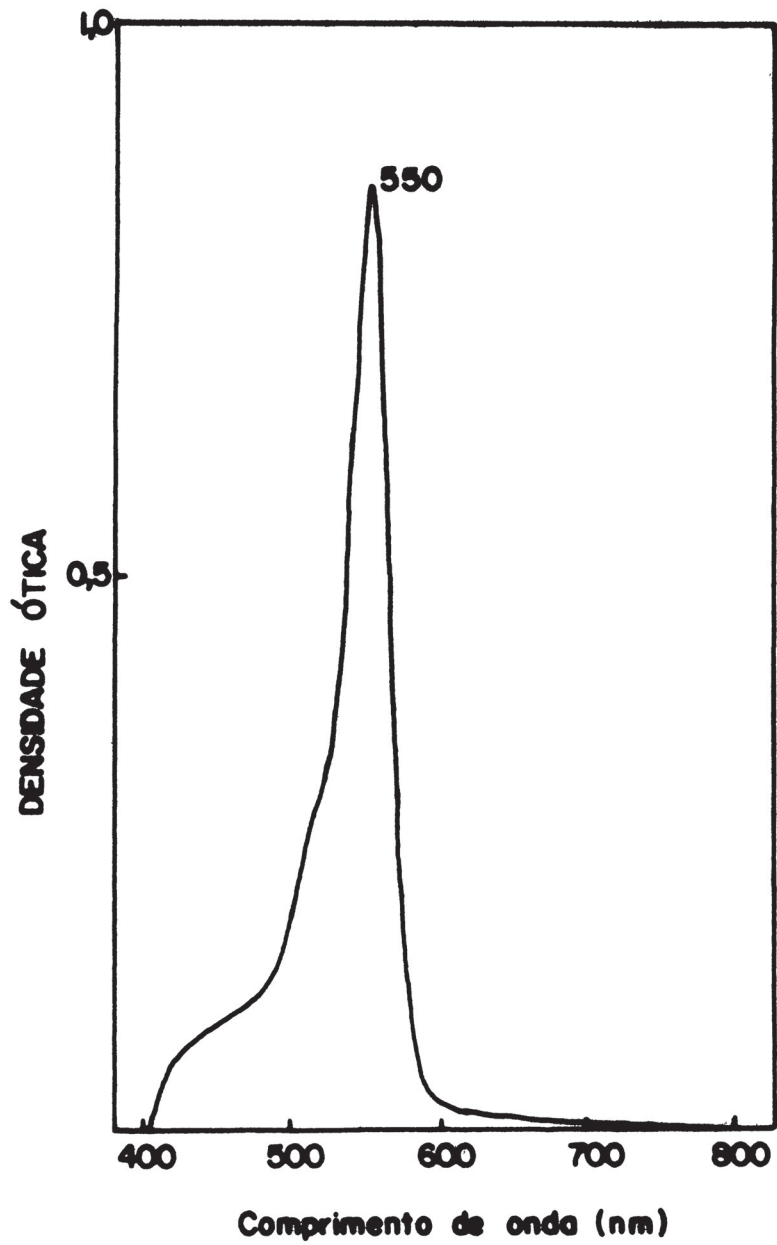


FIGURA 14 - Espectro de absorção do derivado obtido a partir do produto da L-rhamnonato desidratase.

O cromógeno foi preparado segundo a técnica de Weissbach & Hurwitz (89).

TABELA IV - Determinação do produto da desidratase por diferentes métodos.

Métodos	µmoles de 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -rhamnonato por mililitro
Semicarbazida	20
Periodato-ácido tiobarbitúrico	19
Determinação indireta pela desidrogenase láctica	17

O produto da L-rhamnonato desidratase foi isolado conforme descrito em Materiais e Métodos. 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato foi determinado pelo método de periodato-2-tiobarbiturato de Weissbach & Hurwitz (89). Os α -ceto-ácidos foram determinados pelo método da semicarbazona de MacGee & Doudoroff (54). O produto da desidratase foi submetido ainda a uma determinação indireta pela LDH de músculo de coelho (Materiais e Métodos).

desidrogenase lática (15) e L-lactaldeído pelo método de Barker & Summerson (4).

3.10.2 - Sentido da síntese - A reação da aldolase no sentido da síntese foi caracterizada pelo isolamento do produto (Materiais e Métodos) resultante da incubação de piruvato e L-lactaldeído com extrato livre de células de *Pullularia pullulans* crescidas em L-rhamnose, dialisado. Este composto pareceu ser o mesmo produto isolado da reação da L-rhamnonato desidratase. As cromatografias do produto da aldolase no sentido da síntese nos solventes a, b e c mostraram Rfs semelhantes ao produto da reação da L-rhamnonato desidratase nesses mesmos solventes (Tabela V). O tratamento desse composto com periodato 2-tiobarbitúrico (89) resultou um cromógeno cujo espectro está mostrado na Figura 15, com um pico máximo em 550 nm. Foi positiva também a reação de semicarbazida (54) para α -ceto ácidos com absorção máxima em 250 nm.

3.10.3 - Especificidade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase para aldeídos.

A tabela VI mostra a atividade relativa da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase com uma variedade de substratos. Estes resultados indicam que a aldolase (sentido da síntese) pode catalisar as reações de condensação do piruvato com D-lactaldeído, piruvaldeído, D-gliceraldeído além do L-lactaldeído.

3.10.4 - Reversibilidade e equilíbrio da reação da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase.

A clivagem da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato por catálise da aldolase é uma reação reversível. Isso pode ser demonstrado mediante a formação de KDR na presença de piruvato e L-lactaldeído. A Figura 16 mostra o consumo de piruvato e o aparecimento de 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato em função do tempo. No equilíbrio a concentração de piruvato era $1,8 \cdot 10^{-3}$ M. A constante de equilíbrio (K_{eq}), no sentido da clivagem, para a reação: $KDR \rightleftharpoons \text{piruvato} + \text{L-lactaldeído}$ é de $0,48 \cdot 10^{-3}$ M.

TABELA V - Valores de Rfs dos produtos da L-rhamnonato desidratase e da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase (sentido da síntese).

Composto	Valores de Rfs		
	Solvente a	Solvente b	Solvente c
Produto da reação da desidratase	0,75	0,25	0,37
Produto da reação da aldolase	0,76	0,27	0,36

Os produtos das reações enzimáticas foram isolados, cromatografados e revelados conforme Materiais e Métodos.

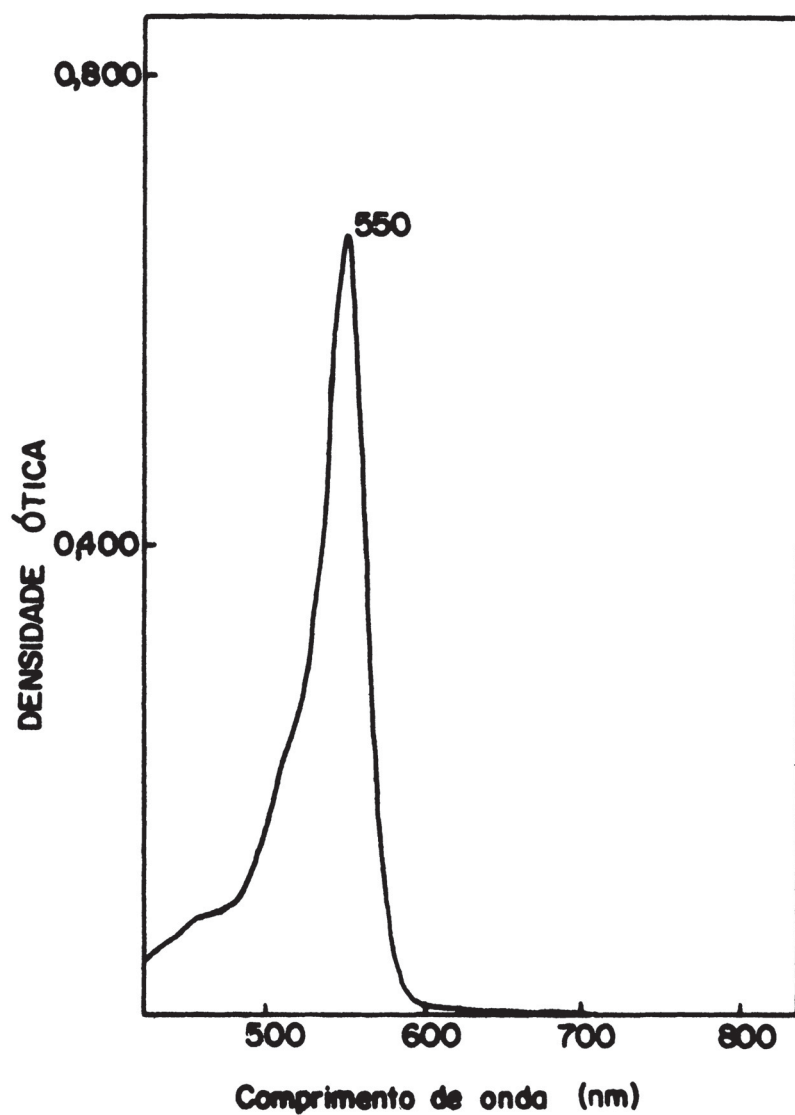


FIGURA 15 - Espectro de absorção do derivado obtido a partir do produto da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase (sendo da síntese).

O cromógeno foi preparado segundo a técnica de Weissbach & Hurwitz (89).

TABELA VI - Especificidade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase para aldeídos (sentido da síntese).

Substrato	Especificidade Atividade relativa (%)
<u>L</u> -lactaldeído	100
<u>D</u> -lactaldeído	83,3
Pirualdeído	58,2
<u>D</u> -gliceraldeído	30
Acetaldeído	0
Formaldeído	0

Sistema de incubação de 1,0 ml continha: 40 μ moles de tampão fosfato, pH 7,4, 10 μ moles de sulfato de magnésio, 5 μ moles de piruvato de sódio, 2,0 μ moles de aldeído e 140 μ g de proteína. Após 1 hora de incubação a 30°C, a reação foi interrompida por aquecimento a 100°C por 1 minuto. Alíquotas (0,2 ml) foram utilizadas para a dosagem de 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato pelo método de Weissbach & Hurwitz (89).

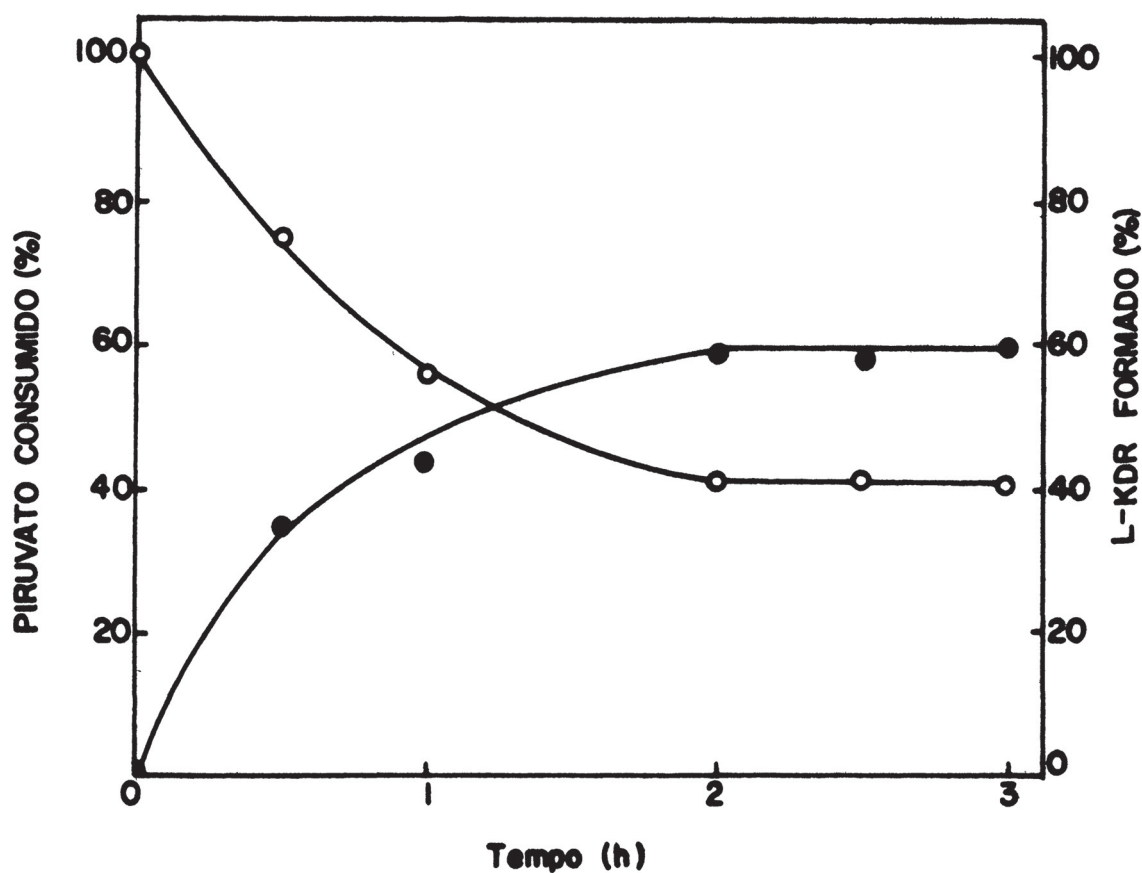


FIGURA 16 - Reversibilidade e equilíbrio da reação da 2-ceto-3-deoxi-L-rhamnonato aldolase.

A mistura de incubação de 1,0 ml continha 46 μ moles de tampão fosfato, pH 7,4, 10 μ moles de $MgSO_4$, 5 μ moles de piruvato, 3,6 μ moles de L-lactaldeído e enzima (0,2 mg de proteína). Nos tempos indicados, alíquotas de 0,2 ml foram removidos e inativados por 3 minutos a 100°C; a proteína desnaturada foi removida por centrifugação. Piruvato foi determinado por LDH (15) e KDR pelo método de Weissbach & Hurwitz (89).

3.11 - Efeito da fonte de carbono sobre a indução da síntese da L-rhamnose desidrogenase em células de *Pullularia pullulans*.

Para testar se L-rhamnose desidrogenase é induzível por outros monossacarídeos, *Pullularia pullulans* foi cultivada com L-rhamnose, L-fucose, D-glucose, D-manose, D-frutose ou glicerol como fonte única de carbono. As culturas foram colhidas depois de 30 horas de crescimento e os extratos livres de células foram testados quanto à atividade enzimática. A atividade específica de L-rhamnose desidrogenase em células crescidas em L-rhamnose é 15 a 30 vezes maior que as células crescidas em outras fontes de carbono (Tabela VII).

3.12 - Efeito da adição de cicloheximida sobre a síntese da L-rhamnose desidrogenase em células de *Pullularia pullulans* em repouso.

A cicloheximida, um efetivo inibidor de síntese de proteínas em eucariotes (77), foi adicionado no meio de indução, conforme Materiais e Métodos, de L-rhamnose desidrogenase. Como mostra a Figura 17, resultou na inibição completa da síntese dessa enzima. A atividade da glucose 6-fosfato desidrogenase, determinada como um controle mostrou a mesma atividade específica em presença ou ausência do antibiótico (dado não mostrado). Portanto, esse aumento em atividade específica da L-rhamnose desidrogenase pela L-rhamnose sugere uma síntese "de novo" da enzima.

3.13 - Efeito de diferentes monossacarídeos na repressão da síntese da L-rhamnose desidrogenase de *Pullularia pullulans*.

A indução da L-rhamnose desidrogenase foi reprimida por D-glucose e D-galactose. Esses açúcares na concentração de 0,2% provocaram aproximadamente 50% de repressão. D-manose e D-frutose não reprimiram a síntese da enzima (Tabela VIII).

3.14 - Cinética da indução e repressão da L-rhamnose desidrogenase.

Experimentos preliminares mostraram que glicerol não a-

TABELA VII - Efeito de diferentes monossacarídeos como fontes de carbono na indução da L-rhamnose desidrogenase.

Fonte de carbono	Atividade específica da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase (nmoles/min/mg de proteína)
<u>L</u> -rhamnose	150
<u>D</u> -frutose	10
<u>D</u> -glucose	5
<u>D</u> -manose, <u>L</u> -fucose e glicerol	5

As células de *Pullularia pullulans* foram crescidas por 28 h em meio líquido contendo 0,2% dos açúcares indicados e a atividade da L-rhamnose desidrogenase nos extratos livres de células foi determinada conforme Materiais e Métodos.

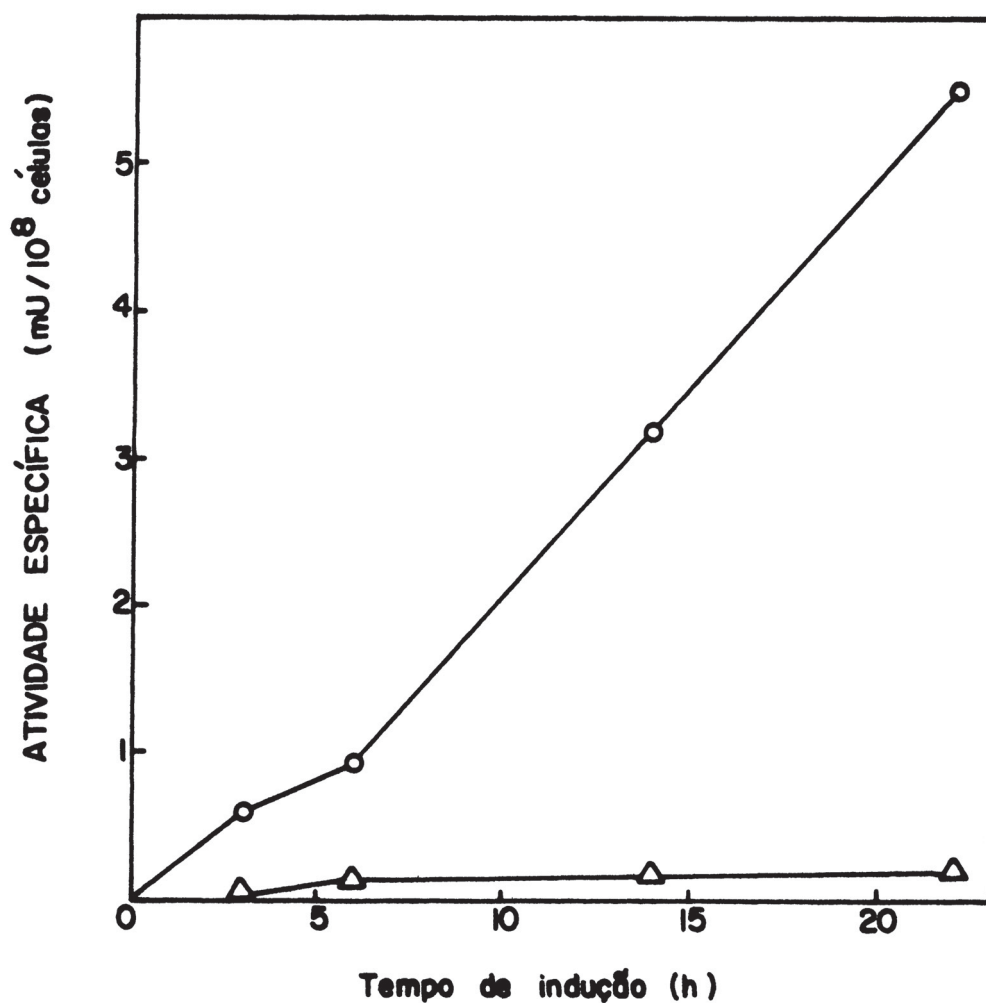


FIGURA 17 - Efeito de cicloheximida na indução da L-rhamnose desidrogenase.

As células foram crescidas em glicerol a 1% por 30 horas, colhidas, lavadas esterilmente e incubadas na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/ml em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,2, contendo 0,5% de L-rhamnose com ou sem cicloheximida por 21 horas. Nos intervalos indicados, as células foram colhidas e lavadas por centrifugação a $5.000 \times g$ por 10 minutos e suspensas em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,2). Depois de tratamento com tolueno 1% foi testada a atividade de L-rhamnose desidrogenase.

L-rhamnose 0,5% como indutor (-o-); L-rhamnose 0,5% mais cicloheximida (20 $\mu g/ml$) (-Δ-).

TABELA VIII - Efeito de diferentes monossacarídeos na repressão da síntese de L-rhamnose desidrogenase.

Fonte de carbono	Atividade específica da <u>L</u> -rhamnose desidrogenase (μ moles / min/mg de proteína)	Atividade relativa (%)
<u>L</u> -rhamnose	140	100
<u>L</u> -rhamnose + <u>D</u> -manose	140	100
<u>L</u> -rhamnose + <u>D</u> -frutose	128	91,4
<u>L</u> -rhamnose + <u>D</u> -glucose	71	50,7
<u>L</u> -rhamnose + <u>D</u> -galactose	61	43,6

Pullularia pullulans foi pré-crescida em L-rhamnose. Seis mililitros da cultura (5×10^7 células/ml) foram inoculados em 100 ml de meio contendo L-rhamnose 0,5% ou a mistura de L-rhamnose 0,5% e 0,2% dos açúcares indicados. Depois de 28 horas de incubação a 28°C, as células foram colhidas, lavadas e os extratos dessas células foram testados quanto a atividade de L-rhamnose desidrogenase conforme descrito em Materiais e Métodos.

fetava na velocidade de síntese da L-rhamnose desidrogenase quando era adicionado junto com o 6-desoxiaçúcar, nas células em repouso. No experimento (Figura 18) conduzido sob condições não repressoras ou condições de mínima repressão, a atividade específica da enzima aumentou linearmente com o tempo. Sob condições de mínima repressão a velocidade de síntese foi cerca da metade daquela observada nas células crescidas em glicerol e induzidas na presença de L-rhamnose.

No entanto, a indução na presença de altos níveis de D-glucose (em condições de máxima repressão por catabólitos) teve como efeito a completa inibição da síntese da L-rhamnose desidrogenase (Figura 19).

3.15 - Efeito da fonte de carbono na indução da L-rhamnonato desidratase em células de *Pullularia pullulans*.

A Tabela IX mostra que a L-rhamnose desidratase foi induzida quando L-rhamnose era adicionada ao meio de cultura. A atividade específica da L-rhamnonato desidratase era 85 vezes maior que nas células crescidas em glicerol.

3.16 - Efeito da fonte de carbono na indução da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase em células de *Pullularia pullulans*.

A Tabela X mostra que a enzima 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase foi induzida em presença de L-rhamnose no meio de cultivo, cerca de 40 vezes, quando comparada com a atividade da enzima em células crescidas em glicerol.

3.17 - Repressão da síntese da L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnonato desidratase e 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase em células de *Pullularia pullulans* em repouso, por D-glucose.

A Figura 20 (A, B e C) mostra que no meio de indução contendo L-rhamnose, as atividades específicas da L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnonato desidratase e KDR aldolase das células de *P. pullulans* em repouso aumentaram em função do tempo. A adição de D-glucose 0,2% com a L-rhamnose reprimiu essas atividades

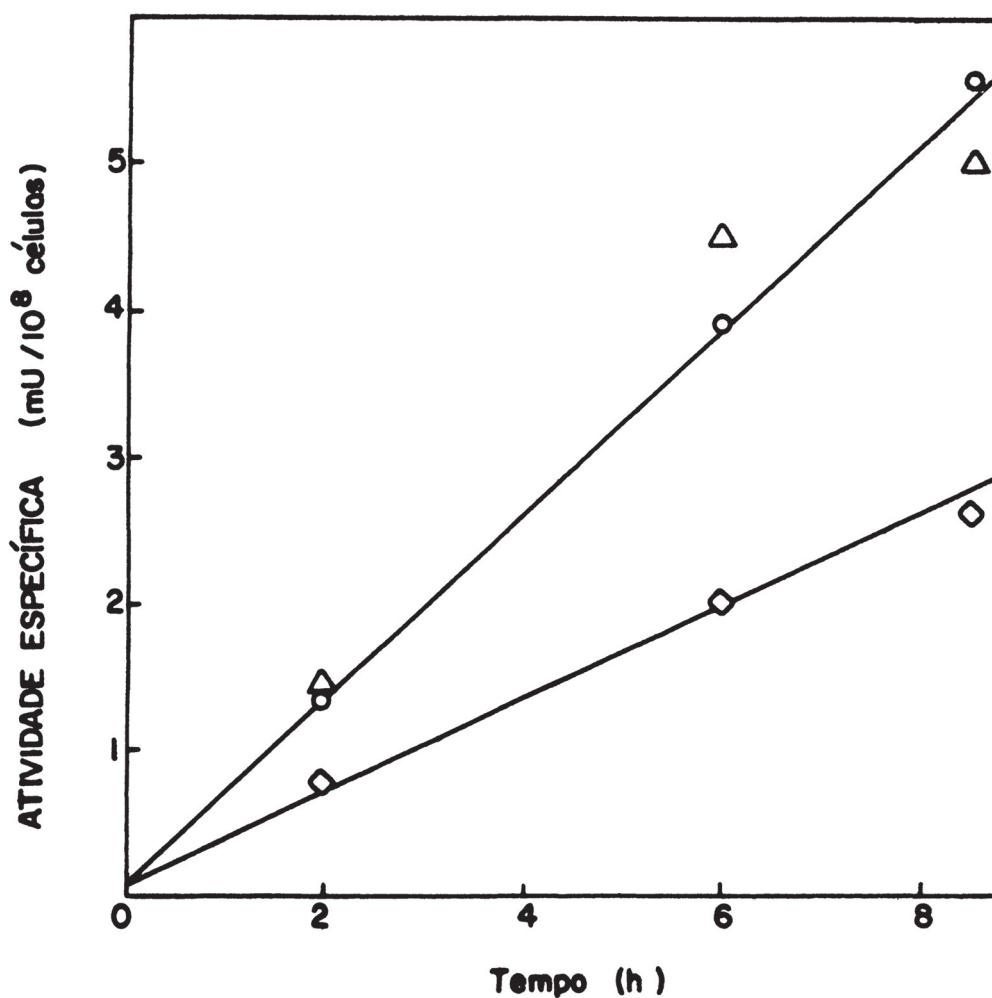


FIGURA 18 - Cinética da indução e repressão da síntese da L-rhamnose desidrogenase.

Células pré-crescidas em glicerol e induzidas com L-rhamnose 0,5% (-o-); células pré-crescidas em glicerol e induzidas com L-rhamnose 0,5% e glicerol 0,5% (-Δ-); células pré-crescidas em glicerol e induzidas com L-rhamnose 0,5% e D-glucose 0,2% (-◇-). As condições de indução foram realizadas conforme Materiais e Métodos. As células nos tempos indicados foram tratados com tolueno 1% e determinadas as atividades de L-rhamnose desidrogenase.

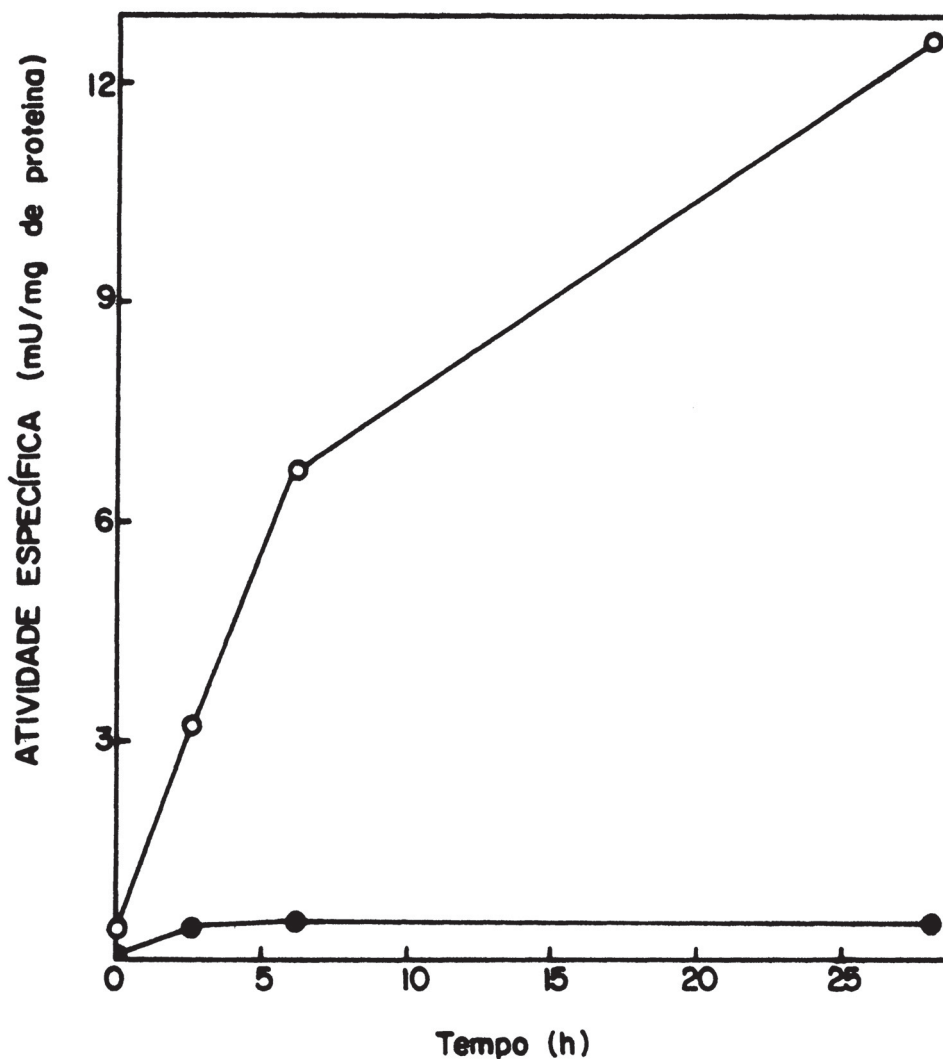


FIGURA 19 - Repressão da síntese da L-rhamnose desidrogenase por D-glucose 2%.

Células pré-crescidas em D-glucose 0,5% e induzidas com L-rhamnose 0,5% (-○-); células pré-crescidas em D-glucose 0,5% e induzidas com L-rhamnose 0,5% e D-glucose 2% (-●-). As condições de indução foram realizadas conforme Materiais e Métodos. Nos tempos indicados as células foram colhidas, lavadas e os extratos livres dessas células foram testados quanto à atividade de L-rhamnose desidrogenase.

TABELA IX - Efeito de diferentes monossacarídeos como fontes de carbono na indução da L-rhamnonato desidratase.

Fonte de carbono	Atividade específica da <u>L</u> -rhamnonato desidratase (U/mg de proteína) x 10 ⁻²
<u>L</u> -rhamnose	170
<u>L</u> -fucose	1,7
Glicerol	2,0
<u>D</u> -glucose	1,3

As células de *Pullularia pullulans* foram crescidas por 28 horas em meio líquido contendo 0,2% dos açúcares indicados e a atividade de L-rhamnonato desidratase nos extratos livre de células foi determinada conforme Materiais e Métodos.

TABELA X - Efeito de diferentes monossacarídeos como fontes de carbono na indução da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase.

Fonte de carbono	Atividade específica da 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -rhamnonato aldolase (U/mg de proteína) x 10 ⁻² .
<u>L</u> -rhamnose	160
<u>D</u> -glucose	6
<u>L</u> -fucose	4
Glicerol	4

Pullularia pullulans foi crescida por 28 horas em meio líquido contendo 0,2% dos açúcares indicados e a atividade de L-rhamnonato desidratase nos extratos livres de células foi determinada conforme Materiais e Métodos.

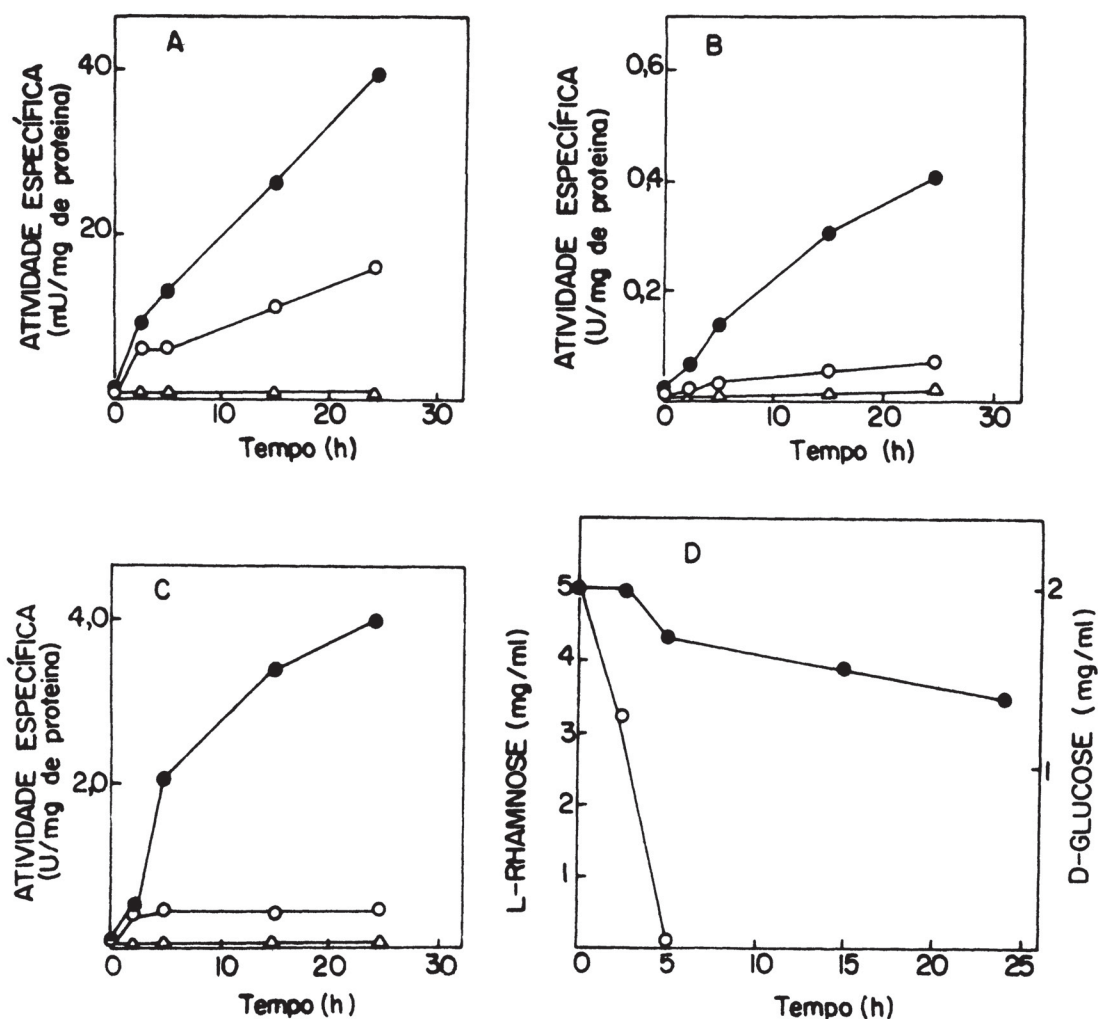


FIGURA 20 - Efeito da D-glucose sobre a indução da síntese das enzimas: (A) L-rhamnose desidrogenase, (B) L-rhamnonato desidratase e (C) 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase por L-rhamnose em células de *Pullularia pullulans* em repouso.

Células de *Pullularia pullulans* crescidas previamente em glicerol 1%, como descrito em Materiais e Métodos, foram transferidas para 15 frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,2, sendo a concentração final de células de $2,4 \times 10^8$ /ml. A indução foi realizada na presença de L-rhamnose 0,5% e D-glucose 0,2% ou 2% com agitação (120 rpm) a 28°C. Nos tempos indicados as células foram colhidas para a determinação das atividades específicas. Células induzidas na presença de L-rhamnose 0,5% (-●-), na presença de L-rhamnose 0,5% e D-glucose 0,2% (-○-) e na presença de L-rhamnose 0,5% e D-glucose 2% (-△-). (D) Aliquotas do meio de indução contendo 0,5% de L-rhamnose e 0,2% de D-glucose foram utilizadas para a dosagem de L-rhamnose (-●-) e D-glucose (-○-). Nessas condições (células em repouso) não ocorreu crescimento significativo.

cerca de 53% para a desidrogenase, 80% para a desidratase e 87% para a aldolase. A adiçãõ de D-glucose 2% com L-rhamnose às células de *Pullularia pullulans* em repouso, produziu uma inibiçãõ completa da sîntese das enzimas. A Figura 20 (D) mostra o consumo da L-rhamnose 0,5% e D-glucose 0,2% quando adicionados juntos no meio de induçãõ.

3.18 - Repressãõ da sîntese da L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnonato desidratase e 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase em células de *Pullularia pullulans* em crescimento, por D-glucose.

A repressãõ da sîntese das enzimas do metabolismo da L-rhamnose por D-glucose estã evidente das 10 primeiras horas de crescimento (Figura 21, A, B e C). Apõs êsse tempo, ocorreu a sîntese simultânea da L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnonato desidratase e 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase. A Figura 21 (D) mostra a curva de crescimento das células de *Pullularia pullulans* em meio de cultivo que continha L-rhamnose 0,5% e D-glucose 0,2% e as respectivas curvas de consumo dos açúcares presentes no meio de cultura.

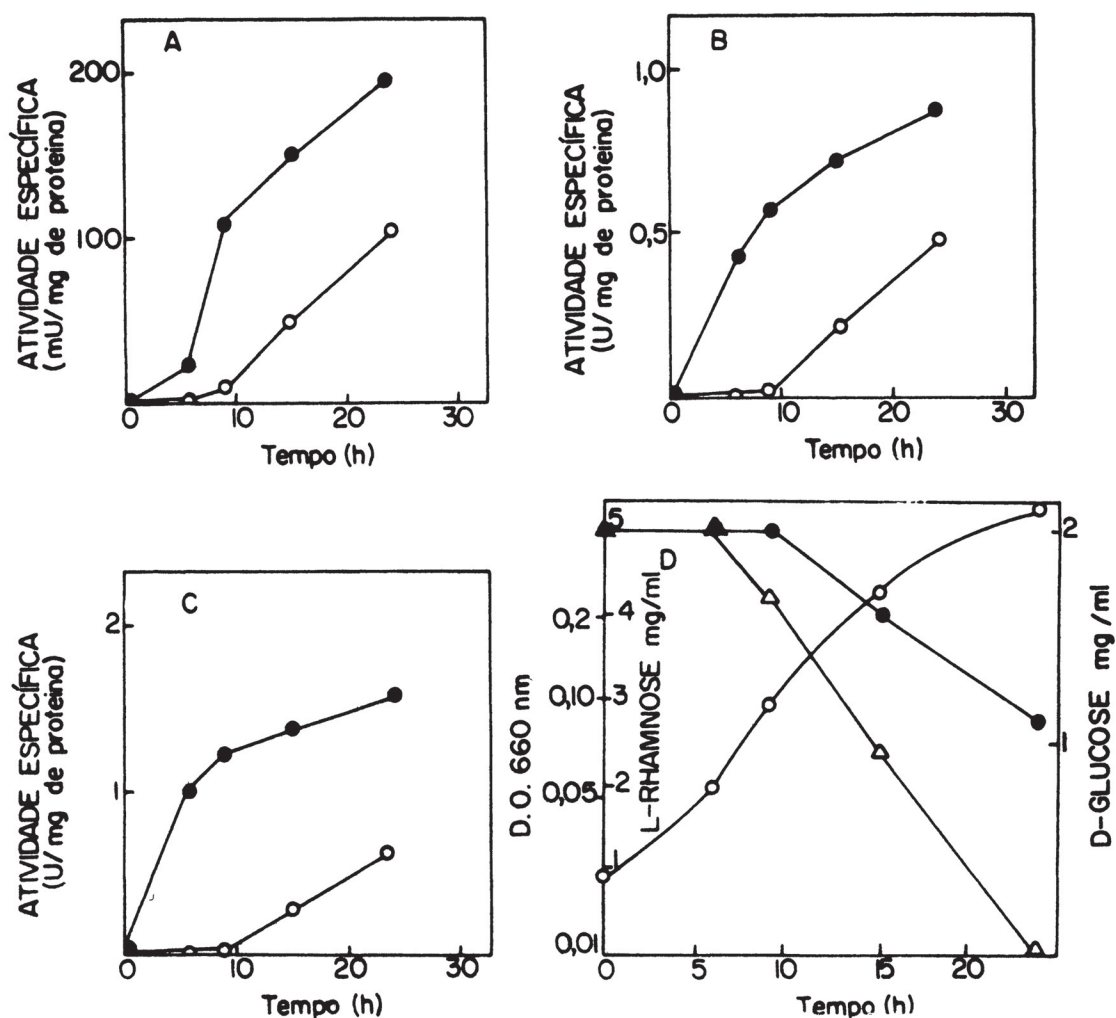


FIGURA 21 - Efeito da D-glucose sobre a indução da síntese das enzimas: (A) L-rhamnose desidrogenase, (B) L-rhamnonato desidratase e (C) 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase, por L-rhamnose em células de *Pullularia pullulans* em crescimento.

Células de *Pullularia pullulans*, pré-crescidas em glicerol 1% foram inoculadas na concentração de $2,4 \times 10^5$ /ml em frascos Erlenmeyer contendo 500 ml de meio líquido. O crescimento foi realizado na presença de L-rhamnose 0,5% (-●-) ou na presença de L-rhamnose 0,5% e D-glucose 0,2% (-○-) nas condições descritas em Materiais e Métodos e foram colhidas nos tempos indicados para a determinação das atividades específicas. (D) - Curva de crescimento de *Pullularia pullulans* na presença de L-rhamnose e D-glucose (-○-). Aliquotas desse meio foram utilizadas para dosagem de L-rhamnose (-●-) e D-glucose (-△-).

4. DISCUSSÃO

Estudos de caracterização das vias envolvidas no metabolismo de L-rhamnose foram realizados em bactérias (10,11,74, 82, 83). Apenas três enzimas, a L-rhamnose isomerase, a L-rhamnulose quinase e a L-rhamnulose 1-P aldolase são conhecidas como enzimas de uma via em que L-rhamnose é utilizada por uma isomerização inicial a L-rhamnulose (82, 90). L-rhamnulose por sua vez é fosforilado a L-rhamnulose 1-P (10,83) e então clivado pela aldolase a dihidroxiacetona fosfato e L-lactaldeído (11,27,74). Portanto, é conhecida apenas uma via de degradação de L-rhamnose em microrganismos.

Em 1961, Eagon (28) sugeriu a existência de outra via de catabolismo de L-rhamnose, embora a maioria das espécies bacterianas utilizem L-rhamnose por isomerização para suas correspondentes cetoses, seguidos por fosforilação às custas de ATP.

Suzuki & Onishi (81), em 1968, estudando produtos de meios de culturas de leveduras que fermentam L-rhamnose, encontraram duas espécies *Candida polymorpha* e *Pichia robertsii* que transformam L-rhamnose em ácido L-rhamnônico.

Não existem dados na literatura a respeito de uma via oxidativa de utilização de L-rhamnose e nem seu metabolismo em fungos. As características gerais de uma via oxidativa de L-rhamnose em *Pullularia pullulans* estão relatadas no presente trabalho e não foram ainda descritas em nenhum outro microrganismo.

O fungo *Pullularia pullulans* metaboliza eficientemente qualquer das fontes de carbono (Figura 1). Como se observa, o seu crescimento foi mais rápido e atingiu níveis mais elevados em D-glucose.

Este resultado era esperado quando da utilização de D-glucose, pois segundo demonstraram Clark & Wallace (12), o fungo em questão apresenta enzimas constitutivas para a degradação desse açúcar, enzimas tais como as da via glicolítica de Embden-Meyerhof e da via das pentoses - fosfato. Segundo Magasanik et al (58) a utilização de D-glucose como fonte de carbono pela maioria dos microrganismos incorre em tempo de crescimento mais reduzido do que com a utilização de outros monossacarídeos conhecidos.

Os resultados das experiências com células intactas (Fi

guras 2 e 3) sugerem que as enzimas da via de metabolismo de L-rhamnose em *Pullularia pullulans* sejam induzíveis.

Em experimentos com extratos livres de células crescidas em meio contendo L-rhamnose como fonte de carbono, não foram observadas atividades de isomerase, epimerase, nem reações de fosforilação ou redução em presença de NADH ou NADPH. No entanto foi encontrada a atividade de uma L-rhamnose desidrogenase NAD^+ -dependente (Figuras 4 e 5). Esta enzima é induzível, pois somente é encontrada em células crescidas em L-rhamnose (36,87).

A L-rhamnose desidrogenase apresentou alta especificidade com relação a L-rhamnose (69,86). Devido às propriedades e essa especificidade, foi possível adaptar um método espectrofotométrico simples para a determinação de L-rhamnose (8). É um método sensível e específico para a determinação de L-rhamnose mesmo em presença de outros açúcares. Dentro dos parâmetros de 0 a $0,2 \mu\text{mol}$ obedece uma relação estritamente linear. Essa técnica apresentou resultados satisfatórios quando aplicada a uma variedade de situações. Foi utilizado o extrato bruto como fonte de enzima, devido à instabilidade da enzima purificada (Tabela 1).

O produto enzimático da primeira enzima, a L-rhamnose desidrogenase, foi caracterizado em pH 7,0 como sendo a L-rhamnono- γ -lactona. A reação foi confirmada com os experimentos de reversibilidade usando a enzima purificada (Tabela 1). A reversibilidade da reação com L-rhamnono- γ -lactona sintetizado quimicamente indica que a L-rhamnose desidrogenase oxida L-rhamnose a L-rhamnono- γ -lactona, excluindo a possibilidade do produto da desidrogenação ser uma δ -lactona. Assim, a única enzima capaz de transformar L-rhamnose foi uma desidrogenase NAD^+ -dependente.

A etapa seguinte do metabolismo de L-rhamnose foi realizada com L-rhamnono- γ -lactona sintetizada quimicamente e utilizada como substrato para a determinação da atividade de lactonase (Figura 8).

Nessa reação, efetuada em pH 7,0, a γ -lactona sofre uma hidrólise enzimática, dando L-rhamnonato, que foi isolado e caracterizado. A ocorrência de uma L-rhamnono- γ -lactonase nos extratos (Figura 8) constitui uma das evidências que L-rhamnono- γ -lactona é o produto de desidrogenação. Foi verificado por Dahms & Anderson, em 1972 (19) a presença de uma γ -lactonase em *Pseudomonas*,

quando este último foi crescido em presença de D-fucose induzindo enzimas de uma via oxidativa para a degradação desse desoxiaçúcar (18,21).

Seguindo a via oxidativa proposta, da incubação com L-rhamnonato foi obtido um composto, que isolado, foi identificado como sendo 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato, produto resultante da desidratação do substrato catalisado por uma desidratase. Semelhante reação de desidratação foi descrita por Dahms & Anderson (20) na via oxidativa para a degradação de D-fucose. A oxidação com periodato desse composto (KDR) produziu β -formil-piruvato que forma um complexo colorido com 2-tiobarbiturato. Essa reação é específica para ácidos 2-ceto-3-desoxi-aldônicos (89).

O produto da reação catalisado pela desidratase foi ainda submetido a espectrometria nuclear magnética de proton. Como pode ser visto em Resultados, o sinal δ 1,68 ppm é compatível com a presença de grupo CH_3 como no KDF (94). O sinal com δ 2,71 ppm é consistente ainda com a presença do grupo CH_2 , muito provavelmente adjacente a um grupo polar. Em suma, a espectroscopia de ressonância nuclear magnética de proton confirma a estrutura do 2-ceto-3-6-dideoxihexonato proposto. Muitas tentativas foram feitas com a finalidade de sintetizar quimicamente esse composto. A transformação de L-rhamnose em ácido metassacarínico (92), como primeira etapa de síntese e posterior oxidação em presença de V_2O_5 e NaClO_3 (67) foram técnicas utilizadas nas tentativas de síntese, porém não foram bem sucedidas.

O α -cetoácido resultante da reação de desidratação sofre clivagem catalisada pela 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase e este composto isolado enzimaticamente foi utilizado como substrato na reação da aldolase. Os produtos dessa reação de clivagem foram identificados como sendo piruvato e L-lactaldeído. A reversibilidade dessa reação (Figura 16), utilizando piruvato e L-lactaldeído como substratos, reforça a possibilidade de serem esses os produtos da clivagem pela aldolase. Tanto o composto isolado da reação de desidratação, como o composto da reação da aldolase no sentido da síntese, quando degradados com periodato e condensados com ácido 2-tiobarbitúrico resultam um cromógeno com λ max em 550 nm, indicando que o produto da degradação seria o ácido β -formilpirúvico (89). Segundo os mesmos autores, β -formilpiruvato

provêm da degradação dos ácidos 2-ceto-3-desoxi-aldônicos com periodato. Os espectros de absorção dos dois produtos são compatíveis (Figuras 14 e 15) e apresentam também as mesmas mobilidades cromatográficas.

Quando L-rhamnose foi a fonte de carbono, observou-se a lêm da L-rhamnose desidrogenase (Figuras 4 e 5), o aparecimento de mais duas enzimas (Figuras 6 e 7), a L-rhamnonato desidratase e a 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase, sugerindo que L-rhamnose é metabolizada oxidativamente (70).

A presença de L-rhamnonato desidratase e 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase nos extratos livres de células de *Pullularia pullulans*, crescidas em L-rhamnose, possibilitou o isolamento dos produtos dessas reações e suas caracterizações.

Os níveis de L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnonato desidratase e KDR aldolase são significativos somente quando o fungo é crescido na presença de L-rhamnose. Os valores de indução mostram inequivocamente que L-rhamnose é o indutor por excelência (Tabelas VII, IX e X).

A indução da síntese da L-rhamnose desidrogenase foi inibida por cicloheximida, um inibidor efetivo de síntese proteica (77). Resultados apresentados na Figura 17 demonstram que o aumento de atividade específica da L-rhamnose desidrogenase por L-rhamnose sugere síntese "de novo" da enzima (34).

As figuras 18 e 19 mostram claramente que o glicerol não interfere na indução da síntese da L-rhamnose desidrogenase, mas a D-glucose, tanto no meio de indução ou como fonte de carbono, demonstrou efeitos repressores na síntese da enzima. D-glucose é um modulador negativo das enzimas catabólicas (56,57,64) e, portanto, provoca uma redução na velocidade de síntese dessas enzimas. Em leveduras, por exemplo, previne a síntese de enzimas mitocondriais (52) e reprime a expressão de enzimas induzíveis, tais como α -glucosidase (29), β -glucosidase (55), invertase (22, 26) e galactoquinase (2).

Em *Pullularia pullulans* a indução de L-rhamnose desidrogenase foi reprimida por D-glucose e D-galactose. Esses açúcares na concentração de 0,2% produziram aproximadamente 50% de repressão (Tabela VIII), enquanto que D-frutose e D-manose, na mesma concentração, não tiveram praticamente efeito. A razão da diferença entre os resultados obtidos com D-glucose ou D-galactose e os

outros monossacarídeos não foi elucidada.

Tentativas para reverter a repressão da síntese de L-rhamnose desidrogenase por D-glucose pela adição de AMP - cíclico (AMPc), não foram bem sucedidas. Isso pode ser devido a permeabilidade com relação ao nucleotídeo cíclico (14,32,71,76,78).

Na Figura 20 (A, B e C) fica evidente que a síntese das enzimas do metabolismo de L-rhamnose em células de *Pullularia pullulans* em repouso, sofre repressão parcial em presença de D-glucose 0,2% e em presença de D-glucose 2% se observa completa inibição da síntese das enzimas da via.

A síntese das enzimas desidratase e aldolase (Figura 20) em presença de D-glucose permaneceu reprimida mesmo com o consumo desse açúcar, mas a L-rhamnose desidrogenase foi sintetizada antes da D-glucose ser completamente exaurida do meio.

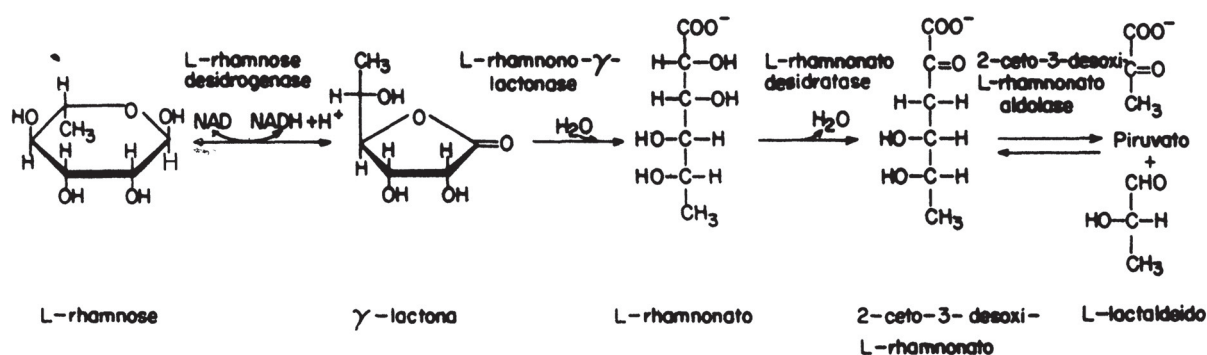
Quando foi adicionado D-glucose juntamente com o indutor no meio de crescimento de *Pullularia pullulans*, as atividades específicas das enzimas do metabolismo de L-rhamnose permaneceram baixas por um período de cerca de 10 horas (Figuras 21 - A, B e C). Isto poderia ser explicado pela diminuição dos níveis de D-glucose no meio de crescimento ao ser metabolizado. No caso da síntese induzida de α -glucosidases em leveduras (27) a presença de D-glucose causa inibição até este açúcar ser quase completamente metabolizado.

Esses resultados sugerem que em *Pullularia pullulans* como em outras células eucarióticas (7,50) a regulação dos níveis enzimáticos foge ao modelo proposto para a regulação das células procarióticas (46) nas quais os genes de um mesmo operon são reprimidos ou desreprimidos coordenadamente.

A possibilidade dos genes das enzimas da via estarem em operons diferentes não pode ser deixada de lado. Essa confirmação dependerá de estudos mais efetivos sobre a regulação da síntese dessas enzimas.

Os estudos realizados indicam claramente que a via de degradação de L-rhamnose em células de *Pullularia pullulans* é uma via oxidativa diferente da via fosforilativa encontrada em *Escherichia coli* (10,11,74,82,83) e outras bactérias (27,30,31,49).

Os dados apresentados sugerem ainda que o metabolismo de L-rhamnose em *Pullularia pullulans* segue esta sequência de reações:



A degradação posterior dos produtos finais deve acontecer pelas vias clássicas do metabolismo intermediário. O L-lactaldeído pode ser convertido em ácido lático ou 1, 2-propanodiol(43, 44,45,72,73), este último podendo ser utilizado na biossíntese de lipídeos.

A indução da síntese das enzimas da via, assim como a repressão, constituem fenômenos pelos quais as células de *Pullularia pullulans* regulam os níveis das enzimas para a degradação de L-rhamnose.

Estudos com mutantes dessas células deverão ser realizados na tentativa de esclarecer o mecanismo intrínscico desses fenômenos.

A purificação e a cinética de todas as enzimas envolvidas na via são outros aspectos a serem estudados e que poderão enriquecer substancialmente as evidências apresentadas neste trabalho.

5. CONCLUSÕES

1. Entre as fontes de carbono testadas somente a L-rhamnose induz a síntese da L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnose desidratase e 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase em células de *Pullularia pullulans*.
2. A primeira enzima da via de degradação de L-rhamnose em *Pullularia pullulans* foi comprovada através do seu isolamento e purificação. Trata-se de uma desidrogenase NAD⁺-dependente. O produto da reação da L-rhamnose desidrogenase foi isolado e identificado como sendo L-rhamnono- γ -lactona.
3. Os extratos livres de células de *Pullularia pullulans* apresentaram atividades de uma lactonase, quando incubados com L-rhamnono- γ -lactona. O produto da reação foi identificado como L-rhamnonato.
4. L-rhamnonato desidratase e KDR aldolase foram evidenciadas nas células de *Pullularia pullulans* crescidas em L-rhamnose, quando incubadas com L-rhamnonato ou com piruvato e L-lactaldeído, através do isolamento e identificação dos seus produtos de reação.

Produto da desidratação:
2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato

Produto da aldolase (sentido da síntese):
2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato
5. A via de degradação de L-rhamnose em *Pullularia pullulans* não é uma via fosforilativa. A L-rhamnose é metabolizada oxidativamente através da formação de L-rhamnono- γ -lactona, L-rhamnonato, 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato (KDR), piruvato e L-lactaldeído.
6. As enzimas induzidas por L-rhamnose em células em crescimento ou repouso sofrem repressão pela adição de D-glucose ao meio e a redução da velocidade da síntese das enzimas da via de degradação da L-rhamnose, na presença de glucose, foi interpretada como repressão por catabólitos da glucose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-AKHER, M. & SMITH, F. The detection of carbohydrate esters and lactones after separation by paper chromatography. J.Am.Chem.Soc., 73: 5859-5860, 1951.
2. ADAMS, B.G. Induction of galactokinase in *Saccharomyces cerevisiae*; kinetics of induction and glucose effects. J.Bacteriol. 111: 308-315, 1972.
3. BARKER, S.A.; BOURNE, E.J.; PINKARD, R.M.; WHIFFEN, D.H. Infrared spectra of carbohydrates. Differentiation of γ - and δ -lactones of aldonic acids. Chem. Ind. (Lond.) (22): 658-649, 1958.
4. BARKER, S.B. & SUMMERSON, W.H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. J.Biol.Chem., 138: 535-554, 1941.
5. BERGMAYER, H.U. Principles of enzymatic analysis. In: BERGMAYER, H.U. ed. Methods of enzymatic analysis. 2 ed. New York, Academic, 1965, p. 3-13.
6. BLOCK, R.J.; DURRUM, E.L.; ZWEIG, G. A manual of paper chromatography and electrophoresis. 2 ed. New York, Academic, 1958, 710 p.
7. BROWN, D.D. Gene expression in eukaryotes. Science, 211:667-674, 1981.
8. BRUEL, S.L.; MARÉCHAL, L.R.; RIGO, L.U.; VEIGA, L.A. Specific determination of L-rhamnose by L-rhamnose dehydrogenase. Arq.Biol.Tecnol., 22: 149-153, 1979.
9. CHABY, R.; CHARON, D.; SARFATI, R.S.; SZABÓ, L.; TRIGALO, F. Estimation of 3-Deoxy-2-ketoaldonic acids. In: WOOD, W.A. ed. Carbohydrate metabolism. part. B. New York, Academic, 1975. p. 32-34.

10. CHIU, T.H. & FEINGOLD, D.S. The purification and properties of L-rhamnulokinase. Biochim. Biophys. Acta, 92: 489-497, 1964.
11. CHIU, T.H. & FEINGOLD, D.S. L-rhamnulose 1-phosphate aldolase from *Escherichia coli*. Crystallization and properties. Biochemistry, 8: 98-108, 1969.
12. CLARK, D.S. & WALLACE, R.H. Carbohydrate metabolism of *Pullularia pullulans*. Can.J.Microbiol., 4: 43-54, 1958.
13. COOKE, W.B. A taxonomic study in the "Black Yeasts". Micopathol.Mycol.Appl., 17: 1-43, 1962.
14. CROMBRUGGHE, B.; VARMUS, H.E.; PERLMAN, R.L.; PASTAN, I.H. Stimulation of LAC mRNA synthesis by cyclic AMP in cell free extracts of *Escherichia coli*. Biochem.Biophys.Res. Commun., 38: 894-901, 1970.
15. CZOK, R. & LAMPRECHT, W. Pyruvate phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: BERGMEYER, H.U. ed. Methods of enzymatic analysis. New York, Academic, 1974. v. 3, p.1446-1451.
16. DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose oxidase reagent. Biochem. J., 80: 547-551, 1961.
17. DAHMS, S. & ANDERSON, R.L. 2-keto-3-deoxy-L-arabonate aldolase and its role in a new pathway of L-arabinose degradation. Biochem.Biophys.Res.Commun., 36: 809-814, 1969.
18. DAHMS, A.S. & ANDERSON, R.L. D-fucose metabolism in a Pseudomonad. I. Oxidation of D-fucose to D-fucono- δ -lactone by a D-aldohexose dehydrogenase. J.Biol.Chem., 247: 2222-2227, 1972a.
19. DAHMS, A.S. & ANDERSON, R.L. D-fucose metabolism in a pseudomonad. II. Oxidation of D-fucose to D-fucono- γ -lactone by an L-arabino-aldose dehydrogenase and hydrolysis of the lac

- tone by a lactonase. J.Biol.Chem., 247: 2228-2232, 1972 b.
20. DAHMS, A.S. & ANDERSON, R.L. D-fucose metabolism in a pseudo monad. III. Conversion of D-fuconate to 2-keto-3-deoxy-D-fuconate by a dehydratase. J.Biol.Chem., 247: 2233-2237, 1972 c.
 21. DAHMS, A.S. & ANDERSON, R.L. D-fucose metabolism in a pseudo monad. IV. Cleavage of 2-keto-3-deoxy-D-fuconate to pyruvate and D-lactaldehyde by 2-keto-3-deoxy-L-arabonate aldolase. J.Biol.Chem., 247: 2238-2241, 1972 d.
 22. DAVIES, A. Invertase formation in *Saccharomyces fragilis*. J. Gen.Microbiol., 14: 109-121, 1956.
 23. DAVIES, A. The specific polysaccharides of some gram-negative bacteria. Biochem. J., 59: 696-704, 1955.
 24. DeLEY, J. & DOUDOROFF, M. The metabolism of D-galactose in *Pseudomonas saccharophila*. J.Biol.Chem., 227: 745-757, 1957.
 25. DISCHE, Z. & SHETTLES, L.B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. J.Biol.Chem., 175: 595-603, 1948.
 26. DODYK, F. & ROTHSTEIN, A. Factors influencing the appearance of invertase in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch.Biochem.Biophys., 104: 478-486, 1964.
 27. DOMAGK, G.F. & HEINRICH, R. "Über den Abbau der Desoxyzucker durch Bakterien enzyme. Biochem. Z., 341: 420-429, 1965.
 28. EAGON, R.G. Bacterial dissimilation of L-fucose and L-rhamnose. J.Bacteriol., 82: 548-550, 1961.
 29. EATON, N.R.; KHAN, N.A., ZIMMERMAN, F.K. Genetics of maltase formation in yeasts. Yeast, 20: 47-48, 1971.
 30. ENGLERBERG, E. Physiological basis for Rhamnose utilization by a mutant of *Pasteurella pestis*. I. Experiments with res-

- ting cells; The isolation of lactic aldehyde. J.Bacteriol., 74: 8-11, 1957 a.
31. ENGLERBERG, E. Physiological basis for Rhamnose utilization by a mutant of *Pasteurella pestis*. II. A single mutational event leading to the production of two enzymes. Arch. Biochem.Biophys., 71: 179-193, 1957 b.
32. FANG, M. & BUTOW, R.A. Nucleotide reversal of mitochondrial repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem.Biophys.Res. Commun., 41: 1579-1583, 1970.
33. GHALAMBOR, M.A. & HEATH, E.C. The metabolism of L-fucose. II. The enzymatic cleavage of L-fuculose 1-phosphate. J. Biol. Chem., 237: 2427-2433, 1962.
34. GORTS, C.P.M. Effect of different carbon sources on the regulation carbohydrate metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 33: 451-563, 1967.
35. GREEN, M. & COHEN, S.S. Enzymatic conversion of L-fucose to L-fuculose. J.Biol.Chem., 219: 557-567, 1956.
36. GUIMARÃES, M.F.; RIGO, L.U.; VEIGA, L.A. Metabolism of 6-deoxyhexoses in *Pullularia pullulans*. In: BACILA, M.; HORECKER, B.L.; STOPPANI, A.O.M. Biochemistry and genetics of yeasts. eds. New York, Academic, 1978. p. 161-169.
37. GUIMARÃES, M.F. & VEIGA, L.A. L-fucose dehydrogenase from *Pullularia pullulans*. I.R.C.S. Med.Sci., 1:73-77, 1973.
38. HALL, W.B. & MANVILLE, J. Studies of deoxy sugar by proton magnetic ressonance spectroscopy. Advan.Chem.Ser., 74: 228-253, 1968.
39. HAUSER, G. KARNOVSKY, M.L. Rhamnose and Rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. J.Biol.Chem., 224: 91-105, 1957.

40. HEATH, E.C. & GHALAMBOR, M.A. The metabolism of L-fucose. I. The purification and properties of L-fuculose kinase. J.Biol.Chem., 237: 2423-2426, 1962.
41. HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. J.Biol.Chem., 180: 249-261, 1949.
42. HOUGH, L.: JONES, J.K.N.; WADMAN. W.H. Quantitative Analysis of mixtures of Sugars by the Method of Partition Chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. J.Chem.Soc., 1702-1706, 1950.
43. HUANG, P.C. & MILLER, O.N. The metabolism of Lactaldehyde.V. Metabolism of L-fucose. J.Biol.Chem., 231: 201-205, 1958.
44. HUFF, E. The metabolism of 1-2 propanediol. Biochim.Biophys. Acta., 48: 506-516, 1961.
45. HUFF, E. & RUDNEY, H. The enzymatic oxidation of 1,2-propanediol phosphate to acetol phosphate. J.Biol.Chem., 234:1060-1064, 1959.
46. JACOB, F. & MONOD, J. On the regulation of gene activity.Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 26: 193-211, 1961.
47. JONES, J.K.N. & SMITH, F. Plant gums and mucilages. Adv.Carbohydr.Chem., 4: 243-285, 1949.
48. LANNING. M.C. & COHEN, S.S. The detection and estimation of 2-ketohexonic acids. J.Biol.Chem., 189:109-114, 1951,
49. LEVINSON, S.L. & KRULWICH, T.A. Metabolism of L-rhamnose in *Arthrobacter pyridinolis*. J.Gen.Microbiol. 95: 277-286,1976.
50. LEWIN, B. Control of transcription. In: LEWIN, B. ed. Gene expression. Chichester, J. Wiley, 1978. v.2, p.320-375.

51. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. J.Am.Chem.Soc., 56: 658-666, 1934.
52. LINNANE, A.W.; HASLAM, J.M.; LUKINS, H.B.; NAGLEY, P. The biogenesis mitochondria in microorganisms. Annu.Rev.Microbiol., 26: 163-198, 1972.
53. LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193: 265-275, 1951.
54. MacGEE, J. & DOUDOROFF, M. A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. J.Biol.Chem., 210: 617-626, 1954.
55. MacQUILLAN, A.M. & HALVORSON, H.O. Metabolic control β -glucosidase synthesis in yeast. J. Bacteriol., 84: 23-30, 1962.
56. MAGASANIK, B. Catabolite repression. Cold spring Harbor Symp. Quant.Biol., 26: 249-256, 1961.
57. MAGASANIK, B. Glucose effects: inducer exclusion and repression. In: ZISPER, D. & BECKWITH, J.R. ed. The Lactose Operon. New York, Cold spring Harbor Laboratory, 1970. p.189-219.
58. MAGASANIK, B.; MAGASANIK, A.K.; NEIDHART, F.C. Regulation of growth and composition of bacterial cell. In: WOLSTENHOLME, G.E.W. & O'CONNOR, C.N. eds. Regulation of cell metabolism. Boston, Little, Brown, 1959. p. 334-349.
59. MOBLEY, P.W.; METZGER, R.P.; WICK, A.N. NAD^+ -dependent L-fucose dehydrogenase from sheep liver. Arch.Biochem.Biophys., 139: 83-86, 1970.
60. MOORE, S. & LINK, K.P. Carbohydrate characterization. J.Biol.Chem., 133: 293-311, 1940.
61. NAKANO, M.; RIGO, L.U.; FEINGOLD, D.S.; VEIGA, L.A. Oxidative pathway of L-rhamnose degradation. In: INTERNATIONAL CON-

- GRESS OF BIOCHEMISTRY. 9. Stockolm, 1973, Abstracts. Sto-
ckolm, 1973. p. 362.
62. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for
the determination of glucose. J.Biol.Chem., 153: 375-380, 1944.
63. NWOKORO, N.A. & SCHACHTER, H. L-fucose metabolism in mammals.
Kinetic studies on pork liver 2-keto-3-deoxy-L-fuconate:NAD⁺
oxidoreductase. J.Biol.Chem., 250: 6191-6196, 1975.
64. PAIGEN, K. & WILLIAMS, B. Catabolite repression and other con-
trol mechanisms in carbohydrate utilization. Adv. Microb.
Physiol., 4: 251-324, 1970.
65. PEDROSA, F.O. & ZANCAN, G.T. L-arabinose metabolism in *Rhizo-*
bium japonicum. J. Bacteriol., 119: 336-338, 1974.
66. PIGMAN, W.W. & GOEPP Jr., R.M. Chemistry of the carbohydrates.
New York, Academic, 1948. p. 108.
67. REGNA, P.P. & CALDWELL, B.P. The preparation of 2-ketopoly-
hydroxy acids. J.Am.Chem.Soc., 66: 243, 1944.
68. RIGO, L.U.; NAKANO, M.; FEINGOLD, D.S.; VEIGA, L.A. Metabo-
lismo de L-rhamnose em *P. pullulans*. In: CONGRESSO LATINO-A
MERICANO DE MICROBIOLOGIA. 5. Punta del Este, 1971. Resumos.
Punta del Este, 1971. p. 108.
69. RIGO, L.U.; NAKANO, M.; VEIGA, L.A.; FEINGOLD, D.S. L-rham-
nose dehydrogenase of *Pullularia pullulans*. Biochim.Biophys.
Acta, 445: 286-293, 1976.
70. RIGO, L.U.; VIEIRA, M.M.; MARÉCHAL, L.R.; VEIGA, L.A. Indu-
ção, repressão e propriedades das enzimas da via de degrada-
ção de L-rhamnose em *P. pullulans*. Arq.Biol.Tecnol., 24 (1):
39, 1981.
71. ROBINSON, G.A.; BUTCHER, R.W.; SUTHERLAND, E.W. Cyclic AMP.
New York, Academic, 1971. p. 97-138.

72. SANDMAN, R.P. & MILLER, O.N. Studies on the metabolism of lactaldehyde. I. Separation and determination of lactaldehyde and related 3-carbon compounds. J.Biol.Chem. 230:353-359, 1958 a.
73. SANDMAN, R.P. & MILLER, O.N. Studies on the metabolism of lactaldehyde. II. By baker's yeast cells. J.Biol.Chem., 230: 361-368, 1958.
74. SAWADA, H. & TAKAGI, Y. The metabolism of L-rhamnose in *Escherichia coli*. III. L-rhamnulose 1-phosphate aldolase. Biochim.Biophys.Acta, 92: 26-32, 1964.
75. SCHACHTER, H.; SARNEY, J.; MCGUIRE, E.; ROSEMAN, S. Isolation of diphosphopyridine nucleotide-dependent L-fucose dehydrogenase from pork liver. J.Biol.Chem., 244:4785-4792, 1969.
76. SCHAMHART, D.H.; TEN BERGE, A.M.A. & VAN DE POLL, K.W. Isolation of a catabolite repression mutant of yeast as a revertant of a strain that is maltose negative in the respiratory-deficient state. J. Bacteriol., 121: 747-752, 1975.
77. SIEGEL, M.R. & SISLER, H.D. Site of action of cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. I. Effect of the antibiotic on cellular metabolism. Biochim.Biophys.Acta, 87:70-82, 1964.
78. SINGH, B.; GUPTARROY, B.; HASAN, G.; DATTA, A. Inhibitory effect of glucose and adenosine 3'-5' monophosphate on the synthesis of inducible N-acetylglucosamine catabolic enzymes in yeast. Biochim.Biophys.Acta, 632: 345-353, 1980.
79. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol.Chem., 160: 61-68, 1945.
80. SUGAI, J.K. & VEIGA, L.A. Purification and properties of the xylitol dehydrogenase from *Pullularia pullulans*. An. Acad. Brasil.Ciênc., 53 (1): 183-193, 1981.

81. SUZUKI, T. & ONISHI, H. Aerobic dissimilation of L- rhamnose and the production of L-rhamnonic acid and 1,2- propanediol by yeasts. Agric.Biol.Chem., 32: 888-893, 1968.
82. TAKAGI, Y. & SAWADA, H. The metabolism of L-rhamnose in *Escherichia coli*. I. L-rhamnose isomerase. Biochim. Biophys. Acta, 92: 10-17, 1964 a.
83. TAKAGI, Y. & SAWADA, H. The metabolism of L-rhamnose in *Escherichia coli*. II. L-rhamnulose kinase. Biochim. Biophys. Acta, 92: 18-25, 1964 b.
84. TECCE, G.; LAZZARI, G.; & GIROLAMO, M. DI. Adattamento al L-rhamnosio e utilizzazione del D-arabinosio in un ceppo di *Escherichia coli*. Giorn. Microbiol., 3: 154-165, 1957.
85. TREVELYAN, W.E.; PROCTOR, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by the use of dipping reagents. Nature (Lond.), 166: 444-445, 1950.
86. VEIGA, L.A.; RIGO, L.U.; FEINGOLD, D.S.; NAKANO, M. L-rhamnose dehydrogenase: isolation of a new enzyme from *Pullularia pullulans*. I.R.C.S. Med. Sci., 2: 1397, 1974.
87. VIEIRA, M.; RIGO, L.U.; MARÉCHAL, L.R.; VEIGA, L.A. Induction and catabolite repression of L-rhamnose dehydrogenase in *Pullularia pullulans*. J. Bacteriol., 38: 55-59, 1979,
88. WARBURG, O. & CHRISTIAN, H. Isolierung und kriställisation des garungs ferments enolase. Biochem. Z., 310: 384 - 421 , 1941.
89. WEISSBACH, A. & HURWITZ, J. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. I. Identification. J.Biol. Chem., 234: 705-709, 1959.
90. WILSON, D.M. & AJL, S. Metabolism of L-rhamnose by *Escherichia coli*. I. L-rhamnose isomerase. J. Bacteriol., 73: 410-414, 1957 a.

91. WILSON, D.M. & AJL, S. Metabolism of L-rhamnose by *Escherichia coli*. II. L-rhamnulose kinase. J.Bacteriol., 73: 415-420, 1957 b.
92. WISTLER, R.L. & BeMILLER, J.N. "α"-D-galactometasaccharinic acid. In. WISTLER, R. & WOLFROM, M.L. eds. Reactions of carbohydrates. New York, Academic, 1963. p. 483-485. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 2).
93. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. 6-Deoxy-α-L-manose (α-L-rhamnose) monohydrate. In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM, M.L. eds. Analysis and preparation of sugars. New York, Academic, 1962. p. 202-205. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 1).
94. YUEN, R. & SCHACHTER, H. L-fucose metabolism in mammals. I. Pork liver L-fuconate hydro-lyase. Can.J.Biochem., 50: 798-806, 1972.