

EVERARDO FERREIRA PRAÇA

TREALASE EXTRACELULAR DE *Scopulariopsis brevicaulis*

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

CURITIBA
(1981)

A meus pais.

Tese orientada pela professora
Dra. Kazuko Hishida do Nascimento

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Kazuko H. do Nascimento, pela dedicação na orientação, apoio e amizade em todas as fases de elaboração deste trabalho.

Em especial a meus irmãos Socorro e Nelson por haverem proporcionado condições para que este trabalho pudesse ser realizado, e aos quais, também dedico esta tese.

À Cristina Flores Reis pelo apoio, incentivo e amizade que muito contribuiu para a execução deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Ramon Maréchal pelas informações seguras e precisas.

À Dra. Glaci T. Zancan, ao Dr. Shigehiro Funayama e à professora Juliet K. Sugai, pela revisão gramatical e do conteúdo deste trabalho.

Ao Dr. Aguinaldo J. do Nascimento, pela amizade e assistência na determinação do ponto isoelétrico.

À Maria Helena B. Imayuki pela revisão das referências bibliográficas

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo

À FINEP pelo suporte financeiro

Aos professores, funcionários, colegas e amigos que direta ou indiretamente prestaram colaboração

SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas	viii
Lista de figuras	ix
Resumo	xi
I. INTRODUÇÃO	01
II. MATERIAIS E MÉTODOS	09
2.1 Microorganismo	09
2.2 Manutenção e esporulação do fungo	09
2.3 Obtenção da suspensão de esporos	09
2.4 Meio de cultura	10
2.5 Inoculação dos esporos	10
2.6 Obtenção da fonte de enzima	10
2.7 Ensaio da atividade enzimática	11
2.8 Obtenção do extrato livre de células	12
2.9 Dosagem de proteínas	12
2.10 Efeito da concentração de amido	12
2.11 Curva de crescimento	13
2.12 Liofilização do meio de cultura	13
2.13 Purificação da enzima extracelular	13
2.13.1 Sephadex G-100	13
2.13.2 DEAE-celulose	14
2.14 Identificação do produto da reação	15

	Página
2.15 Estequiometria da reação	15
2.16 Especificidade da enzima	16
2.17 Estabilidade da enzima em diferentes pHs e determinação do pH ótimo.....	16
2.18 Estabilidade em diferentes temperaturas e determinação da temperatura ótima	17
2.19 Inativação térmica	17
2.20 Influência de íons metálicos e outros com- postos sobre a atividade enzimática	17
2.21 Efeito da concentração do substrato	18
2.22 Determinação do ponto isoelétrico	18
2.23 Determinação do peso molecular	19
2.24 Produtos químicos	19
2.24.1 Padrões	20
2.24.2 Substratos	20
2.24.3 Enzimas	20
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 Efeito da fonte da carbono na produção de trealase	22
3.1.1 Efeito da concentração de amido na produção da enzima	22
3.2 Efeito da idade da cultura na produção da enzima	22
3.3 Efeito da concentração de glucose na produ- ção da enzima	23
3.4 Extração e purificação da enzima	25
3.4.1 Cromatografia em coluna de Sepha-	

	Página
dex G-100	25
3.4.2 Caracterização da enzima	26
3.4.2.1 Especificidade	26
3.4.2.2 Inativação térmica	26
3.4.3 Cromatografia em DEAE-celulose	27
3.5 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática.....	28
3.6 Efeito do pH sobre a atividade da enzima ...	29
3.7 Atividade da trealase em função da concentração de proteína	29
3.8 Efeito do tempo de incubação na atividade da trealase	29
Estequiometria e produto da reação catalisada	
3.9 pela trealase	30
3.10 Efeito da concentração de substrato sobre a atividade da trealase	30
3.11 Determinação do ponto isoelétrico	31
3.12 Determinação do peso molecular	31
3.13 Efeito de íons sobre a atividade enzimática .	
3.14 Efeito de substâncias não iônicas sobre a atividade da trealase	32
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
I	Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a atividade da trealase de <i>S. brevicaulis</i>	35
II	Sumário da purificação da trealase extracelular de <i>S. brevicaulis</i>	36
III	Efeito de íons metálicos sobre a atividade da trealase extracelular de <i>S. brevicaulis</i>	37
IV	Ocorrência e propriedades da trealase de várias fontes.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efeito da concentração de amido sobre o nível de trealase extracelular de <i>S. brevicaulis</i>	39
2	Variação da atividade enzimática em função da idade da cultura.....	40
3	Trealase intra e extracelular do fungo <i>S. brevicaulis</i>	41
4	Efeito da concentração de glucose sobre a atividade da trealase intra e extracelular do fungo <i>S. brevicaulis</i>	42
5	Perfil de eluição de hidrolases por filtração em gel Sephadex G-100.....	43
6	Inativação térmica da amilase, maltase e trealase extracelular de <i>S. brevicaulis</i>	44
7	Perfil de eluição da trealase por força iônica da coluna de DEAE-celulose.....	45
8	Efeito da temperatura sobre a atividade da trealase extracelular de <i>S. brevicaulis</i>	46
9	Efeito do pH sobre a atividade da trealase	

Figura		Página
	extracelular de <i>S. brevicaulis</i>	47
10	Efeito da concentração de proteínas sobre a atividade da trealase.....	48
11	Efeito do tempo de incubação sobre a atividade da trealase.....	49
12	Estequiometria da reação catalizada pela trealase.....	50
13	Cromatograma do produto de hidrólise da reação catalizada pela trealase extracelular de <i>S. brevicaulis</i>	51
14	Determinação gráfica do Km e Vmax da reação catalizada pela trealase.....	52
15	Determinação do ponto isoelétrico.....	53
16	Determinação do peso molecular da trealase de <i>S. brevicaulis</i>	54

RESUMO

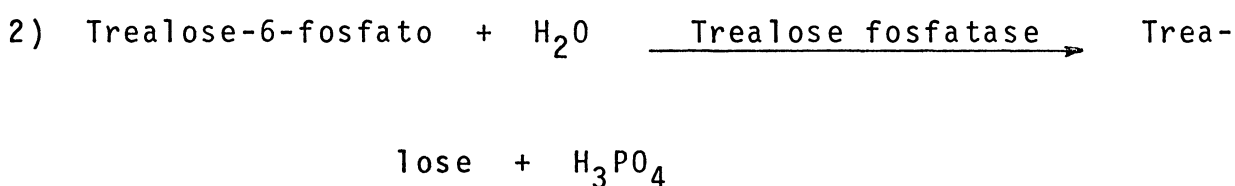
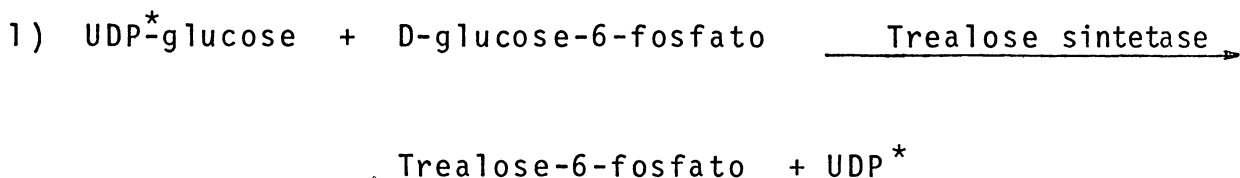
A trealase extracelular do fungo *S. brevicaulis* foi estudada em presença de diferentes fontes de carbono. O crescimento do fungo tendo o amido como única fonte de energia proporcionou uma produção de unidades de enzima por mililitro do meio de cultivo, cerca de 10 vezes maior do que quando a fonte de energia era a glucose. A trealase foi purificada em torno de 63 vezes com rendimento de 44 %. A especificidade da enzima é absoluta para a trealose com o Km da ordem de 0,4 mM em tampão fosfato. O peso molecular é cerca de 590 000 e o pI 4,2. A enzima mostrou atividade máxima em pH de 5,6 a 6,0 e em temperatura de 40 a 50°C.

I. INTRODUÇÃO

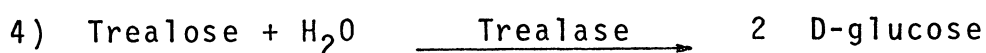
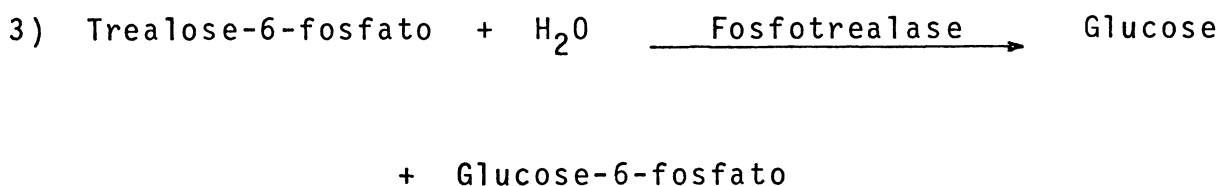
A trealose é um dissacarídeo não redutor, constituído por duas moléculas de glucose unidas por ligação α -(1 \rightarrow 1). A α , α -trealose é o único isômero da trealose encontrado na natureza e foi, provavelmente, isolado pela primeira vez em 1832 por Wiggers (6). Este açúcar ocorre em algas, bactérias, insetos, leveduras, vertebrados, invertebrados, vegetais e na maioria das espécies de fungos (20). Em fungos a trealose é encontrada em diferentes proporções, dependendo da fase de crescimento e sua ocorrência com poliois tem sido verificada desde os estudos de BOURQUELOT no século dezenove (8, 9).

A trealose desempenha diferentes papéis no seu metabolismo em fungos: a) Funciona como um componente estrutural, fazendo parte da estrutura de vários fosfolipídeos; b) como um suprimento de energia durante os estágios iniciais de germinação de esporos; c) como um intermediário na reabsorção da D-glucose (20). Devido a sua importância, o seu metabolismo tem sido estudado com grande interesse na última década. Excelentes revisões de trealoses e trealases foram feitas em 1963 por BIRCH (6) e em 1974 por ELBEIN (20). A biossíntese e degradação desse açúcar tem sido descrita em diferentes organismos: levedura de panificação, PANEK (46, 47), *Dictyostelium discoideum*, ROTH & SUSSMAN (51) e CECCARINI (11, 12).

No metabolismo da trealose, as enzimas anabólicas e catabólicas são claramente diferenciadas. A biossíntese ocorre em duas etapas (7):



E o catabolismo é efetuado pela fosfotrealase (5) ou pela trealase (7):



A trealase (EC.3.2.1.28 - α,α -trealose glucohidrolase) (36) é a enzima que hidrolisa a α,α -trealose e é encontrada em todos os organismos onde a trealose está presente, seja na forma solúvel (48, 56) ou ligada à membrana celular (14,27). Excepcionalmente, a trealase também é encontrada em organismos que não sintetizam nem armazenam a trealose, presumivelmente, para catalizar a hidrólise da trealose proveniente da dieta (20). A atividade enzimática da trealase foi primeiramente de-

* UDP: Uridina-difosfato.

monstrada por BOURQUELOT em 1893 (8). Em 1904, BOURQUELOT & HERISSEY (9) verificaram que o desaparecimento da trealose, em fungos, coincidia com o aparecimento da trealase.

Desde os trabalhos de BOURQUELOT (8, 9) muitos outros pesquisadores tem isolado, purificado e determinado as propriedades físicas e químicas de trealase(s) de uma grande variedade de organismos, como: bicho da seda *Bombix mori*, SAITO (53); *Drosophila melanogaster*, MARZLUF (41); *Formia regina*, FRIEDMAN & ALEXANDER (22); rim: humano e suíno, LABAT *et al* (38); ratos, SASAJIMA *et al* (54) e NAKANO *et al* (44); *Artemia salina*, BALLARIO *et al* (4); camundongo, TENAN *et al* (60); *Panstrongilus megistus*, CHANDELIER *et al* (13); *Apis mellifera*, TAKEWAKI (59).

GODDARD, 1935, (24) determinou que sob circunstâncias naturais, ascosporos de *Neurospora* são dormentes e provavelmente permanecem viáveis nessas condições por anos. A ativação ou quebra da dormência, pode ser consumada pela aplicação de um choque de temperatura.

Em 1959, SUSSMAN & LINGAPPA (58) encontraram que a grande quantidade de trealose armazenada em ascosporos dormentes de *Neurospora tetrasperma* era utilizada somente durante a germinação. Nesse fungo 15 % do carboidrato de reserva é a trealose (11). A atividade da trealase aumentava dramaticamente durante a germinação de esporos (12, 28, 30) e paralelamente ao aumento da atividade da trealase existia um rápido declínio no nível de trealose, sugerindo que esse açúcar fornecia a energia necessária para a germinação dos esporos. Em 1973, HEY-FERGUSON *et al* (30) observaram que durante o processo germinativo dos esporos,

a atividade da trealase chegava a aumentar até 15 vezes, enquanto que o glicogênio não era consumido.

HILL & SUSSMAN, 1963, (32) encontraram vários picos de atividade da trealase quando essa enzima era purificada em coluna de DEAE-celulose. As atividades enzimáticas, eluída em diferentes frações, eram muito similares quanto ao Km, pH ótimo, especificidade ao substrato e resposta a inibidores. Em conídias de *Aspergillus oryzae* (35) a trealase era encontrada em ambas as formas: uma ligada a membrana e outra solúvel; ambas eram inibidas competitivamente pelo D-manitol que é também uma reserva de energia nesse organismo. A atividade da trealase era completamente restaurada após a remoção do D-manitol por diálise.

Segundo YU *et al*, 1967, (69) a trealase de ascósporos intactos era mais estável em temperaturas de 60 - 65 °C que a trealase de extratos livres de células. Em 1973, usando técnicas imunofluorescente HECKER & SUSSMAN (31) descobriram que a trealase estava associada com a parede mais interna do ascósporo (endosporo), o que explicaria a maior estabilidade dessa trealase (31) a temperaturas de 60 - 65 °C do que a trealase de extratos livres de células (69). A trealase, no entanto, está localizada no citoplasma e, portanto, fisicamente separada da hidrolase. Assim, foi sugerido que a parede do ascósporo protegeria a trealase da inativação pelo calor requerido para ativar a germinação (31). Destes resultados foi concluído que a ativação por calor ou tratamento químico, provavelmente envolveria: a) a dissociação da trealase do endosporo; b) um aumento na permeabilidade da membrana plasmática do ascósporo, permitindo a difusão

da trealose através dessa membrana. Conseqüentemente, a trealose sofreria hidrólise e forneceria os intermediários metabólicos e energia para a germinação (31).

SOUZA E PANEK, 1968, (56) analisaram a distribuição da trealase e trealose em células de levedura e revelaram que a trealase estava localizada na fração solúvel de protoplastos lisados enquanto a trealose permanecia associada com a fração particulada. Tanto a trealose como a trealase não foram detectadas na parede celular. Foi concluído, então, que a membrana citoplasmática parecia ser uma barreira entre a enzima e o substrato, e verificaram que alterações na permeabilidade da membrana em presença de tolueno ou durante a divisão celular, conduzia a hidrólise da trealose pela trealase.

Em 1969, HANKS & SUSSMAN (27) descreveram variações na atividade da trealase em relação ao crescimento e conidiação de *Neurospora crassa*, e demonstraram que o aumento da atividade não aparecia até algum tempo após o início da conidiação. Foi observado ainda, que em condições de conidiação reprimida ou em mutantes sem conídios, a atividade da trealase permanecia baixa até o final do ciclo de crescimento após o qual ocorria um aumento. Desse modo, a formação da trealase poderia ser dependente da conidiação e o mecanismo regulatório responsável pelo controle da síntese da enzima, poderia ser afetado por esse proceso. No mesmo ano (1969), HANKS & SUSSMAN (28) verificaram que mutantes de *Neurospora crassa* sem conídios, quando crescidos em fontes de carbono que permitia um rápido crescimento micelial, a atividade da trealase por unidade de peso do micélio era muito baixa, contrastando com a atividade muito alta dessa mesma

enzima quando era utilizada fontes de carbono em que o crescimento micelial era lento. Em experimentos posteriores (28), concluíram que o aumento da atividade enzimática resultava de uma síntese "de novo".

CHANG & TREVITHICH, 1972, (14) demonstraram em *Neurospora crassa*, que em torno de 25 % do total da atividade da invertase e trealase celular era encontrada em uma preparação purificada de parede celular, e verificaram que esta atividade era liberada por enzimas hidrolíticas, não ocorrendo o mesmo quando era utilizado detergentes ou outros reagentes químicos. PATTERSON *et al*, 1972, (48) isolaram e purificaram as trealases de *Streptomyces hygroscopicus* e *Mycobacterium smegmatis*. A enzima de *S. hygroscopicus* estava presente na fração solúvel, enquanto que a de *M. smegmatis* estava ligada à membrana, mas poderia ser solubilizada pelo tratamento com butanol aquoso a 10 %.

Vários mecanismos tem sido considerados para explicar a ativação de ascosporos dormentes pelo choque de temperatura. Em 1972, van ASSCHE *et al* (2) mostraram que a trealase de esporos de *Phycomyces blakesleeianus* ocorre em duas diferentes formas, as quais, são interconvertíveis "in vivo": uma forma com baixa atividade, encontrada em esporos dormentes, e uma forma ativa após a quebra da dormência. O tratamento dos esporos desse fungo pelo calor (50°C por 3 minutos), quebrava a dormência dos mesmos causando um súbito aumento de 10 - 15 vezes na atividade da trealase, independentemente da síntese de proteínas. Dentro de uma hora, esta atividade caía para o nível encontrado nos esporos dormentes. Foi sugerido, então, que o tratamento pelo calor converte temporariamente uma forma menos

ativa de trealase em outra mais ativa. Em 1975, van ASSCHE & CARLIER (1) verificaram as diferenças quanto a mobilidade eletroforética, peso molecular e influência de diferentes temperaturas e concentração de substrato entre a forma menos ativa de trealase em esporos dormentes e o estado ativado após a indução da germinação.

A maioria das trealases de microorganismos descritas até o presente, são de natureza intracelular. Sua ocorrência extracelularmente é muito incomum. Usando bentonite comercial e sem tratamento prévio, VIJAYAKUMAR *et al*, 1978, (64) purificaram uma α, α' -trealase extracelular de *Trichoderma reesei*, cerca de 70 - 80 vezes, com uma recuperação de 90 % da atividade enzimática e verificaram que o seu pH ótimo era 4,4, o ponto isoelétrico 5,7 e o Km da ordem de 3,1 mM.

O trabalho aqui apresentado determina a ocorrência da atividade trealásica intra e extracelular no ascomiceto *Scopulariopsis brevicaulis*, bem como algumas das propriedades físicas e químicas da trealase extracelular. O fungo *Scopulariopsis brevicaulis*, vem sendo estudado há alguns anos pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, com referência a determinação da via de metabolismo de carboidrato (34, 49) e a modificação da parede celular conforme o seu crescimento em diferentes fontes de carbono (15). Este fungo hidrolisa inúmeros carboidratos e cresce em diferentes fontes de carbono.

Atenção será dada para a trealase extracelular, por esta ser uma enzima de ocorrência pouco comum e se encontrar presente no meio em uma quantidade apreciável, como também para estabelecer alguns parâmetros entre essa enzima e os diferentes está-

gios de crescimento do fungo.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICROORGANISMO

A cepa de *Scopulariopsis brevicaulis* (anteriormente denominada de *Pycnoporus cinnabarinus*) foi cedida gentilmente pela Dra. Dēa Amaral. Trata-se de um epiparasita do *P. cinnabarinus*, que é um fungo apodrecedor de madeira. A denominação de *Scopulariopsis brevicaulis* (Saccardo) Bainier foi dada pelo Herb. Identification Services Commonwealth Mycological Institute (IMI - nº 239748) - England.

2.2 MANUTENÇÃO E ESPORULAÇÃO DO FUNGO

O fungo foi mantido em ágar Sabouraud-glucose e repicado cada três meses. Os esporos foram obtidos crescendo o fungo em ágar malte. Após a esporulação este microorganismo foi conservado na geladeira a 4°C até o uso.

2.3. OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS.

Para cada 20 ml de ágar malte contendo formas vegetativas e esporuladas, foi adicionado 15 ml de água destilada estéril. As formas vegetativas e esporuladas foram ressuspensas com uma alça de repique e filtradas esterilmente em lã de vidro. Os micélios ficaram retidos nas

lhas de lâ de vidro e os esporos no filtrado.

2.4. MEIO DE CULTURA.

Inicialmente o crescimento foi realizado em Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do meio líquido descrito por MARKUS *et al* (40) com a seguinte composição: KH_2PO_4 anidro 9 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 2 mg; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 20,1 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; NH_4NO_3 1 g; Tiamina 5 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 2,5 mg; água destilada q.s.p. 1000 ml (pH 6,0). A este meio foi adicionado diferentes fontes de carbono com concentrações variáveis: glucose 1 g %; acetato 1 g %; trealose 1 g %; maltose 1 g %; lactose 1 g %; sacarose 1 g %; melibiose 1 g %; rafinose 1 g %; celobiose 1 g %; amido 0,2 g %. O meio foi esterilizado a uma atmosfera de pressão durante 30 minutos. Os açúcares foram dissolvidos em água destilada, esterilizados a vapor fluente por 30 minutos, separadamente, e acrescentados ao meio de crescimento. O amido foi autoclavado a uma atmosfera de pressão juntamente com o meio de crescimento.

2.5. INOCULAÇÃO DOS ESPOROS.

Para o crescimento inoculou-se 2 ml da suspensão de esporos (aproximadamente 5×10^6) para 100 ml do meio líquido de crescimento contendo a fonte de carbono adequada.

2.6. OBTENÇÃO DA FONTE DE ENZIMA

Depois de 72 horas de crescimento a 28°C em agitador rotatório (New Brunswick) a 100 r.p.m., a cultura foi filtrada em

gaze e o micélio lavado com água destilada e congelado. O meio foi dialisado contra tampão fosfato 5 mM pH 6,0 durante uma noite, mantido a 4 °C e utilizado como fonte de enzima.

2.7 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A não ser quando indicado no texto, o sistema de incubação para medir a atividade enzimática da trealase continha: 25 mM de trealose; 50 mM de tampão fosfato pH 6,0; 50 µl da amostra previamente dialisada, sendo o volume final de 200 µl. Este sistema foi incubado por 30 minutos em banho-maria a 40 °C e a atividade enzimática foi determinada pela quantidade de açúcar redutor liberada, sendo este medido pelo método colorimétrico de SOMOGYI (55) e NELSON (45) ou pelo método específico da glucose-oxidase (16). A reação foi interrompida pela adição do reativo de SOMOGYI (55) ao sistema de incubação e a cor desenvolvida foi medida em espectrofotômetro Colleman Jr. a 540 nm para o método de SOMOGYI (55) e NELSON (45) e a 420 nm para o método da glucose-oxidase. Como controle foi adicionado o sistema de incubação completo sendo que o reativo de SOMOGYI (55) era adicionado antes da enzima.

Para a determinação da atividade enzimática nos meios cujas fontes de carbono utilizadas pelo fungo eram acetato, lactose, maltose, celobiose, rafinose, trealose, sacarose, melibiose, glucose e amido, 10 ml do meio de cultura foi concentrado até a secura, dissolvido com 1 ml de água destilada e dialisado contra tampão acetato 5 mM pH 5,0 por uma noite. Foi utilizado o sistema de incubação convencionado acima, substituindo o tampão fosfato pelo tampão acetato pH 5,0 na mesma concentração final.

A unidade de enzima (U.E.) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio e a atividade específica como a unidade de enzima por miligrama de proteína.

2.8 OBTENÇÃO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS.

O extrato livre de células foi obtido rompendo-se as células por trituração com areia do mar em geral previamente gelado. Para cada grama de micélio foram adicionadas duas gramas de areia e 3 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0. Após o rompimento das células, o material resultante foi centrifugado em centrífuga refrigerada (12 000 x g) durante 10 minutos. O sobrenadante foi dialisado contra tampão fosfato 5 mM pH 6,0 por uma noite e a atividade da trealase foi determinada segundo a mesma técnica utilizada para a determinação da atividade da trealase extracelular.

2.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.

As proteínas foram determinadas, no meio concentrado e dializado, pelo método descrito por LOWRY *et al* (39) ou pela técnica de WARBURG & CHRISTIAN (66).

2.10 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO.

O efeito da concentração de amido foi verificada com o crescimento do fungo por 72 horas, em Erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml do meio de cultivo e amido em concentrações va-

riáveis (0,05 a 1 g %). A atividade enzimática foi determinada diretamente do meio de cultura.

2.11. CURVA DE CRESCIMENTO.

Utilizando o amido a 0,2 % como fonte de carbono, foi realizado o crescimento em frascos de 2000 ml contendo 300 ml do meio de MARKUS *et al* (40), com agitação constante (100 r.p.m.) e temperatura de 28⁰C. Nos diferentes tempos de incubação foram retiradas, asépticamente, alíquotas de 50 ml do meio, filtradas em papel de filtro previamente preparado (deixado na estufa a 60⁰C até peso constante) e levado a estufa até peso constante. O peso seco do micélio foi determinado por diferença. Com o meio líquido foram realizadas as seguintes determinações: o pH do meio após o crescimento, a concentração de amido residual pelo método do fenol sulfúrico (19), a atividade da trealase e a concentração de proteínas. O peso úmido foi determinado filtrando o meio em "papel Wheaton" duplo (Wheaton plasticos do Brasil Ind. e Com.) a vácuo até a secura.

2.12. LIOFILIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.

Após o crescimento em amido a 0,2 g %, o meio de cultura foi dividido em frações de 300 ml e distribuído em balões para liofilização com capacidade para 1000 ml e liofilizado (Cryolyzer Freeze Drying Apparatus - New Brunswick Scientific - N.J. - U.S.A.). O material seco foi conservado na geladeira até o uso,

2.13. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR:

2.13.1. SEPHADEX G-100.

Alíquotas de 3 gramas do meio liofilizado foram dissolvidas em 10 ml de água destilada, passadas por uma coluna de Sephadex G-100 (Pharmacia - Suécia) de 3 x 25 cm, equilibrada previamente com tampão acetato 25 mM pH 5,0. A eluição foi feita com o tampão de equilíbrio, em câmara fria (4 °C), com um fluxo de eluição de 1 ml por minuto. Foram coletadas frações de 5 ml em um coletor (Ultrorac Fraction Collector L.K.B. 7000).

As frações que apresentaram maior atividade enzimática foram reunidas e liofilizadas. Após a cromatografia, a coluna foi lavada com tampão acetato 25 mM pH 5,0 contendo NaCl 0,1 M para remover algum material remanescente e posteriormente equilibrada com tampão acetato 25 mM pH 5,0 para uso subsequente. Esta operação foi repetida várias vezes para obter amostra suficiente para a realização das outras etapas de purificação.

2.13.2. DEAE-CELULOSE.

As frações coletadas da coluna de Sephadex G-100, liofilizadas (50 mg) foram dissolvidas em 10 ml de água destilada e passadas por uma coluna de DEAE-celulose (Sigma Chemical Co. - U.S.A.) de 3,5 x 35 cm, com capacidade de troca de 0,95 mEq/g e equilibrada com tampão fosfato 5 mM pH 6,2. O fracionamento foi efetuado por etapas, em câmara fria (4 °C), inicialmente com 300 ml do tampão de equilíbrio e depois com o mesmo volume do tampão contendo NaCl nas concentrações de 0,1 a 0,4 M. O fluxo de eluição foi de 2 ml por minuto.

Foram coletadas frações de 5 ml e as frações com maior atividade foram reunidas (35 ml), dialisadas contra tampão fosfato 5 mM pH 6,2 por uma noite, passadas novamente através da coluna de

DEAE-celulose nas mesmas condições da anterior e liofilizadas.

2.14. IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO

Para a determinação do produto da reação foi realizado um sistema de incubação contendo 400 mM de tampão fosfato pH 6,0; 200 mM de trealose; 7,2 unidades de enzima, em um volume final de 1,6 ml. A superfície da mistura de reação foi coberta com tolueno para evitar o crescimento de bactérias e em tempos determinados (de zero a 12 horas) foram retiradas alíquotas de 0,2 ml. A reação foi interrompida em banho-maria fervente por 5 minutos. Cada amostra foi passada em coluna de amberlite MB 3 (Mallinckrodt Chemical Works - U.S.A.) de 1,8 x 2 cm e eluída com água bidestilada. Dessas amostras foram aplicados 10 µl para a análise cromatográfica.

A cromatografia foi realizada em papel Whatmann nº 1 pela técnica descendente, sendo utilizado como solvente o n-butanol: piridina : água (6:4:3,v/v) durante 24 horas. O cromatograma foi revelado com nitrato de prata alcalino segundo TREVELYAN *et al* (62). Como padrões foram utilizados a D-glucose e a trealose.

2.15. ESTEQUIOMETRIA DA REAÇÃO.

Para a estequiometria da reação foram utilizadas as mesmas condições e o mesmo sistema de incubação usado para a determinação dos produtos de hidrólise.

Após parar a reação em banho-maria fervente, determinou-se açúcares totais pelo método do fenol sulfúrico (19), e a glu-

cose liberada, pelo método da glucose-oxidase (16). A trealose consumida foi determinada pela diferença entre a quantidade de açúcares totais e a glucose liberada pela hidrólise da trealose em cada tempo de incubação.

2.16. ESPECIFICIDADE DA ENZIMA.

A especificidade foi verificada incubando-se a enzima com 25 mM de diferentes substratos: trealose (1-0- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosídeo), maltose (4-0- α -D-glucopiranosil-D-glucopirano-se), sacarose (β -D-frutofuranosídeo- α -D-glucopiranosídeo), melibiose (6-0- α -D-galactopiranosil-D-glucopirano-se), celobiose (4-0- β -D-glucopiranosil-D-glucopirano-se), gentiobi-ose (6-0- β -D-glucopiranosil-D-glucopirano-se), lactose (4-0- β -D-galactopiranosil-D-glucopirano-se), 6-fosfotrealose, amido (0,1 g %). A atividade foi determinada pelo método da glucose-oxida-se (16).

2.17. ESTABILIDADE DA ENZIMA EM DIFERENTES pHs E DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO.

A estabilidade da enzima foi medida incubando-se a enzima em diferentes pHs (3,0 a 9,0) por 16 horas. Após esse tempo o pH de incubação foi ajustado para o pH de ensaio (6,0) adicionando-se tampão fosfato 0,2 M. Em seguida foi acrescentado o substrato (trealose), incubado e medida a atividade. Para a deter_{min}ação do pH ótimo, a enzima foi incubada em diferentes pHs (3,0 a 9,0), durante 30 minutos em 40 °C e determinada a ativi-dade.

2.18. ESTABILIDADE EM DIFERENTES TEMPERATURAS E DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA.

A enzima foi colocada previamente em diferentes temperaturas (zero a 70°C) durante 30 minutos na ausência de substrato, resfriada em banho de gelo, e, posteriormente, incubada com substrato e medida a atividade enzimática como na técnica já descrita. A temperatura ótima da atividade enzimática foi determinada em diferentes temperaturas (zero a 70°C) durante 30 minutos.

2.19. INATIVAÇÃO TÉRMICA.

A inativação térmica foi realizada colocando-se 2 ml da enzima obtida da coluna de Sephadex G-100, em banho-maria a 55°C. Nos tempos especificados (de zero a 120 minutos) foram retiradas alíquotas de 200 µl. As amostras foram resfriadas em banho de gelo. Destas amostras foram ensaiadas atividades sobre trealose, maltose e amido, utilizando, respectivamente, 20, 50 e 100 µl da preparação. A incubação foi realizada a 40°C durante 30 minutos. A atividade enzimática foi determinada como descrito anteriormente, sendo a glucose medida pelo método da glucose-oxidase (16) para os dois primeiros substratos e o açúcar redutor pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45) para o amido.

2.20. INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS E OUTROS COMPOSTOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foi verificada a influência do HgCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 ,

ZnCl₂ , CoCl₂ , tris(hidroximetil)aminometano, amido, sacarose, celobiose, maltose, D-manitol, D-sorbitol, D-arabitol e L-arabitol em diferentes concentrações, adicionando-se estes compostos ao sistema de incubação e em seguida medindo-se a atividade da enzima.

2.21. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO.

Foram realizados vários sistemas de incubação contendo 50 mM de tampão fosfato pH 6,0; 0,45 unidades de enzima e diferentes concentrações de substrato, em um volume final de 200 µl. Em tempos determinados (10, 20, 30 minutos) a reação foi parada pela adição do reativo de SOMOGYI (55) e medida a atividade enzimática pelo método convencional. Esta operação foi repetida para cada concentração de substrato, ou seja, para cada concentração de substrato foi realizada uma curva de tempo para obter a média dos valores.

2.22. DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO.

O ponto isoelétrico foi determinado usando-se gel de poli acrilamida, segundo VESTERBERG (63) e WRIGLEY (68). Para o gradiente de pH foi utilizada a anfolina na faixa de 3 a 10.

O tempo de eletro-enfoque foi de 3 horas em uma temperatura de 4°C, a 350 volts.

A atividade enzimática foi determinada cortando-se o gel em fatias de 2 mm com o auxílio de um parafuso micrométrico (Shardlow Micrometers L^{td} - Sheffield, England). Essas frações

do gel foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,5 ml de água destilada e medida a variação de pH. Em seguida os diferentes pHs foram ajustados para o pH de ensaio (6,0) adicionando-se tampão fosfato 0,2 M. O gel foi macerado com bastão de vidro. À alíquotas de 0,2 ml do sobrenadante foi acrescentado 5 µmoles de trealose e incubado durante 12 horas. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45).

2.23. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

O peso molecular foi determinado em uma coluna de Sepharose 6 B (1 x 70 cm), usando como padrões: "blue dextran" (PM = 2 000 000); urease (PM = 590 000); albumina bovina (PM=134 000); hemoglobina (PM = 64 500); citocromo "c" (PM = 12 400). A eluição foi efetuada com tampão fosfato 5 mM pH 6,0 contendo NaCl 0,5 M. Foram coletadas frações de 2 ml com um fluxo de eluição de 1 ml/min. e os picos de eluição dos padrões foram detectados pelos seguintes métodos: absorvância em 540 nm ("blue dextran"); absorvância em 420 nm (Hemoglobina, citocromo "c"); LOWRY *et al* (39) (albumina bovina); SUMNER (57) (urease). A trealase foi acompanhada determinando-se a atividade pela técnica descrita anteriormente.

2.24. PRODUTOS QUÍMICOS.

Os produtos químicos eram tidos como quimicamente puros e foram obtidos de fontes como: Calbiochem - U.S.A.; Merck - Alemanha; Pfanstiehl Chemical Co. - U.S.A.; Sigma Chemical Co. - U.S.A.; Pharmacia - Suécia.

2.24.1. PADRÕES.

"Blue dextran" (Pharmacia); urease (Merck); albumina bovina, D-glucose, citocromo "c" (Sigma); hemoglobina foi preparada seguindo a técnica descrita por GHIRETTI-MAGAMDI & GHINETTI (23).

2.24.2. SUBSTRATOS.

Trealose (Sigma); fosfotrealose (cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Luiz Ramon Maréchal); maltose e amido (Pfanstiehl); sacarose, melibiose, celobiose, gentiobiose e lactose (Calbiochem).

2.24.3. ENZIMAS.

D-glucose-oxidase e peroxidase (Sigma).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. EFEITO DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE TREALASE.

Na tabela I pode-se observar que a atividade enzimática por mililitro do meio de cultivo e a atividade específica da trealase de *S. brevicaulis* dependem da fonte de carbono utilizada. Foi observado que a liberação da enzima para o meio é variável quando o fungo é crescido em diferentes fontes de carbono, sendo que a secreção é menor quando o crescimento é efetuado em acetato, lactose, rafinose, maltose, celobiose, sacarose e glucose do que quando o fungo é crescido em melibiose, trealose e amido.

Entre as fontes de carbono estudadas, o amido foi a mais efetiva na produção de unidades de enzima por mililitro do meio de crescimento, o que sugere que este polissacarídeo induz a síntese da trealase extracelular se for comparado o seu efeito com o do acetato ou mesmo com o da trealose.

AVIGAD *et al* (3) observaram em levedura que a fonte de carbono adicionada ao meio mínimo de crescimento não tinha nenhum efeito sobre a produção da enzima intracelular, uma vez que a relação entre a unidade de enzima e o peso seco do micélio eram similares em cada fonte de carbono utilizada, o que não ocorre em *S. brevicaulis* que em presença de amido aumenta cerca de dez vezes a unidade de enzima da trealase extracelular comparado com a glucose quando esta era a fonte de carbono.

METZENBERG (43) encontrou resultados semelhantes em *Neurospora*, onde a atividade da trealase era aumentada em torno de 5 vezes quando aquele fungo era crescido em meio contendo 1,35 % de galactose, enquanto WANG & TOURNEAU (65) verificaram que a trealose aumentava a produção dessa enzima em *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.1.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO NA PRODUÇÃO DA ENZIMA.

Sendo o amido a fonte de carbono mais efetiva na produção de trealase, foi então determinada qual a sua concentração ideal para a preparação da enzima em grande escala. O limite analisado foi de 0,05 a 2 g %, como mostra a Fig. 1.

A atividade da trealase aumenta quando é utilizado o amido em concentrações crescentes até 0,4 % onde ocorre produção máxima da enzima. Em concentração superior a 1 g % o amido não é consumido totalmente e interfere na determinação da atividade enzimática.

Como a concentração de amido que fornecia maior atividade específica era 0,2 g %, esta concentração foi utilizada nos experimentos subsequentes.

3.2. EFEITO DA IDADE DA CULTURA NA PRODUÇÃO DA ENZIMA.

Para a determinação da produção máxima de trealase em função do crescimento, o fungo foi crescido em amido a 0,2 g %. Durante o crescimento foi analisado o consumo de amido dosando açúcar total, a liberação de proteínas para o meio extracelular,

o peso seco do micélio e a variação do pH do meio (Fig. 2).

Observou-se que a produção da enzima intracelular e extracelular aumentam paralelamente com o crescimento da massa micelial que atinge o máximo em 72 horas. Nesse ponto, pode-se observar que praticamente todo o amido foi consumido. Após 72 horas, o peso seco do micélio começa a decrescer, contudo, a atividade enzimática extracelular e proteínas continuam aumentando, possivelmente, por entrar na fase autolítica liberando a trealase e proteínas intracelulares (Fig. 2 e 3). Por outro lado, quando o peso micelial começa a decrescer, a atividade da trealase intracelular decresce bruscamente para níveis bastante inferiores (Fig. 3), sugerindo que esta enzima tenha sofrido ação das proteases, liberada pela autólise, provocando a sua inativação.

A trealase extracelular parece não sofrer ação dessas proteases, pois mantém a sua atividade mesmo após a fase autolítica. Destes resultados pode-se sugerir que as trealases intra e extracelular de *S. brevicaulis*, são de natureza distinta (Fig. 3). Como não houve variação do pH do meio, a atividade da enzima se mantém durante uma semana de crescimento (Fig. 2).

3.3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NA PRODUÇÃO DA ENZIMA.

Muitos autores tem utilizado altas concentrações de glucose, como fonte de energia, para a obtenção da trealase, como: WANG & TOURNEAU (65) em *Sclerotinia sclerotiorum* (3 g %); METZENBERG (43), em *Neurospora* (1,35 g %); HANKS & SUSSMAN (27), em *Neurospora* (2 g %); PRASSAD & MAHESHWARI (50), em *Humicola lanuginosa* (2 g %), não sendo mencionado em nenhum destes traba-

lhos o efeito repressor da glucose que é um fenômeno observado em um grande número de glicosidases quando concentrações elevadas desse açúcar são utilizadas (17, 21, 67).

Quando o fungo *S. brevicaulis* era crescido em meio contendo de 0,1 a 5 g % de glucose, a atividade da trealase intracelular aumentava gradativamente, mesmo na concentração de 5 g % de glucose, enquanto a atividade da trealase extracelular permanecia constante (Fig. 4), sugerindo que as duas enzimas são diferentes. A síntese da trealase intracelular parece não sofrer repressão pela adição de elevadas concentrações de glucose ao cultivo, enquanto que, a trealase extracelular parece estar sob o controle do sistema de indução e repressão, como pode ser observado na tabela I e na Fig. 4.

O aumento no estímulo da produção de trealase extracelular de *S. brevicaulis* quando o fungo é crescido em amido (Fig. 3), é devido, possivelmente, a presença de uma enzima no meio de cultura, presumivelmente a amilase (Fig. 5), capaz de hidrolisar o amido formando os oligossacarídeos. Esses oligossacarídeos formados a partir do amido, estimulariam a maior liberação da trealase para o meio.

Essa hipótese pode ser favorecida pelo fato de que a atividade da trealase extracelular começava a aumentar quando o amido adicionado ao meio de crescimento, era praticamente todo consumido (Fig. 2). A baixa produção da trealase exógena, quando a fonte de energia para o crescimento do fungo, era a glucose (Fig. 4) e maltose (Tabela I), sugere que os oligossacarídeos induzem a formação de algum componente responsável pela pela excreção da enzima.

Por outro lado, há a possibilidade de que quando o fungo é crescido em presença de concentrações de glucose superiores a 1 g % (Fig. 4), ocorra um sequestro da trealase podendo a glucose estar reprimindo a síntese de algum componente envolvido no sistema de secreção. Esse fenômeno não seria observado quando o fungo é crescido em presença de amido (Fig. 2 e 3) por não haver no meio de crescimento, um acúmulo de glucose, resultante da hidrólise do amido, pois a glucose formada é imediatamente utilizada pelo fungo em crescimento.

A hipótese de que oligossacarídeos sejam indutores de secreção das enzimas extracelulares, pode ser sugerida também pelos resultados de VIJAYAKUMAR *et al* (64) que mostra que quando o *Trichoderma reesei* era crescido em presença de celulose, mostrava produção simultânea de celulase e trealase extracelular a qual foi posteriormente purificada.

3.4. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA.

3.4.1. CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G-100.

Três gramas do material resultante da liofilização de 5 litros do meio de cultura, cuja atividade específica variava de 2,6 a 3,6 foram dissolvidos em 10 ml de água destilada e passadas por uma coluna de Sephadex G-100 equilibrada e eluída com tampão acetato 25 mM pH 5,0. O fluxo de eluição foi de 1 ml por minuto e foram coletadas frações de 5 ml. A trealase foi recuperada no volume morto da coluna, sugerindo que o seu peso molecular era superior a 150 000, e, como mostra a Fig. 5, foi encontrado um único pico de atividade.

3.4.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA.

3.4.2.1. ESPECIFICIDADE.

Na fração eluída no volume morto, da coluna de Sephadex G-100, foi testada a atividade de α -glucosidases utilizando como substrato a maltose e o amido e verificou-se que ambas as atividades eram coincidentes com a atividade trealásica. Para testar a especificidade da enzima foram reunidas as frações mais ativas e verificada sua atividade sobre os seguintes substratos: trealose, maltose, amido, fosfotrealose, sacarose, celobiose, lactose, rafinose, gentiobiose e isomaltose. Foi encontrada atividade somente para os três primeiros substratos, sendo a atividade relativa de 100, 50 e 14, respectivamente.

3.4.2.2. INATIVAÇÃO TÉRMICA.

Para verificar se a atividade das frações, obtidas da coluna de Sephadex G-100, sobre a trealose era devida a atividade α -glucosidásica, essa preparação foi submetida a uma inativação térmica a 55 °C durante 120 minutos. O resultado é mostrado na Fig. 6. Uma vez que a atividade α -glucosidásica sobre a maltose e amido era totalmente perdida em 45 minutos quando incubada a 55 °C (Fig. 6), provavelmente, essa atividade enzimática, que foi evidenciada, seja de uma única enzima. Em contra posição, cerca de 15 % da atividade trealásica era mantida quando a preparação enzimática era submetida a 55 °C por 120 minutos, sugerindo que se trata de uma proteína diferente da anterior.

3.4.3. CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE.

As frações, com atividade da trealase, coletadas da coluna de Sephadex G-100, liofilizadas e dissolvidas em água destilada foram passadas através de uma coluna de DEAE-celulose e eluída sucessivamente com NaCl em tampão fosfato. A enzima foi recuperada em um único pico na concentração de 0,3 M de NaCl (Fig. 7). Também foi acompanhada a eluição da α -glucosidase, contudo, não foi detectada a sua atividade até 0,4 M de NaCl, sugerindo que talvez a força iônica empregada não tenha sido suficiente para eluir essas hidrolases ou que as mesmas tenham sido inativadas com este tratamento. As frações mais ativas da trealase foram reunidas e recromatografadas em outra coluna de DEAE-celulose para obter melhor purificação. Após estas etapas a trealase mostrou-se específica somente para a trealose.

A tabela II sumariza o processo de purificação empregado. A enzima foi purificada em torno de 63 vezes com um rendimento de 44 %.

Os mais variados sistemas tem sido empregados para a obtenção da trealase purificada, sendo a grande maioria desses sistemas, baseados no fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE-celulose (3, 32, 42). VIJAYAKUMAR *et al* (64) desenvolveram um método simples de purificação da trealase extracelular de *Trichoderma reesei* empregando a bentonite como adsorvente, proporcionando uma purificação de 70 - 80 vezes com rendimento de 90 %. Entretanto, em *S. brevicaulis* a técnica foi testada utilizando-se diferentes concentrações de bentonite e em vários pHs, não sendo observada nenhuma adsorção

da trealase que proporcionasse a purificação. Outros autores utilizaram técnicas mais sofisticadas como o fracionamento em coluna de hidroxapatita e concanavalina A (37) ou óxido de alumínio e acrilamida agarose (26).

A trealase de levedura (3) tem sido descrita como sendo muito instável, mas, específica para trealose e quando eluída em coluna de DEAE-celulose foi separada da α -glucosidase com recuperação de ambas as atividades em picos distintos, o que não ocorre com o presente experimento.

3.5. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

Como mostra a Fig. 8 quando incubada em presença de substrato, a velocidade máxima da atividade enzimática foi observada entre 45 e 50 °C, não apresentando qualquer atividade se incubada a zero °C e sendo inativada quando a incubação era feita a 70 °C.

Por outro lado, na ausência de substrato, a trealase é estável até 40 °C. Temperatura superior a esta leva a uma inativação progressiva, sendo totalmente inativada a 60 °C. Quando a enzima está na presença do substrato pode-se observar o efeito protetor do mesmo, pois a 60 °C a enzima mantém ainda cerca de 44 % da sua atividade.

Os resultados acima são similares aos encontrados na literatura, como a trealase de *Dictyostelium discoideum* (12), *S. cerevisiae* (47), *Humicola lanuginosa* (50). Em *Aspergillus oryzae* (35) a enzima é estável nas temperaturas de zero a 50 °C, enquanto que em *Aspergillus niger* (52) a α -glucosidase extracelular

matêm em torno de 30 % da sua atividade quando aquecida a 65⁰C por 60 minutos e a intracelular, por sua vez, é totalmente inativada em 45 minutos nas mesmas condições.

3.6. EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA.

A incubação da enzima na presença de substrato em diferentes pHs, apresenta a atividade máxima na faixa de 5,6 a 6,0 (Fig. 9). A trealase é estável na faixa de pH entre 5,0 e 7,5, sendo que o pH abaixo ou acima desse limite mostra uma inativação bastante acentuada (Fig.9).

O pH ótimo da trealase extracelular de *S. brevicaulis* é semelhante ao da trealase de outros microorganismos (11, 31, 32, 47, 52, 60), observando que valores mais elevados foram encontrados em *Phycomyces blakesleeanus* (1, 2) cujo pH ótimo foi 7,5 e em levedura (3) 6,9. pHs mais ácidos, em torno de 4,0, também foram encontrados em *Aspergillus oryzae* e *Pullularia pullulans* (35, 42).

3.7. ATIVIDADE DA TREALASE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.

Através da Fig.10 pode-se verificar que a atividade da enzima é diretamente proporcional a quantidade de proteínas adicionadas a mistura de reação (faixa de 0,1 a 1,2 unidades de enzima), o que sugere que não existe ativador ou inibidor na preparação enzimática.

3.8. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE DA TREALASE.

As Fig.11 e 12 evidenciam que a reação enzimática era linear

atē 8 horas de incubação nas condições de ensaio, e portanto, não houve inibição pelo produto durante esse tempo de incubação, sendo que em tempos superiores houve limitação da concentração do substrato que foi praticamente todo hidrolisado.

3.9. ESTEQUIOMETRIA E PRODUTO DA REAÇÃO CATALIZADA PELA TREALASE

A estequiometria da reação (Fig.12) demonstra que para cada μmol de trealose consumido havia liberação de 2 μmoles de glucose que eram detectados pelo método da glucose-oxidase (16) e que nas condições de ensaio metade da trealose era hidrolisada em 6 horas e 24 minutos. A reação foi seguida dosando açúcar total e glucose por métodos específicos e o produto da reação foi observado por cromatografia em papel (Fig. 13). Somente duas manchas foram reveladas em todos os tempos de incubação e coincidiam com os R_f dos padrões D-glucose e trealose. Não foi observado nenhuma outra mancha que indicasse reação de transglicosilação, sendo similar a trealase de levedura estudada por AVIGAD *et al* (3). A ausência de outros produtos, diminui a possibilidade de haver participação da fosfotrealase ou fosforilase na reação.

3.10. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A ATIVIDADE DA TREALASE.

Utilizando a trealose em concentrações crescentes de 0,2 a 5 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 6,0, verificou-se que a enzima apresentava um comportamento cinético segundo Michaelis-Menten e o valor do K_m obtido segundo representação gráfica de

Lineweaver-Burk (Fig. 14) foi de 0,4 mM e a velocidade máxima (Vmax.) igual a 0,74 μ mol de glucose/min./0,4 μ g de proteína (Fig. 14).

A trealase extracelular de *Scopulariopsis brevicaulis* é altamente específica e o seu Km de 0,4 mM é similar ao das trealases de outras fontes (47, 48, 53). Por outro lado, tem sido publicado valores de Km que variam de 0,1 (20) a 55 mM (1, 2).

3.11. DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO.

Para determinar o ponto isoelétrico a trealase foi submetida a eletro-enfoque em gel de poliacrilamida usando anfolina na faixa de pH de 3 a 10 (Fig. 15). A amostra apresentou um único pico de atividade e o seu ponto isoelétrico localizava-se em pH 4,2. A trealase de *T. reesei* possui ponto isoelétrico em pH 5,7 (64); a de *Artemia salina* (crustáceo) em pH 6,2; a de rim de porco (mamífero) em pH 4,8 (38); a de *Melolontha vulgaris* (26) e larva de *Rhynchociara americana* (61) (insetos) em pH 3,95 e 4,6, respectivamente, o que mostra que as trealases são proteínas de natureza acídica.

3.12. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR.

O peso molecular (Fig. 16) foi determinado em coluna de Sepharose 6 B (1 x 70 cm) e o pico de eluição da enzima ocorreu no volume correspondente ao peso molecular de 590 000, sendo coincidente com o da urease (18), quando a eluição foi efetuada com tampão fosfato 5 mM contendo NaCl 0,5 M ou na ausência de NaCl. A trealase de *Neurospora* descrita por HECKER & SUSSMAN (31) so

fre efeito da força iônica durante a eluição, e, na determinação do peso molecular foi verificado que variando a força iônica do eluente, surgiam dois picos de atividade enzimática: um com peso molecular aproximadamente 160 000 a 250 000 e outro com mais de 400 000. Outros trabalhos tem sido publicados com o peso molecular dessa enzima variando de 60 000 a mais de 400 000 (2, 13, 31, 44, 48, 52, 60), sendo que somente em *Trichoderma reesei* (64) foi avaliado o peso molecular da trealase extracelular que é igual a 88 000 quando submetido a tratamento com SDS.

3.13. EFEITO DE ÍONS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

Os íons tem influência de maneira distinta sobre a atividade da trealase, conforme a origem da enzima (3, 13, 54). Em *S. brevicaulis*, exceto o Mg^{2+} , todos os íons testados nas concentrações especificadas na tabela III, tiveram efeito inibitório sobre a atividade enzimática, sendo que a enzima era totalmente inibida pelo Hg^{2+} que é um bloqueador do grupamento -SH, sugerindo que eles parecem ser essenciais na catálise enzimática.

3.14. EFEITO DE SUBSTÂNCIAS NÃO IÔNICAS SOBRE A ATIVIDADE DA TREALASE.

Em muitos trabalhos tem sido relatada a influência de compostos não eletrólitos sobre a atividade da trealase e foi verificado que esses compostos podem ou não modificar a atividade dessa enzima dependendo da sua origem (3, 35, 50, 54, 65). Em *S. brevicaulis* observou-se que o tris(hidroximetil)aminome-

tano não inibe a atividade da trealase em concentrações até 10 mM, contudo, 50, 100 e 250 mM inibe 26, 56 e 92 % da atividade dessa enzima, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por AVIGAD *et al* (3). Outros autores como SASAJIMA *et al* (54); WANG & TOURNEAU (65) publicaram que esse composto inibe a atividade da trealase mesmo em concentrações inferiores a 50 mM.

Foi verificado, ainda, em *S. brevicaulis* que a sacarose, maltose, celobiose (1 - 100 mM); D-manitol, D-sorbitol, D-arabitol, L-arabitol (5 - 250 mM) e amido (0,1 - 10 mg %) não tinham qualquer efeito sobre a atividade da trealase.

O D-manitol, presente como um material de reserva em *A. oryzae* (35) é um inibidor da atividade de trealase, entretanto, em micélio de *Humicola lanuginosa* (50), apesar de estar presente esse composto não inibe essa enzima. Outros compostos como a trealosamina, em *D. discoideum*(12) e em *S. hygrosopicus* (29) a trealose-6-fosfato e glucose, em levedura (3), o D-xilitol e D-arabitol, em *Sclerotinia sclerotiorum* (65), também tem efeito inibitório sobre a atividade da trealase dessas fontes.

Na tabela IV pode-se observar algumas propriedades das trealases de origem microbiana, sendo a maioria de localização intracelular (esporos, micélio, ameba ou levedura).

Como pode ser observado, a trealase extracelular de *S. brevicaulis* é bastante semelhante a trealase de *S. cerevisiae* (47) e *Neurospora crassa* (32) quanto ao pH ótimo, Km e temperatura ótima, diferindo fundamentalmente na localização da enzima e por possuir alto peso molecular. A única trealase extracelular descrita na literatura, é a do *Trichoderma reesei* (64)

que difere um pouco nas suas propriedades, com relação a afinidade e por apresentar o Km e o ponto isoelétrico superiores ao da trealase de *S. brevicaulis*. As diferenças entre as trealases, de modo geral, são marcantes, dependendo da origem da enzima, como pode ser observado na tabela IV.

Neste trabalho foi descrita a purificação da trealase extracelular, e, sua pureza até a homogeneidade não foi demonstrada devido a quantidade muito pequena de proteína obtida na preparação, bem como a não detecção da mesma pelos métodos de amido negro e azul de Coomassie. Tem sido descrito técnicas mais específicas para glicoproteínas e estas deverão ser utilizadas futuramente para elucidação.

A influência do amido e glucose no processo de excreção da enzima para o meio extracelular, necessita de estudos mais detalhados para esclarecer as hipóteses descritas no presente trabalho.

A trealase extracelular de *S. brevicaulis* é uma enzima altamente específica e de obtenção relativamente fácil, sendo, portanto, viável a sua aquisição para a aplicação em análise específica quantitativa da trealose, bem como na determinação da estrutura de polissacarídeos.

Tabela I - EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A ATIVIDADE DA TREALASE EXTRACELULAR DE *S. brevicaulis*.

FONTES DE CARBONO	$\mu\text{mol glucose min.}^{-1}$ ml meio	ATIVIDADE ESPECÍFICA
Acetato	$1,7 \times 10^{-3}$	0,28
Lactose	2,7 "	0,33
Rafinose	7,5 "	0,42
Maltose	7,2 "	0,42
Celobiose	8,9 "	0,42
Sacarose	9,4 "	0,55
Trealose	16,0 "	0,65
Glucose	8,4 "	0,69
Melibiose	14,4 "	1,3
Amido	81,8 "	3,9

O fungo foi crescido por 72 horas em meio líquido de MARKUS *et al* (40) contendo 1 g % de diferentes fontes de carbono, exceto para o amido (0,2 g %). O sistema de incubação continha: 50 mM de tampão acetato pH 5,0; 25 mM de trealose; 50 μl do meio de cultura concentrado, em um volume final de 200 μl . Incubação em 40°C por 30 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45).

Tabela II - SUMÁRIO DA PURIFICAÇÃO DA TREALASE EXTRACELULAR DE *Scopulariopsis brevicaulis*

ETAPAS DE PURIFICAÇÃO	U.E.* ml ENZ.	PROTEÍNAS (mg/ml)	ATIVIDADE ESPECÍFICA	U.E.* TOTAIS	PURIFI CAÇÃO	RENDI MENTO (%)
MEIO DE CULTURA	0,24	0,22	1,09	24,00	0,00	100
SEPHADEX G-100	0,14	0,03	4,63	19,46	4,25	81
DEAE-CELULOSE I	4,16	0,10	41,62	12,48	38,20	52
DEAE-CELULOSE II	3,05	0,044	69,32	10,68	63,60	44,5

* - Unidades de Enzima ($\mu\text{mol glucose min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$)

Tabela III - EFEITO DE ÍONS METÁLICOS SOBRE A ATIVIDADE DA
TREALASE EXTRACELULAR DE *S. brevicaulis*.

REAGENTES	MOLAR	ATIVIDADE RELATIVA
Sem adição	-	100
MgCl ₂	10 ⁻³	100
CaCl ₂	10 ⁻²	31
ZnCl ₂	10 ⁻²	14
MnCl ₂	10 ⁻²	11
CoCl ₂	10 ⁻²	8
HgCl ₂	10 ⁻⁵	0

O sistema de incubação continha: 50 mM de tampão fosfato pH 6,0; 25 mM de trealose; 0,5 unidades de enzima; íons nas concentrações acima, em um volume final de 200 µl. Incubação em 40°C por 30 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45).

Tabela IV - OCORRÊNCIA E PROPRIEDADES DA TREALASE DE VÁRIAS FONTES

MICROORGANISMOS	LOCALIZAÇÃO	ESPECIFICIDADE	pH ÓTIMO	Km (mM)	T (°C) ÓTIMA	PESO MOLECULAR	INIBIÇÃO	PURIFICAÇÃO	PONTO ISOELÉTRICO	REFERÊNCIAS
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Intracelular	Trealose, sacarose rafinose, maltose, gentiobiose	5,0	1,7	40 - 45		D-manitol D-xilitol D-arabitol			65
<i>Pullularia pullulans</i>	"	Trealose	4,0	3,2	37					50
<i>Aspergillus oryzae</i>	"	Trealose	4,0	2,5	37		D-manitol	40		42
<i>Hemicola lanuginosa</i>	"	Trealose	5,5	3,2	50	170 000		184		35
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	"		7,5	55	30	210 000	ATP			1, 2
<i>Neurospora crassa</i>	"	Trealose	5,6	0,57	38	105 000 a 400 000	Manitol Inositol	680		31
Hybrid yeast	"	Trealose	6,8	10	30					3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	"	Trealose Rafinose	5,7	0,41	40 - 50		Hg ²⁺ ATP	33		47
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	"	Trealose	5,5	0,5	30		Hg ²⁺	733		37
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	"	Trealose	6,5	18	37			80		29
<i>Dictyostelium discoideum</i>	"	Trealose	5,5	1,2	45			90		11
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	"	Trealose 6-desoxi-trealose	6,45	20	30		K ⁺ NH ₄ ⁺	160		25
<i>Trichoderma reesei</i>	Extracelular	Trealose	4,4	3,1	50			70 - 80	5,7	64
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	"	Trealose	5,6	0,4	40 - 50	590 000	Tris Hg ²⁺	63	4,2	Este trabalho

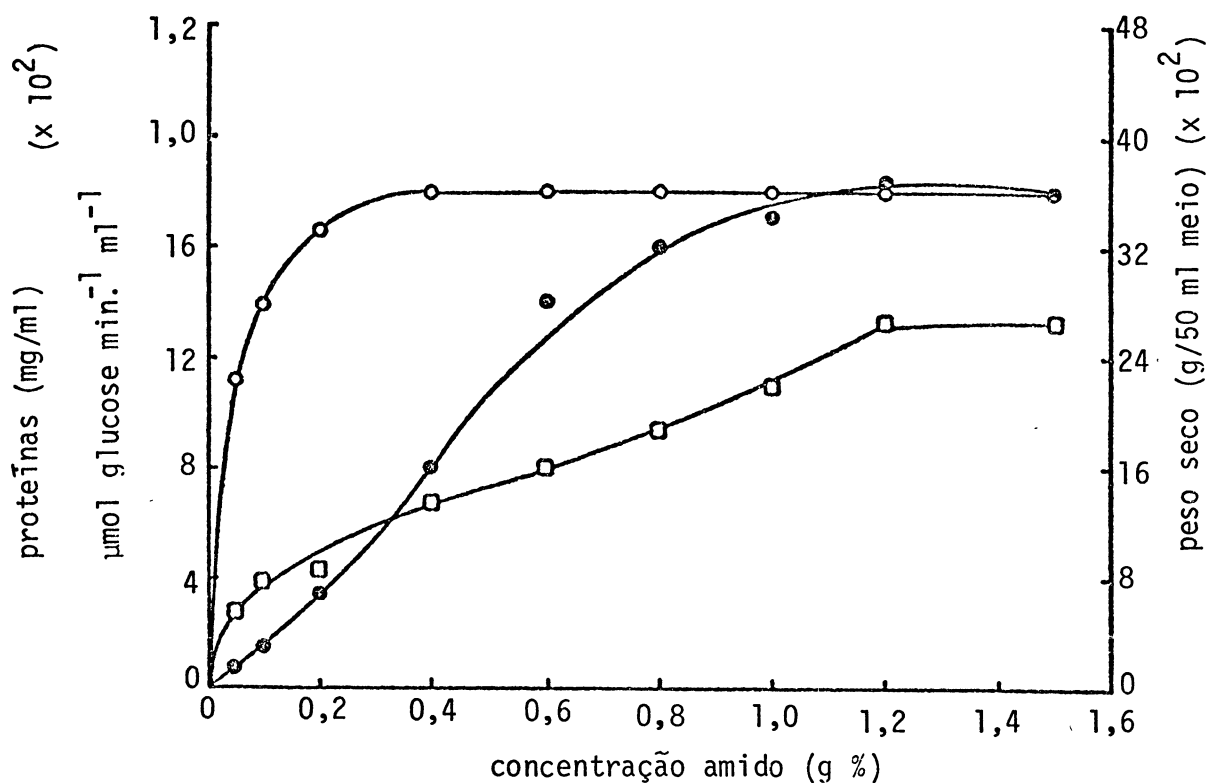


Fig. 1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO SOBRE O NÍVEL DE TREA-LASE EXTRACELULAR DE *S. brevicaulis*.

O fungo foi crescido por 72 horas em meio líquido de MARKUS *et al* (40) contendo diferentes concentrações de amido. O sistema de incubação continha: 50 mM de tampão acetato pH 5,0; 25 mM de trealose; 50 µl da amostra, em um volume final de 200 µl. Incubação em 40 °C por 30 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45). Símbolos: ○—○ = unidades de enzima; ●—● = peso seco; □—□ = proteínas.

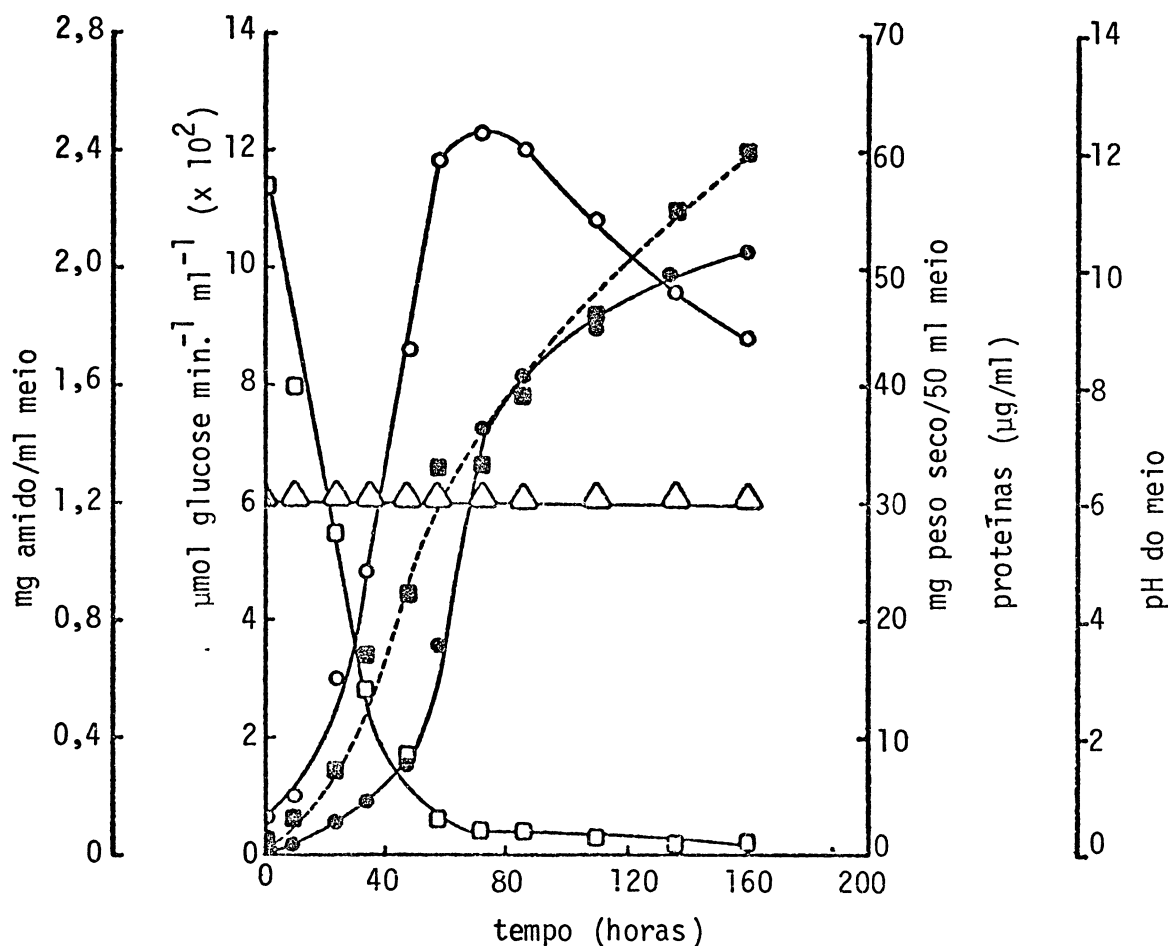


Fig. 2 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DA IDADE DA CULTURA.

O crescimento do fungo foi realizado em meio líquido de MARKUS *et al* (40) contendo 0,2 g % de amido. A mistura de reação continha: 50 mM de tampão fosfato pH 6,0; 25 mM de trealose; 50 μl da amostra, em um volume final de 200 μl . Incubação em 40 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45). Símbolos: ●—● = unidades de enzima; ○—○ = peso seco; □—□ = amido residual; ■—■ = proteínas; Δ—Δ = pH do meio.

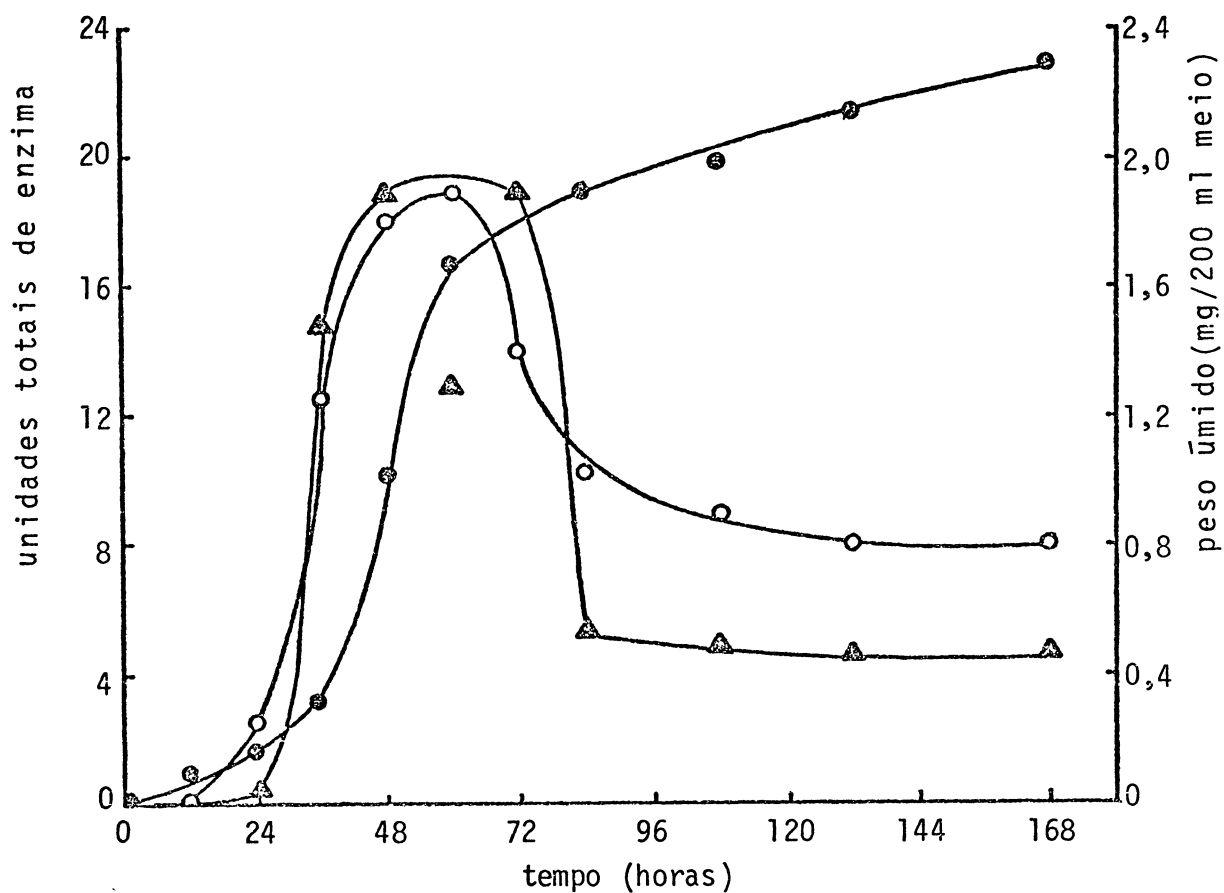


Fig. 3 - TREALASE INTRA E EXTRACELULAR DO FUNGO *S. brevicaulis*.

O crescimento do fungo foi realizado em meio líquido de MARKUS *et al* (40) contendo 0,2 % de amido. A atividade da trealase intracelular, trealase extracelular e peso úmido foram determinados como descrito em materiais e métodos. Símbolos: Δ — Δ = trealase intracelular; \bullet — \bullet = trealase extracelular; \circ — \circ = peso úmido.

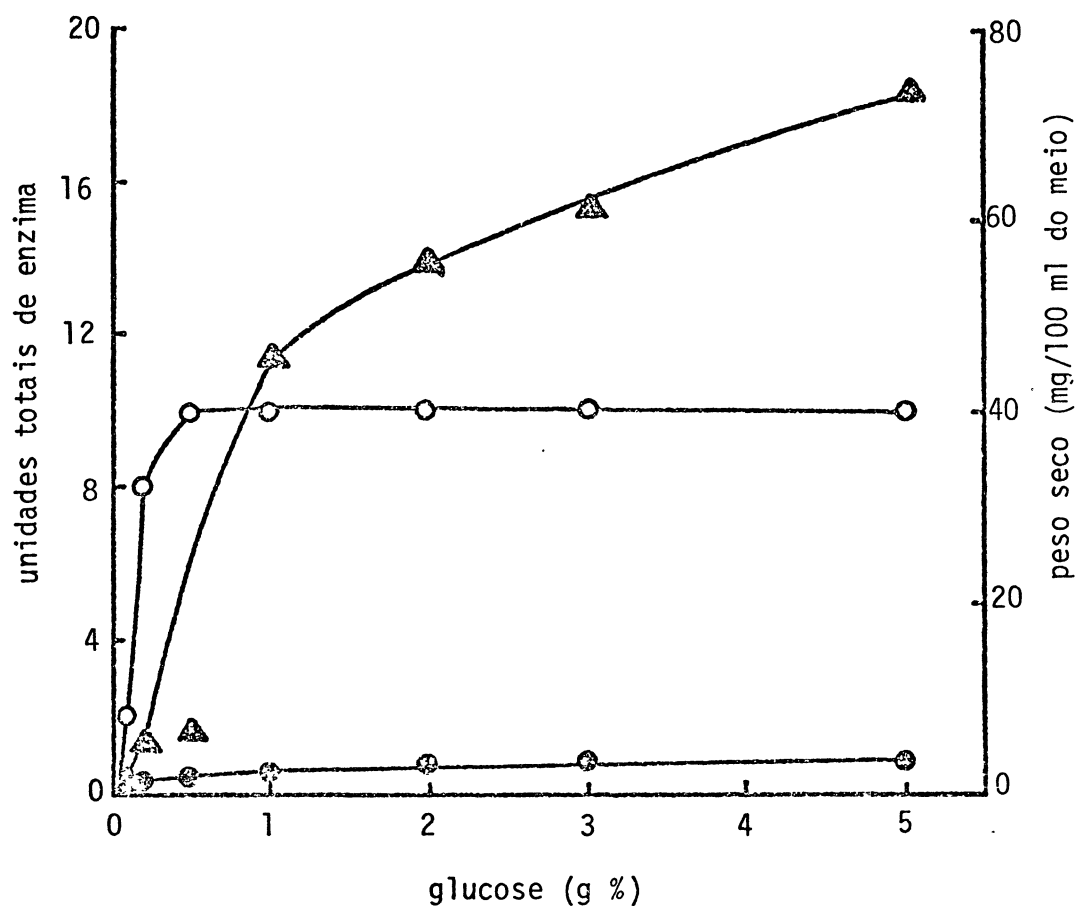


Fig. 4 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE SOBRE A ATIVIDADE DA TREALASE INTRA E EXTRACELULAR DO FUNGO *S. brevicaulis*.

O fungo foi crescido por 72 horas em meio líquido de MARKUS *et al* (40) contendo diferentes concentrações de glicose. A atividade da trealase intracelular, trealase extracelular e peso seco, foram determinados como descrito em Materiais e Métodos. Símbolos: \blacktriangle — \blacktriangle = trealase intracelular; \bullet — \bullet = trealase extracelular; \circ — \circ = peso seco.

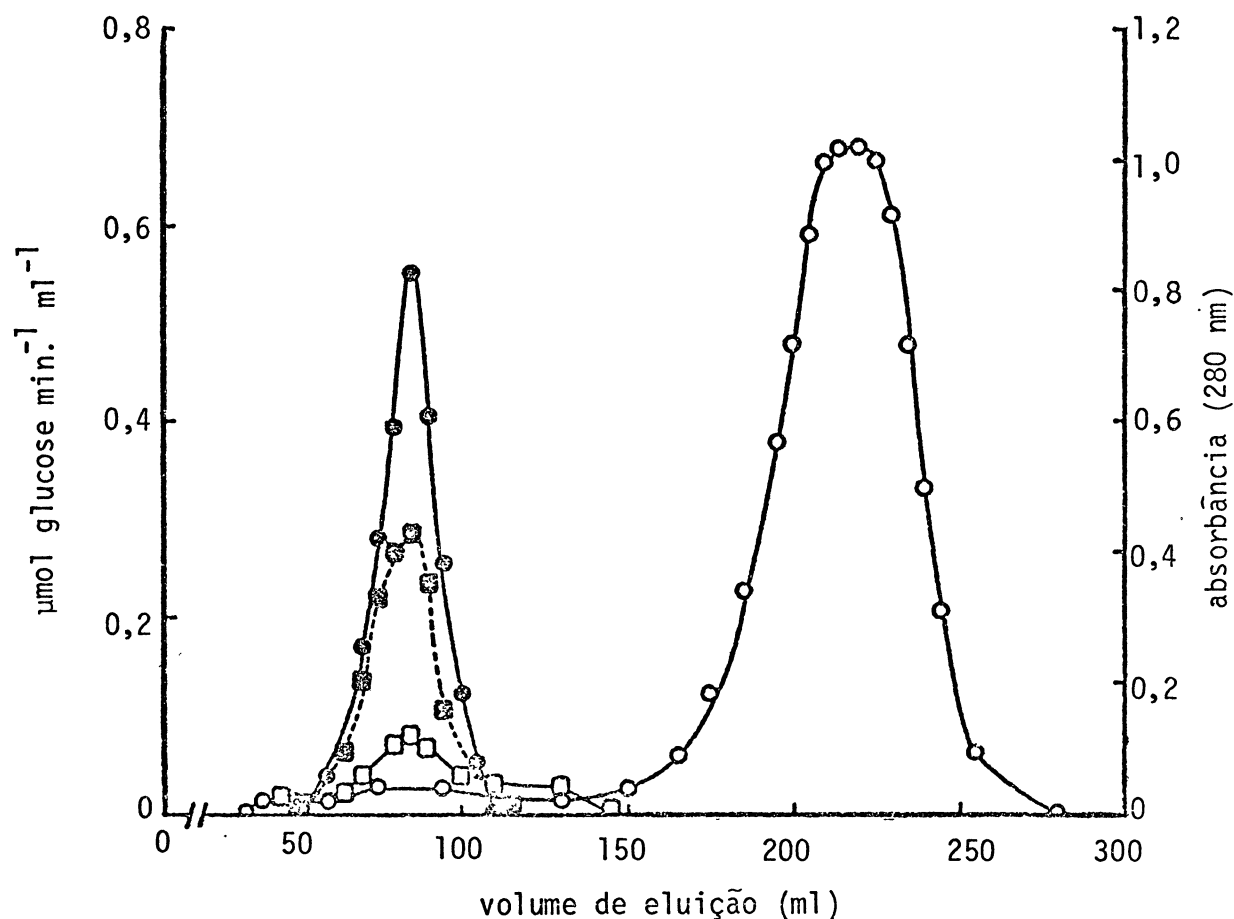


Fig. 5 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HIDROLASES POR FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-100.

A filtração na coluna de Sephadex G-100 foi realizada como descrito em Materiais e Métodos. O sistema de incubação para determinação da atividade da trealase, maltase e amilase, continha: 50 mM de tampão acetato pH 5,0; 20 μ l da amostra; substrato (25 mM de trealose; 25 mM de maltose; 0,1 mg de amido), em um volume final de 200 μ l. Incubação em 40°C por 30 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método da glucose oxidase (16) quando o substrato era trealose e maltose e pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45) quando o substrato era amido. As proteínas foram acompanhadas pela absorbância em 280 nm. Símbolos: ●—● = trealase; ■—■ = maltase; □—□ = amilase; ○—○ = proteínas.

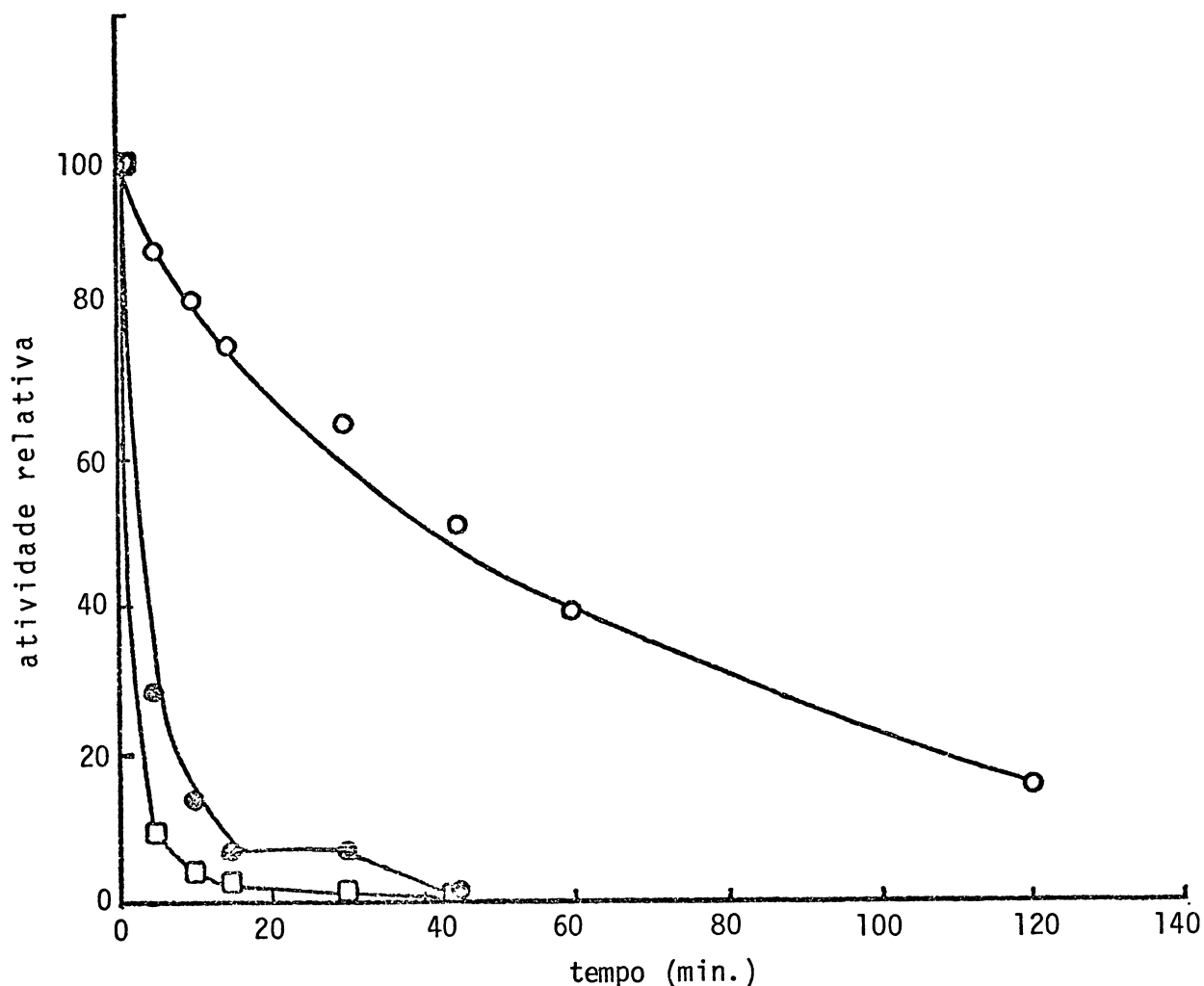


Fig. 6 - INATIVAÇÃO TÉRMICA DA AMILASE, MALTASE E TREALASE EXTRACELULAR DE *S. brevicaulis*.

A inativação térmica da trealase, maltase e amilase foi realizada a 55 °C nos intervalos de tempo de zero a 120 minutos (Materiais e Métodos). O sistema de incubação continha em um volume final de 200 µl: (Trealase: 50 mM de tampão acetato pH 5,0; 2,5 mM de trealose; 1,0 µg de proteínas); (Maltase: 50 mM de tampão acetato pH 5,0; 2,5 mM de maltose; 2,5 µg de proteínas); (Amilase: 50 mM de tampão acetato pH 5,0; 0,25 mg de amido; 5 µg de proteínas). Incubação em 40 °C por 30 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método da glucose-oxidase (16) na atividade da trealase e maltase e pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45) na atividade da amilase. Símbolos: ○—○ = trealase; □—□ = maltase; ●—● = amilase.

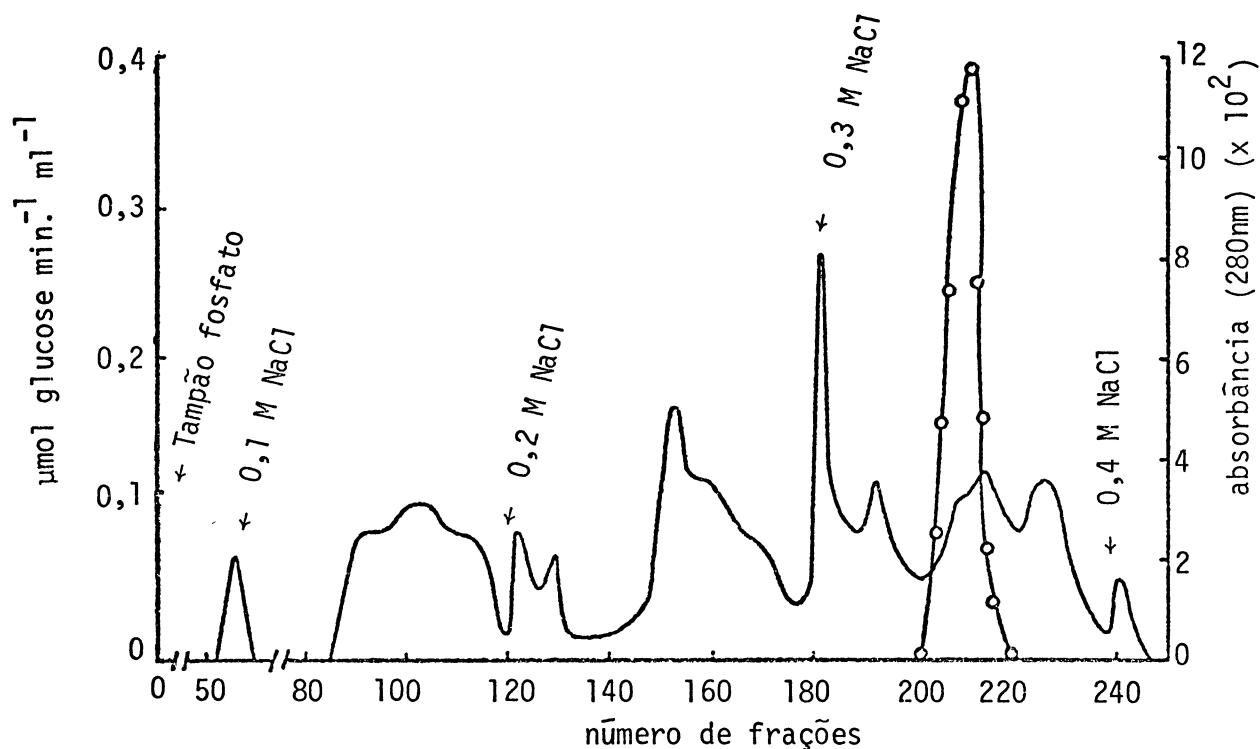


Fig. 7 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA TREALASE POR FORÇA IÔNICA DA COLUNA DE DEAE-CELULOSE.

A eluição foi efetuada por etapas utilizando tampão fosfato 5 mM pH 6,2 contendo NaCl (zero a 0,4 M). A mistura de reação continha 50 mM de tampão fosfato pH 6,0; 25 mM de trealose e 20 μ l da amostra, em um volume final de 200 μ l. Incubação em 40 °C por 30 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45). Símbolos:
 ○—○ = unidades de enzima; — = proteínas.

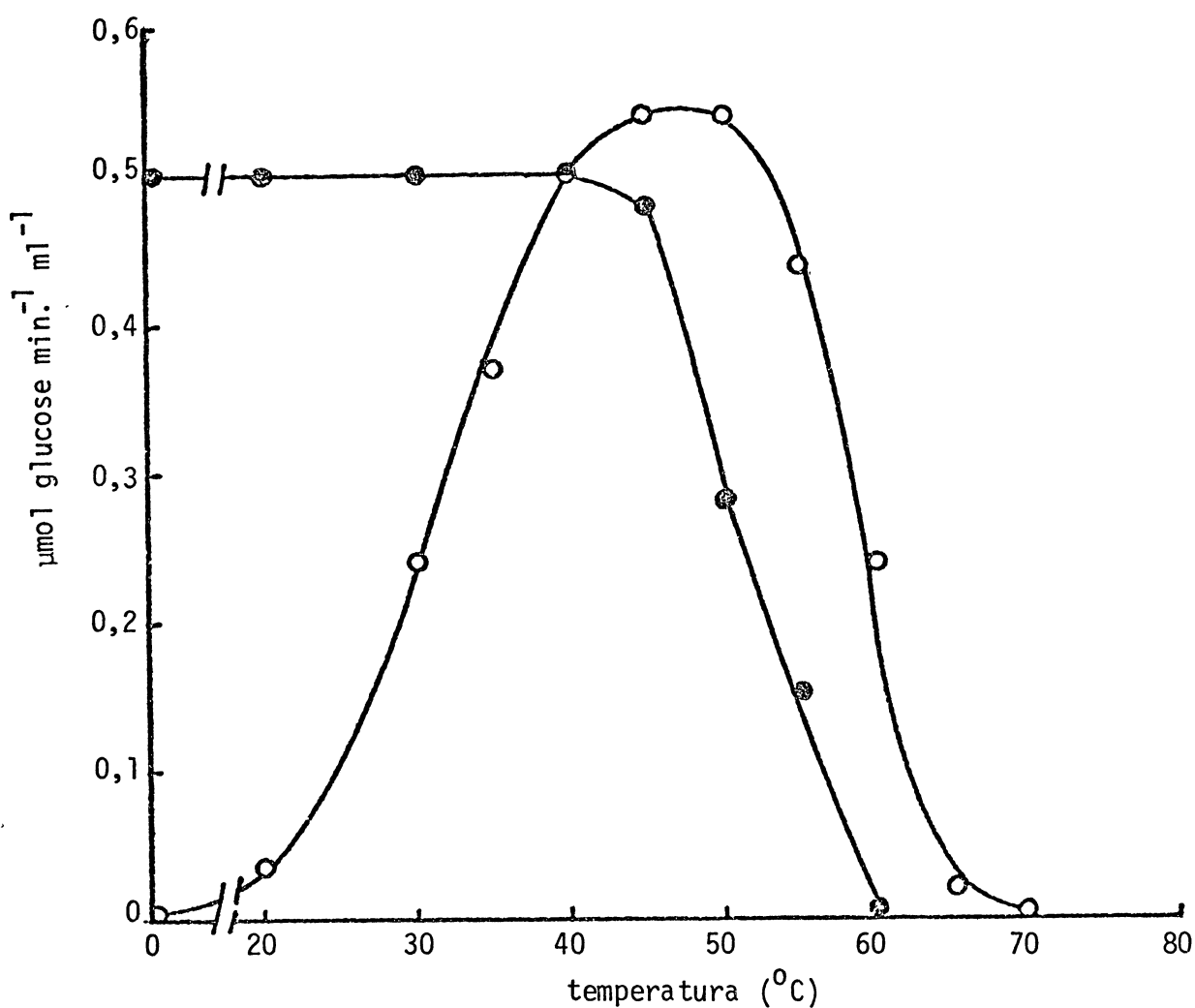


Fig. 8 - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DA TREALASE EXTRA-CELULAR DE *S. brevicaulis*.

O sistema de incubação continha: 50 mM de tampão fosfato pH 6,0; 25 mM de trealose; 0,45 unidades de enzima, em um volume final de 200 μ l. Incubação em 40 °C por 30 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45). Símbolos: ○—○ = curva de temperatura; ●—● = curva de estabilidade da enzima: incubação prévia da enzima em diferentes temperaturas por 30 minutos.

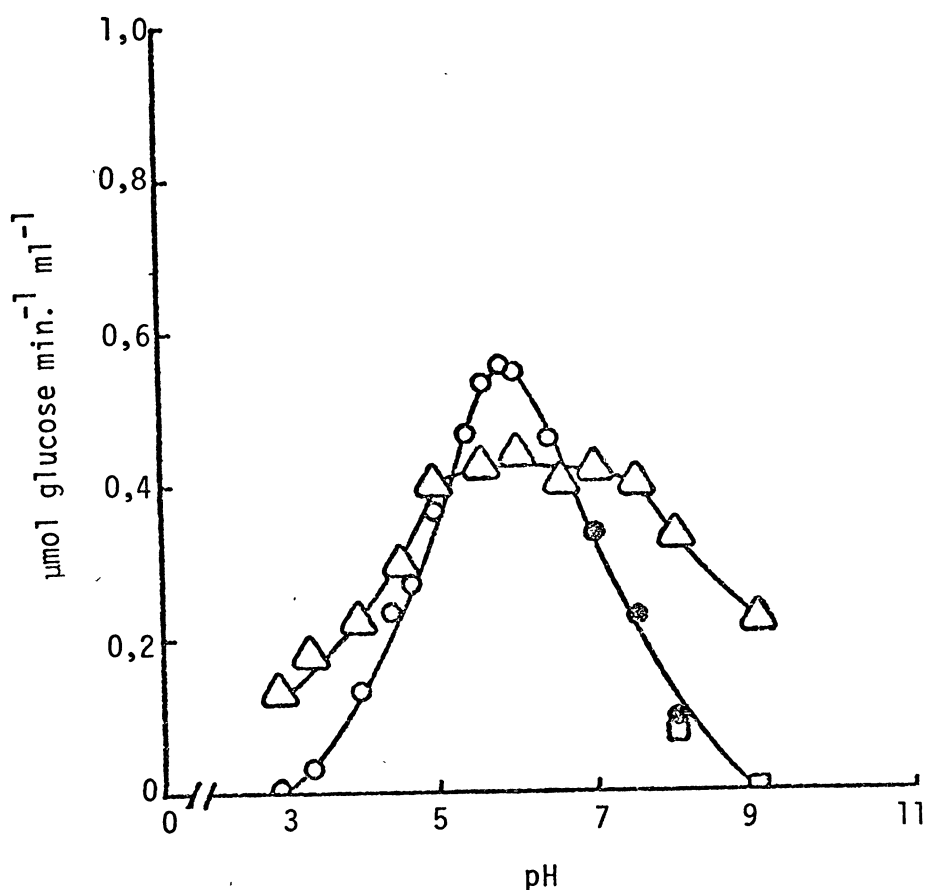


Fig. 9 - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA TREALASE EXTRACELULAR DE *S. brevicaulis*.

Sistema de incubação: 50 mM de tampão fosfato pH 6,0; 25 mM de trealose; 0,5 unidades de enzima, em um volume final de 200 μ l. Incubação em 40°C por 30 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45). Símbolos: ○—○ = tampão citrato fosfato; ●—● = tampão fosfato; □—□ = tampão ácido bórico- bórax; Δ — Δ = estabilidade: incubação prévia de 0,5 unidades de enzima e 50 mM de tampão em diferentes pHs durante uma noite (Materiais e Métodos)

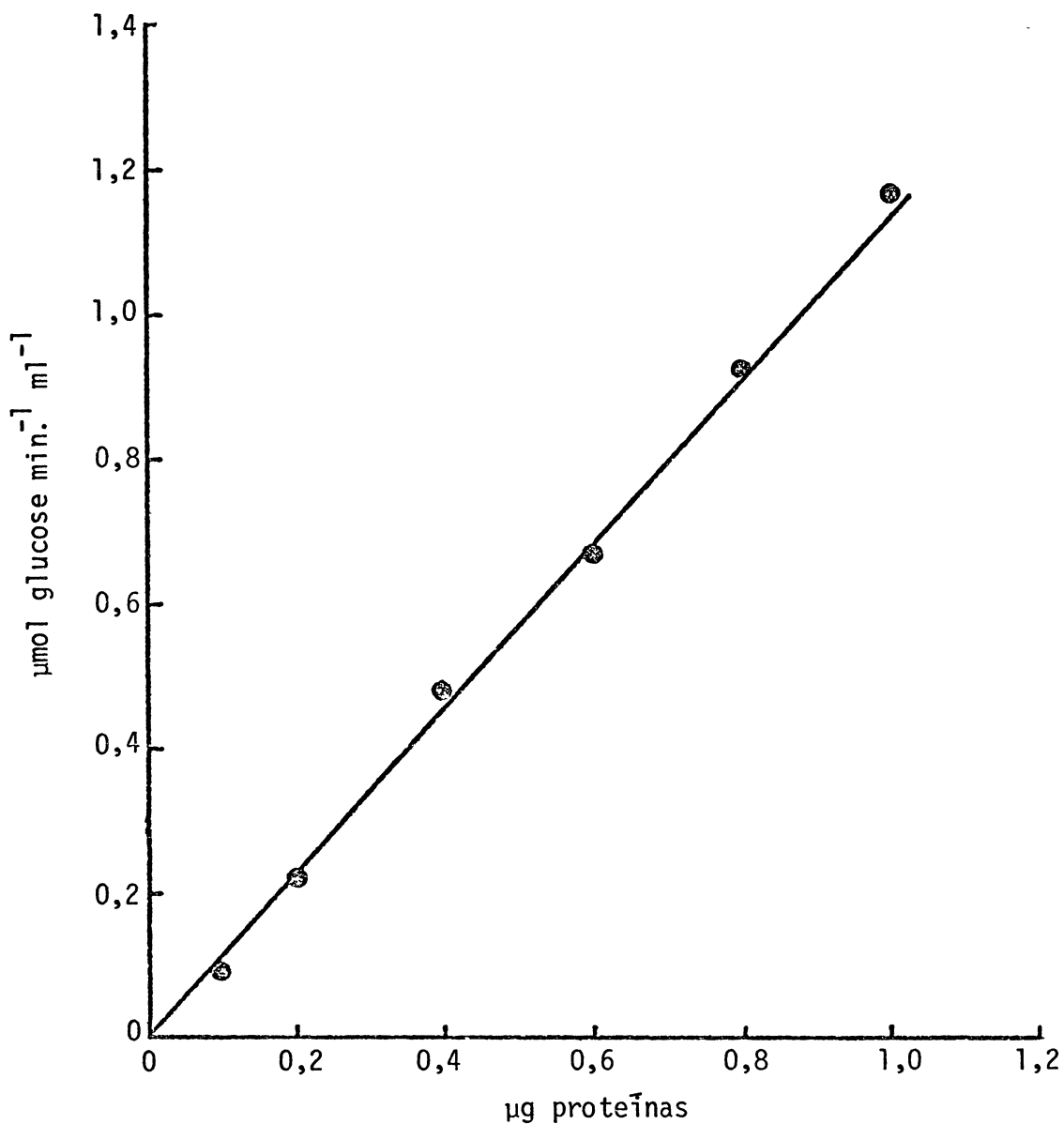


Fig. 10 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOBRE A ATIVIDADE DA REALASE.

A atividade da trealase foi determinada incubando 50 mM de trealose; 10 mM de tampão fosfato pH 6,0 e quantidade variável de proteína (0,1 a 1,2 unidades de enzima), em um volume final de 200 µl. Incubação em 40 °C por 10 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45).

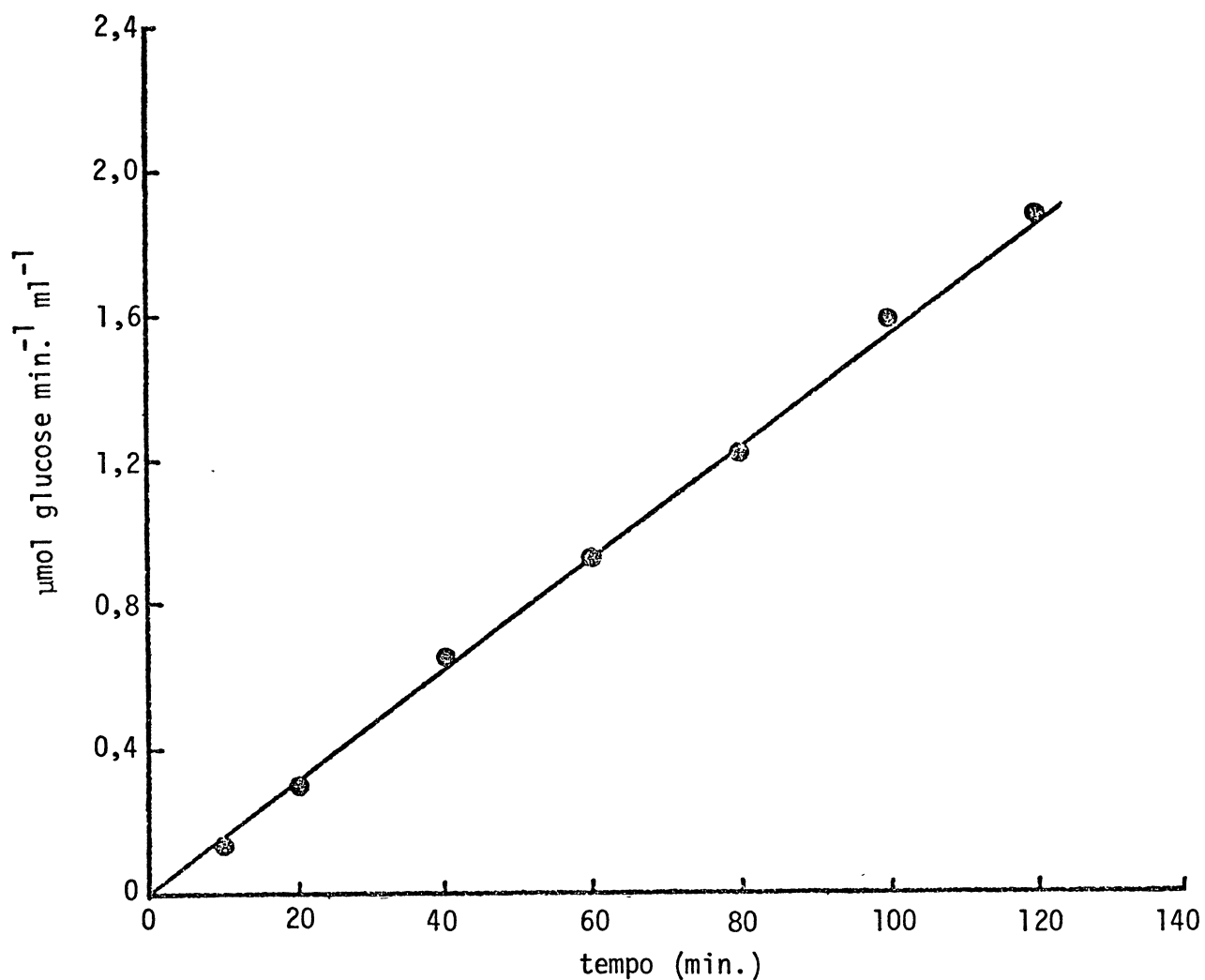


Fig. 11 - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DA TREALASE.

A atividade da enzima foi determinada incubando 50 mM de tampão fosfato pH 6,0; 25 mM de trealose e 0,45 unidades de enzima, em um volume final de 200 μ l. Incubação em 40 °C de zero a 120 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45).

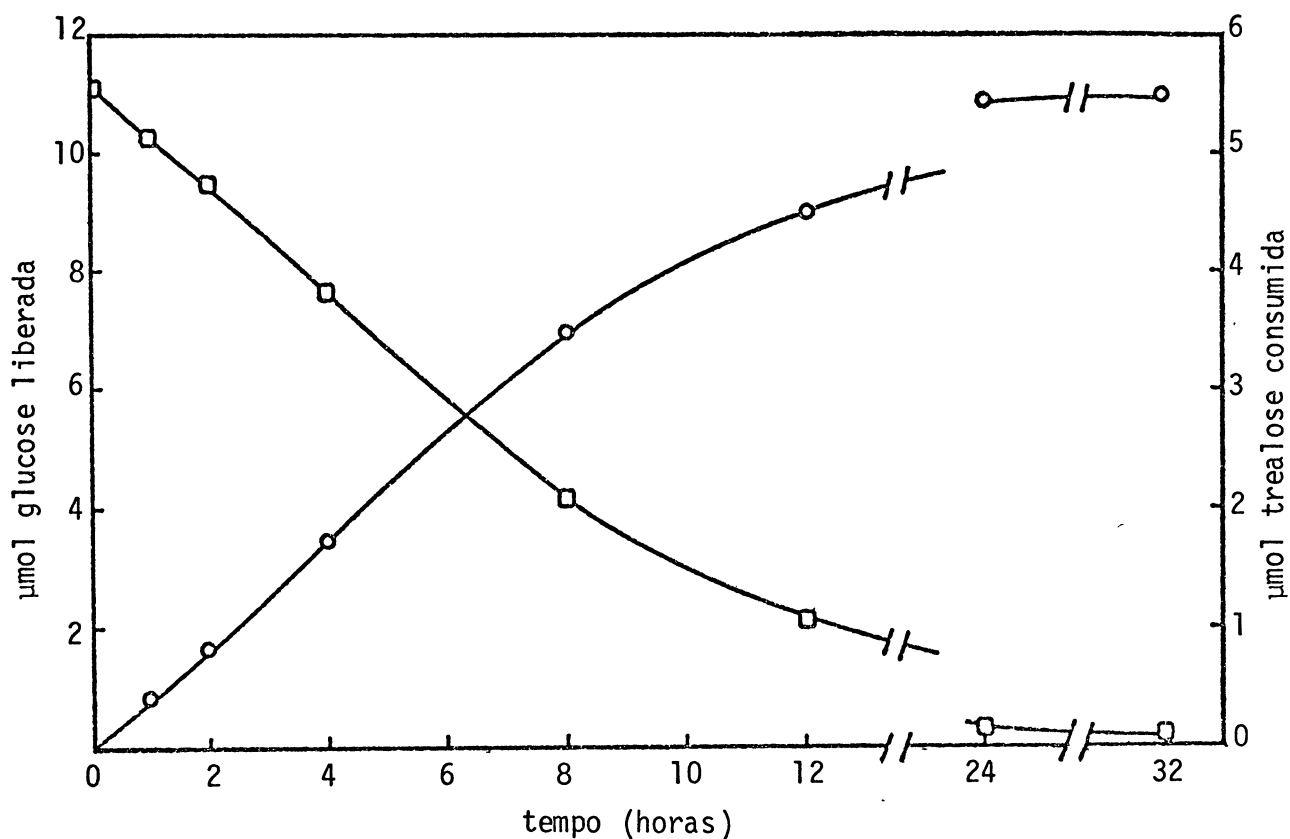


Fig. 12 - ESTEQUIOMETRIA DA REAÇÃO CATALIZADA PELA TREALASE

A glucose liberada e a trealose consumida, foram determinados pelos métodos da glucose oxidase (16) e fenol sulfúrico, respectivamente, como descrito em Materiais e Métodos. Símbolos: ○—○ = glucose liberada; □—□ = trealose consumida.

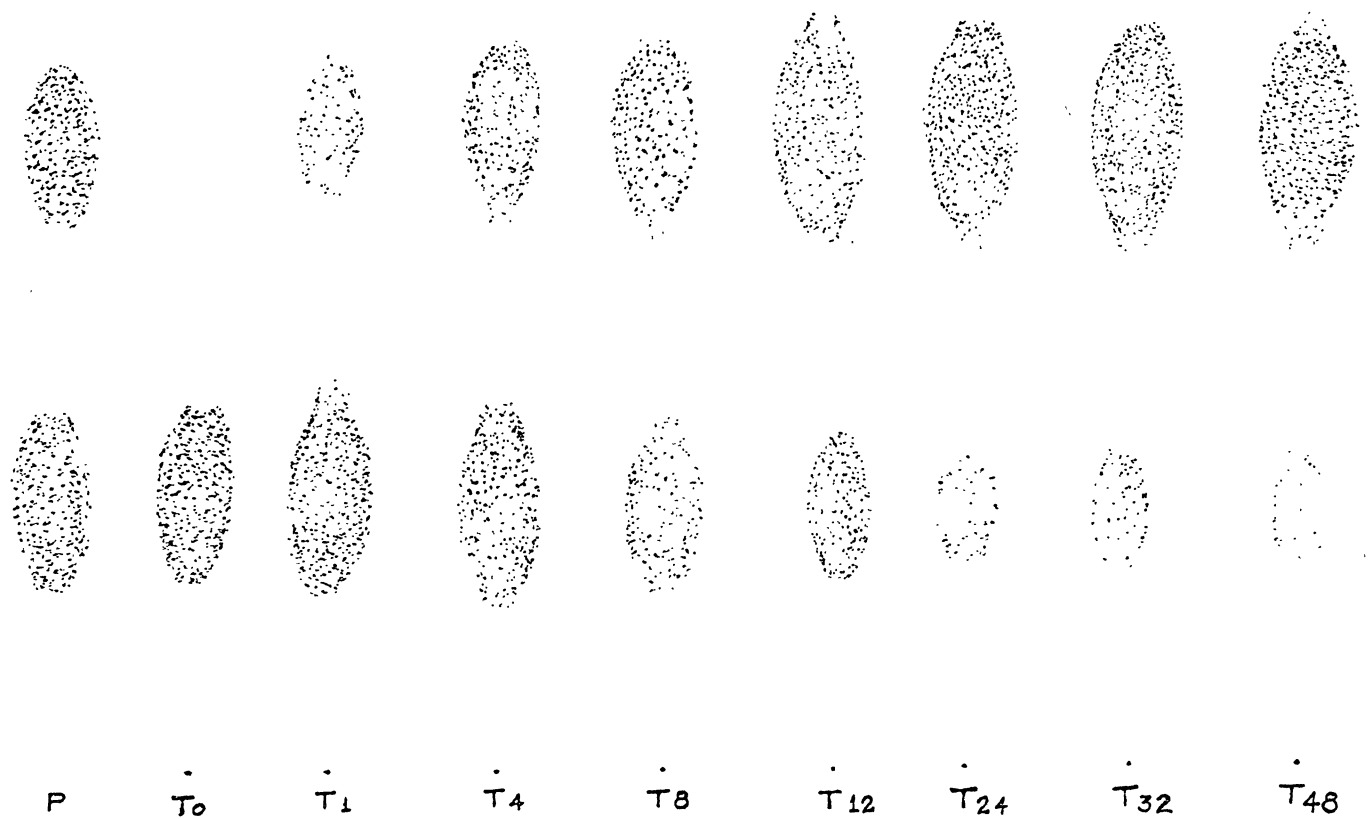


Fig. 13 - CROMATOGRAMA DO PRODUTO DE HIDRÓLISE DA REAÇÃO CATALISADA PELA TREALASE EXTRACELULAR DE *S. brevicaulis* (Materiais e Métodos).

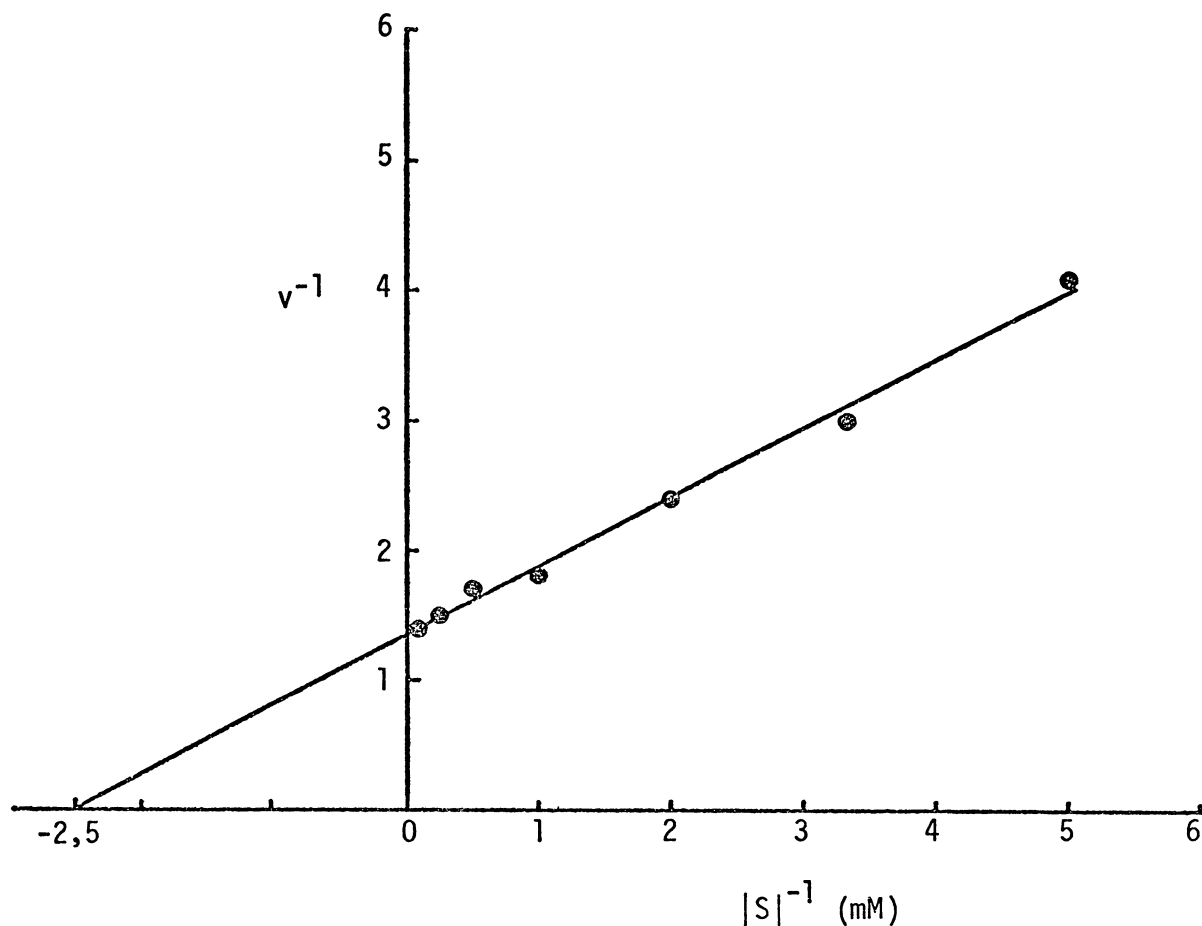


Fig. 14 - DETERMINAÇÃO GRÁFICA DO K_m E V_{max} DA REAÇÃO CATALIZADA PELA TREALASE.

O sistema de reação continha: 50 mM de tampão fosfato pH 6,0; 0,45 unidades de enzima e diferentes concentrações de substrato, em um volume final de 200 μ l. Incubação em 40 $^{\circ}$ C por 30 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado pelo método de SOMOGYI (55) e NELSON (45). (Materiais e Métodos).

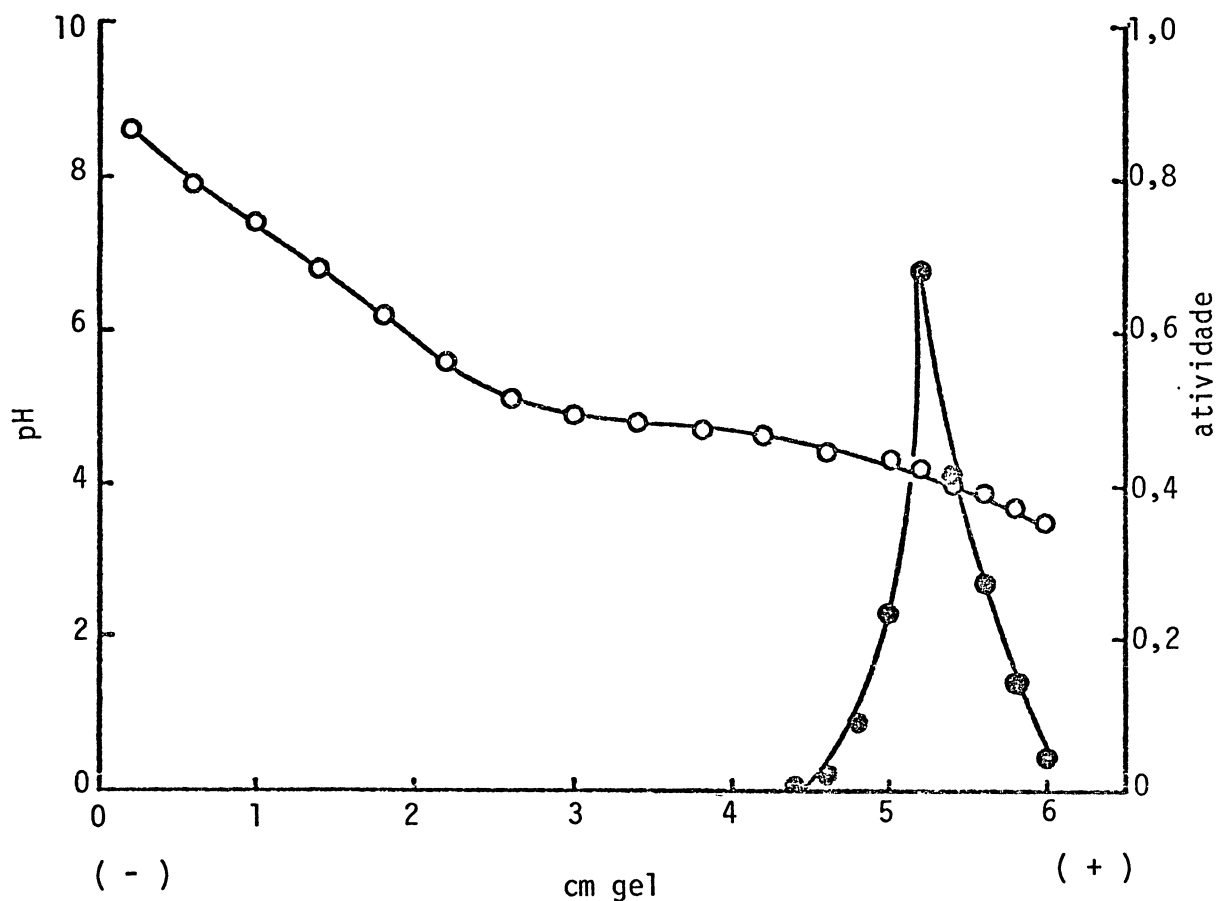


Fig. 15 - DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO.

O ponto isoelétrico foi determinado utilizando eletro-enfoque em gel de poliacrilamida. A atividade da enzima foi medida como descrito em Materiais e Métodos. Símbolos: ○—○ = gradiente de pH (3,0 a 10); ●—● = atividade da trealase.

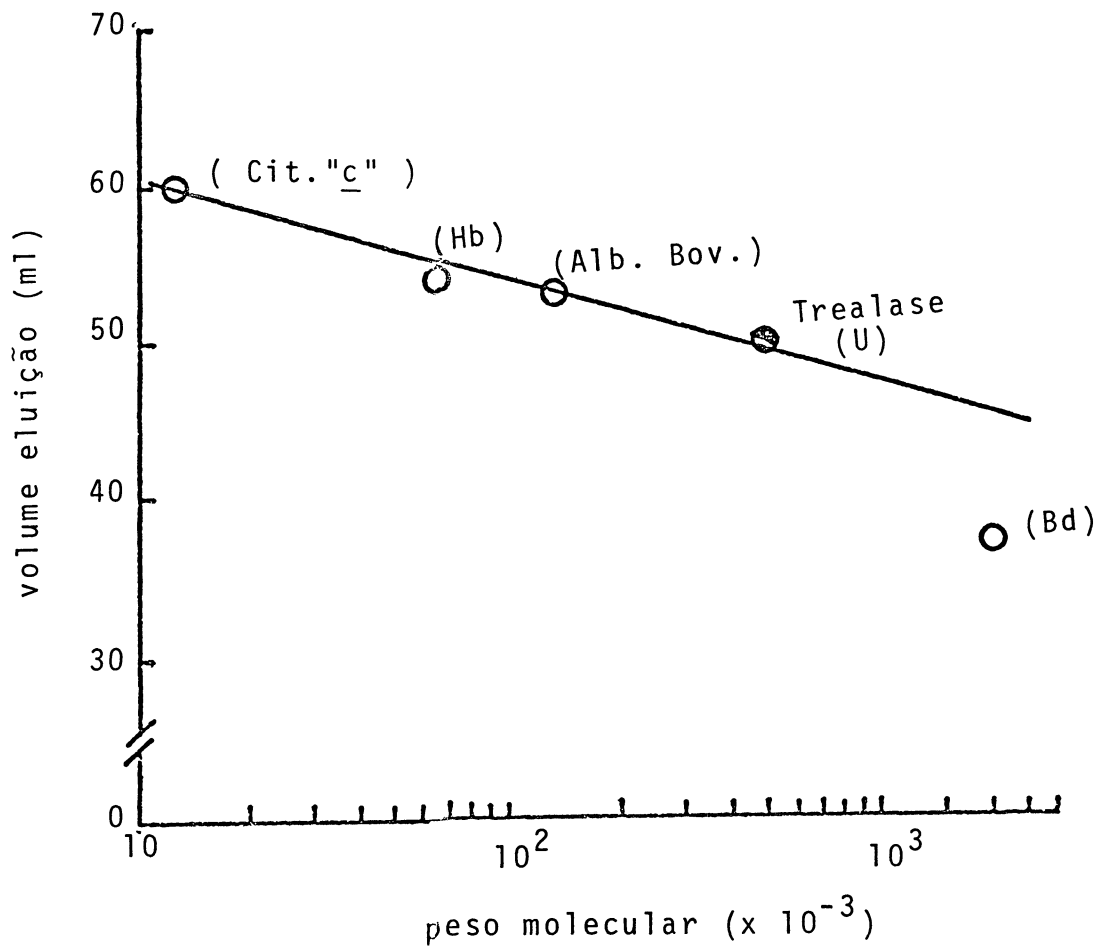


Fig. 16 - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA TREALASE DE *S. brevicaulis*.

O peso molecular foi determinado em coluna de Sepharose 6 B (1 x 70 cm) eluída com tampão fosfato 5 mM pH 6,0 contendo NaCl 0,5 M. 5 mg dos padrões foram aplicados na coluna e coletadas frações de 2,0 ml (Materiais e Métodos).

<u>Padrões</u>	<u>Peso Molecular</u>
"Blue dextran"(BD)	- 2 000 000
Urease (U)	- 590 000
Albumina bovina (Alb. Bov.)	- 134 000
Hemoglobina (Hb.)	- 64 000
Citocromo "c" (Cit. "c")	- 12 500

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSCHE, J.A. van & CARLIER, A.R. Some properties of trehalase from *Phycomyces blakesleeanus*. Biochim. Biophys. Acta., 391 : 154 - 161, 1975.
2. ASSCHE, J.A. van; CARLIER, A.R.; DEKEERSMAEKER, H.I. Trehalase activity in dormant and activated spores of *Phycomyces blakesleeanus*. Planta, 103 : 327 - 333, 1972.
3. AVIGAD, G.; ZIV, O.; NEUFELD, E. Intracellular trehalase of a hybrid yeast. Biochem. J., 97 : 715 - 722, 1965.
4. BALLARIO, P.; BERGAMI, M.; CACACE, M.G.; SCALA, F.; SILVESTRI, L. α, α -trehalase from the brine shrimp *Artemia salina*: purification and properties. Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem., 61 : 265 - 270, 1978.
5. BHUMIRATANA, A.; ANDERSON, R.L.; COSTILOW, R.N. Trehalose metabolism by *Bacillus popilliae*. J. Bacteriol., 119 : 484 - 493, 1974.
6. BIRCH, G.G. Trehaloses. Adv. Carbohydr. Chem., 18 : 201 - 225, 1963.
7. BLUMENTHAL, H.J. Reserve carbohydrates in fungi. In: SMITH, J.E.; BERRY, D.R. ed. The Filamentous Fungi. London, Edward Arnold, 1976 v. 2, cap. 9, p. 290 - 307.
8. BOURQUELOT, E. Sur un ferment soluble nouveau d'édoublant le

- tréhalose en glucose. Copt.Rend., 116 : 826 - 828, 1893.
9. BOURQUELOT, E. & HERISSEY, H. Sur la tréhalase; sa présence générale dans les champignons. Compt. Rend., 139 : 874 - 876, 1904.
10. CATLEY, B.J. & KELLY, P.J. Metabolism of trehalose and Pullulans during the growth cycle of *Aureobasidium pullulans* Biochem. Soc. Trans., 3 : 1079 - 1081, 1975.
11. CECCARINI, C. Trehalase from *Dictyostelium discoideum*: purification and properties. Science, 151 : 454 - 456, 1967.
12. CECCARINI, C. The biochemical relationship between trehalase and trehalose during growth and differentiation in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. Biochim. Biophys. Acta., 148 : 114 - 124, 1967.
13. CHANDELIER, E.L.; MARÉCHAL, L.R.; VEIGA, L.A. Soluble trehalase from *Panstrongylus megistus* Burm. (Reduviidae, Triatominae). Rev. Brasil. Biol., 39 : 267 - 274, 1979.
14. CHANG, P.L.Y. & TREVITHICK, J.R. Release of wall-bound invertase and trehalase in *Neurospora crassa* by hydrolytic enzymes. J. Gen. Microbiol., 70 : 13 - 22, 1971.
15. CURY, J.A. & AMARAL, D. Carbon source dependent differences in the composition of the cell walls of the basidiomycete *P. cinnabarinus*. Can. J. Microbiol., 23 : 1313 - 1317, 1977.
16. DAHLQVIST, A. A determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. Biochem. J., 80 : 547 - 551, 1961.

17. DAVIES, R. Enzyme formation in *Saccharomyces fragilis*.
Biochem. J., 55 : 484 - 497, 1953.
18. DIXON, N.E.; HINDS, J.A.; FIELLY, A.K.; GAZZOLA, C.;
WINZOR, D.J.; BLAKELEY, R.L. ZERNER, B. Jack bean urease
(EC 3.4.1.5.) IV. The molecular size and the mechanism
of inhibition by hydroxamic acids. Spectrophotometric
titration by enzymes with reversible inhibitors. Can. J.
Biochem., 58 : 1323 - 1334, 1980.
19. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.;
SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars
and related substances. Anal. Chem., 28 : 350 - 356, 1956.
20. ELBEIN, A.D. The metabolism of α,α -trehalose. Adv. Carbohyd.
Chem. Biochem., 30 : 227 - 256, 1974.
21. EPPS, H.M.R.; GALE, E.F. The influence of the presence of
glucose during growth on the enzymic activities of
Escherichia coli: comparison of the effect with that
produced by fermentation acids. Biochem. J., 36 : 619 -
623, 1942.
22. FRIEDMAN, S. & ALEXANDER, S. Multiple forms of trehalase in
Phormia regina. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42 : 818 -
823, 1971.
23. GHIRETTI-MAGALDI, A. & GHIRETTI, F. The respiratory protein
of marine animals. Curitiba, Centro de Biologia Marinha,
U.F.Pr., 1979, p. 18 - 19, Apostila.
24. GODDARD, D.R. The reversible heat activation inducing
germination and increased respiration in the ascospores
of *Neurospora tetrasperma*. J. Gen. Physiol., 19 : 45 -

- 60, 1935.
25. GUILLOUX, E.; ARCILA, A.; COURTOIS, J.E.; MOUMRIKOFF, V. La tréhalase de *Pseudomonas fluorescens*. Biochimie, 53 : 853 - 857, 1971.
 26. GUILLOUX, E.B.; ROBIC, D.; COURTOIS, J.E. A purified trehalase from may-bug (*Melolontha vulgaris*). Biochimie, 62 : 719 - 722, 1980.
 27. HANKS, D.L. & SUSSMAN, A.S. The relation between growth, conidiation and trehalase activity in *Neurospora crassa*. Amer. J. Bot., 56 : 1152 - 1159, 1969.
 28. HANKS, D.L. & SUSSMAN, A.S. Control of trehalase synthesis in *Neurospora crassa*. Amer. J. Bot., 56 : 1160 - 1166, 1969.
 29. HEY, A.E. & ELBEIN, A.D. Partial purification and properties of a trehalase from *Streptomyces hygroscopicus*. J. Bacteriol., 96 : 105 - 110, 1968.
 30. HEY-FERGUSON, A.; MITCHEL, M.; ELBEIN, A.D. Trehalose metabolism in germinating spores of *Streptomyces hygroscopicus*. J. Bacteriol., 116 : 1084 - 1085, 1973.
 31. HECKER, L.R. & SUSSMAN, A.S. Activity and heat stability of trehalase from micelium and ascospores of *Neurospora*. J. Bacteriol., 115 : 582 - 591, 1973.
 32. HILL, E.P. & SUSSMAN, A.S. Purification and properties of trehalase(s) from *Neurospora*. Arch. Biochem. Biophys., 102 : 389 - 396, 1963.
 33. HILL, E.P. & SUSSMAN, A.S. Development of trehalase and invertase activity in *Neurospora*. J. Bacteriol., 88 :

1556 - 1566, 1964.

34. HIRONO, E.; ZANCAN, G.T.; AMARAL, D. Glucose metabolism in *P. cinnabarinus*. Can. J. Microbiol., 24 : 620 - 622, 1978.
35. HORIKOSHI, K. & IKEDA, Y. Trehalase in conidia of *Aspergillus oryzae*. J. Bacteriol., 91 : 1883 - 1887, 1966.
36. INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY. Nomenclature Committee. Enzyme nomenclature, 1978. New York, Academic, 1979 p. 281.
37. KELLY, P.J. & CATLEY, B.J. A purification of trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. Anal. Biochem., 72 : 353 - 358, 1976.
38. LABAT, J.; BAUMAN, F.; COURTOIS, J.E. Human and porcine kidney trehalase: purification and some properties. Biochimie, 56 : 805 - 814, 1974.
39. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265 - 275, 1961.
40. MARKUS, Z.; MILLER, G.; AVIGAD, G. Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. Appl. Microbiol., 13 : 686 - 693, 1965.
41. MARZLUF, G.A. Studies of trehalase and sucrase of *Drosophila melanogaster*. Arch. Biochem. Biophys., 134 : 8 - 18, 1969.
42. MERDINGER, E.; LANGE, C.F.; BOOKER, B.F. Isolation and identification of trehalase from *Pullularia pullulans*. J. Bacteriol., 106 : 1034 - 1035, 1971.

43. METZENBERG, R.L. A gene effecting the repression of invertase and trehalase in *Neurospora*. Arch. Biochem. Biophys., 96 : 468 - 474, 1962.
44. NAKANO, M.; SUMI, Y.; MIYAKAWA, M. Purification and properties of trehalase from rat intestinal mucosal cells. J. Biochem., 81 : 1041 - 1049, 1977.
45. NELSON, N.A. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biochem., 153 : 376 - 380, 1944.
46. PANEK, A. Synthesis of trehalose by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Arch. Biochem. Biophys., 98 : 349 - 455, 1962.
47. PANEK, A. & SOUZA, N.O. Purification and properties of baker's yeast trehalase. J. Biol. Chem., 239 : 1671 - 1673, 1964.
48. PATTERSON, B.W.; FERGUSON, A.H.; MATULA, M.; ELBEIN, A.D. Trehalase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Mycobacterium smegmatis*. In: GINSBURG, V. ed. Complex carbohydrates; Part B. New York, Academic, 1972, p. 996 - 1000. (Methods in Enzymology, 28).
49. PETIZ, A.L. Regulação do ciclo dos ácidos tricarbóxicos em *Scopulariopsis brevicaulis*. Interrelações com o metabolismo do glutamato. Curitiba 1980. 82 p. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
50. PRASSAD, A.R.S. & MAHESHWARI, R. Purification and properties of trehalase from the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. Biochim. Biophys. Acta., 525 : 162 - 170, 1978.

51. ROTH, R. & SUSSMAN, M. Trehalose synthesis in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. Biochim. Biophys. Acta., 122 : 225 - 231, 1966.
52. RUDIC, M.J.; FITZGERALD, A.E.; RUDIC, V.L. Intra and extracellular forms of α -glucosidases from *Aspergillus niger*. Arch. Biochem. Biophys., 193 : 509 - 520, 1979.
53. SAITO, S. Trehalase of the silkworm, *Bombix mori*. J. Biochem. 48. : 101 - 109, 1960.
54. SASAJIMA, K.; KAWACHI, T.; SATO, S.; SUGIMURA, T. Purification and properties of the α , α -trehalase from mucosa of rat small intestine. Biochim. Biophys. Acta., 403 : 139 - 146, 1975.
55. SOMOGYI, M.A. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160 : 61 - 68, 1945.
56. SOUZA, N.O. & PANEK, A.D. Location of trehalase and trealose in yeast cells. Arch. Biochem. Biophys., 125 : 22 - 28, 1968.
57. SUMNER, J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. J. Biol. Chem., 69 : 435 - 441, 1926.
58. SUSSMAN, A.S. & LINGAPPA, B.T. Role of trehalose in ascospores of *Neurospora tetrasperma*. Science, 130 : 1343, 1959.
59. TAKEWAKI, S.; CHIBA, S.; KIMURA, A.; MATSUI, H.; KOIKE, Y. Purification and properties of α -glucosidase of the Honey Bee *Apis mellifera* L. Agric. Biol. Chem., 44 : 731 - 740, 1980.
60. TENAN, M.N.; OLIVEIRA, C.P.H.; PANEK, A.D. Mouse kidney

- trehalase: purification and properties. An. Acad. Brasil. Cienc., 51 : 151 - 158, 1979.
61. TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; BIANCHI, A.G. Physical properties and this inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach to the nature of its active site. Biochim. Biophys. Acta., 524 : 131 - 141, 1978.
62. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugar on paper chromatograms. Nature, 166 : 444, 1950.
63. VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins. In: JAKOBY, W.B.ed. Enzyme purification and related techniques; New York, Academic, 1971, p. 389 - 412. (Methods in Enzymology, 22).
64. VIJAYAKUMAR, P.; ROSS, W.; REESE, E.T. α, α -trehalase of *Trichoderma reesei*. Can. J. Microbiol.; 24 : 1280 - 1283, 1978.
65. WANG, SY-YING C. & TOURNEAU, D. Trehalase from *Sclerotinia sclerotiorum*. Arch. Microbiol., 87 : 235 - 241, 1972.
66. WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem. Z., 310 : 384 - 421, 1941.
67. WIJK, R. van; OUWEHAND, J.; BOSS, T. van den; KONINGSBERGER, V.V. Induction and catabolite repression of α -glucosidase synthesis in protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochim. Biophys. Acta., 186 : 178 - 191, 1969.
68. WRIGLEY, C.W. Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel electrofocusing. J. Chromatog., 36 : 362 - 365, 1968.

69. YU, S.; SUSSMAN, A.S.; WOOLEY, S. Mechanism of protection of trehalase against heat inactivation in *Neurospora*. J. Bacteriol., 94 : 1306 - 1312, 1967.