

JULIET KIYOKO SUGAI

Xilitol Desidrogenase de **Pullularia**
Pullulans (de Bari, 1866) Berkout,
1923 : Cinética de Indução e
“Efeito da Glucose” .

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

CURITIBA
1987

ERRATA

Página:	Linha:	Onde se lê:	Leia-se:
3	22º	85	86
4	5º	77	76
6	12º	... enzimas.	NO ENTANTO, DESDE 1898, tem sido...
7	15º	68	6
7	16º	24,73,136	136,24,73
8	15º	76	75
18	21º	150 mm	15,0 mm
27	13º	15%	1,5%
34	26º	xilose(T=2h)	xilose(T=3h)
45	1º	69	70
74	6º	0,7 mU/ml x h	24 mU/ml x h
77	19º	39,6	40,2
78	8º	69	70
80	13º	ses	ces
100	5º	glactosidase	galactosidase
102	2º	dehidrogenase	dehydrogenase

Orientador

Dr. Luiz Alberto Silva Veiga

TÉRMO DE APROVAÇÃO

XILITOL DESIDROGENASE DE *PULLULARIA PULLULANS* (DE BARY, 1866)

BERKOUT, 1923: CINÉTICA DE INDUÇÃO E "EFEITO DA GLUCOSE"

por

JULIET KIYOKO SUGAI

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Dr. Luiz Alberto Silva Veiga - Orientador

Curitiba, de de 1988.

Aos meus pais,
com afeto.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luiz Alberto Veiga pela orientação e apoio recebidos.

Ao Dr. Shigehiro Funayama pelas informações e auxílio recebidos durante a parte experimental de imunologia deste trabalho.

À Dra. Kazuko H. do Nascimento pelo apoio, sugestões e dedicação na análise crítica desta tese.

À Dra. Muriel M. Vieira pela leitura crítica desta tese.

Às Dras. Liu Un Rigo e Momoyo Nakano pelas sugestões apresentadas após a leitura dos originais desta tese.

Ao Dr. Aguinaldo José do Nascimento pelo auxílio prestado na obtenção das fotografias.

À bioquímica Emiko Hirono pela permissão do uso do espectrofotômetro Varian-Techtron.

Ao laboratório do Ministério da Agricultura-Curitiba/PR, pela utilização do espectrofotômetro Varian-Techtron.

À arquiteta Neuza K. Ogama pela confecção dos desenhos.

À CAPES/PICD/UFSC pelo apoio financeiro no período de março/
1979 à agosto/1982.

Aos colegas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina pelo apoio e incentivo recebidos.

À todos que direta e indiretamente contribuíram para tornar
possível a realização deste trabalho, em especial a minha fa
mília pelo permanente incentivo e apoio.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
2.1 - Reagentes.....	14
2.2 - Organismos.....	14
2.3 - Meios de Cultura.....	15
2.3.1 - Meio Sólido.....	15
2.3.2 - Meio Líquido.....	15
2.4 - Métodos.....	16
2.4.1 - Conservação das Cepas.....	16
2.4.3 - Curva de Crescimento do Microrganismo.....	16
2.4.4 - Preparo da Suspensão Celular em Estado Não-Proli- ferante.....	17
2.4.5 - Obtenção do Extrato Livre de Células.....	18
2.4.6 - Determinação da Atividade Enzimática.....	19
2.4.7 - Determinação de Proteínas.....	19
2.4.8 - Determinação da Concentração de Coenzimas.....	20
2.4.9 - Determinação da Concentração de Açúcares.....	20
2.4.10 - Purificação da Enzima.....	20
2.4.10.1 - Preparo do Extrato Livre de Células.....	20
2.4.10.2 - Precipitação com Sulfato de Protamina.....	21
2.4.10.3 - Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	21
2.4.10.4 - Filtração em Gel Sephadex G-150.....	22
2.4.10.5 - Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-celulose	22
2.4.10.6 - Cromatografia de Afinidade em "blue sepharose" CL-6B.....	23
2.4.11 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	24

2.4.12 - Preparo de Anticorpos Contra Xilitol Desidrogenase.....	25
2.4.13 - Preparo de Agar-Gel para Placas de Imunodifusão	27
2.4.14 - Imunodifusão de Ouchterlony.....	28
2.4.15 - Determinação do Ponto de Equivalência Antígeno-Anticorpo.....	28
3 - RESULTADOS.....	30
3.1 - Purificação da Xilitol Desidrogenase.....	30
3.2 - Critérios de Pureza.....	31
3.2.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	31
3.2.2 - Imunodifusão.....	31
3.3 - Determinação do Ponto de Equivalência Antígeno-Anticorpo.....	32
3.4 - Mecanismo de Reação da Xilitol Desidrogenase.....	32
3.4.1 - Estudo da Velocidade Inicial.....	32
3.4.2 - Estudo da Inibição pelos Produtos da Reação.....	33
3.5 - Curvas de Crescimento e Utilização de Diversos Açúcares como fonte de carbono e energia por <i>Pullularia pullulans</i>	34
3.6 - Níveis da Xilitol Desidrogenase em Células de <i>Pullularia pullulans</i> crescidas em diferentes fontes de carbono.....	35
3.7 - Relação entre o crescimento e a síntese de xilitol desidrogenase de <i>Pullularia pullulans</i> como uma função do tempo.....	35
3.8 - Determinação da Velocidade Diferencial de Síntese da Xilitol Desidrogenase de <i>Pullularia pullulans</i> em crescimento.....	36
3.9 - Cinética de Indução da Síntese da Xilitol Desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em Estado Não-Proliferante.....	37
3.10 - Efeito da Concentração do Indutor Sobre a Cinética de Indução da Síntese da Xilitol Desidrogenase em Células de <i>Pullularia pullulans</i> em Estado Não-Proliferante.....	37
3.11 - Efeito da Cicloeximida Sobre a Indução da Síntese da Xilitol Desidrogenase em Células de <i>Pullularia pullulans</i> em Estado Não-Proliferante.....	38

3.12 - Efeito do "Pré-Inóculo", Crescido em Diferentes Fontes de Carbono, Sobre a Indução da Xilitol Desidrogenase em Células de <i>Pullularia pullulans</i> em Crescimento.....	38
3.13 - Efeito da Adição Simultânea do Indutor e de Glucose ou Glicerol Sobre a Cinética de Indução da Xilitol Desidrogenase de Células de <i>Pullularia pullulans</i> em Estado Não-Proliferante.....	39
3.14 - Efeito da Glucose Sobre a Xilitol Desidrogenase Induzida em Células de <i>Pullularia pullulans</i> em Crescimento em Presença de D-Xilose.....	40
3.15 - Efeito da Glucose Sobre a Xilitol Desidrogenase Induzida em Células de <i>Pullularia pullulans</i> em Estado Não-Proliferante.....	40
3.16 - Efeito da adição Simultânea de Glucose e Cicloeximida sobre a Xilitol Desidrogenase em Células de <i>Pullularia pullulans</i> em Estado Não-Proliferante...	41
3.17 - Efeito da Remoção de Glucose Sobre a Xilitol Desidrogenase Induzida por D-Xilose em Células de <i>Pullularia pullulans</i> em Estado Não-Proliferante.....	41
3.18 - Efeito da Adição de Glucose e Cicloeximida Sobre a Xilitol Desidrogenase Previamente Induzida ao Máximo em Células de <i>Pullularia pullulans</i> em Estado Não-Proliferante.....	42
3.19 - Efeito da Dibutiril AMPc Sobre o "Efeito de Glucose" Estimulada Durante a Indução da Xilitol Desidrogenase em Células de <i>Pullularia pullulans</i> em Estado Não-Proliferante.....	43
3.20 - Imunodifusão Dupla da Xilitol Desidrogenase de <i>Pullularia pullulans</i> Inibida pela Glucose.....	43
3.21 - Efeito da Concentração de Xilitol Sobre a Atividade da Xilitol Desidrogenase de <i>Pullularia pullulans</i> Incubadas com D-Xilose e com D-Glucose.....	44
3.22 - Efeito da Concentração de NAD ⁺ Sobre a Atividade da Xilitol Desidrogenase Obtida de Células de <i>Pullularia pullulans</i> incubadas com D-Xilose e com D-glucose.....	44
4 - DISCUSSÃO.....	77

5 - CONCLUSÕES.....	92
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela I	Purificação da xilitol desidrogenase de <i>Pullularia Pullulans</i>	46
Tabela II	Efeito de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento de células de <i>Pullularia pullulans</i> e a atividade da xilitol desidrogenase.....	47
Figura 1	Cromatografia em gel Sephadex G-150.....	48
Figura 2	Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulase	49
Figura 3	Cromatografia de afinidade em "blue sepharose" CL-6B.....	50
Figura 4	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	51
Figura 5	Imunodifusão de Ouchterlony.....	52
Figura 6	Determinação do ponto de equivalência entre a xilitol desidrogenase e seu respectivo anti-corpo.....	53
Figura 7	Gráfico da influência de várias concentrações fixas de xilitol sobre a velocidade inicial da atividade da xilitol desidrogenase, em concentrações variáveis de NAD^+	54
Figura 8	Gráfico da influência de diferentes concentrações fixas de NAD^+ sobre a velocidade inicial da atividade da xilitol desidrogenase, em concentrações variáveis de xilitol.....	55
Figura 9	Gráfico da inibição da atividade de xilitol desidrogenase pelo produto da reação NADH a várias concentrações fixas, em relação ao NAD^+ como substrato variável.....	56

Figura 10	Gráfico da inibição da atividade de xilitol desidrogenase pelo produto da reação NADH a várias concentrações fixas, em relação ao xilitol como substrato variável.....	57
Figura 11	Gráfico da inibição da atividade da xilitol desidrogenase pelo produto da reação D-xilulose a várias concentrações fixas, em relação ao NAD ⁺ como substrato variável.....	58
Figura 12	Gráfico da inibição da atividade da xilitol desidrogenase pelo produto da reação D-xilulose a várias concentrações fixas, em relação ao xilitol como substrato variáveis.....	59
Figura 13	Curvas de crescimento de <i>Pullularia pullulans</i> em diferentes fontes de carbono.....	60
Figura 14	Relação entre o crescimento e a síntese da xilitol desidrogenase em função do tempo de crescimento de células de <i>P. pullulans</i>	61
Figura 15	Determinação da velocidade diferencial de síntese da xilitol desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em crescimento.....	62
Figura 16	Cinética de indução da síntese da xilitol desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em condições não-proliferantes.....	63
Figura 17	Efeito da concentração do indutor sobre a cinética de indução da síntese da xilitol desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em condições não-proliferantes.....	64
Figura 18	Efeito da cicloeximida sobre a indução da síntese da xilitol desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em estado não-proliferante.....	65
Figura 19	Efeito do inóculo, crescido em diferentes fontes de carbono, sobre a indução da xilitol desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em crescimento.....	66

Figura 20	Efeito da presença simultânea do indutor e de glucose ou glicerol sobre a cinética de indução da xilitol desidrogenase de células de <i>Pullularia pullulans</i> em estado não-proliferante.....	67
Figura 21	Efeito da glucose sobre a indução da xilitol desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em crescimento em presença de D-xilose.....	68
Figura 22	Efeito da glucose sobre a indução da xilitol desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em estado não-proliferante.....	69
Figura 23	Efeito da adição simultânea de glucose e cicloeximida sobre a indução da xilitol desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em estado não-proliferante.....	70
Figura 24	Efeito da remoção de glucose sobre a xilitol desidrogenase induzida por D-xilose em células de <i>Pullularia pullulans</i> em estado não-proliferante.....	71
Figura 25	Efeito da adição de glucose e cicloeximida sobre a xilitol desidrogenase totalmente induzida pela xilose em células de <i>Pullularia pullulans</i> em estado não-proliferante.....	72
Figura 26	Efeito de dibutiril AMPc sobre o "efeito de glucose" estimulada durante a indução da xilitol desidrogenase em células de <i>Pullularia pullulans</i> em estado não-proliferante.....	73
Figura 27	Imunodifusão dupla da xilitol desidrogenase inibida pela glucose.....	74
Figura 28	Efeito da concentração de xilitol sobre a atividade da xilitol desidrogenase de células de <i>Pullularia pullulans</i> incubadas com D-xilose e com D-glucose.....	75
Figura 29	Efeito da concentração de NAD ⁺ sobre a atividade da xilitol desidrogenase de células de <i>Pullularia pullulans</i> incubadas com D-xilose e com D-glucose.....	76

ABREVIATURAS

- AMPC - adenosina-3',5'-monosfosfato cíclico
- A₂₈₀ - absorbância a 280 nm.
- CAP - "catabolite activator protein"
- CRP - "catabolite receptor protein"
- DEAE - dietilaminoetano
- DNA - ácido desoxiribonuclêico
- D.P.E. - departamento de patologia experimental
- ln - logarítmo natural
- mRNA - ácido ribonuclêico mensageiro
- NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
- NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
- TEMED - N,N,N',N'-tetrametilenodiamina.
- TRIS - Tris (hidroximetil) aminometano
- XiDH - xilitol desidrogenase

RESUMO

Pullularia pullulans (De Bary, 1866) Berkout, 1923, um fungo imperfeito leveduriforme, metaboliza xilitol através de uma XiDH intracelular. A síntese da XiDH é induzida especificamente pela D-xilose em células em crescimento e em estado não proliferante. Experimentos realizados em presença de cicloeximida indicam que a indução da síntese da XiDH é dependente da síntese protéica. Estudos da indução da enzima, em culturas em crescimento, mostram que o nível máximo de indução (cerca de 200 vezes o nível basal), é atingido em 25-57 horas de crescimento.

A adição de D-glucose a uma cultura de células em crescimento, em que a XiDH está sendo ativamente sintetizada, provoca uma brusca queda da atividade específica. Em células em estado não proliferante a adição de D-glucose resulta numa inibição da XiDH pré-existente pela indução, bem como uma fraca repressão catabólica da síntese da XiDH. Esta inibição da enzima, causada pela glucose, não é dependente de uma síntese protéica "de novo", mas a repressão catabólica o é. A remoção de glucose do sistema de indução, acarreta numa rápida e completa recuperação da atividade da XiDH inibida e reprimida pela glucose. A presença de AMPc exógena reverte a "inibição-repressão catabólica" estimulada pela glucose.

1 - INTRODUÇÃO

A D-xilose é uma das mais abundantes formas de carboidrato encontradas em biomassas. As pentoses D-xilose e L-arabinose constituem cerca de 30% dos carboidratos neutros derivados da madeira, de resíduos agrícolas, tais como sabugos de milho, palhas de aveia e arroz, cascas de sementes de algodão, cascas de côcos, amêndoas e bagaço de cana-de-açúcar⁽⁸³⁾. Estes açúcares junto com D-glucose e outras hexoses são componentes da "hemicelulose" da parede celular dos vegetais. Muitas espécies de leveduras e fungos são capazes de sintetizar hemicelulases extracelulares que degradam esta hemicelulose⁽²⁷⁾. Portanto, estas espécies de microrganismos são capazes de utilizar prontamente a D-xilose e a L-arabinose, que são produtos da degradação da hemicelulose. A utilização destas duas pentoses através de enzimas como pentose redutases, resultam frequentemente em produção de xilitol e L-arabitol como principais produtos metabólicos⁽⁹⁸⁾. A subsequente utilização destes pentitóis, através de polióis desidrogenases, leva a formação de xilulose, a qual é fosforilada a xilulose-5-fosfato, conforme o Esquema 1^(17,15,18,104).

A xilulose-5-fosfato é o intermediário chave na interconversão de pentoses (via das pentoses fosfato) em um "pool" metabólico de açúcares fosforilados com 3, 4, 5, 6 e 7 carbonos em inter-relação com a via glicolítica de Embden-Meyerhoff Par

pentose através de um sistema de reações de redução e oxidação, tendo xilitol como intermediário. A D-xilulose formada é então, fosforilada pela D-xiluloquinase dando D-xilulose-5-fosfato que poderá seguir a via das pentoses fosfato ou ser fermentada a etanol.

Este sistema enzimático de óxido-redução foi descrito pela primeira vez em *Penicillium chrysogenum* por Chiang e Knight em 1959⁽¹⁵⁾, e logo a seguir em 1960, por Veiga e colaboradores⁽¹³⁵⁾. Também tem sido estudado em *Rhodotorula*⁽¹³⁹⁾, *Oospora lactis*⁽⁹¹⁾, *Pichia miso*⁽⁹⁷⁾, *Candida utilis*^(14,58,59,112), *Candida polymorpha*⁽⁹⁸⁾, *Candida albicans*^(132,133,134), *Pichia quercuum*^(124,125), *Pachysolen tannophilus*^(29,119) e em onze outras espécies de fungos miceliais⁽⁸³⁾. O fungo imperfeito *Pullularia pullulans*, conhecido como "levedura preta", é também capaz de utilizar D-xilose como fonte de carbono e energia. A presença de D-xilose em meio mineral induz a síntese de xilitol desidrogenase que catalisa a oxidação do xilitol, a D-xilulose, em presença de seu cofator NAD⁺⁽¹²³⁾.

A via de conversão de D-xilose a D-xilulose parece depender do microrganismo. Geralmente, os procarióticos (bactérias) empregam uma isomerase para converter D-xilose diretamente a sua cetopentose^(11,51,52,53,66,71,85,111,115,118,151), ao passo que os eucarióticos como leveduras e fungos, metabolizam a D-xilose através de um intermediário, o xilitol. Poucas exceções tem sido descritas^(54,76,129,149,152).

A oxidação de polióis para cetoses foi descrita pela primeira vez em *Acetobacter xylinum* por Betrand em 1898⁽⁸⁾, mas os primeiros estudos de uma poliol desidrogenase couberam a Blakley⁽¹⁰⁾, que em 1951 descreveu uma sorbitol desidrogenase-

NAD⁺ dependente, na fração solúvel de fígado de rato. Subsequentemente, várias desidrogenases tendo xilitol e/ou outros polióis como substrato foram descritas em diferentes tecidos animais (5,22,49,50,55,82,144), em hemolinfa de invertebrado⁽³⁴⁾ e em bactérias^(26,77,116). Em leveduras e fungos também tem sido descritas enzimas capazes de oxidar xilitol a D-xilulose. Arcus e Edson⁽⁴⁾ em 1956 relataram que extrato livre de células de *Candida utilis* poderia oxidar manitol, sorbitol, L-ramnitol e xilitol. Poucos anos mais tarde Chiang e Knight⁽¹⁵⁾ e Veiga e colaboradores⁽¹³⁵⁾ descreveram as etapas iniciais do metabolismo de D-xilose em *Penicillium chrysogenum* e em *Candida albicans* como sendo a redução de D-xilose a xilitol, por uma redutase NADPH, dependente, e a oxidação do xilitol a D-xilulose por uma desidrogenase NAD⁺ dependente. Várias xilitol desidrogenases tem sido estudadas, as de *C. utilis* (14,58,59,112), *C. albicans* (133,135), *Pachysolen tannophilus*⁽¹¹⁹⁾ e *Pullularia pullulans*⁽¹²³⁾, tem sido purificada e as suas propriedades caracterizadas.

A presença deste sistema enzimático em diversos microrganismos mostra a capacidade de adaptação destes ao meio em que se encontram, já que xilitol e outros polióis como manitol e sorbitol, são encontrados em quantidades significantes em frutas e vegetais⁽¹³⁸⁾ *.

A relativa facilidade com que as leveduras podem utilizar a D-xilulose através da via das pentoses fosfato ou pela fermentação para etanol, sugere que a conversão de D-xilose a D-xilulose, através do xilitol, está sob um proces-

* Teor de xilitol (mg/100 g de peso sêco)⁽¹³⁸⁾: ameixa (935), morango (362), framboesa (268), couve-flor (300), vagem (258), berinjela (180), alface (131) e cogumelo (128).

so de regulação⁽⁶³⁾.

Muitas enzimas como a xilitol desidrogenase são enzimas induzidas e são encontradas somente quando o microrganismo é crescido em presença de um indutor específico. Assim sendo, a síntese destas enzimas, como todas as outras proteínas na célula está geneticamente controlada. Os genes que iniciam a síntese de certas enzimas chaves podem ser seletivamente "disparadas" para produzir mais moléculas de enzimas, se a célula está em presença de algum substrato específico, que é chamado de indutor. Portanto, a indução pode ser interpretada como sendo o aumento na velocidade de síntese de determinada enzima causada pela presença do indutor.

A síntese induzida de novas proteínas, é portanto, um evento básico em muitos processos celulares fundamentais como a diferenciação celular, controle do crescimento, regulação metabólica e secreção celular. Somente com a formulação do modelo de operon da lactose em organismos procarióticos, por Jacob e Monod^(61,89,90) e subsequente explicação dos detalhes é que forneceram subsídios para a formulação quantitativa dos aspectos da indução. A formação induzida de novas proteínas é atualmente estudada em grande variedade de sistemas, incluindo regulação bacteriana, infecção viral em células procarióticas e eucarióticas, adaptação enzimática em cultura de células, efeitos hormonais-neurais em vários tecidos e modelos de sistema de diferenciação⁽¹⁵⁰⁾. A questão é saber, até que ponto, os conceitos formulados para operon bacteriano se aplicam a estes sistemas citados, especialmente em células eucarióticas, como leveduras e fungos.

Um dos mais bem conhecidos exemplos de sistema regulató-

rio é o da síntese de β -galactosidade, a qual tem sido utilizada como um modelo para o estudo da indução e repressão da síntese de enzimas em microrganismos.

A indução de β -galactosidase tem sido estudada em *Escherichia coli* (89,90,94) e em outros organismos procarióticos (81) e eucarióticos (6,28). Em todos, há diferenças relativas aos níveis máximos de indução, especificidade de indução, concentração do indutor necessária para produzir a síntese máxima de enzima, cinética da síntese, e outros parâmetros.

Desde os pioneiros estudos sobre a β -galactosidase, em 1947, um grande número de trabalhos tem sido publicado sobre indução e repressão de numerosas enzimas. Tem sido descrito que a indução de determinadas enzimas era reduzida pela adição de glucose ao meio de cultivo. Esta observação conhecida na época como "efeito da glucose" foi considerada como um fenômeno que participava na regulação do metabolismo de carboidratos, somente em 1942, graças aos trabalhos de Epps e Gale (33,89) em bactérias. Cinco anos mais tarde, Spiegelman e colaboradores (121, 122) observaram efeito semelhante durante a indução da "galactozimase" em leveduras. Em 1961, Magasanik (74) propõe a este efeito a denominação de "repressão catabólica", baseado em dados de que não são a glucose, mas também seus catabólitos que são rapidamente formados e acumulados na célula, são responsáveis pela repressão da síntese das enzimas. Portanto, a repressão catabólica será interpretada como uma redução ou parada da velocidade da síntese de certas enzimas, na presença de glucose ou de outra fonte de carbono.

Além desta repressão, pode ocorrer um fenômeno conhecido como "repressão transitória" (102). Neste efeito ocorre um pe-

ríodo de intensa repressão, imediatamente após a exposição das células à glucose que pode permanecer até o tempo de uma geração. A "repressão transitória" foi descrita inicialmente em β -galactosidase de mutantes de *Escherichia coli*⁽¹⁰¹⁾, sempre que o glicérol era substituído por glucose, e em outras cepas de *E. coli*, quando a glucose era adicionada ao meio contendo glicérol⁽⁹²⁾. Este fenômeno também foi observado em β -galactosidase de *Salmonella typhimurium*⁽¹³¹⁾, em galactoquinase de *Saccharomyces cerevisiae*⁽¹⁾, em triptofanase e D-serina desaminase de *E. coli*⁽¹⁰²⁾ e em amidase de *Pseudomonas aeruginosa*⁽²⁰⁾.

Dentre as enzimas de leveduras e fungos sujeitas a repressão catabólica pode-se citar as envolvidas na hidrólise de dissacarídeos como as maltases (α -glucosidases)^(35,142), as α -galactosidases^(77,85), as invertases⁽¹³⁾, as β -galactosidases^(28,68,103); as galactoquinases⁽¹⁾; as desidrogenases de L-ranose, L-fucose e de álcool^(24,73,136). Outras enzimas sob o efeito da repressão catabólica estão sumarizadas na revisão feita por Paigen e Williams⁽¹⁰²⁾.

O local de ação no mecanismo regulatório da repressão catabólica, tanto na permanente como na transitória, é conflitante. A β -galactosidase de *E. coli* descrita por Nakada & Magasanik^(93,94) e por Kepes⁽⁶⁵⁾ parece estar regulada ao nível da transcrição. A repressão catabólica de α -glucosidase de *Saccharomyces carlsbergensis* ocorre também ao nível da transcrição, porém, mais tarde os autores sugeriram que a glucose pode atuar ao nível da tradução⁽¹⁴²⁾.

O nível de controle destes dois tipos de repressão parece estar sobre a transcrição, ou seja, na síntese do mRNA^(93,94,142), e/ou sobre a tradução do mRNA⁽¹⁴²⁾. Contudo são resultados não

conclusivos, pois há dúvidas se a glucose pode exercer controle independente sobre os dois níveis da síntese de uma mesma enzima (transcrição e tradução), ou se o nível da regulação é dependente de que o microrganismo seja procariótico ou eucariótico.

O efeito do AMPc no mecanismo regulatório da síntese enzimática de organismos procarióticos e eucarióticos tem sido descrito, mas controvertido. Em bactérias, o AMPc parece combinar com uma proteína receptora específica (CAP ou CRP) resultando num complexo, o qual se liga ao DNA na região promotora do operon dependente de AMPc, estimulando a síntese proteica ao nível da transcrição^(42,147). Sendo assim, o AMPc tem um papel essencial e definido no mecanismo da repressão catabólica em bactérias. Contudo, muitos trabalhos têm sido realizados a procura de um sistema regulatório em leveduras e fungos^(76,113,127,141).

Embora a "repressão transitória" e a "repressão catabólica permanente" tenham cinéticas diferentes, parece que ambas são causadas pelo decréscimo nos níveis de AMPc intracelular, uma vez que o AMPc exógeno reverte tanto a "repressão transitória" como a "catabólica permanente"⁽¹⁰⁵⁾. Este decréscimo na concentração intracelular de AMPc é causado pela glucose e/ou seus metabólitos^(105,113,147). Em células de *Schizosaccharomyces pombe* foi demonstrado que o nível intracelular de AMPc e a atividade de enzimas sensíveis a catabólitos são inversamente proporcionais a concentração de glucose presente no meio⁽¹¹³⁾. É conhecida uma exceção que é a que ocorre na galactokinase de mutantes de *S. cerevisiae*. Matsumoto e colaboradores⁽⁷⁹⁾ sugeriram que o AMPc não está envolvido no mecanismo de repressão

catabólica nesta levedura, porque a glucose reprime a síntese da galactokinase tanto na presença quanto na ausência deste nucleotídeo no meio. Portanto, não existe uma correlação clara entre o nível de AMPc em células de leveduras e a alteração da síntese de enzimas controladas pela repressão por glucose e/ou seus catabólitos. É desconhecido, também como a glucose e/ou seus metabólitos exercem influência sobre os níveis de AMPc intracelular em leveduras. Experimentos em *Schizosaccharomyces pombe* ⁽¹¹³⁾ indicam que além da mudança de permeabilidade da membrana celular com respeito ao AMPc há outros sistemas regulatórios a serem considerados: i) inibição da adenil ciclase; ii) inativação da fosfodiesterase-AMPc; iii) inativação do AMPc sintetizado através da ligação reversível do nucleotídeo com uma proteína específica para AMPc; iv) mudança na concentração de AMPc entre os compartimentos celulares. Sy e Rychter ⁽¹²⁷⁾ demonstraram que a atividade de adenil ciclase em *Saccharomyces fragilis* era alterado em função das condições de crescimento. Speziale e van Wijk ⁽¹²⁰⁾ observaram que a atividade de fosfodiesterase-AMPc de *Saccharomyces carlsbergensis* era reduzida por polifosfatos inorgânicos e pirofosfatos. Se fôr provado que a glucose diminui os níveis destes fosfatos em células de leveduras, o papel regulatório da fosfodiesterase-AMPc, pode ser sugerido. Os dois últimos mecanismos sugeridos por Schlanderer e Dellweg ⁽¹¹³⁾ não tem ainda o respaldo de um suporte experimental.

A outra forma de controle de utilização de carboidratos é a "inativação catabólica", ao lado da "repressão transitória" e "repressão catabólica permanente". A "inativação catabólica" é um controle exercido pela glucose sobre a atividade de certas enzimas, preferencialmente sobre a formação da enzima ⁽⁵⁶⁾. É um efeito inibitório

rio sobre as moléculas pré-existentes da enzima e é distinto da "repressão catabólica". Este decréscimo na atividade específica de certas enzimas é mais rápido que o provocado pela repressão catabólica da síntese da enzima e pela diluição provocada pela síntese de outras novas proteínas.

Apesar deste fenômeno ter sido reconhecido como um mecanismo de controle por Gaudy e colaboradores⁽⁴¹⁾ somente em 1963, Woods⁽¹⁴⁸⁾, já descrevia em 1935, provavelmente pela primeira vez que a produção de indol pelo triptofano pelas células lavadas de *E. coli*, era inibida por glucose. Mais tarde Spiegelman e Reiner⁽¹²²⁾ relataram que a adição de glucose ao cultivo de células de leveduras em crescimento em galactose, não só reprimia a síntese do sistema metabólico da galactose ("galactozimase") mas também inativava rapidamente este sistema enzimático.

O fenômeno de inativação catabólica ficou sendo chamado de "inativação-repressão", por acharem Ferguson e colaboradores⁽³⁷⁾, tratar-se de um tipo incomum de repressão catabólica. Posteriormente, McGinnis e Paigen⁽⁸⁴⁾ introduziram o termo "inibição catabólica" e, finalmente em 1975 e 1976, Feldman e Datta⁽³⁶⁾ e Holzer⁽⁵⁶⁾, respectivamente, propuseram o termo "inativação-catabólica" para descrever o mesmo fenômeno.

Dentre os mecanismos para regulação da inativação de enzimas, os melhores conhecidos são⁽⁵⁶⁾:

- i) degradação proteolítica limitada ou total da enzima;
- ii) modificação covalente da enzima, sem a quebra de ligação peptídica;

(*) os autores usaram este termo para a inativação de treonina desidratase de *Escherichia coli* pelo piruvato.

iii) mudança conformacional e/ou na estrutura quaternária da enzima, dependente do efector, na ausência de formação ou quebra de ligação covalente.

O mecanismo proteolítico é aceito para explicar a inativação catabólica de um grande grupo de enzimas, mas a elucidação das bases moleculares da regulação pela inativação é motivo de pesquisas.

Holzer⁽⁵⁶⁾ observou que todas as enzimas sensíveis a inativação catabólica eram irreversivelmente inativadas e que havia necessidade de síntese "de novo" para a recuperação da atividade enzimática perdida. Mas em 1980, Lenz e Holzer⁽⁶⁹⁾, após sucessivas pesquisas, concluíram que a inativação induzida pela glucose, da frutose-1, 6-bisfosfatase de *Saccharomyces cerevisiae*, ocorria em 2 etapas: uma perda rápida de cerca de 60% da atividade inicial dentro dos três primeiros minutos após a adição de glucose; e a outra, seguida por um processo de inativação lenta, que leva a perda completa da atividade remanescente em cerca de 1 hora. A inativação inicial rápida é reversível quando a glucose do meio é substituída por acetato, e em presença de cicloeximida, sugerindo uma modificação covalente como o mecanismo de inativação. Contudo, a segunda e lenta etapa do fenômeno é irreversível, em presença de cicloeximida, uma vez que é o resultado de uma seletiva degradação proteolítica⁽¹³⁰⁾. Trabalhos posteriores de Mazón e colaboradores⁽⁸⁰⁾ e de Purwin e colaboradores⁽¹⁰⁷⁾ permitiram concluir que uma seletiva proteólise pode ser iniciada através da fosforilação (dependente de AMPc) de enzima sensível a inativação. A forma fosforilada é susceptível a ação de proteinases de citoplasma e/ou vacuolar, ao passo que a forma não fosforilada não sofre prote

ólise.

A inativação catabólica de carbono não é um fenômeno causado exclusivamente por glucose e/ou seus metabólitos, mas também por açúcares como frutose, sacarose, manose e maltose, que, metabolicamente, são estreitamente relacionados⁽⁵⁶⁾, formando efeto(r)es que provocaria(m) uma modificação covalente (efeito alostérico) na molécula da enzima. Assim haveria a estimulação da adenilciclase e/ou inibição da fosfodiesterase-AMPC, levando a um aumento nos níveis de AMPC, o qual serviria de sinal para a fosforilação da enzima para posterior proteólise seletiva⁽¹⁰⁷⁾.

A ocorrência da inativação catabólica em diferentes espécies de leveduras tem sido estudada em malato desidrogenase citoplasmática^(32,37), em frutose-1,6-bisfosfatase^(40,87) em proteínases A e B e carboxipeptidases⁽⁴⁸⁾, em aminopeptidase I⁽³⁸⁾, em sistemas de consumo ("uptake") de galactose⁽⁷⁸⁾ e maltose⁽⁴⁴⁾, e Switzer⁽¹²⁶⁾ em sua revisão, cita 41 enzimas que são controladas por inativação.

O principal papel da "inativação catabólica" junto com a "repressão catabólica" não está claro, mas parece contribuir para a economia celular reprimindo e inativando as enzimas⁽⁵⁶⁾. Não se sabe claramente ainda, por que a célula necessita da "inativação catabólica", tendo ela a capacidade de utilizar a "repressão catabólica". Evidências sugerem que a inativação é usada quando a célula necessita de uma rápida remoção da enzima, pois o desaparecimento da atividade enzimática de uma enzima reprimida pela sua "diluição" devido ao crescimento celular, é muito lento^(56,84).

Muitos esforços tem sido dedicados no sentido de elucidar o mecanismo de "efeito da glucose". Tendo em vista o que

diz em várias publicações sobre o assunto, pode-se sugerir que a glucose quando adicionada a uma suspensão de células, provoca alterações em vários níveis como: i) na transcrição; ii) na pós-transcrição, diminuindo a estabilidade de mRNA; iii) na tradução; iv) na modificação da proteína-enzima; v) na glicosilação e secreção da enzima. Dependendo do nível de controle molecular, a inibição pela glucose e/ou seus metabólitos, portanto chamada de inibição catabólica, recebe denominações diferentes como: "repressão catabólica transitória", "repressão catabólica permanente" e "inativação catabólica".

O presente trabalho tem por finalidade estudar os parâmetros cinéticos da indução da xilitol desidrogenase pela D-xilose, bem como mostrar que a adição de glucose no sistema de indução no decorrer da síntese induzida da XiDH em *Pullularia pullulans* não é reprimida através de mecanismos já conhecidos, mas é por um tipo incomum de "inibição catabólica transitória", associada a uma fraca "repressão catabólica permanente". O efeito de cicloeximida e AMPc sobre a inibição da síntese da XiDH, pela glucose, é também estudada.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES

D-xilose, NAD^+ , NADH, D-xilulose, cicloeximida, o-dianisidina, dibutiril-adenosina-3',5'-monofosfato cíclico, albumina do sêro bovino, glucose oxidase, DEAE-celulose, "azul de dextrana", foram obtidos da Sigma Chemical Co., USA.

"Blue-Sepharose" CL-6B, Sephadex G-150, da Pharmacia, Suêcia.

D-glucose, xilitol, cloridrato de tiamina, da E. Merck, Alemanha.

Ágar (Bacto-agar), extrato de levedura, adjuvante completo e incompleto de Freund, da Difco Laboratories, USA.

Metilbisacrilamida, TEMED, persulfato de amônio, da Bio-Rad Laboratories, USA.

D-xilose, da Carlo Erba, Itália.

Extrato de levedura, da Inolex, USA.

Agar (nº 3), da Oxoid, Inglaterra.

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

2.2. ORGANISMOS

O micorganismo empregado foi a cepa de *Pullularia pullu-*

lans em estágio leveduriforme. A cepa original foi cedida gentilmente pela Dra. S. Joly do Instituto Zimotécnico da Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP.

O coelho albino (New Zealand) macho (OD-U 182, OE-CA 436 B) foi procedente da coelheira Campina, Curitiba - PR.

2.3. MEIOS DE CULTURA

2.3.1. O meio sólido empregado foi ágar-D.P.E., abaixo descrito contendo ágar 1,75%, tiamina 0,4 mg% e glicerol 0,5%. A esterilização deste meio foi realizada por autoclavação a 1 atm. de pressão por 25 minutos, e a seguir, os tubos foram inclinados.

2.3.2. O meio líquido foi o descrito por Cooper et al. ⁽²³⁾ modificado e suplementado com 0,4 mg% de cloridrato de tiamina ou com 0,1% de extrato de levedura. O meio descrito a seguir foi denominado de meio mineral de composição definida e designado pela sigla D.P.E. Este meio continha os seguintes componentes por litro: 2,0 g de sulfato de amônio, 1,0 g de nitrato de amônio, 1,23 g de fosfato ácido de potássio, 0,14 g de fosfato básico de sódio, 0,5 g de sulfato de magnésio heptaidratado, 1,5 g de cloreto de potássio, 0,5 g de cloreto de sódio, 0,1 g de cloreto de cálcio, 0,0145 g de nitrato férrico nonaidratado, 0,0088 g de sulfato de zinco heptaidratado, 0,0041 g de sulfato de manganês tetraidratado, 0,003 g de cloreto de cobre, 0,000064 g de molibdato de amônio tetraidratado. O pH do meio foi ajustado para 5,6 com fosfato ácido de potássio e esterilizado em autoclave a 1,5 atm. de pressão por 25 minutos. As fon

tes de carbono e cloridrato de tiamina foram esterilizadas separadamente em vapor fluente, durante 20 minutos e acrescentadas separadamente ao meio mineral líquido definido na concentração final requerida.

2.4. MÉTODOS

2.4.1. CONSERVAÇÃO DAS CEPAS

As cepas de *Pullularia pullulans* foram mantidas e repicadas em meio agar-DPE contendo glicerol 0,5% como fonte de carbono. As culturas foram incubadas a 28°C. Repiques para o mesmo meio foram feitos em intervalos regulares de aproximadamente 1 mês.

2.4.2. PRÉ-INÓCULO

Células do meio sólido foram transferidas para um frasco Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml do meio DPE, 0,4 mg% de tiamina e 0,5% de glicerol. O cultivo foi incubado por 24 horas (exceto quando especificado) a 28°C em um sistema aeróbico obtido por agitação mecânica a 120 rotações por minuto (rpm) em agitador rotatório New Brunswick. O cultivo assim obtido constitui o pré-inóculo.

2.4.3. CURVA DE CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO

Alíquotas de 10 ml do pré-inóculo com densidade ótica a 660 nm entre 0,26 a 0,30, foram transferidas para Erlenmeyer de

2 litros contendo 500 ml do meio líquido DPE com diferentes fontes de carbono a 0,5% e 0,4 mg% de tiamina. Somente para a obtenção das curvas da Figura 13 foi empregado meio DPE contendo 0,1% de extrato de levedura em substituição a tiamina. Estes meios foram incubados em agitador rotatório a 120 rpm a 28°C.

O crescimento das células em diferentes fontes de carbono foi acompanhado determinando o aumento de turbidez a 660 nm em espectrofotômetro Coleman Jr., em intervalos de tempo determinados. Antes das leituras, a suspensão celular foi sempre diluída até alcançar valores de absorvância menores que 0,4 unidades.

A velocidade específica de crescimento (μ) foi calculado de acordo com a equação:

$$\mu = \frac{(\ln x_2 - \ln x_1)}{(t_2 - t_1)}$$

onde x_1 e x_2 representam a concentração celular nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente, na fase exponencial do crescimento⁽⁸⁸⁾.

O tempo de geração (T) foi determinado pela equação:

$$T = \frac{\ln 2}{\mu}, \quad (143)$$

2.4.4. PREPARO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS EM REPOUSO OU EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE

As células foram crescidas em meio DPE contendo 0,4 mg% de tiamina, 0,5% de glicerol, a 28°C, num agitador rotatório a 120 rpm. Quando o crescimento celular atingiu o terço final da fase exponencial de crescimento (31 h de cultivo), as células foram coletadas assepticamente, por centrifugação (5000 xg por 5 minutos em centrifuga Beckman, modelo J-21 B ou Sorvall, mo-

delo RC-5, a 3-5°C), lavadas com água destilada estéril (cêrca de duas vezes o volume do meio) e resuspensas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,6 estéril num volume aproximado de 7-8 vezes menor que o inicial. Esta suspensão celular foi jejuada por 10-12 horas sob agitação a 120 rpm a 28°C. Após o jejum as células foram, novamente, coletadas assepticamente por centrifugação a 28°C e resuspensas em tampão fosfato fresco mantida a 28°C, resultando numa densidade celular de 1,8 a 2,5 unidades de absorbância a 660 nm, que foi utilizado para os experimentos.

2.4.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

As células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 5 minutos a 4°C, lavadas duas vezes com solução de cloreto de potássio 0,15 M, e mantidas a -15°C até o preparo dos extratos.

Os extratos foram obtidos rompendo-se as células com esferas de vidro (0,5 mm de diâmetro) (1:3 p(úmido)/p) em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 com 2-mercaptoetanol 1 mM, por agitação durante 2 minutos, com refrigeração em banho de gelo após cada 30 segundos de agitação. As agitações foram feitas em tubos de plástico (150 mm X 65 mm) num agitador de tubos Vortex Genie à velocidade máxima. O material extraído com tampão fosfato (2 vezes o peso úmido p/v) foi centrifugado a 15.000 x g por 15 minutos a 2°C. Os sobrenadantes foram usados como fonte de enzima.

2.4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática de xilitol desidrogenase (XiDH) foi medida espectrofotometricamente, seguindo a redução de NAD^+ a 340 nm, em espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635-D ou Beckman modelo DB, termostatizado à temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

O sistema de reação (1,0 ml) continha 25 μ moles de tampão glicina/NaOH, pH 9,5; 2 μ moles de NAD^+ e enzima em um volume final de 100 μ l, sendo a reação iniciada pela adição de 20 μ moles de xilitol.

Uma unidade de xilitol desidrogenase foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μ mol de NAD^+ por minuto, nas condições especificadas.

A atividade específica foi definida como unidade de xilitol desidrogenase por miligrama de proteína.

2.4.7. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteínas foi executada pelo método de Lowry et al. ⁽⁷²⁾ utilizando albumina do sôro bovino como padrão ou pela técnica descrita por Warburg e Christian ⁽¹³⁷⁾ nas etapas da purificação enzimática ou pela absorção a 280 nm, utilizando-se o fator no valor de 1,34 ⁽⁶⁰⁾, durante o preparo do anticorpo anti-xilitol desidrogenase. A determinação de proteínas em células intactas foi executada após solubilização da proteína celular em NaOH 1 N a 90°C por 15 minutos, conforme descrito por Jayaraman e colaboradores ⁽⁶²⁾.

2.4.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COENZIMAS

As concentrações de NAD^+ em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0, foram determinadas espectrofotometricamente a 260 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar aproximado de $17,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (7). As concentrações de NADH em tampão glicina / NaOH 20 mM, pH 9,5, foram determinadas espectrofotometricamente a 340 nm utilizando-se o coeficiente de extinção molar aproximado de $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (57).

2.4.9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES

A determinação da concentração de D-xilose no sistema de indução foi realizada pelo método de fenol-sulfúrico (31), usando D-xilose como padrão. A coloração desenvolvida foi medida espectrofotometricamente em Coleman Jr., a 480 nm.

A concentração de glucose no sistema de indução foi determinada pelo método da glucose-oxidase-peroxidase (25), interrompendo-se a reação com H_2SO_4 a 25% p/v (146) e a medida da coloração desenvolvida foi feita a 515 nm. O padrão utilizado foi D-glucose.

2.4.10. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

2.4.10.1. PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

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

O extrato livre de células foi obtido por trituração, em gral de porcelana, de 6,0 g (pêso úmido) de células congeladas de *Pullularia pullulans* crescidas em D-xilose por 15-20 horas, com aproximadamente o dôbro do pêso de células em esferas de vidro (0,5 mm de diâmetro), mais 2 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 contendo 1 mM de 2-mercaptoetanol. O macerado foi suspenso no mesmo tampão fosfato e centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos. A solução sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima para as seguintes etapas de purificação.

2.4.10.2. PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE PROTAMINA

Ao extrato livre de células (19,0 ml) foi adicionada lentamente, com agitação constante, solução de sulfato de protamina a 2%, pH 7,0 até uma concentração final de 0,25%.

A suspensão foi mantida em repouso por 15 minutos em banho de gelo e centrifugada a 16.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a etapa seguinte da purificação, sendo que uma pequena alíquota da fração de cada etapa da purificação foi reservada para o controle da atividade enzimática e determinação de proteínas.

2.4.10.3. FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO

Ao sobrenadante (20 ml) da fração de sulfato de protamina mantido em banho de gelo, foi adicionado lentamente e com agitação constante, sulfato de amônio pulverizado até atingir a saturação de 40%. Após a adição de sulfato de amônio foi

prosseguida a agitação por mais 30 minutos e em seguida o precipitado protéico formado foi descartado por centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos. Ao sobrenadante anterior (21 ml) mantido em banho de gelo, foi adicionado lentamente e com agitação constante, sulfato de amônio pulverizado em quantidade suficiente para alcançar 70% de saturação. Após 4 1/2 horas de repouso em banho de gelo, a suspensão foi centrifugada nas mesmas condições anteriores. O precipitado obtido foi redissolvido em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 contendo 1 mM de 2-mercaptoetanol em volume final de 2,7 ml.

2.4.10.4. FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-150

A fração proteica precipitada entre 40-70% de saturação em sulfato de amônio (2,5 ml) foi aplicada em uma coluna de Sephadex G-150 (2,6 x 36,5 cm) previamente equilibrada com tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 contendo 1 mM de 2-mercaptoetanol e calibrada com azul de dextrana. A eluição foi realizada utilizando-se o mesmo tampão com fluxo de 0,36 ml/min. Frações de 3,2 ml foram coletadas com auxílio de um coletor de frações (Ultra-Rac-Fraction Collector LKB 7.000). As frações que apresentaram maior atividade foram reunidas e cromatografadas na etapa seguinte.

2.4.10.5. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-CELULOSE

A fração contendo XiDH (28,3 ml) obtida na etapa anterior foi aplicada em uma coluna (3 x 3,5 cm) de DEAE-celulose com capacidade de troca igual a 0,98 mEq/g, previamente trata-

da como recomendado por Peterson e Sorber⁽¹⁰⁶⁾ e equilibrada com o mesmo tampão fosfato utilizado anteriormente. Após a adsorção da proteína a resina foi lavada com 65 ml de tampão fosfato 40 mM, pH 7,0 contendo 1 mM de 2-mercaptoetanol e coletadas frações de 4,2 ml. A seguir as proteínas foram eluídas com um fluxo de 0,45 ml/min. com gradiente linear (50-90 mM) de tampão fosfato (50 ml de cada concentração) e coletadas frações de 3,0 ml, no mesmo coletor anteriormente citado. As frações mais ativas foram combinadas e usadas na etapa seguinte.

2.4.10.6. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM "BLUE SEPHAROSE" CL-6B

As frações da etapa anterior (13 ml) com atividades enzimáticas superiores a 0,9 unidade/ml foram reunidas e adicionadas a seis vezes o peso úmido da resina de "blue Sepharose" CL-6B previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 8,0. A suspensão foi mantida em banho de gelo com agitação suave até que toda a enzima fosse adsorvida ou que não houvesse atividade de XiDH no sobrenadante desta preparação. Após, esta suspensão foi transferida para uma coluna (1,8 x 25 cm) e lavada com tampão de equilíbrio (3 vezes o volume da resina) ou até que a absorbância a 280 nm fosse igual ou inferior a 0,002 unidades. A enzima foi eluída com solução de NAD⁺ 3 mM em tampão fosfato 10 mM, pH 8,0, com um fluxo aproximado de 1,5 ml/min. As frações de 2 ml foram coletadas em um coletor de frações LKB 7.000; a atividade enzimática e o conteúdo protéico de cada fração foram determinados. As frações com maiores atividades de XiDH (16,4 ml) foram reunidas, concentradas pela ultrafiltração (membrana Diaflo PM 10) sob pressão de nitrogê-

nio de $1,5 \text{ kg/cm}^2$. A seguir, foi adicionada glicerina até uma concentração final de 10% (v/v) à preparação enzimática e estocada a -15°C .

2.4.11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita utilizando-se gel a 7% (99,140) em tampão Tris/borato 0,065M, pH 9,0 e corrente de 5 mA por gel durante 1 a 1 1/2 horas, a 4°C , em um aparelho Ortec, modelo 4.200⁽⁹⁹⁾, ou fonte LKB-Bromma, modelo 3971E.

O indicador de corrida empregado foi o azul de bromo fenol 1%. Os géis foram polimerizados em tubos de 0,6 x 5,5 cm, usando persulfato de amônio 0,1% (p/v) como catalisador. Após a polimerização os cilindros de gel foram submetidas a uma pré-eletroforese a uma corrente elétrica de 3 mA/tubo durante aproximadamente 60 minutos, com a finalidade de eliminar o persulfato de amônio.

Alíquotas de 10 μl de uma solução glicerinada a 50% contendo aproximadamente 42 μg de XiDH purificada e 1 μl da solução de azul de bromo fenol foram aplicadas sobre o gel e submetidas ao processo de eletroforese. As bandas de proteínas do gel foram reveladas imergindo o gel em uma solução de "coomasie brilliant blue" G-250⁽⁹⁾. A atividade de XiDH no gel foi observada pela incubação a 25°C e ao abrigo da luz durante 1-2 horas no seguinte sistema (7 ml): 167 μmoles de tampão glicina/NaOH pH 9,5; 16,5 μmoles de NAD^+ ; 196 μmoles de xilitol; 0,49 mg de azul de p-nitrofenil tetrazolium e 0,43 mg de fenazina metassulfato. O controle foi efetuado pela incubação do

gel no sistema na ausência do substrato.

2.4.12. PREPARO DE ANTICORPOS CONTRA A XiDH

O coelho antes de receber a primeira injeção de antígeno foi submetido a punção cardíaca, coletando-se 15 ml de sangue. O sangue foi incubado a 37°C por 40 minutos e em seguida o sôro foi separado por centrifugação numa centrífuga clínica (velocidade 4), por 10 minutos. O sôro (3 ml) assim obtido (sôro controle) foi distribuído em tubos de ensaio em alíquotas de até 1 ml e estocadas a -15°C.

Os anticorpos contra a XiDH foram obtidos por injeções subcutâneas de emulsões preparadas com a enzima purificada e adjuvante de Freund em coelho albino (New Zealand) macho com 7 meses de idade. O coelho recebeu 4 injeções com intervalos de 15, 23 e 25 dias, sendo que nas duas primeiras a emulsão continha 0,1 mg de xilitol desidrogenase purificada e 1,0 ml de adjuvante completo de Freund. A terceira injeção continha 0,5 mg de xilitol desidrogenase purificada e 0,5 ml de adjuvante completo de Freund, sendo que a última emulsão foi constituída de 0,1 mg de XiDH purificada e 1,0 ml de adjuvante incompleto de Freund. Parte da 3ª injeção e da 4ª injeção foram intramusculares.

O título de anticorpos foi acompanhado semanalmente após a 2ª injeção da XiDH purificada, pelo método de dupla difusão de Ouchterlony⁽¹⁰⁰⁾ empregando-se diferentes diluições da enzima purificada. Para a determinação do título de anticorpo no sôro, o coelho foi sangrado pela veia marginal da orelha, coletando-se aproximadamente 1 ml de sangue. Após a retração do co

águlo, o sôro foi separado por centrifugação e usado na imunodifusão.

Aos 83 dias após a primeira injeção de emulsão com a enzima, canulou-se a artéria carótida do coelho, coletando cerca de 83 ml de sangue, que foi incubado a 37°C por 10 horas. O sôro formado foi coletado e o coágulo foi mantido por mais 15 horas a 4°C. O sôro expulso pela retração deste coágulo foi acrescentado ao primeiro e foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos, obtendo-se um volume de 36,5 ml de sôro.

O sôro obtido foi submetido às seguintes etapas de purificação: precipitação com sulfato de amônio: o sôro foi tratado com sulfato de amônio e após 5 horas a 4°C, o material foi centrifugado a 16.600 x g por 15 minutos (5°C). As proteínas precipitadas entre 0 a 45% de saturação, foram resuspensas em 20 ml de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 8,0. Esta preparação foi dialisada contra o mesmo tampão fosfato (2 litros), mantido sob agitação por 14 horas a 4°C. As proteínas precipitadas foram eliminadas por centrifugação a 16.600 x g por 15 minutos e o sobrenadante (26 ml) foi tratado com DEAE-celulose (3,0 g, peso úmido) previamente equilibrada com tampão fosfato 10 mM, pH 8,0. O material foi mantido em banho de gelo por 1 hora com agitação suave a cada 10 minutos. Após a adsorção da proteína albumina, a suspensão foi submetida a filtração através de papel Wheaton com auxílio de uma trompa de água. A resina foi lavada com o mesmo tampão fosfato (cerca de 3,5 vezes o volume da suspensão) até que neste "lavado" não houvesse absorvância a 280 nm. O "lavado" que contém gama-globulina anti XiDH foi concentrado pela ultrafiltração (Amicon com membrana Diaflo PM 10 sob pressão de nitrogênio de 1,5 kg/cm²) e passado

através da coluna (1,6 x 30 cm) de gel Sephadex G-100 previamente equilibrada com tampão fosfato 10 mM, pH 6,95 para retirar traços de hemoglobina resultante da hemólise. A eluição foi efetuada utilizando-se o tampão de equilíbrio com fluxo aproximado de 0,4 ml/min. Foram coletadas frações de 3 ml com o auxílio de um coletor de frações (Ultra-Rac-Fraction Collector LKB 7.000). Cada fração foi monitorada a 280 nm. As frações com maior teor protéico foram reunidas e concentradas pela ultrafiltração como descrito anteriormente. A fração concentrada foi distribuída em alíquotas de 0,5 ml e estocadas a -15°C.

2.4.13. PREPARO DE AGAR-GEL PARA PLACAS DE IMUNODIFUSÃO

Uma solução de ágar (Difco "special agar noble") a 15% foi preparada em água destilada em ebulição. Após solidificada por esfriamento, o gel foi cortado em pequenos fragmentos (5 x 5mm) e lavados, inicialmente em água destilada com agitação por 48 horas. Em seguida foram lavados em solução tampão barbital/HCl 25 mM, pH 8,6 por 48 horas e filtrados em gaze. Os pedaços de agar-gel foram fundidos e alíquotas de 10 a 15 ml foram transferidas para tubos de ensaio, esterilizados e estocados a 4°C.

Para a imunodifusão de Ouchterlony foram utilizadas placas de vidro de 4 x 6 cm, sobre as quais foram transferidas volumes de 10 a 15 ml de ágar-gel fundido. Após solidificação foram abertos 4 orifícios periféricos e um central nesta camada de ágar-gel e utilizados para imunodifusão.

2.4.14. IMUNODIFUSÃO DE OUCHTERLONY

A imunodifusão foi feita segundo a técnica descrita por Ouchterlony e Nilson ⁽¹⁰⁰⁾. No orifício central foi aplicado 50 μ l da solução de gama-globulina anti XiDH (70,9 mg/ml proteína) e nos periféricos foram aplicados diferentes preparações de XiDH. Paralelamente, efetuou-se uma outra placa de imunodifusão, na qual, substituiu-se o imunosôro anti-XiDH por 50 μ l de sôro controle obtido como descrito no ítem 2.4.12 de Materiais e Métodos. A seguir a placa de imunodifusão foi colocada em câmara úmida saturada com tolueno e mantida a temperatura ambiente por 48 horas. Após este período a placa foi lavada 3 vezes, com agitação, em solução de cloreto de sódio 0,9% por 48 horas e em seguida em água destilada por 24 horas. Após estas lavagens a placa de ágar-gel foi secada com auxílio de secador a ar quente, inicialmente e transferida para estufa a 40°C. Para a visualização das linhas de precipitinas, o ágar-gel seco foi corado com solução de "coomassie" G-250 ⁽⁹⁾.

2.4.15. DETERMINAÇÃO DO PONTO DE EQUIVALÊNCIA ANTÍGENO-ANTI-CORPO

A determinação do ponto de equivalência entre o antígeno e anticorpo foi de acordo com o descrito por Kabat e Meyer ⁽⁶⁴⁾. Foi adicionado uma quantidade fixa de gama-globulina anti-XiDH (10 μ l) ou soro controle, sobre diluições crescentes de XiDH conttendo 0,023 a 0,184 unidade. O volume final destas diluições foi de 0,20 ml. Este sistema foi incubado a 30°C por 4 ho-

ras e a seguir a 4^oC por 14 horas. Após este tempo, cada diluição foi centrifugada a 16.600 x g por 15 minutos (3^oC) e foi dosada a atividade remanescente de XiDH nos sobrenadantes.

3 - RESULTADOS

3.1. PURIFICAÇÃO DA XiDH

A XiDH obtida pela ruptura das células de *P. pullulans* crescidas em meio líquido DPE, contendo 0,5% de D-xilose durante 15 a 20 horas, foi purificada até a homogeneidade com a finalidade de preparar anticorpos contra a XiDH.

Os resultados da purificação da enzima estão sumarizados na Tabela 1. Inicialmente, o extrato livre de células foi tratado com solução de sulfato de protamina para precipitar os ácidos nucleicos. A seguir a preparação enzimática foi fracionada com sulfato de amônio em 2 etapas: 0-40% de saturação e entre 40-70% de saturação. Neste tratamento parte das proteínas contaminantes foram descartadas. A XiDH precipitada entre 40-70% de saturação em sulfato de amônio foi submetida à filtração em gel Sephadex G-150. A XiDH foi eluída em um único pico de atividade. Nesta etapa, os pigmentos presentes na preparação enzimática foram eluídos do gel no volume morto da coluna (Figura 1).

A cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (Figura 2), possibilitou a recuperação de uma preparação enzimática com melhor rendimento que aquela efetuada em trabalho anterior⁽¹²³⁾. Na lavagem da coluna, grande parte das proteínas contaminantes foram excluídas e a XiDH foi eluída como um único pico de ati-

vidade em gradiente de tampão fosfato 60-70 mM. Como nesta etapa de purificação não se obteve uma preparação homogênea, as frações com atividade enzimática superior a 0,9 unidades/ml, foram reunidas e cromatografadas em "blue sepharose" CL-6B (Figura 3), conforme descrito no ítem 2.4.10.6 de Materiais e Métodos.

A eluição específica da enzima da coluna de afinidade foi realizada com o seu cofator NAD^+ 3 mM em tampão fosfato 10 mM, pH 8,0, uma vez que em concentrações inferiores deste coenzima e em pH acima ou abaixo deste valor empregado, não se obteve resultados satisfatórios.

3.2. CRITÉRIOS DE PUREZA

3.2.1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A homogeneidade da preparação de XiDH purificada foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% de acordo com o método descrito no ítem 2.4.11 de Materiais e Métodos. Na figura 4 observa-se a presença de uma única banda de proteína indicando que a preparação enzimática está eletroforéticamente homogênea.

3.2.2. IMUNODIFUSÃO

A imunodifusão efetuada segundo descrito por Ouchterlony e Nilson⁽¹⁰⁰⁾, mostrada na Figura 5, indica que tanto o extrato livre de células como a preparação enzimática mais purificada formam uma única linha de precipitação. Estes ensaios de-

monstram que a preparação de XiDH empregado para obtenção de anticorpos está com alto grau de pureza. A imunodifusão efetuada com o "sôro controle" em lugar do imuno-sôro anti XiDH purificado não apresenta nenhuma linha de precipitação, indicando que o sôro do coelho utilizado não possui anticorpos contra XiDH, antes de ter sido sensibilizado com a XiDH.

3.3. DETERMINAÇÃO DO PONTO DE EQUIVALÊNCIA ANTÍGENO-ANTICORPO

Com a finalidade de titular o anticorpo formado foi realizado a determinação do ponto de equivalência entre o antígeno e o anticorpo. A Figura 6 mostra que o título do anticorpo obtido é da ordem de 72 mU de xilitol desidrogenase para 10 μ l de imunosoro.

3.4. MECANISMO DE REAÇÃO DA XILITOL DESIDROGENASE

3.4.1. ESTUDO DA VELOCIDADE INICIAL

Estudos da velocidade inicial (39,114,109) de óxido-redução de xilitol-NAD⁺ pela XiDH são mostradas na Figura 7 e 8.

A Figura 7 mostra que o gráfico dos inversos das velocidades iniciais contra o inverso das concentrações de NAD⁺ (70), em várias concentrações fixas de xilitol dá uma série de retas que cruzam em um ponto comum, à esquerda do eixo das ordenadas e acima do eixo das abcissas.

A figura 8 mostra que o gráfico dos inversos das velocidades contra o inverso das concentrações de xilitol, em várias concentrações fixas de NAD⁺ dá, também, uma série de linhas que se cruzam em um ponto comum, à esquerda do eixo das ordenadas e acima do eixo das abcissas.

Estes resultados sugerem um mecanismo cinético do tipo sequencial, isto é, todos os substratos precisam estar presentes, simultaneamente, no sítio ativo da enzima antes da formação do produto⁽³⁹⁾.

3.4.2. ESTUDO DA INIBIÇÃO PELOS PRODUTOS DA REAÇÃO

O estudo da inibição da XiDH pelo produto da reação (3, 114) NADH com respeito às concentrações variáveis de NAD^+ é mostrado na Figura 9. A inibição é do tipo competitivo, ou seja, todas as retas se cruzam sobre o eixo das ordenadas.

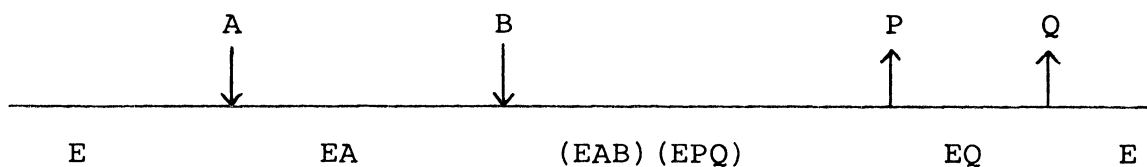
A figura 10 mostra o estudo da inibição da XiDH pelo produto da reação NADH com respeito às concentrações variáveis de xilitol. Todas as retas se cruzam num ponto comum, à esquerda do eixo das ordenadas e acima do eixo das abcissas (inibição do tipo misto ou não competitivo na nomenclatura de Cleland) (114).

A figura 11 mostra o estudo da inibição da XiDH pelo produto da reação D-xilulose com respeito à concentração variáveis de NAD^+ . A inibição é do tipo misto (não competitivo na nomenclatura de Cleland) (21,114).

A Figura 12 mostra o gráfico da inibição da XiDH pelo produto da reação D-xilulose com respeito à concentração variáveis de xilitol. A inibição mostra ser do tipo misto ou não competitivo.

Os resultados obtidos dos experimentos registrados nas Figuras 9 a 12 mostram que há 3 inibições pelo produto do tipo não competitivo (nomenclatura de Cleland)⁽²¹⁾, e 1 inibição pelo produto do tipo competitivo. Estes dados permitem identificar um mecanismo se-

quencial do tipo ordenado^(3,114). Este mecanismo cinético está descrito abaixo. A enzima é simbolizada por uma linha horizontal, e as sucessivas adições dos substratos e a dissociação dos produtos são designados por setas verticais. As formas de enzimas são mostradas abaixo da linha:



E= XiDH; A= NAD⁺; B= xilitol; EA, EAB= complexos enzima substratos; P= D-xilulose; Q= NADH; EPQ, EQ= complexos enzima produtos.

3.5. CURVAS DE CRESCIMENTO E UTILIZAÇÃO DE DIVERSOS AÇÚCARES COMO FONTE DE CARBONO E ENERGIA POR *PULLULARIA PULLULANS*

A Figura 13 mostra as curvas de crescimento deste fungo em sua forma de levedura em presença de diversos açúcares como fonte de carbono. Através destas curvas é possível calcular a velocidade específica de crescimento (μ), bem como o tempo de geração (T) do fungo (Tabela 2).

O resultado obtido pela Figura 13 indica que o microrganismo utiliza diferentes fontes de carbono para sua proliferação, sendo que a velocidade específica de crescimento máxima foi alcançada em presença de D-glucose ($\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$), seguida pela D-xilose ($\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$) e D-manitol ($\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$). A utilização de pentoses como D-arabinose ($\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$) e D-ribose ($\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$) foi ineficiente em relação à D-xilose. Portanto, o menor tempo de geração é alcançado em D-glucose (T= 2h) e D-xilose (T= 2 h), seguido por D-manitol (T= 3 h) e D-galactose

(T= 4,6 h).

3.6. NÍVEIS DA XiDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* CRESCIDAS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

A capacidade de indução da xilitol desidrogenase foi testada através do crescimento do microrganismo em presença de diversas fontes de carbono utilizáveis pelo mesmo, comparando-se as atividades específicas em extratos livres de células.

O nível da enzima em células crescidas em D-glucose, D-manitol, glicerol, succinato, D-arabinose, D-ribose e D-galactose, não é significativo. Embora D-manitol seja utilizado como fonte de carbono para o crescimento das células, este composto não é um eficiente indutor.

A Tabela 2 mostra que a atividade específica de XiDH é cerca de 200 vezes maior em células crescidas em D-xilose.

3.7. RELAÇÃO ENTRE O CRESCIMENTO E A SÍNTESE DE XiDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* COMO UMA FUNÇÃO DO TEMPO

A Figura 14 mostra a síntese da XiDH em função do tempo de crescimento induzida com D-xilose no meio salino DPE contendo cloridrato de tiamina ou extrato de levedura. Em ambos os cultivos, observa-se que após uma pequena fase de "lag" a atividade induzida da XiDH é aparentemente função linear do tempo, alcançando um nível máximo após 25-27 horas de crescimento, a partir do qual há um declínio. Este decréscimo da atividade enzimática parece estar associada à chegada da cultura em sua fase estacionária de crescimento. No entanto, quando as celu-

las de *P. pullulans* na fase estacionária de crescimento são diluídas com meio de cultivo fresco e mantidas em sua fase exponencial, a atividade de XiDH não aumentou, significativamente, após 4 tempos de gerações.

A Figura 14 mostra também que o perfil da atividade específica da XiDH induzida em presença de cloridrato de tiamina ou de extrato de levedura é similar. Portanto, substituiu-se o extrato de levedura do meio de DPE por tiamina, passando este meio a ter uma composição definida.

3.8. DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DIFERENCIAL DE SÍNTESE DA XiDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM CRESCIMENTO

Conforme Paigen e Williams (102) o comportamento de um cultivo em crescimento pode ser expresso como o aumento da síntese enzimática a um dado tempo ($\Delta E = E_t - E_0$) em termos da massa celular inicial (M_0), e a massa celular presente a um dado tempo (M_t), ou seja:

$$\frac{\Delta E}{M_0} \times \frac{M_t}{M_0}$$

Nestes termos, o valor da velocidade diferencial de síntese da XiDH obtida pela inclinação da curva mostrada na Figura 15-A é da ordem de 1,4 unidades/mg de proteína sintetizada. Os dados mostrados na Figura 15-A indicam que no início do crescimento, a quantidade de enzima sintetizada é maior que a

síntese de outras proteínas. Subsequentemente esta proporção se torna constante.

3.9. CINÉTICA DE INDUÇÃO DA SÍNTESE DA XiDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO PROLIFERANTE

A XiDH é induzível tanto em células em crescimento em presença do indutor D-xilose, como em suspensões de células intactas em condições não-proliferantes. A Figura 16 mostra que as células pré-crescidas em meio contendo glicerol e incubadas em presença do indutor, conforme descrito em Materiais e Métodos, sintetizam a XiDH logo após a adição do indutor. Esta atividade induzida é função linear do tempo de incubação em presença do indutor, contudo, na sua ausência não se processa a síntese da enzima. Durante este processo indutivo não se observa variações significativas da densidade celular.

3.10. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO INDUTOR SOBRE A CINÉTICA DE INDUÇÃO DA SÍNTESE DA XiDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE

A Figura 17 mostra que a velocidade de síntese da XiDH depende da concentração do indutor empregado. A adição de 2% de D-xilose no sistema de incubação não aumenta significativamente, a velocidade de síntese da indução da XiDH acima daquela obtida com uma concentração de D-xilose de 1,7%. Logo, nas condições de indução utilizadas a concentração de D-xilose capaz de induzir a enzima ao máximo é de 1,7%. Na ausência do indutor no sistema de incubação (tampão fosfato 0,1 M, pH 6,6) ou a sua subs

tituição por glicerol a 0,5%, não ocorre o processo de indução da enzima. A percentagem residual de D-xilose no sistema de incubação, após 8 horas de indução, é de 32,8%, 31,7% e 26,5% da concentração inicial de 0,7 g, 1,7 g e 2,0 g em 100 ml do sistema, respectivamente.

3.11. EFEITO DA CICLOEXIMIDA SOBRE A INDUÇÃO DA SÍNTESE DA XIDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE

A Figura 18 mostra que o aparecimento da atividade induzida da XidH é inibida pela cicloeximida quando este composto é adicionado, simultaneamente, com a D-xilose no início da indução, ou 4 horas após a indução. Estes resultados indicam que o aumento da atividade enzimática por indução depende de uma síntese protéica ativa, uma vez que a cicloeximida é um potente inibidor de síntese protéica em organismos eucarióticos (117).

3.12. EFEITO DO "PRÉ-INÓCULO", CRESCIDO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO, SOBRE A INDUÇÃO DA XIDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM CRESCIMENTO

A Figura 19 A-B mostra que quando células pré-crescidas em meio contendo D-glucose ou glicerol são inoculadas em um meio de cultivo contendo D-xilose, o nível máximo da XidH é induzida, respectivamente, após 15 e 23 horas de crescimento. Observa-se a indução da XidH após um curto período de "lag" atingindo o máximo na sua fase logarítmica de crescimento. Quando se usa células previamente adaptadas à D-xilose no "pré-inóculo"

culo" não há incremento na indução mantendo-se níveis constantes da XiDH durante toda a fase logarítmica de crescimento e decrescendo na fase estacionária do cultivo em D-xilose (Figura 19-C).

O crescimento do "pré-inóculo" num meio em presença de D-glucose ou glicerol não afeta o nível máximo da síntese da XiDH durante o crescimento das células em um meio contendo o indutor.

3.13. EFEITO DA ADIÇÃO SIMULTÂNEA DO INDUTOR E DE GLUCOSE OU GLICEROL SOBRE A CINÉTICA DE INDUÇÃO DA XiDH DE CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE

A Figura 20 mostra que a cinética de indução da síntese da XiDH por D-xilose é alterada, quando a indução é efetuada em presença simultânea de D-xilose e de glicerol ou D-glucose no sistema de indução. A adição simultânea de glicerol e D-xilose à uma suspensão de células jejuadas leva a formação de um período de "lag" (4 horas) da síntese da XiDH. Após este período a velocidade de formação da enzima aumenta e retomando àquela do sistema de indução na ausência de glicerol (controle).

A adição simultânea de D-glucose e de D-xilose ao sistema de indução demonstra que as células não sintetizam detectáveis quantidades de XiDH por um período de 4 horas, após o qual, estas células recuperam a capacidade de síntese à uma velocidade menor que à do sistema controle.

Este retardamento inicial da capacidade de síntese da XiDH mostrada na Figura 20 sugere uma repressão transitória.

3.14. EFEITO DA GLUCOSE SOBRE A XiDH INDUZIDA EM CÉLULAS DE
PULLULARIA PULLULANS EM CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE D-
XILOSE

A Figura 21 mostra que quando se adiciona D-glucose a um cultivo de células na fase exponencial de crescimento em presença de D-xilose, a atividade específica inicial que era de 630 mU/mg proteína decresce até 240 mU/mg proteína dentro de 5 horas de crescimento, ou seja, há perda de 62% da sua atividade. No entanto, as células em crescimento sem a presença de glucose (cultivo controle), continuam sintetizando a XiDH até o nível máximo em torno de 800 mU/mg proteína, a partir do qual passa a declinar naturalmente. Observa-se que o decréscimo na atividade específica da XiDH causada pela adição de glucose ao cultivo de células em crescimento, está abaixo da "curva teórica" que representa a diluição da enzima pré-existente pelo crescimento celular.

3.15. EFEITO DA GLUCOSE SOBRE A XiDH INDUZIDA EM CÉLULAS DE
PULLULARIA PULLULANS EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE

A Figura 22 mostra que células do microrganismo crescidas previamente em glicérol e induzidas pela xilose sintetizam XiDH em sua velocidade máxima, enquanto que aquelas expostas a duas concentrações diferentes de glucose no sistema contendo xilose, provocam inibição transitória das enzimas pré-existentes (um tipo de inibição catabólica transitória) e repressão do acúmulo adicional da enzima (repressão catabólica). Portanto, a adição de glucose ao sistema de indução da XiDH provoca um ti-

po de inibição catabólica transitória seguida por uma fraca repressão catabólica permanente. Este efeito é proporcional a concentração de glucose adicionada. Observa-se na Figura 22 que a inibição catabólica transitória da atividade de XiDH pela glucose inicia somente 1 hora após a adição deste açúcar. A atividade XiDH não é totalmente inibida e nem a indução é totalmente reprimida mesmo em presença de 1,3 vezes mais glucose que xilose no sistema de incubação.

3.16. EFEITO DA ADIÇÃO SIMULTÂNEA DE GLUCOSE E CICLOEXIMIDA SO BRE A XiDH INDUZIDA EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE

A Figura 23 mostra que a adição de cicloeximida simultaneamente com a glucose ao sistema de indução não impede que ocorra a inibição transitória da XiDH causada pela glucose. Portanto, este resultado sugere que não é necessária uma síntese protêica ativa para a inibição transitória da XiDH estimulada pela glucose. Além disso, observa-se que em presença de cicloeximida, este efeito inibitório sobre a XiDH é quase imediato, ao contrário do sistema de incubação com glucose sem a adição de cicloeximida. Cinco horas após a adição simultânea de glucose e cicloeximida há recuperação do nível da XiDH pré-existente, o qual é mantido constante pelo menos por 3 horas sem que haja síntese de novas moléculas de XiDH.

3.17. EFEITO DE REMOÇÃO DE GLUCOSE SOBRE A XiDH INDUZIDA POR D-XILOSE EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE

A Figura 24 mostra que quando células incubadas em presença de glucose são lavadas e resuspensas em tampão fosfato sem fonte de carbono, obtém-se uma reativação completa da atividade da XiDH. Esta reativação é completamente impedida pela adição de cicloeximida no tampão fosfato, sugerindo que uma síntese de proteína é necessária para o restabelecimento da atividade da XiDH. A figura mostra também que esta atividade recuperada da XiDH é totalmente perdida após 3 1/2 horas de incubação em tampão fosfato (sem a fonte de carbono). Quando as células incubadas em tampão fosfato contendo glucose são lavadas e resuspensas novamente no tampão contendo xilose, observa-se também uma completa reativação da atividade específica da enzima seguida de uma nova indução da XiDH.

3.18. EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUCOSE E CICLOEXIMIDAS SOBRE A XiDH PREVIAMENTE INDUZIDA AO MÁXIMO PELA XILOSE EM CÉLULAS EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE

A adição de D-xilose ou de D-glucose à suspensão de células em condições não-proliferantes, previamente crescidas em meio de DPE contendo D-xilose, não modifica o nível constante da atividade da XiDH (Figura 25). Esta atividade enzimática mantém-se constante desde o início da incubação até 10 horas após, a partir do qual passa a declinar lentamente. A adição simultânea de cicloeximida e glucose também não afeta os níveis máximos da XiDH previamente induzida. A enzima manteve-se estável, isto é, sem perda da atividade até pelo menos 7 horas de incubação em presença deste antibiótico.

3.19. EFEITO DA DIBUTIRIL AMPc SOBRE O "EFEITO DE GLUCOSE" ESTIMULADA DURANTE A INDUÇÃO DA XiDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE

A Figura 26 mostra que a adição de glucose à suspensão de células resulta numa inibição transitória seguida por uma repressão permanente. A adição de 3 mM de AMPc reverte a inibição transitória, bem como a repressão permanene aos níveis do controle (sistema com D-xilose). Com 1 mM deste nucleotídeo ocorre a reversão da inibição transitória e repressão permanente, mas em um nível menor que à do controle.

3.20. ANÁLISE PELA TÉCNICA DE IMUNODIFUSÃO DUPLA DA XiDH INIBIDA PELA GLUCOSE

A Figura 27 mostra que tanto a XiDH induzida pela D-xilose como a "inibida-reprimida" pela D-glucose forma uma única linha de precipitação com o anti-soro preparado contra a XiDH purificada. A intensidade destas linhas de precipitinas são semelhantes, apesar da enzima aplicada no orifício 3 e 4 do gel para a imunodifusão dupla estar "inibida-reprimida" em torno de 50%.

3.21. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE XILITOL SOBRE A ATIVIDADE DA XILITOL DESIDROGENASE DE CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* INCUBADAS COM D-XILOSE E COM D-GLUCOSE

Efetuuou-se o experimento mostrado nas Figura 28 e 29, com o intuito de verificar se a atividade da XiDH obtida de células incubadas em presença de glucose é devida somente a moléculas de XiDH que ainda não sofreram o "efeito da glucose" (considerando que aquelas que sofreram este efeito estariam totalmente sem atividade), ou a uma população de enzimas que estão sob diferentes estágios do efeito deste açúcar e que ainda conservam uma pequena atividade remanescente, com aquelas que não foram "inibidas-reprimidas".

A Figura 28 mostra o efeito da concentração de xilitol sobre a atividade da XiDH induzida em estado não proliferante e de células incubadas por 4 horas em presença de glucose. Os valores de K_m aparente obtidas pelo gráfico de Lineweaver-Burk⁽⁷⁰⁾ foram 8,00 mM e 6,06 mM, respectivamente, para as enzimas sem e com "inibição-repressão". O comportamento da enzima após o "efeito da glucose" permanece ser do tipo michaeliano.

3.22. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NAD^+ SOBRE A ATIVIDADE DA XILITOL DESIDROGENASE DE CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* INCUBADAS COM D-XILOSE E COM D-GLUCOSE

A Figura 29 mostra o efeito da concentração de NAD^+ sobre a atividade da XiDH induzida em estado não proliferante e de células incubadas por 4 horas em presença de glucose. O comportamento das enzimas é do tipo michaeliano, sendo que os va-

lores de K_m aparente obtidos, pelo gráfico dos inversos⁽⁶⁹⁾, é de 0,14 e 0,18 mM, respectivamente para as XiDHs sem e com o "efeito da glucose".

TABELA 1: Purificação da xilitol desidrogenase de células de *Pullularia pullulans*.

ETAPAS DE PURIFICAÇÃO	VOLUME TOTAL (ml)	UNIDADE/ml	PROTEÍNA (mg/ml)	UNIDADES TOTAIS	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/mg proteína)	PURIFICAÇÃO	RENDIMENTO (%)
Extrato bruto	19,0	8,0	12,30	152,0	0,6	-	100,0
Sobrenadante de sulfato de protamina	20,0	6,4	7,00	128,0	0,9	1,5	84,2
Precipitado de 40-70% saturação de sulfato de amônio	2,5	43,8	19,28	109,5	2,3	3,8	72,0
Eluato da coluna de gel Sephadex G-150	28,3	1,5	0,35	42,5	4,3	7,1	28,0
Eluato da coluna de DEAE-celulose	13,0	1,6	0,13	20,8	12,3	20,5	13,7
Eluato da coluna de "blue-Sepharose" CL-6B	16,4	0,7	0,029	11,5	24,1	40,2	7,6

TABELA 2: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento e a atividade de xilitol desidrogenase de *PULLULARIA PULLULANS*

FONTE DE CARBONO (0,5%)	TEMPO DE GERAÇÃO (h)	VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO (a) (h^{-1})	ATIVIDADE ESPECÍFICA (b) (mU x mg proteína ⁻¹)
D-glucose	2,0	0,35	0
D-xilose	3,0	0,23	197
D-manitol	3,0	0,23	4
D-galactose	4,6	0,15	0,30
glicerol	5,3	0,13	0
Succinato de sódio	5,8	0,12	0
D-arabinose	8,1	0,09	3
D-ribose	11,5	0,06	0

(a) estes valores representam a média de 2 ou mais experimentos.

(b) enzimas obtidas de células crescidas até a fase exponencial final em fontes de carbono acima listados e não submetidas ao processo de jejum.

O tempo de geração, a velocidade específica de crescimento e a atividade específica foram calculados a partir das curvas das Figuras 13 e 14, utilizando as equações descritas no ítem 2.4.3. de Materiais e Métodos.

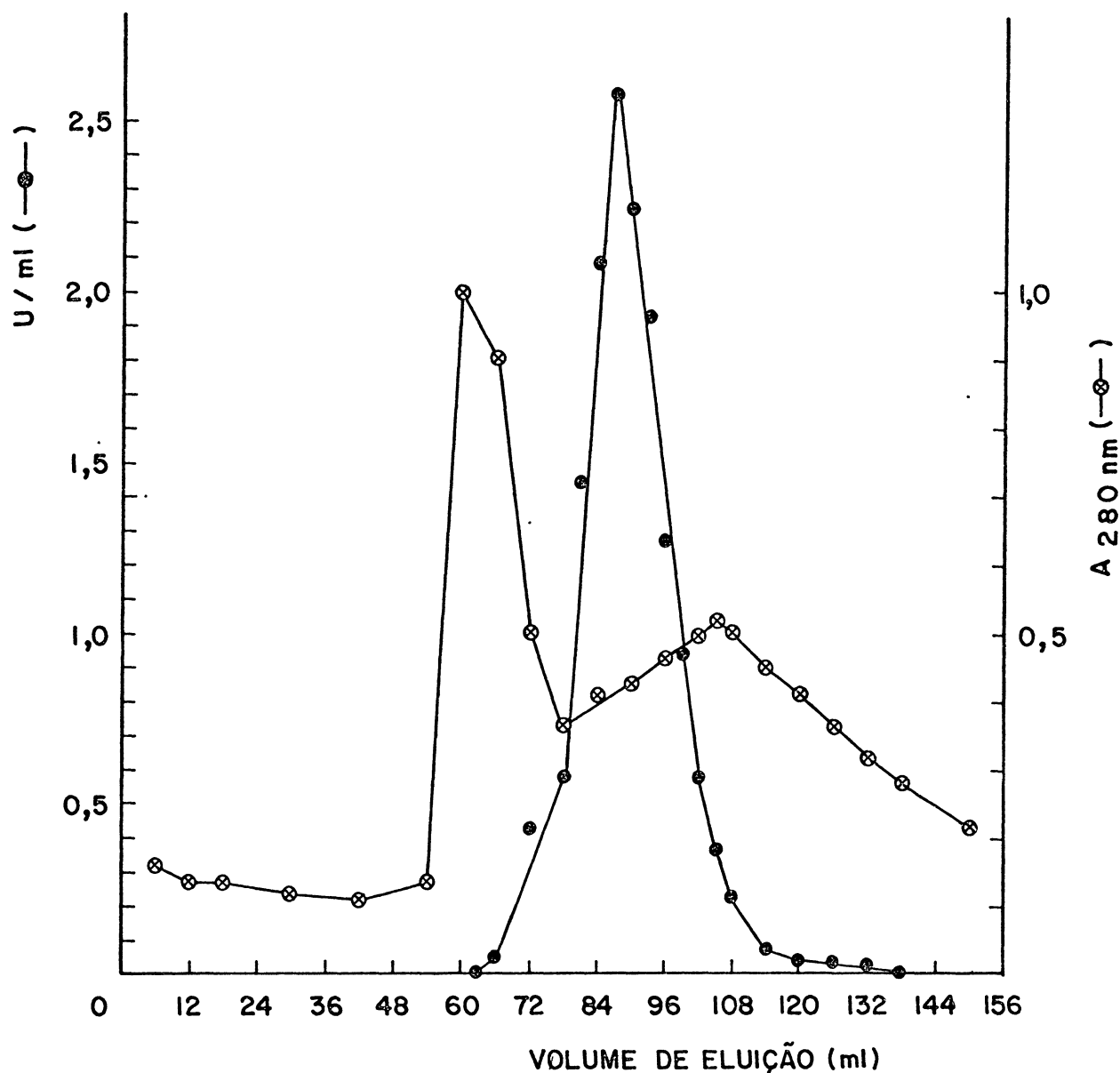


Figura 1 - CROMATOGRAFIA EM GEL SEPHADEX G-150.

A coluna de gel Sephadex G-150 (2,6 x 36,5 cm) foi previamente equilibrada com tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 contendo 1 mM de 2-mercaptoetanol. Foram aplicadas à coluna 109,5 unidades de enzima (2,5 ml) obtidas por precipitação com sulfato de amônio entre 40-70% de saturação. A eluição da enzima foi efetuada com tampão de equilíbrio, com fluxo de 0,36 ml/min. e acompanhada a 280 nm (—○—). A atividade enzimática foi medida em cada fração de 3,2 ml (—●—).

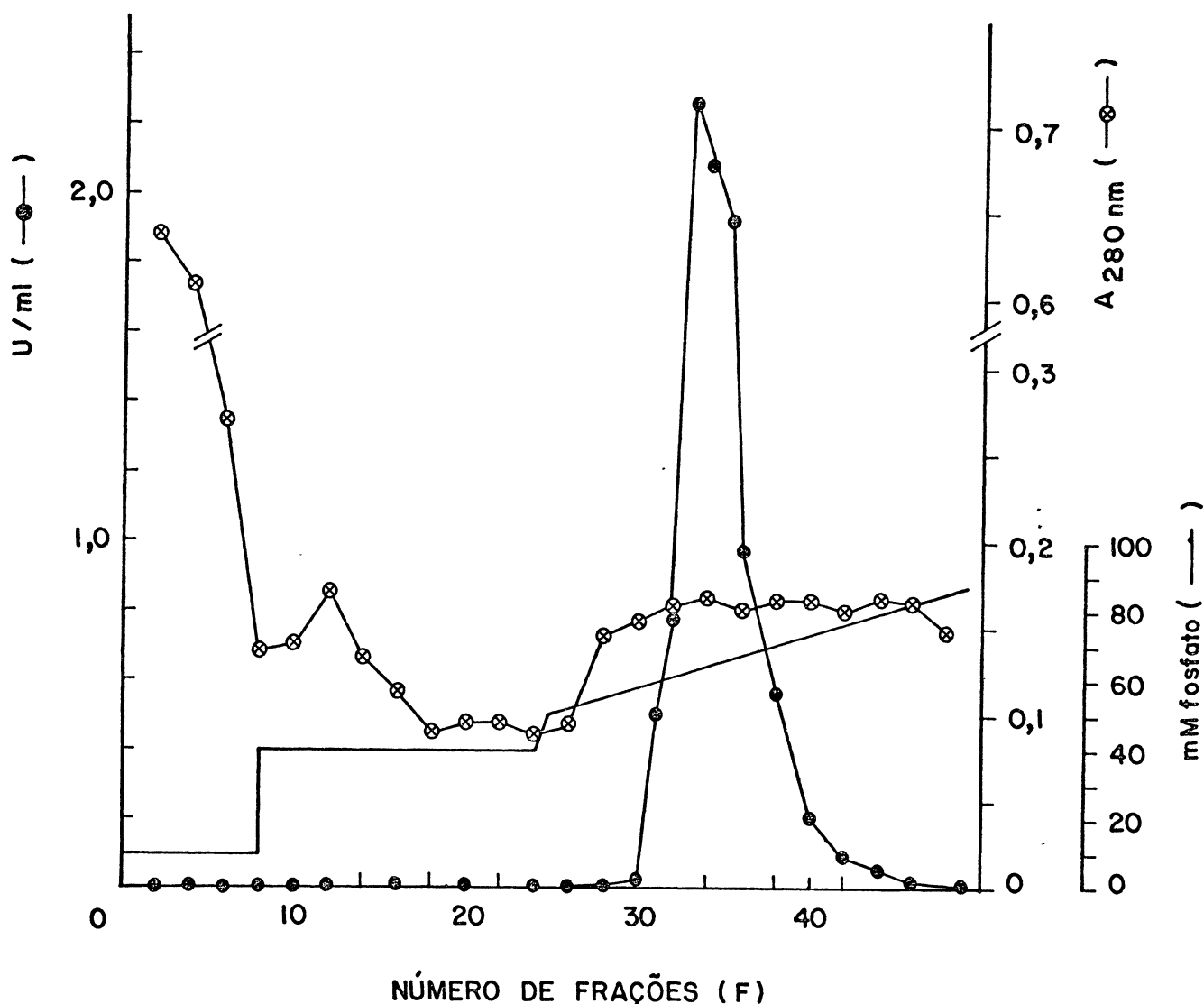


Figura 2 - CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-CELULOSE.

A coluna de DEAE-celulose (3 x 3,5 cm) foi previamente equilibrada com tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 contendo 1 mM de 2-mercaptoetanol. Foram aplicadas à coluna 73,6 unidades de enzima, num volume de 28,3 ml obtidas na etapa de filtração em coluna de Sephadex G-150. Após a lavagem da coluna com 65 ml de tampão fosfato 40 mM, pH 7,0 contendo 1 mM de 2-mercaptoetanol e coletadas em frações de 4,2 ml (F₁ a F₂₀), a eluição da enzima foi efetuada com um gradiente de tampão fosfato entre as concentrações de 50 a 90 mM num volume total de 100 ml e coletadas frações de 3,0 ml, a partir da fração 21.

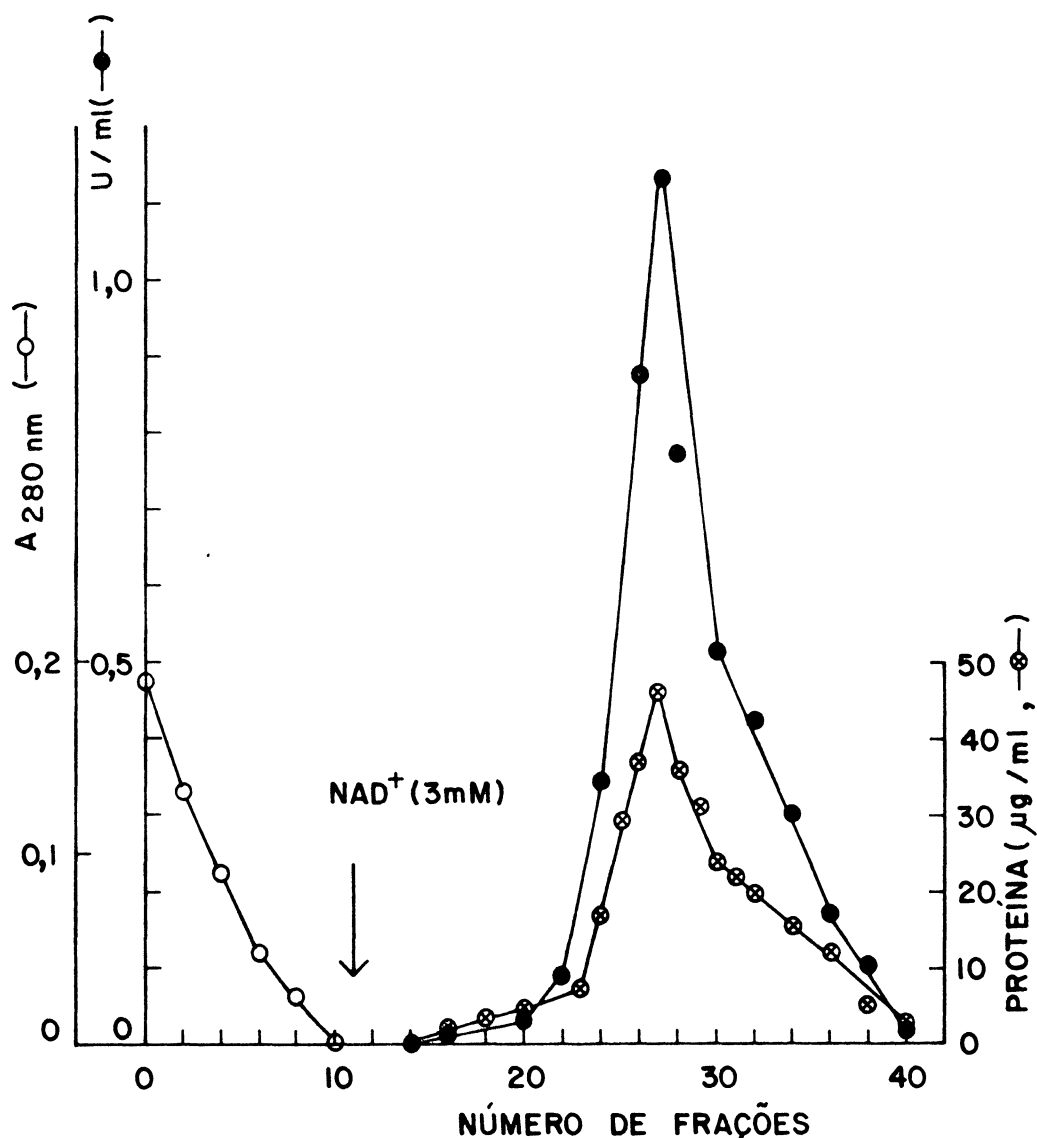


Figura 3 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM "BLUE SEPHAROSE" CL-6B.

A coluna de "Blue Sepharose" CL-6B (1,8 x 25 cm) foi equilibrada com tampão fosfato 10 mM, pH 8,0. Foram aplicadas à coluna 20,8 unidades de enzima num volume de 13 ml. A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio até que a absorvância a 280 nm (—○—) dos eluatos fossem iguais a 0,003 unidade (cerca de 3 vezes o volume da resina). As frações coletadas (F₁ a F₁₀) eram de 12 ml/tubo. A eluição da enzima (—●—) foi efetuada com solução de NAD⁺ 3 mM em tampão de equilíbrio, com fluxo de 1,5 ml/min. e coletadas em frações de 2,0 ml, a partir da fração 11.

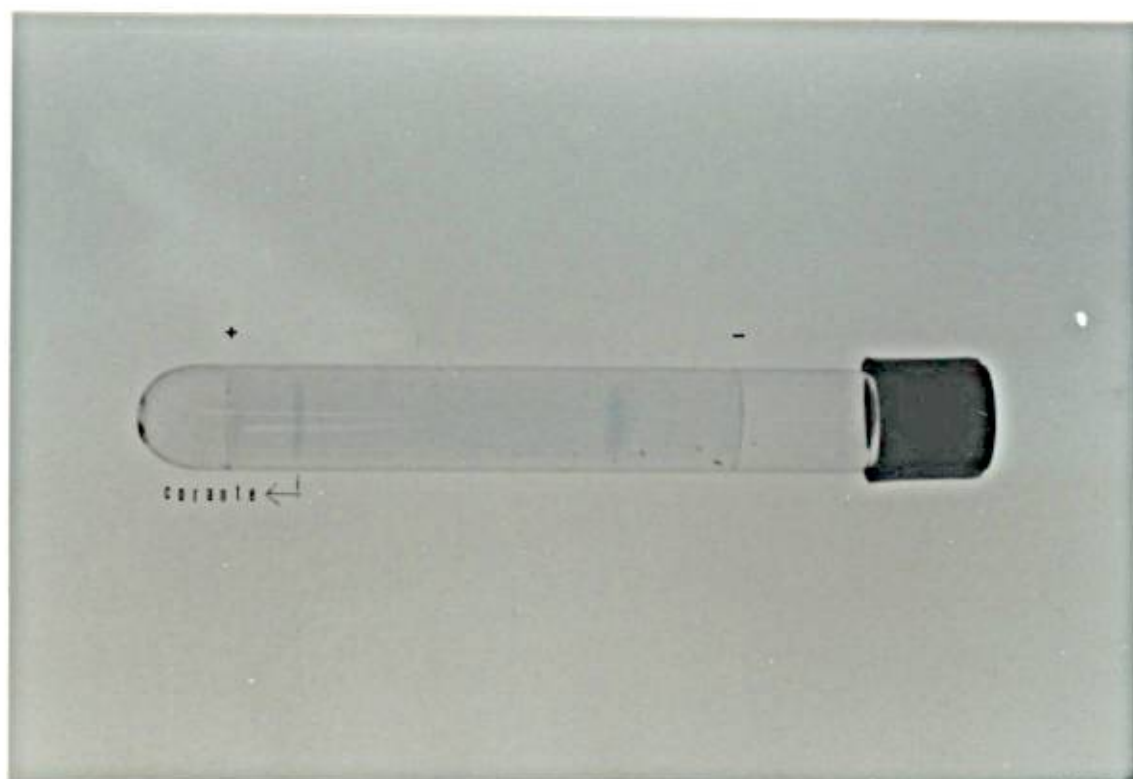


Figura 4 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

A eletroforese foi efetuada em gel de poliacrilamida a 7% (polimerizada com persulfato de amônio) em tampão Tris/borato 0,065M, pH 9,0 durante 1 1/2 horas e corrente de 5 mA/gel. A proteína foi revelada com "coomassie brilliant blue" G-250.



Figura 5 - IMUNODIFUSÃO DE OUCHTERLONY.

No orifício central foi aplicado 50 μ l de imunosoro anti-XiDH purificado de *Pullularia pullulans* e nos periféricos foram aplicados diferentes preparações de XiDH:

1= 50 μ l (29 mU) de XiDH purificada e homogênea.

2 e 4 =25 μ l (70,8 mU) de XiDH parcialmente purificada.

3 =25 μ l (2,4mU) de extrato livre de células

As linhas de precipitinas foram coradas com "coomassie brilliant blue" G-250.

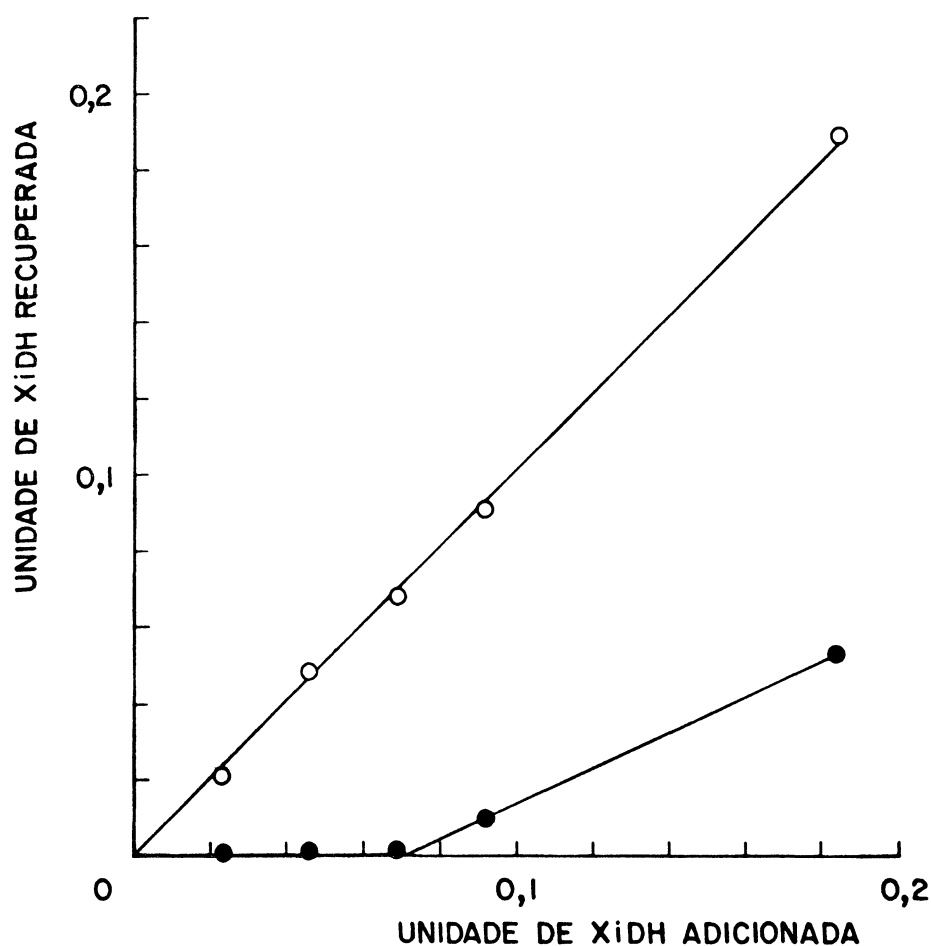


Figura 6 - DETERMINAÇÃO DO PONTO DE EQUIVALÊNCIA ENTRE A XILITOL DESIDROGENASE E SEU RESPECTIVO ANTICORPO.

As quantidades de xilitol desidrogenase indicadas na figura foram incubadas com 10 μ l de soro controle (—○—) ou com 10 μ l de imunossoro (—●—). Após a incubação a 30°C por 4 horas e a seguir a 4°C por 14 horas, os precipitados foram eliminados para dosagens da atividade enzimática.

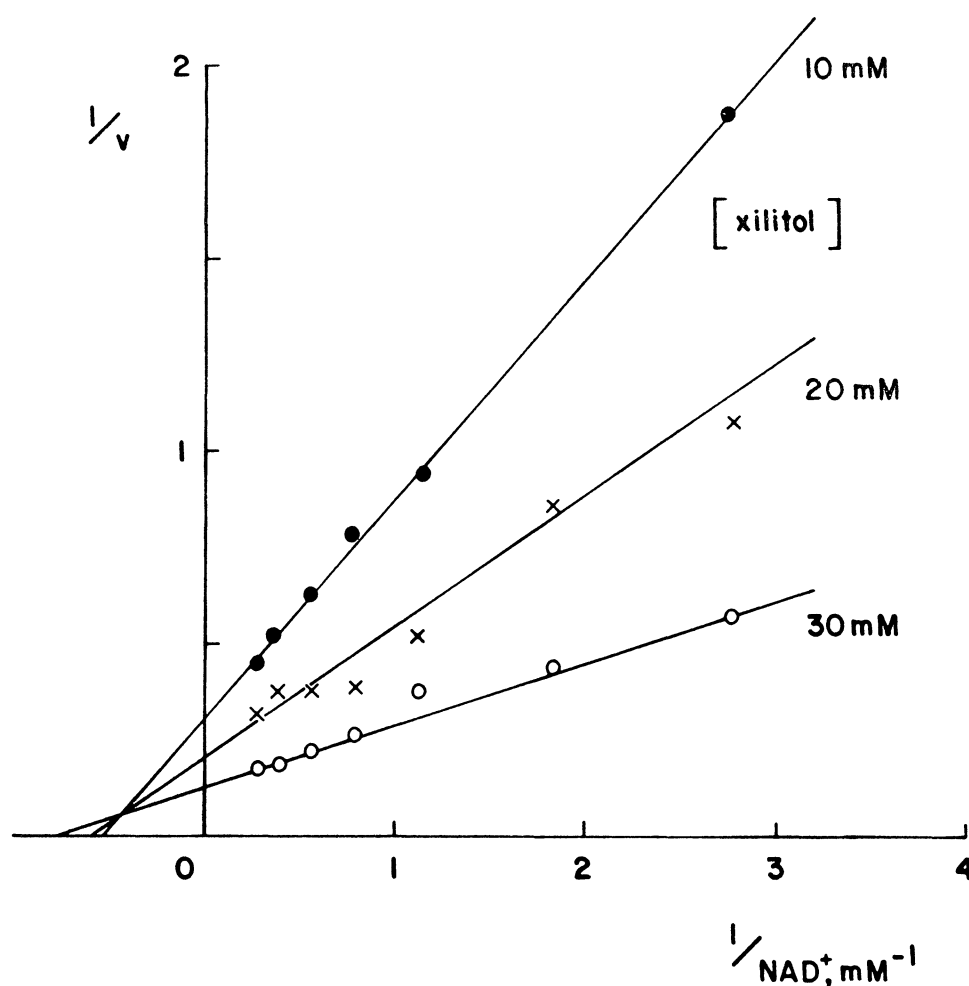


Figura 7 - GRÁFICO DA INFLUÊNCIA DE VÁRIAS CONCENTRAÇÕES FIXAS DE XILITOL SOBRE A VELOCIDADE INICIAL DA ATIVIDADE DA XiDH, EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE NAD^+ .

A atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente a 340 nm a pH 9,6 em 25 mM de tampão glicina/NaOH; 8,0 mU de XiDH purificada e concentrações de NAD^+ entre 0,36 a 3,6 mM e xilitol de 10, 20 e 30 mM. A velocidade da reação está expressa em μ moles de NADH formados por minuto por ml de sistema.

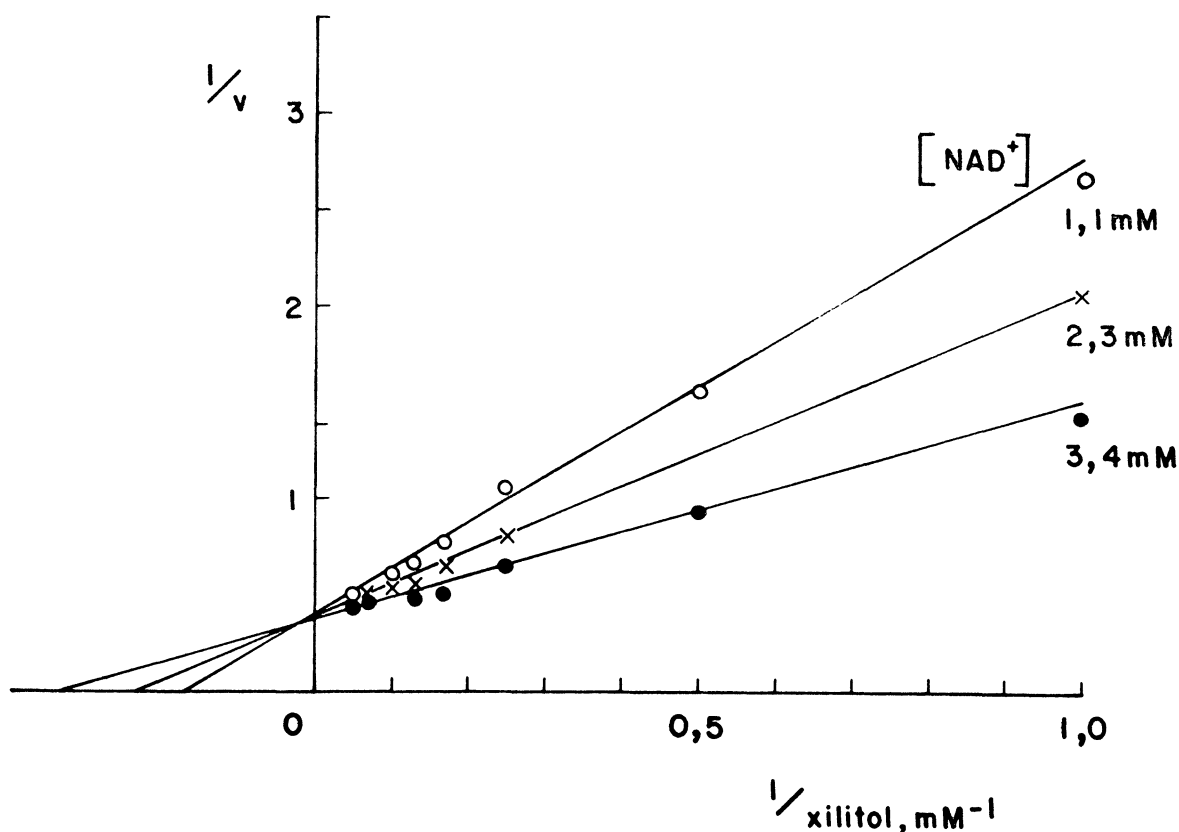


Figura 8 - GRÁFICO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FIXAS DE NAD^+ SOBRE A VELOCIDADE INICIAL DA ATIVIDADE DA XiDH, EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE XILITOL.

A atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente a 340 nm em pH 9,6 em 25 mM de tampão glicina/NaOH; 9,8 mU de XiDH purificada e concentrações de xilitol entre 1,0 a 20,0 mM e NAD^+ de 1,1; 2,3 e 3,4 mM. A velocidade da reação está expressa em μ moles de NADH formados por minuto por ml de sistema.

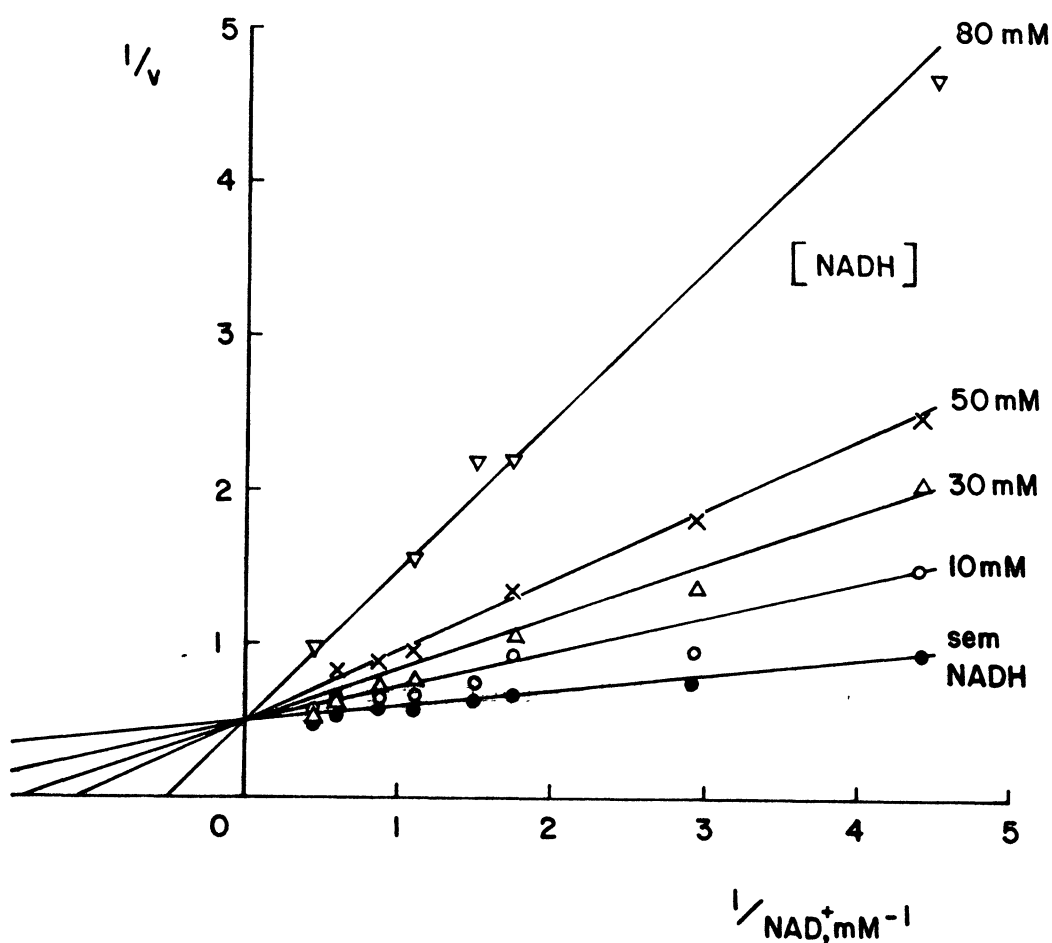


Figura 9 - GRÁFICO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA XILITOL DESIDROGENASE PELO PRODUTO DA REAÇÃO NADH A VÁRIAS CONCENTRAÇÕES FIXAS, EM RELAÇÃO AO NAD^+ COMO SUBSTRATO VARIÁVEL.

A atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente a 340 nm a pH 9,6 em 25 mM de tampão glicina/NaOH; 10,4 mU de XiDH; 20 mM de xilitol; concentrações de NAD^+ entre 0,23 a 2,27 mM e 10; 30; 50 e 80 μM de NADH. A velocidade da reação está expressa em $\mu moles$ de NADH formados por minuto por ml de sistema.

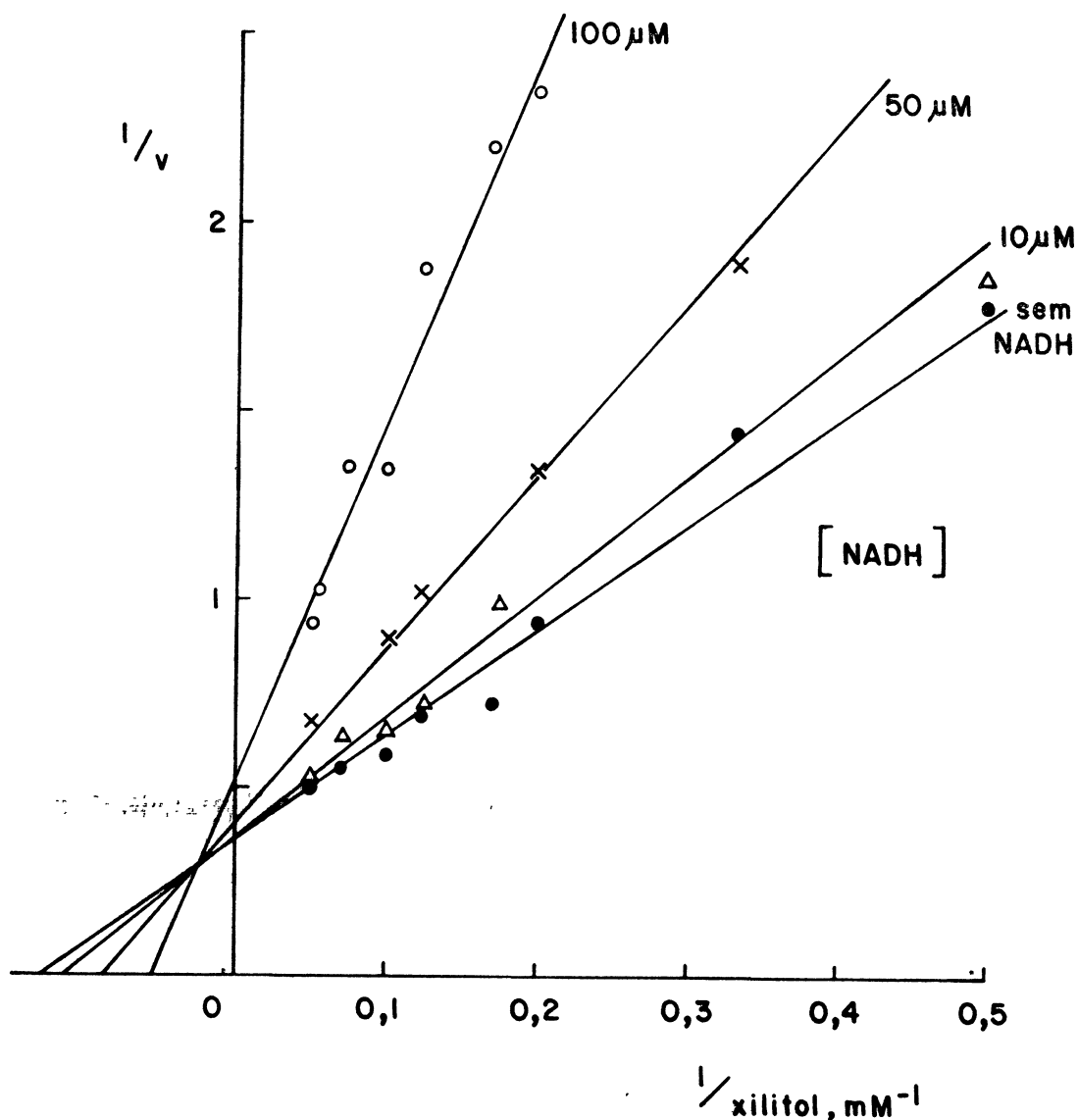


Figura 10 - GRÁFICO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE XidH PELO PRODUTO DA REAÇÃO NADH A VÁRIAS CONCENTRAÇÕES FIXAS, EM RELAÇÃO AO XILITOL COMO SUBSTRATO VARIÁVEL.

A atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente a 340 nm a pH 9,6 em 25 mM de tampão glicina/NaOH; 10,4 mU de XidH purificada; 2,3 mM de NAD^+ ; concentrações de xilitol entre 2 a 20 mM e 10; 50 e 100 μM de NADH. A velocidade da reação está expressa em μ moles de NADH formados por minuto por ml de sistema.

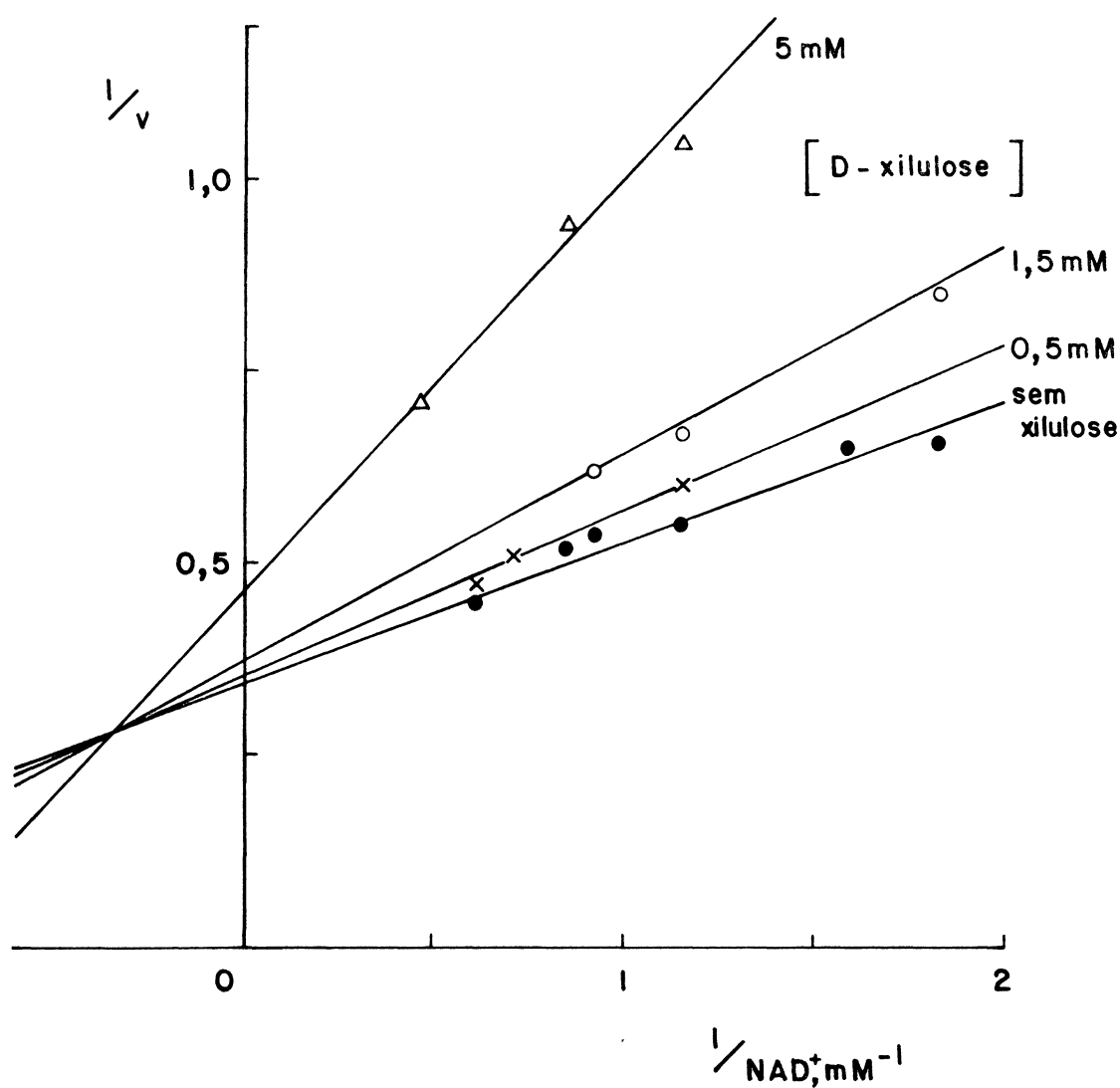


Figura 11 - GRÁFICO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA XIDH PELO PRODUTO DA REAÇÃO D-XILULOSE (A VÁRIAS CONCENTRAÇÕES FIXAS), EM RELAÇÃO AO NAD^+ COMO SUBSTRATO VARIÁVEL.

A atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente a 340 nm a pH 9,6 em 25 mM de tampão glicina/NaOH; 10,6 mU de XidH purificada; 20 mM de xilitol; concentrações de NAD^+ entre 0,55 a 2,18 mM e 0,5; 1,5 e 5 mM de D-xilulose. A velocidade de reação está expressa em μ moles de NADH formados por minutos por ml de sistema.

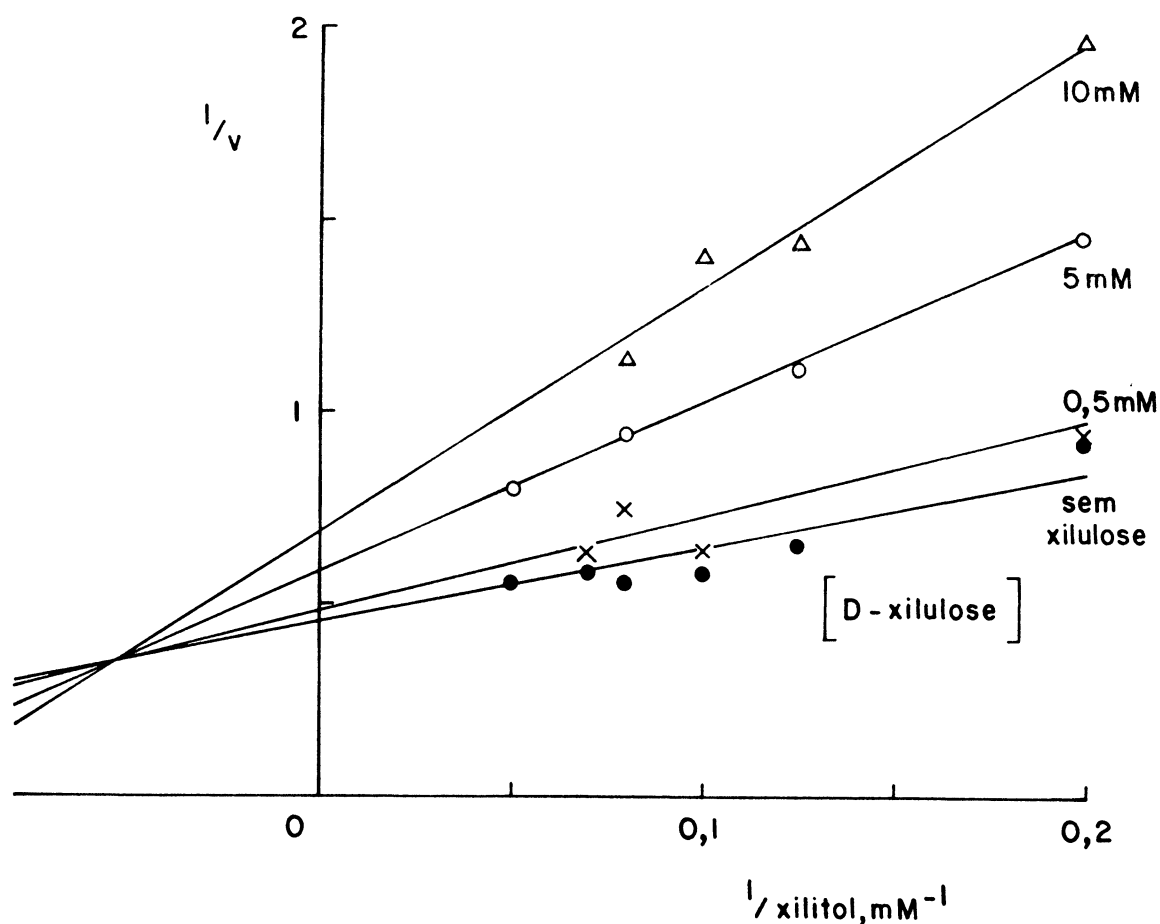


Figura 12 - GRÁFICO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA XiDH PELO PRODUTO DA REAÇÃO D-XILULOSE A VÁRIAS CONCENTRAÇÕES FIXAS EM RELAÇÃO AO XILITOL COMO SUBSTRATO VARIÁVEL.

A atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente a 340 nm a pH 9,6 em 25 mM de tampão glicina/NaOH; 10,6 mU de XiDH ; 2,2 mM de NAD^+ ; concentrações de xilitol entre 5 a 20 mM e 0,5; 5,0 e 10 mM de D-xilulose. A velocidade da reação está expressa em μ moles de NADH formados por minuto por ml de sistema.

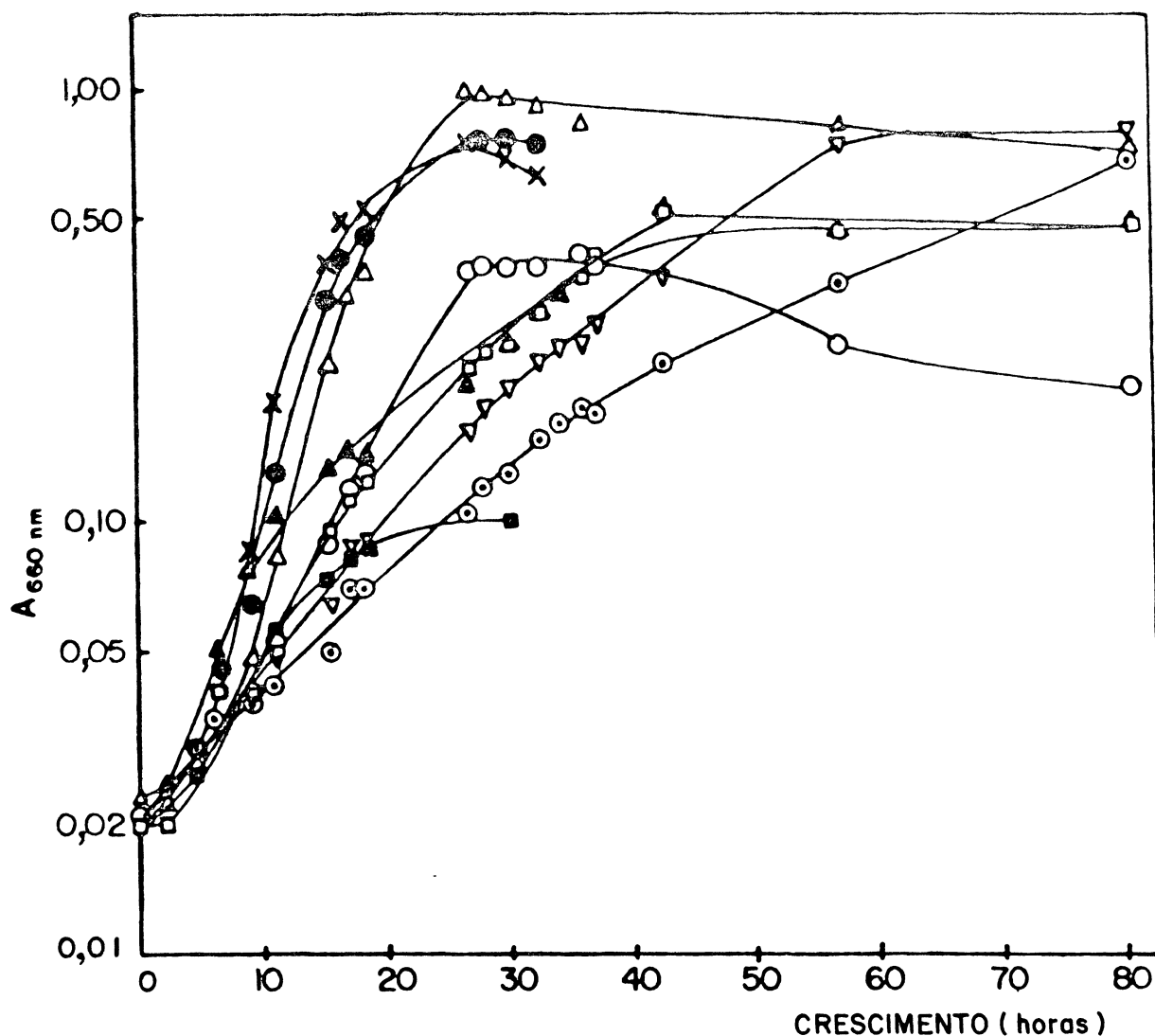


Figura 13 -CURVAS DE CRESCIMENTO DE *PULLULARIA PULLULANS* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.

As células foram crescidas em meio D.P.E. contendo extrato de levedura 0,1%, como descrito em Materiais e Métodos. As fontes de carbono (0,5%) usadas para o crescimento foram: —●—, D-xilose; —x—, D-glucose; —△—, D-manitol; —▽—, D-arabinose; —○—, D-ribose; —□—, glicerol; —▲—, D-galactose; —⊙—, succinato de sódio; —■—, sem adição de fonte de carbono. As densidades celulares foram medidas a 660 nm usando espectrofotometro Coleman Jr.

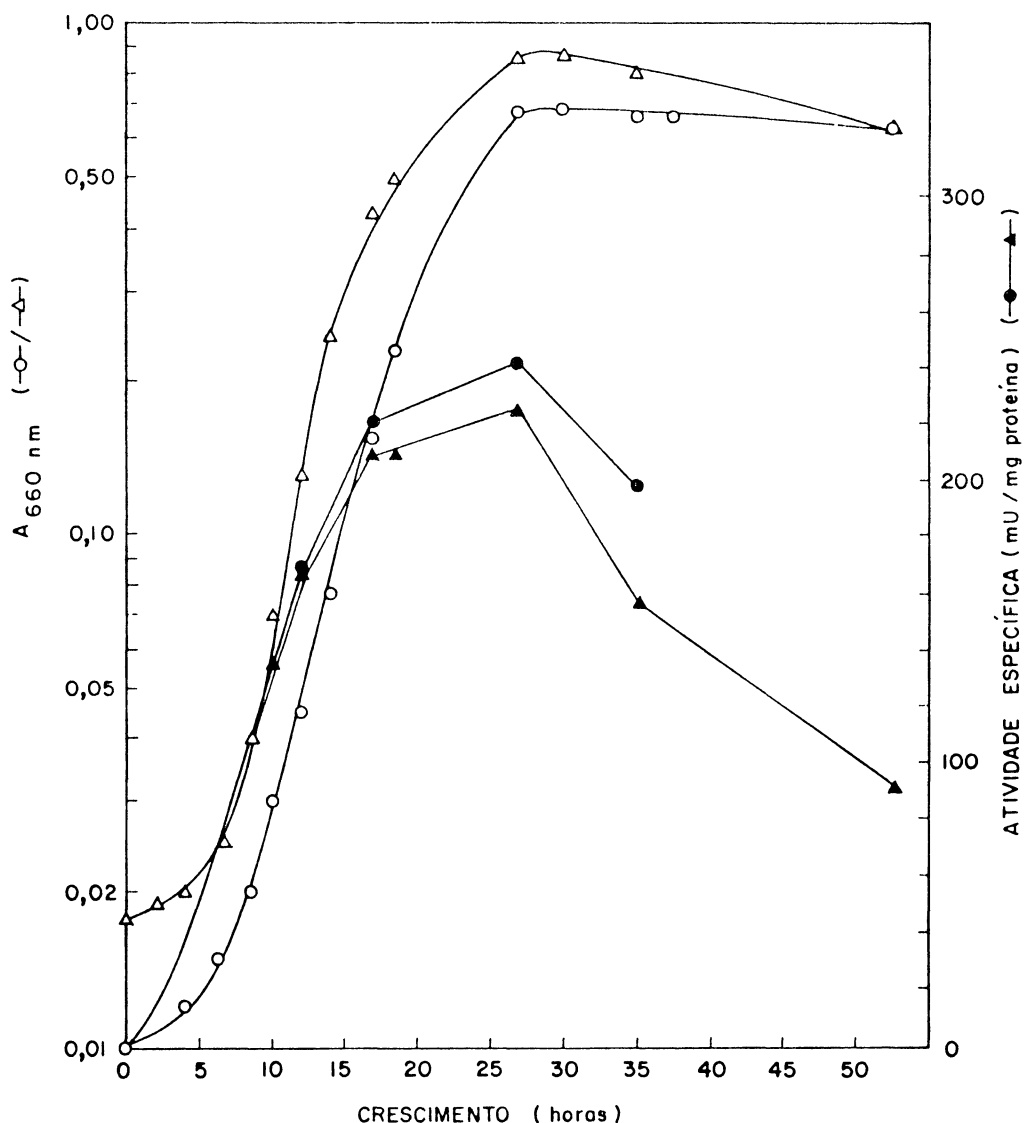


Figura 14 - RELAÇÃO ENTRE O CRESCIMENTO E A SÍNTESE DA XiDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* COMO UMA FUNÇÃO DO TEMPO.

D-Xilose (0,5%) foi adicionada ao tempo zero do crescimento em meio D.P.E. contendo 0,4 mg % de tiamina (meio definido (—○—) ou 0,1g% de extrato de levedura (—△—). Nos intervalos de tempo indicados foram coletadas amostras de células e as atividades da XiDH (—●—) em presença de tiamina; (—▲—) em presença de extrato de levedura foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos.

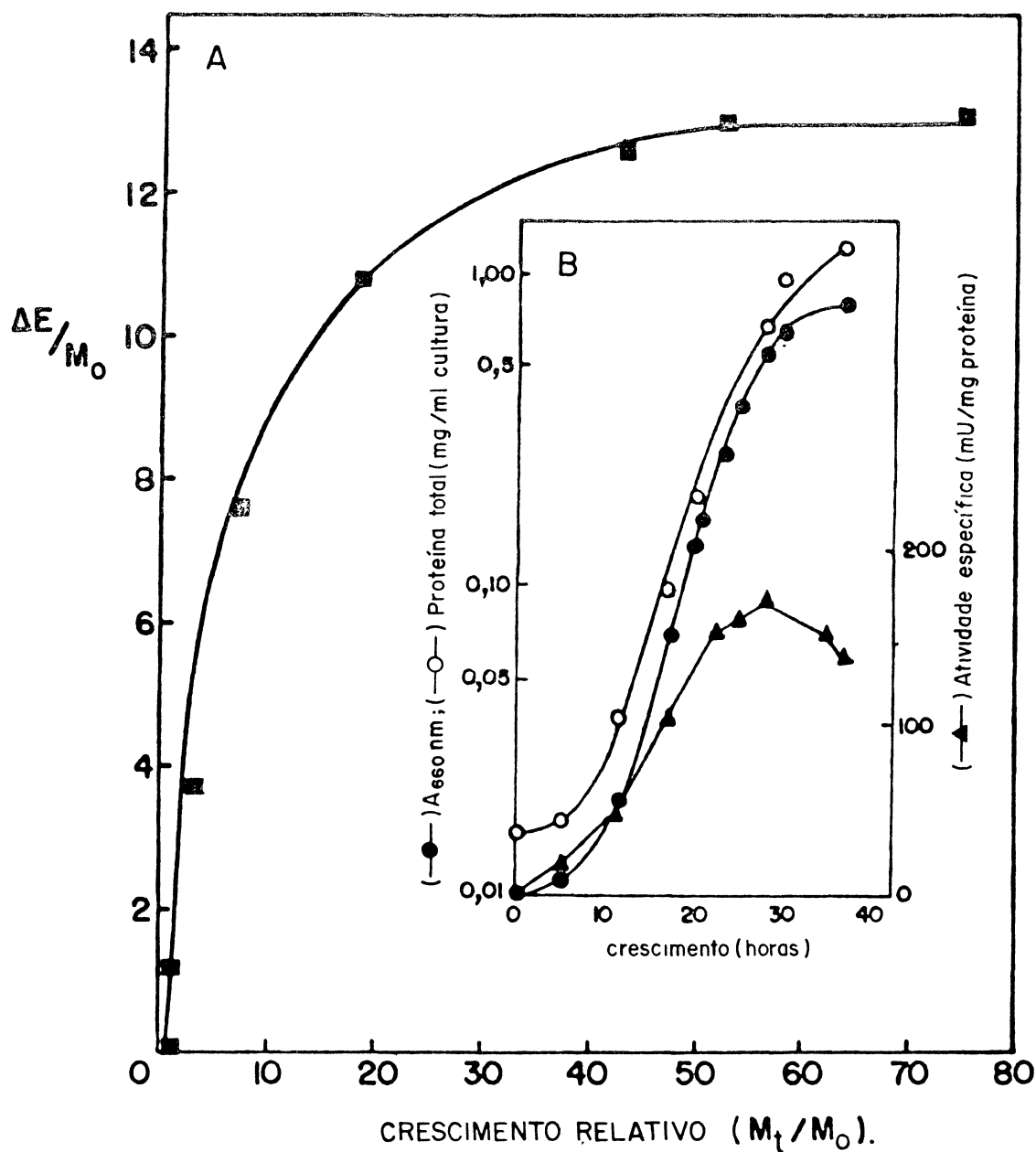


Figura 15 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DIFERENCIAL DE SÍNTESE DA XIDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM CRESCIMENTO.

A : ΔE = aumento da síntese enzimática a um dado tempo; M_0 = proteína das células presentes no início do cultivo; M_t = proteína das células presentes a um dado tempo. Os dados mostrados na Fig.15A foram obtidos da Fig.15B. B : As células foram crescidas em meio definido (—●—) sob as mesmas condições descritas em Materiais e Métodos. Amostras de cultivo foram coletadas para o ensaio enzimático (—▲—) e determinação de proteínas totais (—○—).

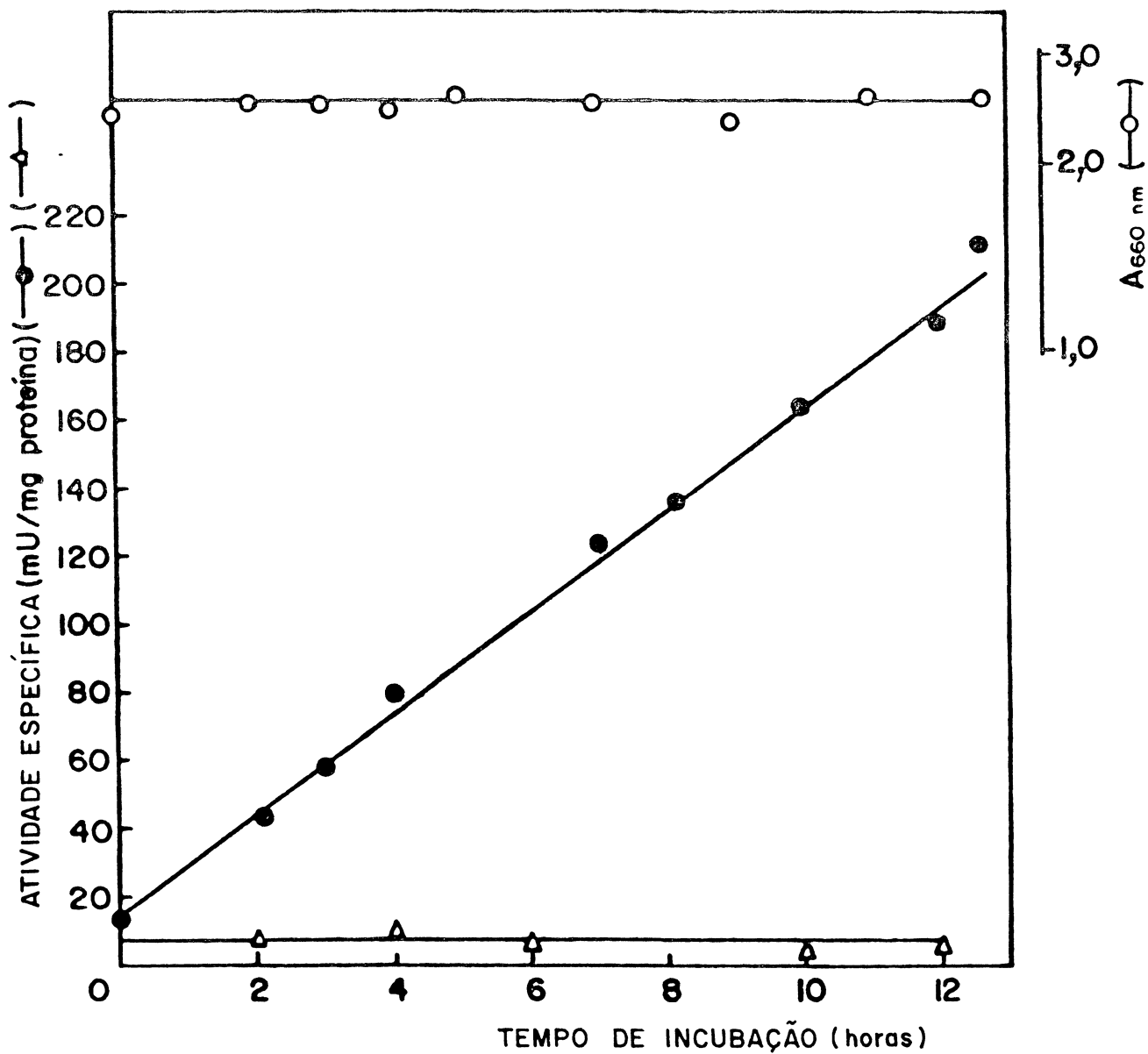


Figura 16 - CINÉTICA DE INDUÇÃO DA SÍNTESE DA XiDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE.

Células de *Pullularia pullulans* pré-crescidas em glicérol foram suspensas em tampão fosfato como descrito em Materiais e Métodos. A densidade celular foi acompanhada a 660 nm (—○—). A atividade da XiDH foi determinada em células sem a adição de D-xilose (—△—) e em células induzidas com 1,5% de D-xilose (—●—).

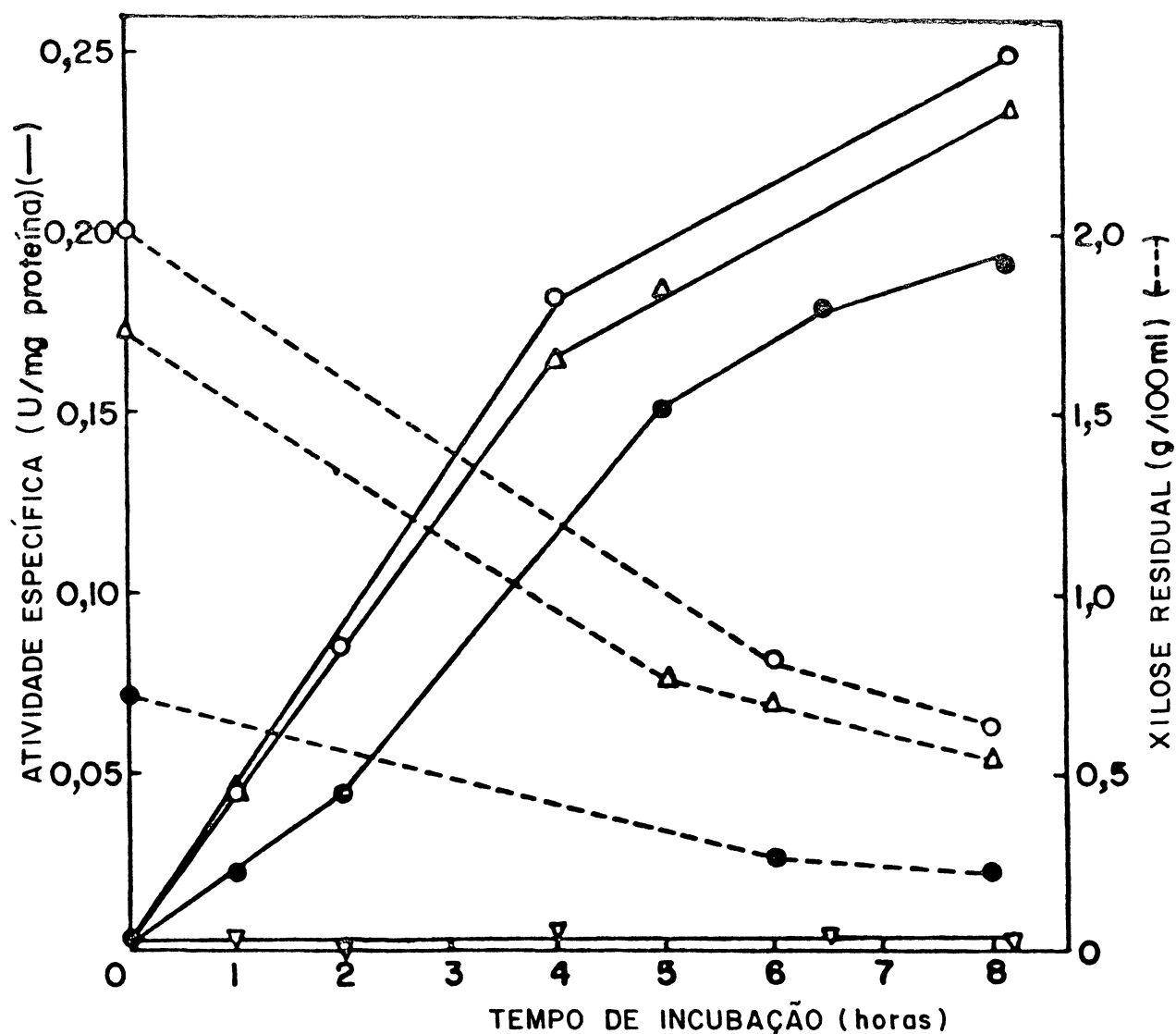


Figura 17 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO INDUTOR SOBRE A CINÉTICA DE INDUÇÃO DA SÍNTESE DA XIDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE.

Células de *Pullularia pullulans* pré-crecidas em glicérol, suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,6 foram incubadas em presença das seguintes concentrações iniciais de D-xilose : ∇ , 0%; \bullet , 0,7%; \triangle , 1,7%; \circ , 2%. Amostras de células foram coletadas para a determinação da atividade da XidH (\bullet \triangle \circ) e do desaparecimento de D-xilose no meio de indução ($-\bullet-$ $-\triangle-$ $-\circ-$).

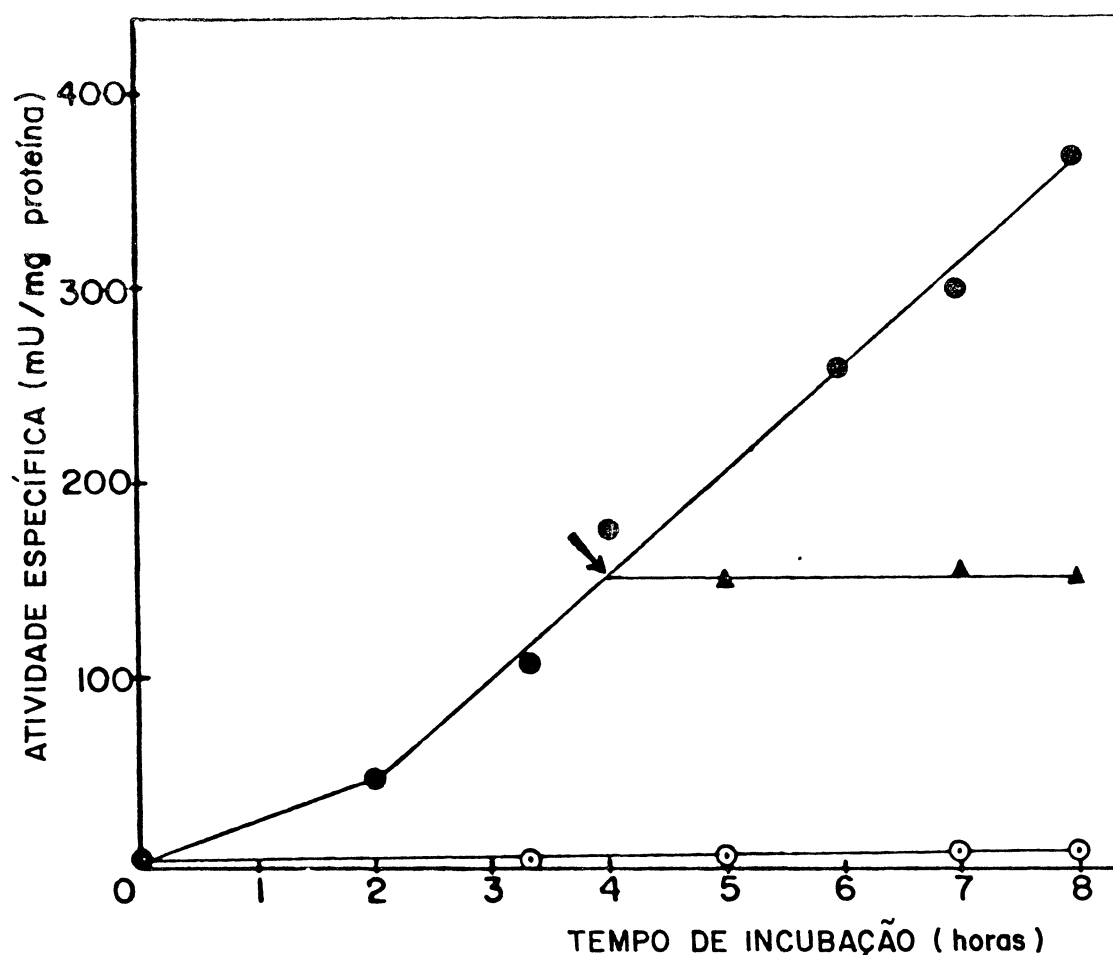


Figura 18 - EFEITO DA CICLOEXIMIDA SOBRE A INDUÇÃO DA SÍNTESE DA XILITOL DESIDROGENASE EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO PROLIFERANTE.

As células foram pré-crescidas em glicerol, jejuadas e suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,6 como descrito em Materiais e Métodos. A atividade da XiDH foi medida em presença de: —●—, 0,5% de D-xilose; —▲—, 0,5% de D-xilose mais 20 µg/ml de cicloeximida, adicionada após 4 horas de indução; —○—, 0,5% de D-xilose mais 20 µg/ml de cicloeximida adicionada no tempo zero da indução.

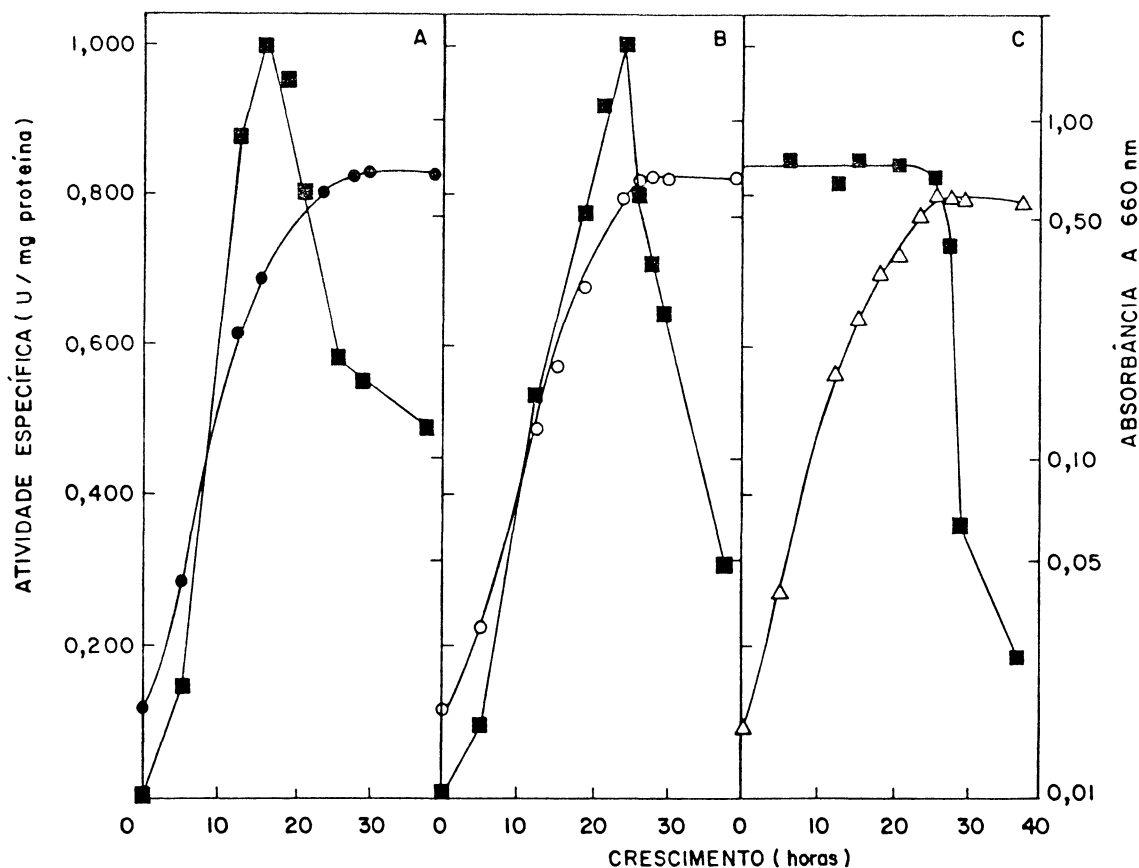


Figura 19 - EFEITO DO INÓCULO, CRESCIDO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO, SOBRE A INDUÇÃO DA XIDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM CRESCIMENTO.

Os inóculos foram crescidos até o final da fase exponencial em meio D.P.E. contendo um dos seguintes açúcares: (A) D-glucose; (B) glicerol; (C) D-xilose. Após, as células foram coletadas, lavadas e suspensas em um volume igual ao inicial de meio D.P.E. sem fonte de carbono. Esta suspensão celular foi inoculada em meio D.P.E. contendo 0,5% de D-xilose para o crescimento. Amostras de células foram coletadas nos tempos indicados para a determinação enzimática (—■—) e crescimento celular: —●—, inóculo crescido em 0,5% de glucose e induzido com 0,5% de D-xilose; —○—, inóculo crescido em 0,5% de glicerol e induzido com 0,5% de D-xilose; —△—, inóculo crescido e induzido em 0,5% de D-xilose.

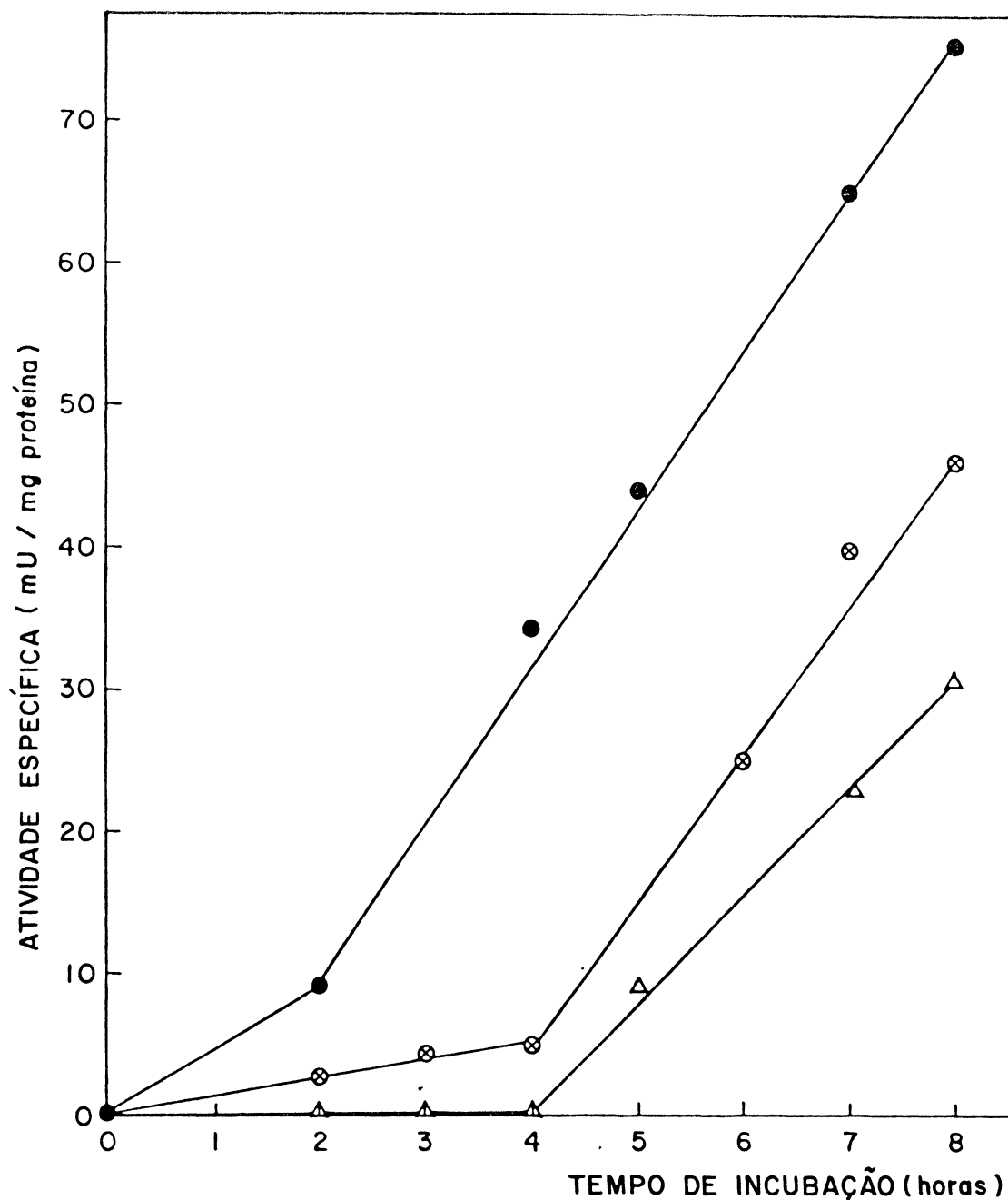


Figura 20 - EFEITO DA PRESENÇA SIMULTÂNEA DE D-XILOSE E DE GLUCOSE OU GLICEROL SOBRE A CINÉTICA DE INDUÇÃO DA XILH DE CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE.

As células foram previamente crescidas em glicerol, jejuadas e suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,6 como descrito em Materiais e Métodos. A indução foi iniciada adicionando-se: 0,5% de D-xilose, —●— ; 0,5% D-xilose mais 0,5% de glicerol, —⊗— ; 0,5% de D-xilose mais 0,5% de D-glucose, —△— .

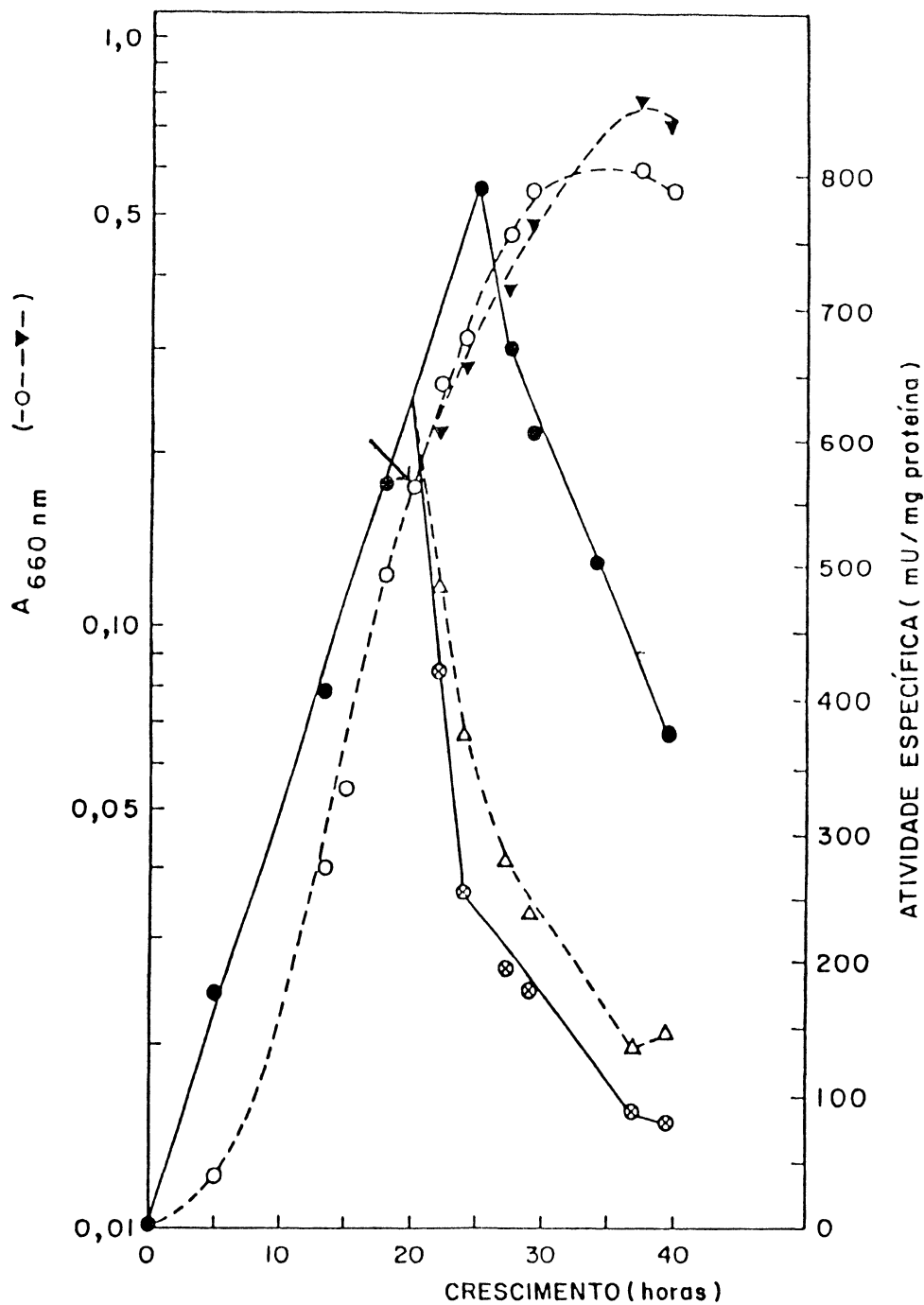


Figura 21 - EFEITO DA GLUCOSE SOBRE A INDUÇÃO DA XiDH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE D-XILOSE.

As células foram crescidas em meio DPE contendo 0,5% de D-xilose (-○-) como descrito em Materiais e Métodos. No tempo indicado pela seta, o cultivo foi separado em duas porções. Uma delas serviu de controle (-○-) e à outra foi adicionada 2% de glicose (-▼-). Foram determinadas as atividades da XiDH no cultivo controle (-●-) e após a adição de glicose (-⊗-); curva teórica que representa a diluição pelo crescimento, das enzimas pré-existentes (---△---).

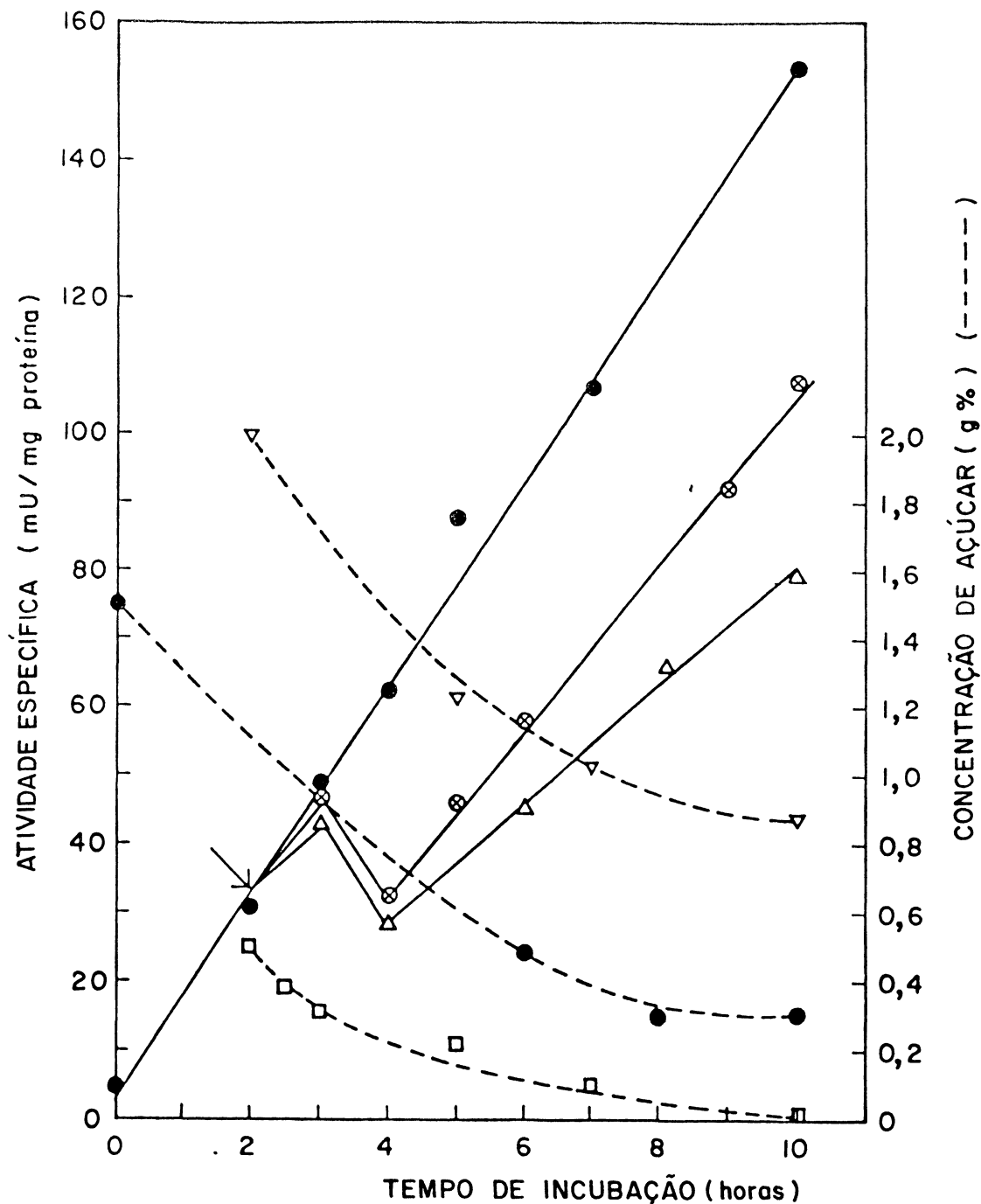


Figura 22 - EFEITO DA GLUCOSE SOBRE A INDUÇÃO DA XidH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE.

As células foram pré-crescidas em meio DPE com glicérol, jejuadas e suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,6 como descrito em Materiais e Métodos. A indução foi iniciada pela adição de 1,5% de D-xilose. Após 2 horas de incubação a suspensão celular foi dividida em 3 partes. Uma delas serviu de controle (—●—) e nos demais foram adicionados 0,5% e 2% de D-glucose, (—⊗—, —▲—). Foram determinados os açúcares residuais no sistema de indução: —●—, D-xilose residual no controle; —▼— e —□—, D glucose residual no sistema de indução.

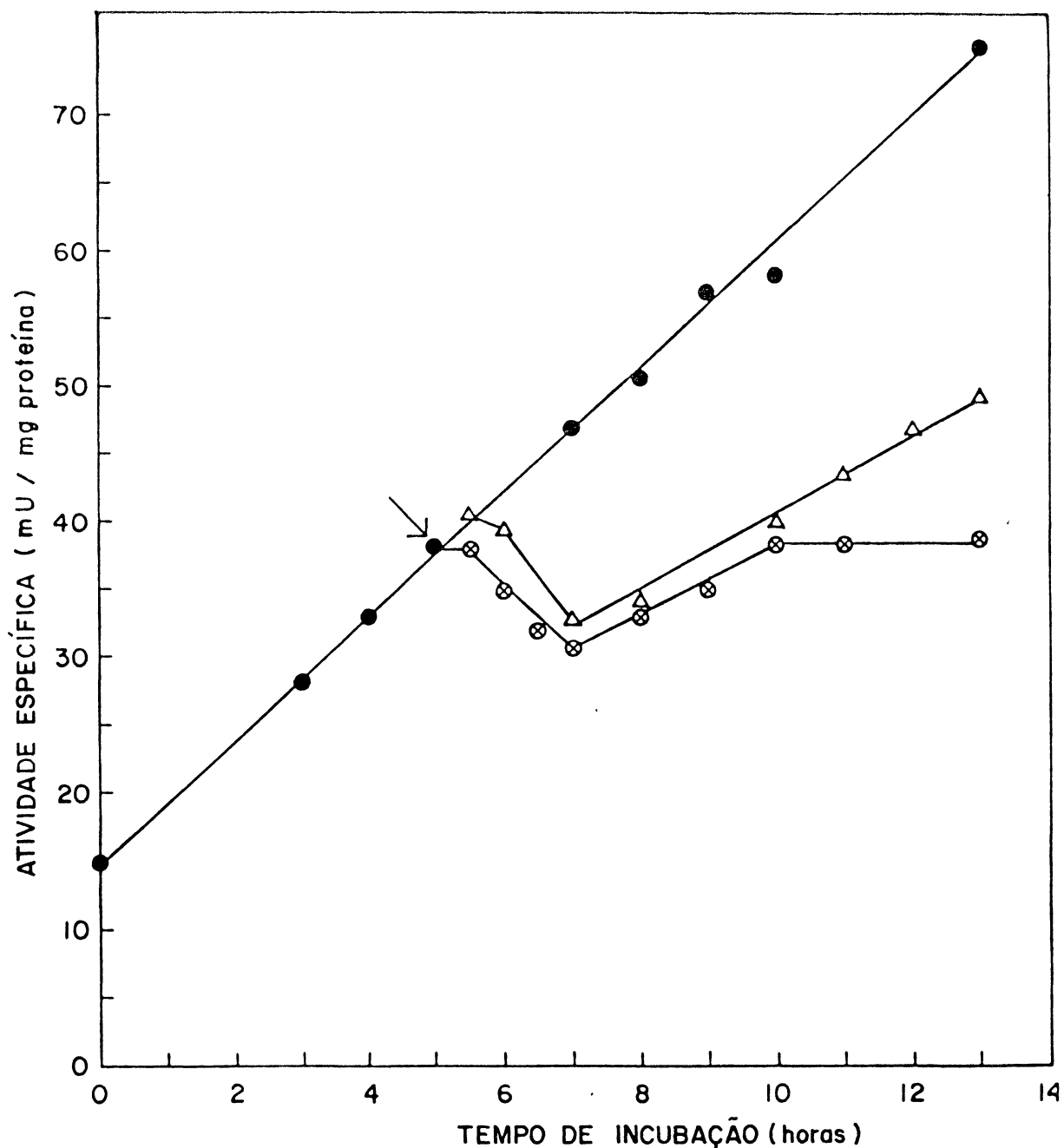


Figura 23 - EFEITO DA ADIÇÃO SIMULTÂNEA DE GLUCOSE E CICLOEXIMIDA SOBRE A INDUÇÃO DA α -D-XILOSE DEHIDROGENASE EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE.

As células previamente crescidas em meio DPE com 0,5% de glicerol, jejuadas e suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,6, como descrito em Materiais e Métodos, foram incubadas em presença de 1,5% de D-xilose (—●—); 1,5% de D-xilose mais 2% de D-glucose (—△—); 1,5% de D-xilose, 2% de D-glucose e 100 µg/ml de cicloeximida (—⊗—).

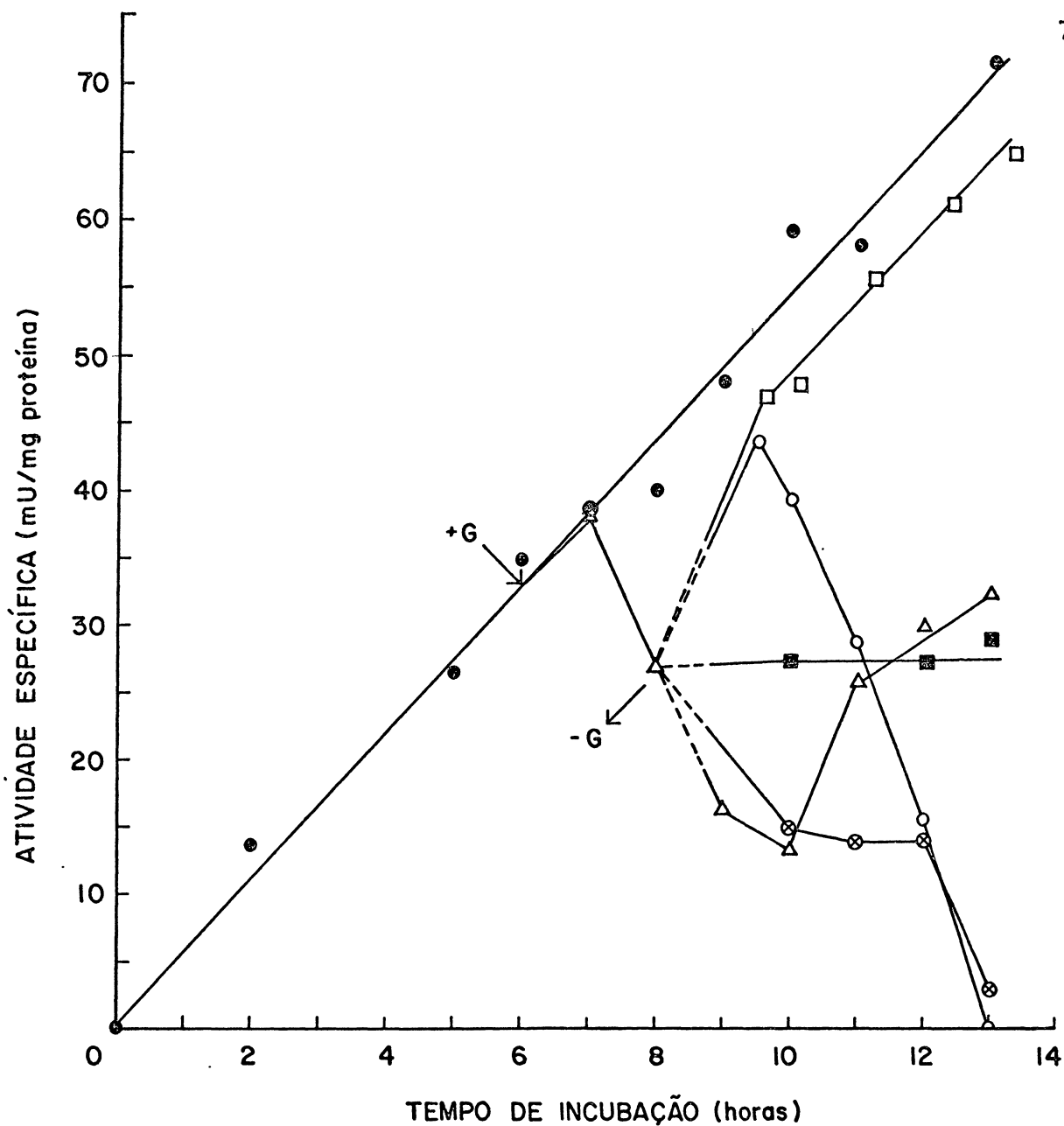


Figura 24 - EFEITO DA REMOÇÃO DE GLUCOSE SOBRE A XIDH INDUZIDA POR D-XILOSE EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE.

As condições de indução foram as mesmas descritas na Figura anterior. Após 6 horas de indução (—●—), 2% de D-glucose foi adicionada ao sistema de incubação, e após mais 2 horas, as células foram coletadas, lavadas e suspensas em tampão fosfato: sem glucose (—○—); sem glucose, com 1,5% de D-xilose (—□—); sem glucose, com 100 µg/ml de cicloeximida (—⊗—); com D-glucose 2% (—△—); sem glucose, com 1,5% de D-xilose mais 100 µg de cicloeximida (—■—); +G →, adição de glucose; -G ←, remoção de glucose.

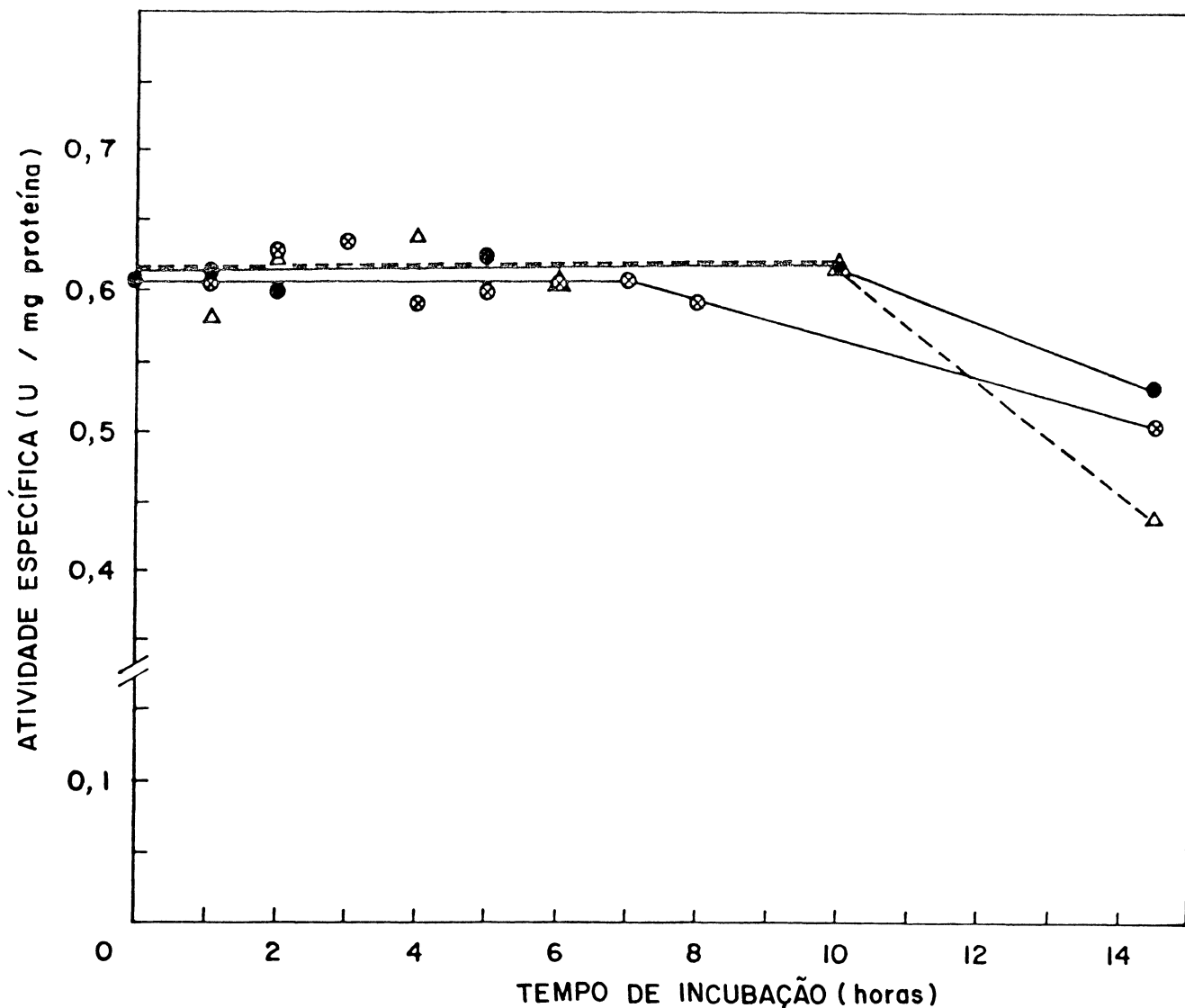


Figura 25 - EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUCOSE E CICLOEXIMIDA SOBRE A XIDH TOTALMENTE INDUZIDA PELA XILOSE EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE.

As células foram crescidas previamente em meio DPE contendo 0,5% de D-xilose, lavadas e suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,6 como descrito em Materiais e Métodos. O experimento foi iniciado pela adição de : 1,5% de D-xilose (●); 2% de D-glucose (△); 2% de D-glucose mais 100 µg/ml de cicloeximida (⊗).

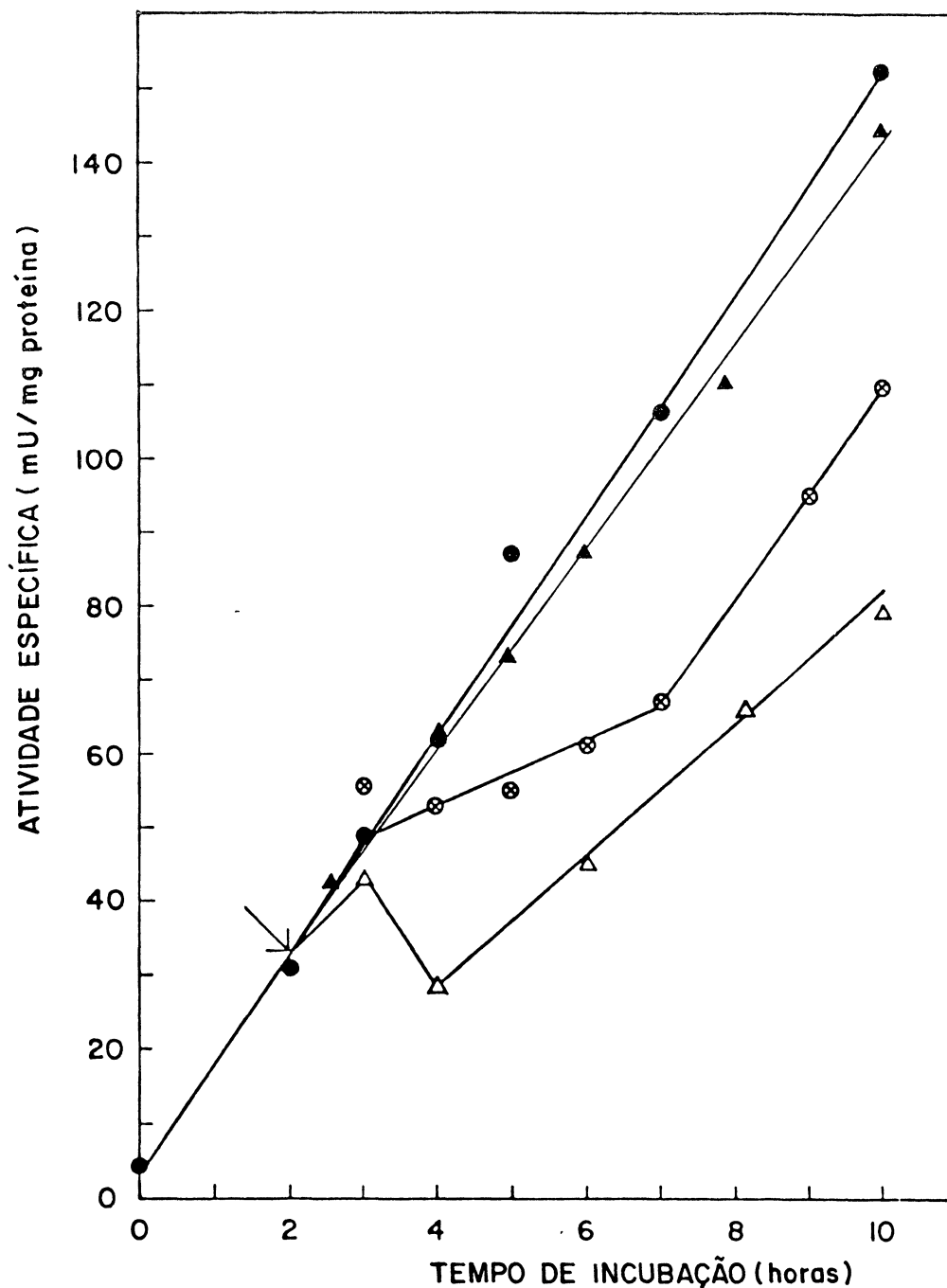


Figura 26 - EFEITO DE DIBUTIRIL AMPc SOBRE O "EFEITO DA GLUCOSE" ESTIMULADA DURANTE A INDUÇÃO DA xidH EM CÉLULAS DE *PULLULARIA PULLULANS* EM ESTADO NÃO-PROLIFERANTE.

As células foram previamente crescidas em meio DPE contendo glicerol, lavadas e suspensas em tampão 0,1 M, pH 6,6 como descrito em Materiais e Métodos. A indução foi iniciada pela adição de 1,5% de D-xilose (—●—). Após 2 horas de incubação foram adicionados ao sistema: 2% de D-glucose (—△—); 2% de D-glucose mais 1 mM de AMPc (—⊗—); 2% de D-glucose mais 3 mM de AMPc (—▲—).

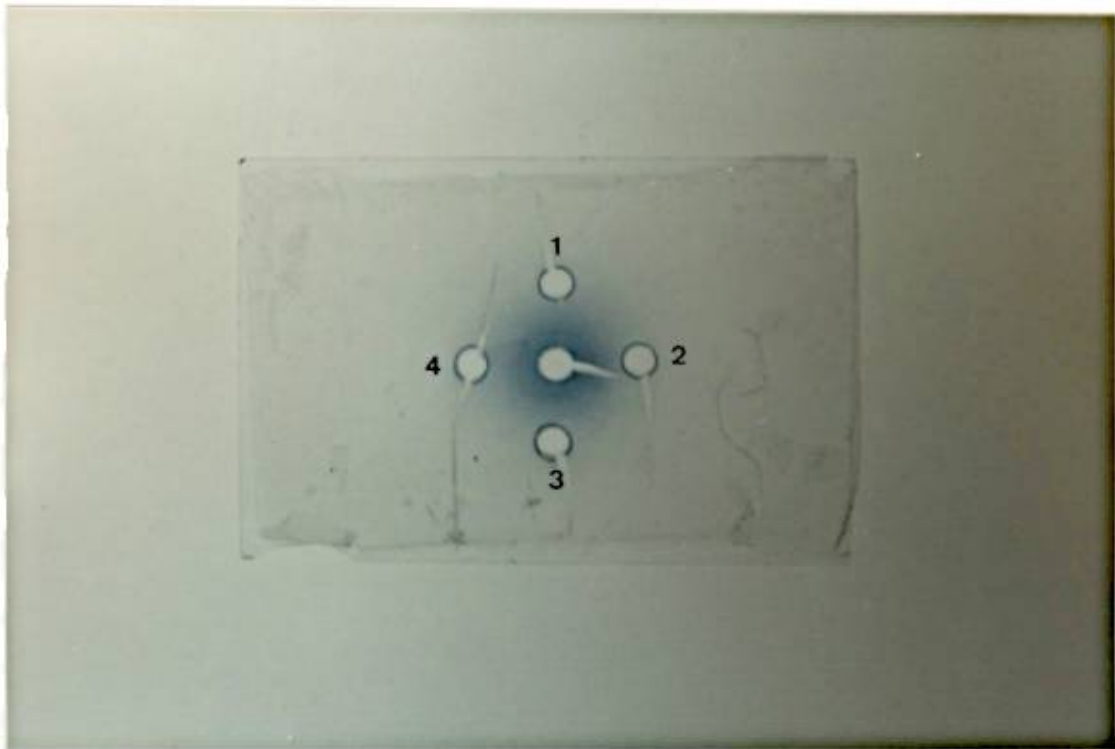


Figura 27 - IMUNODIFUSÃO DUPLA DA XiDH INIBIDA PELA GLUCOSE:

No orifício central foi aplicado 50 μ l de imunosoro anti-XiDH purificado de *Pullularia pullulans* e nos periféricos foram aplicados: (1), (2), 50 μ l da enzima sem "inibição-repressão" pela glucose (0,7 mU/ml x h = 100% de atividade); (3), (4), 70 μ l da enzima após 50% de "inibição-repressão".

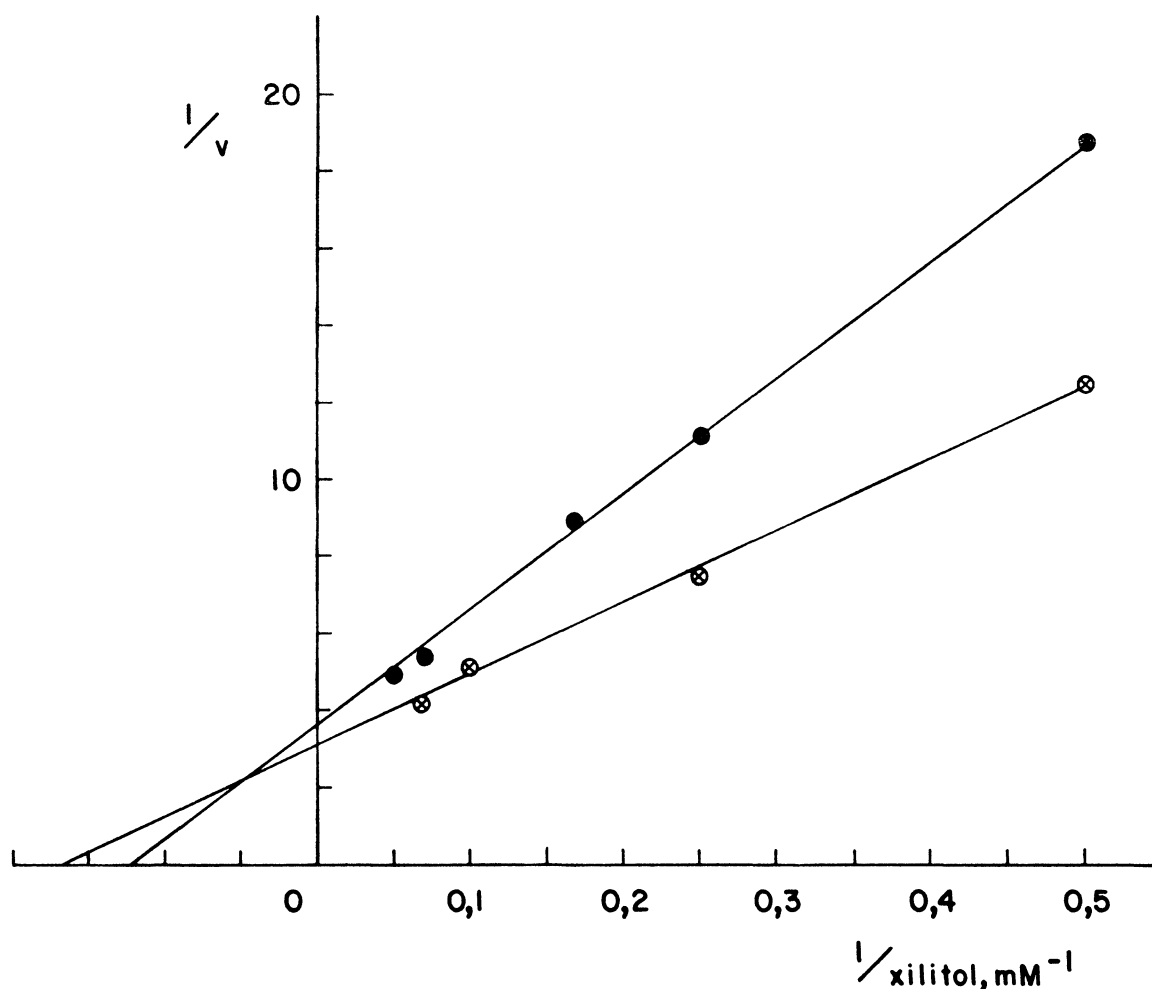


Figura 28 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE XILITOL SOBRE A ATIVIDADE DA XILITOL DESIDROGENASE DE CÉLULAS DE *P. PULLULANS* INCUBADAS COM D-XILOSE E COM D-GLUCOSE.

As enzimas ensaiadas foram os extratos livres de células induzidas em presença de 0,75% de D-xilose (—●—) e de células incubadas em D-glucose por 4 horas (—⊗—). As condições de indução da XiDH foram as mesmas descritas na Figura 26. Após 6 horas de indução, foi adicionada a uma parte do sistema de incubação 2% de glucose e 4 horas após, as células dos 2 sistemas de incubação foram coletadas, lavadas e os extratos preparados. A velocidade da reação está expressa em μ moles de NADH formados por minuto por ml de sistema..

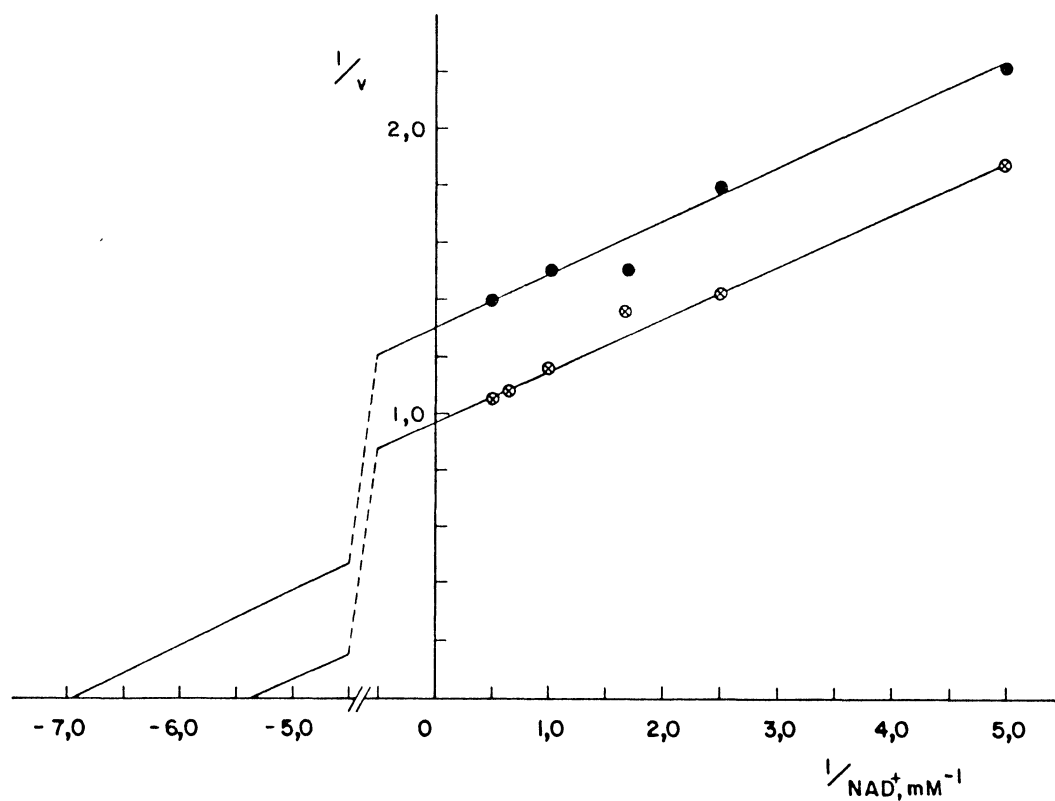


Figura 29 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NAD^+ SOBRE A ATIVIDADE DA XILITOL DESIDROGENASE DE CÉLULAS DE *P. PULLULANS* INCUBADAS COM D-XILOSE E COM D-GLUCOSE.

As enzimas ensaiadas foram os extratos livres de células induzidas em presença de 0,75% de D-xilose (—●—) e de células incubadas em 2% de D-glucose por 4 horas (—○—). As condições do experimento foram as mesmas descritas na Figura 28. A velocidade da reação está expressa em μ moles de NADH formados por minuto por ml de sistema.

4 - DISCUSSÃO

As vias de utilização de D-xilose como fonte de carbono e energia, em organismos procarióticos e eucarióticos, estão amplamente estudadas (14,15,16,43,51,53,58,59,66,83,86,91,97,98,111,112,115,119, 123,125,132,133,135,139,151). No entanto, pouco tem sido publicado, até o momento, sobre a indução, purificação, propriedades gerais e mecanismo cinético da xilitol desidrogenase em leveduras e fungos, com exceção feita para *Candida albicans* (133), *Candida utilis* (14,58,59), *Pachysolen tannophilus* (119) e *Pullularia pullulans* (123).

A *Pullularia pullulans* crescida em meio contendo D-xilose induz a síntese de uma xilitol desidrogenase capaz de oxidar xilitol a D-xilulose em presença de NAD^+ . A XiDH deste fungo imperfeito foi parcialmente purificada e as suas principais propriedades caracterizadas em nosso trabalho anterior (123).

Com a finalidade de se obter anticorpos anti-XiDH, esta enzima foi novamente purificada, uma vez que na purificação anterior não se conseguiu chegar à homogeneidade necessária.

A XiDH foi purificada 39,6 vezes, com 7,6% de rendimento final, apresentando-se homogênea pela eletroforese em gel de poliacrilamida.

A cromatografia de afinidade possibilitou a eliminação de aproximadamente 72% das proteínas contaminantes que estavam presentes na fração eluída da coluna de DEAE-celulose, mostran

do ser uma etapa importante no processo da purificação da XiDH.

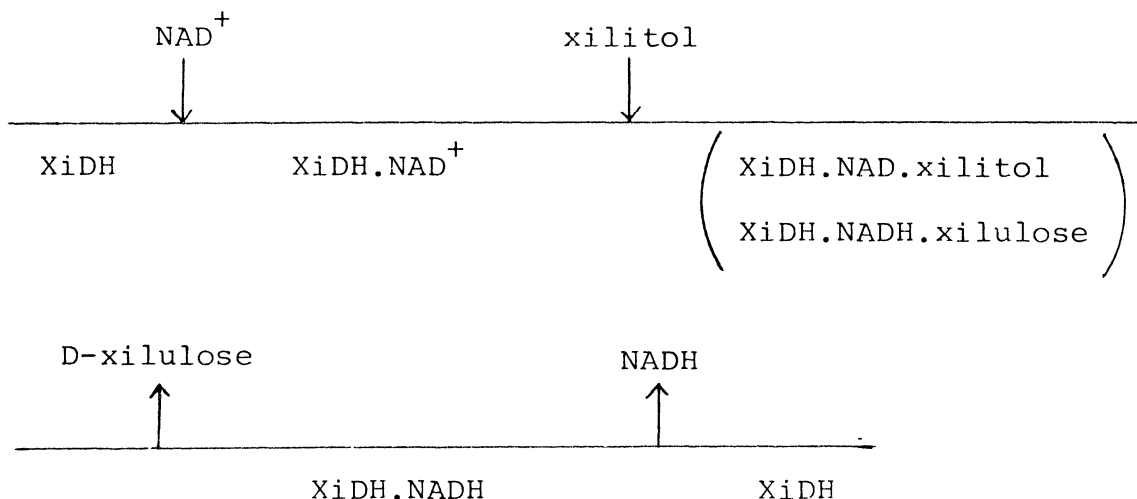
Com a XiDH obtida da fração mais ativa eluída da coluna de DEAE-celulose efetuou-se os estudos para determinar o mecanismo cinético de reação da XiDH.

Estudos da velocidade inicial da reação catalisada pela XiDH forneceram dados para sugerir um mecanismo sequencial⁽²⁾, pois os gráficos dos inversos das velocidades iniciais contra os inversos das concentrações dos substratos⁽⁶⁹⁾ (NAD^+ e xilitol, Figuras 7 e 8) apresentam a intersecção das linhas num único ponto acima do eixo das abcissas e à esquerda do eixo das ordenadas. Se o mecanismo fosse o do tipo "ping pong" as várias linhas não se cruzariam em um ponto comum, mas seriam paralelas. Portanto, xilitol e NAD^+ necessitam estar simultaneamente no sítio ativo da enzima antes de formar os produtos da reação (NADH e D-xilulose).

Segundo Alberty⁽³⁾, o mecanismo sequencial com bi-substratos pode ser diferenciado pelos estudos de inibição pelos produtos da reação.

A análise cinética das Figuras 9 a 12 estão de acordo com a proposição de que o mecanismo de reação da XiDH seja sequencial ordenado Bi Bi⁽¹¹⁴⁾. Logo, NAD^+ e xilitol devem-se ligar a XiDH por uma sequência obrigatória, bem como a liberação dos produtos (NADH e D-xilulose) formados.

Os dados dos gráficos 7 a 12 estão de acordo com a proposição de que NAD^+ é o primeiro substrato a se combinar com a enzima livre, seguida pelo xilitol. A ordem de liberação dos produtos formados é D-xilulose seguido por NADH⁽²¹⁾. Então, a representação gráfica, segundo a notação de Cleland⁽²¹⁾, para o possível mecanismo de oxidação de xilitol pela XiDH é:



O mecanismo sequencial ordenado BiBi proposto para XidH é concernente com outras desidrogenases como a álcool desidrogenase⁽¹⁴⁵⁾, lactato desidrogenase⁽⁴⁷⁾, ribitol desidrogenase⁽⁹⁶⁾ e glucose 6-fosfato desidrogenase⁽⁶⁷⁾.

A *Pullularia pullulans* é capaz de metabolizar diferentes fontes de carbono para a sua proliferação, pois possui enzimas constitutivas para a degradação da maioria dos mono e dissacarídeos mais comuns como a glucose, galactose, maltose, manose, rafinose, sacarose e trealose⁽¹⁹⁾. A análise das curvas de crescimento (Figura 13) deste fungo mostra que o tempo de geração do microrganismo crescido em presença de diferentes fontes de carbono varia de 2 a 11 horas e a velocidade específica de crescimento de 0,06 a 0,35 h⁻¹. Estes dados indicam que este fungo utiliza preferencialmente D-glucose, D-xilose e D-manitol para o seu crescimento.

Embora este fungo tenha crescido em presença de diversos açúcares testados, nenhuma atividade significativa da XidH foi detectada, com exceção do crescimento em D-xilose. (Tabela 2). Este fato sugere que a XidH deste fungo não é uma enzima constitutiva. As células

las de *Pullularia pullulans* somente sintetizam a XiDH em presença de D-xilose, tratando-se portanto de uma desidrogenase induzível, sendo a D-xilose um efetivo indutor. Grande parte das xilitol desidrogenases das leveduras e fungos descritos em "Introdução" são induzíveis, como também é a XiDH da "bactéria entérica" (30).

O nível máximo de indução da XiDH em células de *Pullularia pullulans*, em crescimento em presença de D-xilose, é alcançado após 25-27 horas, a partir daí o fenômeno entra em declínio (Figura 14). Este decréscimo da atividade enzimática parece ser uma condição fisiológica natural das células em crescimento, uma vez que a L-fucose desidrogenase e L-ramnose desidrogenase de *Pullularia pullulans* (24,136); as β -galactosidase de *Streptomyces violaceus* (110), de *Candida pseudotropicalis* (103) e de *Kluyveromyces lactis* (28), a manitol desidrogenase de *Aspergillus parasiticus* (95) e a celulase de *Sporotrichum thermophile* (12), também apresentam efeito semelhante.

A velocidade diferencial de síntese da XiDH da *Pullularia pullulans* é de ordem de 1,4 unidades/mg proteína sintetizada (Figura 15). Isto significa que nas culturas em crescimento exponencial a quantidade de XiDH formada é proporcional a síntese protéica líquida, isto é, a enzima é uma fração constante do total de novas proteínas sintetizadas pelas células. Porém, no início do crescimento, a quantidade de enzima sintetizada em relação à da proteína total é maior, atingindo subsequentemente, proporções decrescentes em relação a proteína total, até alcançar uma velocidade diferencial constante. Estes dados indicam que no início do crescimento, as células biossintetizam quantidades necessárias de XiDH para se adaptarem a nova condição fisiológica e após a adaptação, a velocidade diferencial de síntese

tornou-se constante.

Conforme os resultados apresentados neste trabalho a síntese induzida da XiDH é obtida tanto em células em crescimento, como em células em estado não-proliferante, sempre em presença do indutor D-xilose (Figuras 14 e 16). A cinética de indução da XiDH (Figura 16) mostra que o grau de indução é proporcional ao tempo de indução, assim como é da concentração do indutor presente, sendo que, baixas concentrações do indutor levam a um período de "lag" acentuado.

O aumento da atividade da XiDH por indução envolve a síntese protéica "de novo", já que a adição de cicloeximida no início ou após 4 horas de indução cessa completamente o seu aparecimento (Figura 18). No entanto, este aumento da atividade da XiDH estimulada pela D-xilose não significa, necessariamente, que a proteína-enzima esteja sendo sintetizada "de novo" sob as condições de uma indução. Ela pode ser o resultado de uma ativação ou modificação, pelo indutor, de uma proenzima (proteína inativa), já presente na célula, às custas da síntese de uma proteína específica para tal. Até o momento, não se tem conhecimento de nenhuma poliol desidrogenase que tenha este mecanismo de indução.

Guimarães e colaboradores⁽⁴⁶⁾ estudando duas desidroge-
nase induzidas de *P. pullulans*: L-ramnose e L-fucose desidroge-
nase, excluíram a possibilidade de ativação de enzima latente
através de experimentos com cicloeximida. O mesmo ocorrendo com
a XiDH, pode-se sugerir desta forma que a XiDH deste fungo de-
va também ser sintetizada "de novo".

Foi verificado que glicerol e glucose causam repressão da síntese de

XiDH quando colocados simultaneamente com a D-xilose tanto no sistema de indução ou de crescimento (Figuras 20 e 21). Portanto, o efeito repressor é exercido tanto em células em crescimento como em células em estado não-proliferante.

A adição de D-glucose a um cultivo de células de *P. pullulans* em crescimento, em presença de D-xilose, causa um decréscimo de 62% na atividade específica (Figura 21). A princípio, esta queda seria atribuída somente a uma repressão catabólica e à diluição da enzima pelo crescimento. Assim sendo, a concentração da enzima pré-existente quando submetida a adição da glucose é reduzida à metade ao final de uma geração, à um quarto após duas gerações e assim sucessivamente. Entretanto, observa-se que o decréscimo da atividade da XiDH é mais acentuado que a "curva teórica" que representa a diluição da enzima pré-existente por crescimento celular. Daí, esta perda da atividade específica da XiDH estimulada pela glucose, poder ser interpretada como sendo resultante da parada de sua síntese pela repressão catabólica, da subsequente diluição pelo crescimento celular e finalmente, de um processo adicional de "inativação" da XiDH pré-existente.

A adição de D-glucose ao meio de cultura contendo D-xilose, provoca um rápido decréscimo na atividade específica da XiDH, mas ao mesmo tempo causa um maior crescimento da cultura, sem no entanto, exibir o típico fenômeno de diauxia (Figura 21). Os substratos que promovem rápido crescimento como é a glucose, são conhecidos serem fortes repressores de sistemas induzíveis⁽¹⁰²⁾.

A presença de D-glucose e D-xilose no sistema de indução de células em estado não-proliferante (Figura 20), provoca a completa repressão catabólica da atividade da XiDH por 4 horas e em

seguida reinicia a síntese da enzima sob uma fraca repressão permanente. A substituição da D-glucose por glicerol nas condições acima descrita induz também a repressão catabólica transitória (4 horas), mas de intensidade menor, pois observa-se níveis significativos da atividade da XiDH. Verifica-se que após este período de fraca repressão transitória a velocidade de síntese da enzima iguala àquela do sistema controle, ou seja, na ausência de repressores. Portanto, a presença simultânea de glicerol e D-xilose no sistema de indução provoca somente uma repressão catabólica transitória inicial e fraca, ao contrário da D-glucose que além de reprimir totalmente a síntese inicial da XiDH, reprime parcialmente a indução posterior da enzima.

Em *P. pullulans*, o efeito repressor da D-glucose sobre a indução de enzimas de degradação da L-ramnose e L-fucose tem sido relatado por Rigo e colaboradores⁽¹⁰⁸⁾ e Guimarães⁽⁴⁵⁾. A presença de D-glucose junto com o indutor reprime quase totalmente a síntese das enzimas das duas vias oxidativas, tanto em células em crescimento como em estado não-proliferante. Quando a glucose é adicionada em baixas concentrações junto com o indutor, as enzimas das duas vias aparecem somente quando a glucose do meio diminui.

A adição de D-glucose a um cultivo de células em estado não-proliferante, cuja síntese da XiDH fora previamente induzida provoca um decréscimo transitório na atividade específica pré-existente, seguida por uma repressão parcial da síntese adicional da enzima (Figura 22). Este fenômeno é proporcional às concentrações de D-glucose presentes no sistema de indução. Esta queda inicial na atividade da XiDH causada pela adição de glucose no sistema de indução com células em estado não-proliferante não

é causada por:

i) diluição da enzima pré-existente pelo crescimento celular, pois as células são mantidas em condições não-proliferantes (não se observa aumento na densidade celular a 660 nm);

ii) instabilidade da XiDH, pois esta enzima após o processo da tradução é estável em células em condições de repouso por um período de 10 horas, tanto em presença como em ausência de glucose (Figura 25); a XiDH também não é inibida "in vitro" pela presença de glucose (concentração de 2%) no sistema de ensaio enzimático;

iii) repressão catabólica como o efeito único, porque o nível da atividade específica da XiDH pré-existente não é mantido constante pela interrupção da síntese enzimática, após a adição de glucose no sistema indutor.

O "efeito da glucose" não se manifesta sobre a XiDH previamente induzida em seu nível máximo, pelo crescimento (Figura 25).

Estes resultados sugerem que a glucose exerce um efeito mais acentuado quando adicionado nas etapas iniciais do processo indutivo (Figura 20). A presença de glucose no início da indução junto com o indutor, causa uma repressão total da síntese da XiDH (repressão catabólica transitória) por 4 horas, seguida de uma fraca repressão catabólica. A adição da glucose após um certo nível de indução (Figuras 22 à 24 e 26) provoca inicialmente inibição (por 1-3 horas) na atividade da enzima pré-existente e depois reprime parcialmente a indução adicional. Finalmente, sendo adicionada após a expressão total da XiDH, não tem efeito algum (Figura 25).

Este fenômeno observado em células de *P. pullulans* não foi ainda descrito em fungos e leveduras. Contudo, McGinnis e

Paigen⁽⁸⁴⁾ descreveram em *Escherichia coli* a inibição catabólica como um fenômeno geral no controle da utilização de carboidratos. Ampla pesquisa bibliográfica revela que a glucose pode exercer em graus diferentes uma repressão catabólica transitória ou permanente^(74,102) ou uma inibição da atividade enzimática do tipo inativação catabólica⁽⁵⁶⁾. Como o "efeito da glucose" em células de *P. pullulans* não é uma simples repressão catabólica, nem um caso típico de inativação catabólica, denominou-se este efeito encontrado em células de *P. pullulans* de "inibição transitória-repressão catabólica". Provavelmente, trata-se de uma associação destes 2 fenômenos, pois é conhecido que muitas vias metabólicas possuem um segundo mecanismo de controle, o qual permite um controle mais rápido e flexível da atividade enzimática⁽⁴¹⁾.

A adição simultânea de glucose e cicloeximida à suspensão celular em estado não-proliferante, cuja síntese da XiDH está sendo induzida, não provoca alteração no decréscimo da atividade enzimática causada pela glucose, sugerindo que o efeito inibitório-catabólico não é dependente da síntese protéica (Figura 23). Após a inibição há recuperação natural do nível da enzima pré-existente (antes da adição de glucose), o qual é mantido constante sem que haja síntese adicional de novas moléculas da XiDH, ou seja, a cicloeximida inibe a repressão catabólica. Por outro lado, observa-se que há desaparecimento do aumento inicial de poucas unidades de enzima que normalmente é observado após a adição de glucose. A resposta inibitória à adição de glucose ao sistema sem cicloeximida nunca é imediata, há sempre um pequeno tempo necessário requerido para metabolizar a glucose para formar produto(s) que seria(m) um efetivo inibi-

dor/repressor. Portanto, a inibição catabólica é um mecanismo que não requer a formação de ligações peptídicas nos ribossomas, mas durante a repressão catabólica há síntese protéica "de novo". De acordo com os resultados obtidos a inibição catabólica da XiDH causada pela glucose, pode ser sugerida como resultado de uma mudança na estrutura e/ou conformação da molécula da XiDH, como foi sugerido para a inativação catabólica do sistema de consumo ("uptake") de galactose em leveduras (78).

A inibição catabólica da XiDH observada após incubação das células de *P. pullulans* com glucose não é provavelmente o resultado de uma inativação catabólica pela degradação proteolítica da enzima. Um dado que favorece esta interpretação é a reativação ou recuperação da XiDH após a remoção de glucose do sistema de indução pela transferência das células em tampão fosfato sem fonte de carbono (Figura 24). Após a reativação total da XiDH há um brusco declínio nesta atividade, provavelmente porque a XiDH representa uma valiosa fonte de amino-ácidos e carbono, o qual poderia ser utilizado para a síntese de novas proteínas ou para suprir energia para a célula.

A recuperação da atividade inibida da XiDH após a retirada da glucose do sistema, parece ser dependente da síntese protéica (Figura 24). A XiDH poderia ser sintetizada "de novo" a partir de aminoácidos, ou a recuperação poderia ser devida à associação de subunidades inativas ou uma mudança conformacional em que a formação da ligação peptídica nos ribossomas está envolvida.

O decréscimo na atividade da enzima após a adição de cicloeximida, num sistema livre de glucose, pode ser justificado pela falta de fonte de carbono para as células e a parada total da síntese protéica, o que acarretaria uma degradação rápida

da da XiDH para suprir as células de suas necessidades fisiológicas (Figura 24). Este tipo de efeito é encontrado também durante a reativação da inativação (causada pela glucose) do sistema de consumo ("uptake") de maltose⁽⁴⁴⁾ e de galactose⁽⁷⁸⁾ em leveduras. Apesar da presença de uma fonte de carbono representada pelos respectivos indutores, a adição de cicloeximida causa uma queda na atividade destas enzimas.

Um outro fato que depõe contra uma inativação catabólica do tipo proteolítico é a reversibilidade natural da atividade inibida da XiDH causada pela glucose, após um período inibitório aproximado de 1-2 horas (Figura 22). Esta reversibilidade natural, após o período de inibição e em presença de glucose renascente, se dá com uma velocidade reprimida ou menor que a do sistema controle (indução em presença de D-xilose), estando, portanto, sob o efeito de uma fraca repressão catabólica.

Ocorre uma reativação total da XiDH, inibida pela glucose, quando as células são suspensas em tampão fosfato contendo D-xilose (Figura 24). A presença do indutor faz com que o sistema de indução da síntese da XiDH retome novamente, à sua velocidade máxima. O mesmo não ocorre quando as células são suspensas em tampão fosfato contendo cicloeximida e xilose. Não há reativação da XiDH "inibida-reprimida" e o nível desta atividade permanece constante pelo menos por 5 horas (Figura 24).

A inibição catabólica transitória da XiDH estimulada pela glucose é revertida em presença de 1 mM de AMPc, e a repressão catabólica da XiDH é completamente evitada pela presença deste nucleotídeo (Figura 26). A falta de uma total reversão no início do processo pode ser atribuída a uma quantidade limitada (1mM) deste nucleotídeo e a demora na permeabilidade do AMPc exógeno.

Quando a concentração do AMPc utilizado é de 3 mM, tanto a inibição transitória como a repressão catabólica são revertidas aos níveis do sistema controle. Esta reversão é fato conhecido em diferentes microrganismos principalmente em bactérias⁽¹⁰⁵⁾, onde a permeabilidade deste nucleotídeo através da parece celular é relativamente fácil. Porém em leveduras e fungos^(75,113,127,128,141), a reversão da repressão catabólica é muitas vezes inoperante ou parcial, devido a problemas com permeabilidade das células ao nucleotídeo. Portanto, o resultado sugere que ambos os mecanismos estejam associados com a diminuição da concentração intracelular de AMPc, mas é desconhecido ainda se a glucose e/ou seus metabólitos reduzem a atividade das enzimas sensíveis à catabólitos, exclusivamente pela diminuição da quantidade de AMPc.

O estudo imunológico efetuado pela técnica de Ouchterlony (Figura 27) mostra que o extrato livre de células sob o efeito de "inibição-repressão" pela glucose forma uma única linha de precipitina com o anti-soro contra XiDH. A intensidade desta linha de precipitina, obtida de extrato com atividade enzimática "inibida-reprimida" em 50%, é semelhante à daquela obtida com o extrato não "inibido-reprimido". Isto se deve ao fato de ter sido aplicado quantidades semelhantes das duas preparações enzimáticas.

Esta propriedade imunológica pode ser atribuída a moléculas de XiDH que ainda não sofreram o "efeito da glucose" e, portanto, mantêm ainda a região responsável pelo reconhecimento da reação antígeno-anticorpo. A possibilidade desta resposta imunológica ser devida a uma forma molecular da XiDH "inibida-reprimida" é pouco provável, já que os valores das constantes de Michaelis-Menten (K_m aparente) dos 2 substratos (NAD⁺ e xilitol, Fig.28-29) para a XiDH de células incubadas com e sem glucose

foram semelhantes. Os valores de K_m aparente da XiDH de células na ausência de glucose são de 0,14 mM e 8,0 mM para NAD^+ e xilitol respectivamente, e após a adição de glucose ao sistema de indução, os valores de K_m aparente para NAD^+ e xilitol são 0,18 mM e 6,06 mM, respectivamente. Desta maneira, pode-se sugerir que a atividade enzimática do extrato de células incubadas em presença de glucose é de moléculas de XiDH que não sofreram o "efeito da glucose". Portanto, a XiDH sob o "efeito da glucose" parece sofrer uma alteração na sua estrutura e/ou conformação, acarretando na perda de sua atividade enzimática, bem como na sua capacidade de reação imunológica.

Os estudos realizados neste trabalho mostram que a formação da XiDH em *Pullularia pullulans* é controlada por um sistema indutor-repressor, no qual a D-xilose serve como um indutor. Esta formação induzida da XiDH é afetada pela adição de glucose mostrando um exemplo de "efeito da glucose" em fungos leveduriformes.

Os resultados obtidos em células de *P. pullulans* mostram que não somente a D-glucose, mas também o glicerol, reprimem temporariamente a indução da XiDH. A indução da L-ramnose desidrogenase deste mesmo fungo leveduriforme é também parcialmente reprimida por D-glucose, D-galactose e D-frutose⁽¹³⁶⁾. A L-fucose desidrogenase de *P. pullulans* também é reprimida por D-glucose, D-xilose, D-galactose, glicerol e L-arabinose⁽²⁴⁾. Estes dados sugerem que a repressão catabólica ocorrida não é causada diretamente pela glucose e seus metabólitos imediatos, mas por algum metabólito comum a estes açúcares que atuam nas vias metabólicas deste fungo leveduriforme.

Durante o fenômeno da repressão da XiDH pela glucose, a

atividade desta enzima diminui temporariamente a um nível mais baixo que aquela antes da adição de glucose (inibição transitória), possivelmente pela alteração na molécula induzida da XiDH. Após, a enzima é novamente sintetizada a uma velocidade menor que a do sistema sem a glucose (repressão catabólica permanente). Por esta razão, o termo "inibição transitória-repressão catabólica" é usado para descrever um tipo não comum de mecanismo regulatório da XiDH de *Pullularia pullulans*.

Esta alteração na atividade da XiDH é um fenômeno que apresenta as seguintes características:

i) a inibição não depende da síntese protéica "de novo";
ii) é reversível naturalmente, mesmo em presença de glucose, pois o retorno ao nível anterior ao da inibição ocorre geralmente dentro de 1 a 3 horas após a adição de glucose;

iii) a atividade inibida é reativada após a remoção de glucose do sistema, sendo dependente de uma síntese protéica "de novo";

iv) tanto a inibição como a repressão são revertidas por AMPc exógeno;

v) a glucose não exerce efeito sobre a XiDH induzida ao nível máximo, pelo crescimento celular.

Como a natureza química e as bases bioquímicas do "efeito da glucose" sobre as enzimas sensíveis a catabólitos em organismos eucarióticos, ainda não estão elucidadas, fica difícil esclarecer o mecanismo regulatório da glucose e/ou seus metabólitos sobre a indução da XiDH.

5 - CONCLUSÕES

1. A XiDH de *Pullularia pullulans* foi purificada à homogeneidade.

2. O mecanismo da reação catalisada pela XiDH é do tipo sequencial ordenado Bi Bi, sendo NAD^+ o primeiro substrato a ligar-se a enzima, seguido pelo xilitol. O primeiro produto a ser liberado na reação é a D-xilulose e após o NADH.

3. A XiDH de *Pullularia pullulans* é controlada por um sistema indutor-repressor, no qual a D-xilose é um específico indutor, tanto em células em crescimento como em células em estado não proliferante.

4. A síntese induzida da XiDH é inibida por cicloeximida mostrando que o seu aparecimento é dependente da síntese protéica "de novo".

5. A XiDH induzida por D-xilose em células em crescimento ou em estado não-proliferante é inibida pela adição de D-glucose ao sistema de indução.

6. A inibição da XiDH pela glucose é de um tipo incomum, isto é, uma associação de inibição transitória e uma fraca repressão catabólica. Esta inibição inicial parece não ser dependente de cicloeximida, porém a repressão catabólica necessita de uma síntese protéica "de novo".

7. A inibição da XiDH estimulada pela glucose é reversível espontaneamente ao nível anterior ao da inibição, mesmo em

presença de glucose no sistema indutor.

8. A atividade da XiDH inibida pela glucose é reativada após a remoção da glucose do sistema, sendo que o seu aparecimento é dependente da síntese protéica "de novo".

9. Tanto a "inibição transitória" como a "repressão catabólica" são revertidas por AMPc exógeno.

10. O efeito da concentração de xilitol e de NAD^+ sobre a atividade da XiDH induzida por xilose e da "inibida-reprimida" pela glucose são semelhantes.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, B.G. Induction of galactokinase in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics of induction and glucose effects. J. Bacteriol., 111: 308-15, 1972.
2. ALBERTY, R.A. The relationship between Michaelis constants, maximum velocities and the equilibrium constants for an enzyme-catalyzed reaction. J. Am. Chem. Soc., 75: 1928-32, 1953.
3. ALBERTY, R.A. On the determination of rate constant for coenzyme mechanisms. J. Am. Chem. Soc., 80: 1777-82, 1958.
4. ARCUS, A.C & EDSON, N.L. Polyol dehydrogenase. 2. The polyol dehydrogenases of *Acetobacter suboxydans* and *Candida utilis*. Biochem. J., 64: 385-94, 1956.
5. ATTWOOD, M.A. & DOUGHTY, C.C. Purification and properties of calf liver aldose reductase. Biochim. Biophys. Acta., 370: 358-68, 1974.
6. BATES, W.K.; HEDMAN, S.C. & WOODWARD, D.O. Comparative inductive responses of two β -galactosidases of *Neurospora*. J. Bacteriol., 93: 1631-7, 1969.
7. BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis-biochemical reagents. New York, Academic, vol. I, 1974. 565 p.
8. BETRAND, G. Compt. Rend. Acad. Sci., 126: 762, 1898. Citado por HORITSU, H. & TOMOEDA, M. Pentose metabolism by *Candida utilis*. Part III. Polyol: NAD Oxidoreductase. Agr. Biol. Chem., 30(10): 962-6, 1966.

9. BLAKESLEY, R.W. & BOEZI, J.A. A new staining technique for protein in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G-250. Anal. Biochem., 82: 580-2, 1977.
10. BLAKLEY, R.L. The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. Sorbitol dehydrogenase. Biochem. J., 49: 257-71, 1951.
11. CAMPELLO, J.P. & VEIGA, L.A. Enzymic preparation of L-ribose and D-xylulose. An. Acad. brasil. Cienc., 45: 309-13, 1973.
12. CANEVASCINI, G.; COUDRAY, M.R.; REY, J.-P.; SOUTHGATE, R.I.G. & MEIER, H. Induction and catabolite repression of cellulase synthesis in the Thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. J. Gen. Microbiol., 110: 291-303, 1979.
13. CARLSON, M. & BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNA with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. Cell., 28: 145-54, 1982.
14. CHAKRAVORTY, M.C.; VEIGA, L.A.; BACILA, M. & HORECKER, B.L. Pentose metabolism in *Candida*. II. The diphosphopyridine nucleotide-specific polyol dehydrogenase of *Candida utilis*. J. Biol. Chem., 237(4): 1014-20, 1962.
15. CHIANG, C. & KNIGHT, S.G. D-xylose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. Biochem. Biophys. Acta., 35: 454-63, 1959.
16. CHIANG, C. & KNIGHT, S.G. Metabolism of D-xylose by molds. Nature (London), 188: 79-81, 1960.
17. CHIANG, C. & KNIGHT, S.G. L-arabinose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. Biochim. Biophys. Acta., 46: 271-8, 1961.

18. CHIANG, C.; SIH, C.J. & KNIGHT, S.G. The conversion of D-xylose to xylitol by *Penicillium chrysogenum*. Biochim. Biophys. Acta., 29: 664-5, 1958.
19. CLARK, D.S. & WALLACE, R.H. Carbohydrate metabolism of *Pullularia pullulans*. Can. J. Microbiol., 4: 43-54, 1958.
20. CLARKE, P.H.; HOULDSWORTH, M.A. & LILLY, M.D. Catabolite repression and the induction of amidase synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* 8602 in continuous culture. J. Gen. Microbiol., 51: 225-34, 1968.
21. CLELAND, W.W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. 1. Nomenclature and rate equations. Biochem. Biophys. Acta., 67: 104-37, 1963.
22. CLEMENTS, R. S & WINEGRAND, A.I. Purification of adiltol: NADP Oxidoreductase from human placenta. Biochem. Biophys. Res. Comm., 47: 1473-9, 1972.
23. COOPER, J.A.D.; SMITH, W.; BACILA, M. & MEDINA, H. Galactose oxidase from *Polyporus circinatus*, Fr. J. Biol. Chem., 234(3): 445-8, 1959.
24. CONTER, P.F.; GUIMARÃES, M.F. & VEIGA, L.A. Induction and repression of L-fucose dehydrogenase of *Pullularia pullulans*. Can. J. Microbiol., 30: 753-7, 1984.
25. DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. Biochem. J., 80: 547-55, 1961.
26. DAVID, J. & WEISMEYER, H. Regulation of ribose metabolism in *Escherichia coli*. I. The ribose catabolic pathway. Biochim. Biophys. Acta., 208: 45-55, 1970.

27. DEKKER, R.F.H. & RICHARDS, G.N. HEMICELLULASES: Their occurrence, purification, properties, and mode of action. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32: 277-352, 1976.
28. DICKSON, R.G. & MARKIN, J. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol., 142(3): 777-85, 1980.
29. DITZELMULLER, G.; KUBUCEK, C.P.; WOHRER, W. & ROHR, M. Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus*: purification and properties of xylose reductase. Can. J. Microbiol., 30(11): 1330-6, 1984.
30. DOTEN, R.C. & MORTLOCK, R.P. Inducible xylitol dehydrogenase in enteric bacteria. J. Bacteriol., 162(2): 845-8, 1985.
31. DUBOIS, M.; GILLES, K.H.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28(3): 350-6, 1956.
32. DUNTZE, W.; NEUMANN, D. & HOLZER, H. Glucose induced inactivation of malate dehydrogenase in yeast cells. Eur. J. Biochem., 3: 326-31, 1968.
33. EPPS, H.M.R. & GALE, E.F. The influence of the presence of glucose during growth in the enzymic activities of *Escherichia coli*: comparison of the effect with that produced by fermentation acids. Biochem. J., 36: 619-23, 1942.
34. FAULKNER, P. Polyol dehydrogenase of silk-worm. Biochem. J., 68: 374-80, 1958.
35. FEDEROFF, H.J.; ECCLESHALL, T.R. & MARMUR, J. Carbon catabolite repression of maltase synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. J. Bacteriol., 156: 301-307, 1983.

36. FELDMAN, D.A. & DATTA, P. Catabolite inactivation of biodegradative threonine dehydrate of *Escherichia coli*. Biochemistry, 14: 1760-7, 1975.
37. FERGUSON Jr, J.J.; BOLL, M. & HOLZER, H. Yeast malate dehydrogenase: enzyme inactivation in catabolite repression. European J. Biochem., 1(1): 21-25, 1967.
38. FREY, J. & ROHM, K.H. The glucose-induced inactivation of aminopeptidase I in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett., 100(2): 261-4, 1979.
39. FROMM, H.J. Summary of kinetic reaction mechanisms. Methods Enzymol., 63: 42-53, 1979.
40. GANCEDO, C. Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. J. Bacteriol., 107(2). 401-5, 1971.
41. GAUDY Jr, A.F.; GAUDY, E.T. & KOMOLRIT, K. Multicomponent substrate utilization by natural populations and a pure culture of *Escherichia coli*. Appl. Microbiol., 11: 157-62, 1963.
42. GERBER, L.; NEUBAUER, D. & STRETZENBERGER. Cyclic AMP phosphodiesterase in *Thermomonospora curvata*. J. Bacteriol., 169(5): 2267-71, 1987.
43. GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLICKENGER, M.C.; CHIANG, L.C. & TSAO, G.T. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. Appl. Environ. Microbiol., 41(2): 430-6, 1981.
44. GORTS, C.P.M. Effect of glucose on the activity and the kinetics of the maltose-uptake system and of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta., 184: 299-305, 1969.

45. GUIMARÃES, M.F. Via oxidativa de degradação de L-fucose em *Pullularia pullulans* (De Bary, 1866) Berkout, 1923. Curitiba, 1984. 110 p. Tese, Doutorado, Universidade Federal do Paraná.
46. GUIMARÃES, M.F.; RIGO, L.U. & VEIGA, L.A. Metabolism of 6-deoxyhexoses in *Pullularia pullulans*. In: STOPANI, A.O.M.; BACILA, M. & HORECKER, B.L. ed. Biochemistry and genetics of yeasts. New York, Academic, 1978.p. 161-9.
47. HAKALA, M.T.; GLAID, A.J. & SCHWERT, G.W. Lactic dehydrogenase. II. Variation of kinetic and equilibrium constants with temperature. J. Biol. Chem., 221: 191-209, 1956.
48. HANSEN, R.J.; SWITZER, R.L.& HOLZER, H. Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases and proteinase inhibitors in yeasts. Biochim. Biophys. Acta., 496: 103-14, 1977.
49. HAYMAN, S. & KINOSHITA, J.H. Isolation and properties of lens aldose reductase. J. Biol. Chem., 240(2): 877-82, 1965.
50. HAYMAN, S.; LOU, M.F.; MEROLA, L.O. & KINOSHITA, J.H. Aldose reductase activity in the lens and others tissues. Biochim. Biophys. Acta., 128: 474-82, 1966.
51. HOCHSTER, R.M. & WATSON, R.W. Xylose isomerase . J. Am. Chem. Soc., 75: 3284-5, 1953.
52. HOCHSTER, R.M. The formation of phosphorylated sugars from D-xylose by extracts of *Pseudomonas hydrophila*. Can. J. Microbiol., 1(1): 346-63, 1954.
53. _____. Enzymatic isomerization of D-xylose to D-xylulose. Arch. Biochem Biophys., 48: 120-9, 1954.

54. HÖFER, M.; BETZ, A. & KOTYK, A. Metabolism of the obligatory aerobic yeasts *Rhodotorula gracilis*. IV. Induction of an enzyme necessary for D-xylose catabolism. Biochim. Biophys. Acta., 252: 1-12, 1971.
55. HOLLMAN, S. & TOUSTER, O. The L-xylulose-xylitol enzyme and other polyol dehydrogenase of guinea pig liver mitochondria. J. Biol. Chem., 225: 87-102, 1957.
56. HOLZER, H. Catabolite inactivation in yeast. Trends Biochem. Sci., 1: 178-81, 1976.
57. HORECKER, B.L. & KORNBERG, A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J. Biol. Chem., 175: 385-90, 1948.
58. HORITSU, H. & TOMOEDA, M. Pentose metabolism by *Candida utilis*. Part III. Polyol: NAD⁺ Oxidoreductase. Agr. Biol. Chem., 30(10): 962-6, 1966.
59. HORITSU, H.; TOMOEDA, M. & KUMAGAI, K. Pentose metabolism in *Candida utilis*. Part IV. NADP specific polyol dehydrogenase. Agr. Biol. Chem., 32(4): 514-7, 1968.
60. HURN, B.A.L. & SHIREEN, M.C. Production of reagent antibodies. Methods Enzymol., 70: 104-42, 1980.
61. JACOB, F. & MONOD, J. On the regulation of gene activity. Cold. Spring. Harb. Symp. quant. Biol., 26: 193-211, 1961.
62. JAYARAMAN, J.; COTMAN, C.; MAHLER, H.R. & SHARP, C.V. Biochemical correlates of respiratory deficiency. VIII. Glucose repression. Arch. Biochem. Biophys., 116: 224-51, 1966.
63. JEFFRIES, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 27: 1-32, 1983.

64. KABAT, E.A. & MEYER, M.M. Estimation of antigens. In experimental immunochemistry. Springfield, Charles C. Thomas, 1971, p. 361-83.
65. KEPES, A. Kinetics of induced enzyme synthesis. Determination of the mean life of galactosidase-specific messenger RNA. Biochim. Biophys. Acta., 76: 293-309, 1963.
66. KLINE, E.S. & BARON, L.S. Xylose metabolism in genetic variants of *Salmonella typhosa*. Arch. Biochem. Biophys., 66: 128-39, 1957.
67. KOSOW, D.P. Glucose 6-phosphate dehydrogenase of human blood platelets. Kinetics and regulatory properties. Arch. Biochem. Biophys., 162: 186-93, 1971.
68. LAZO, P.S.; FLÓREZ, I.G.; OCHOA, A.G. & GASCÓN, S. Induction and catabolite repression of α -galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. Cell. Mol. Biol., 27(6): 615-22, 1981.
69. LENZ, A.G. & HOLZER, H. Rapid reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose. FEBS Lett., 109(2): 271-4, 1980.
70. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56: 658-66, 1934.
71. LITTAUER, U.Z. & VOLCANI, B.E. Observation on the metabolism of pentoses in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta., 18: 523-30, 1965.
72. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.R. & RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-75, 1951.

73. LUTSTORF, U. & MEGNET, R. Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-4. Arch. Biochem. Biophys., 126: 933-44, 1968.
74. MAGASANIK, B. Catabolite repression. Cold. Spring. Harb. Symp. quant. Biol., 26: 249-56, 1961.
75. MAHLER, H.P. & LIN, C.C. Exogenous adenosine 3':5'-monophosphate can release yeast from catabolite repression. Biochem. Biophys. Res. Comm., 83: 1039-47, 1978.
76. MARCUS, L. & MARR, A. Polyol dehydrogenase of *Azotobacter agilis*. J. Bacteriol., 82: 224-32, 1961.
77. MARTINEZ, J.P.; ELORZA, M.V.; GOZALBO, D.; & SENTANDREU, R. Regulation of α -galactosidase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and effect of cerulein on the secretion of this enzyme. Biochim. Biophys. Acta., 716: 158-68, 1982.
78. MATERN, H. & HOLZER, H. Catabolite inactivation of the galactose uptake system in yeast. J. Biol. Chem., 252 (18): 6399-402, 1977.
79. MATSUMOTO, K.; UNO, I.; TOH-E, A; ISHIKAWA, T. & OSHIMA, Y. Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence from mutants capable of utilizing it as an adenine source. J. Bacteriol., 150 (1): 277-85, 1982.
80. MAZÓN, M.J.; GANCEDO, J.M. & GANCEDO, C. Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *In vivo* phosphorylation of the enzyme. J. Biol. Chem., 257(3): 1128-30, 1982.
81. McCLATCHY, J.K. & ROSENBLUM, E. Induction of lactose utilization in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 86: 1211-5, 1963.

82. McCORKINDALE, J. & EDSON, N.L. Polyol dehydrogenases. 1.
The specificity of rat-liver polyol dehydrogenase. Biochem. J., 57: 518-23, 1954.
83. McCracken, L.D. & Gong, C.S. D-xylose metabolism by mutant strains of *Candida* sp. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 27: 33-55, 1983.
84. McGinnis, J.F. & Paigen, K. Catabolite inhibition: a general phenomenon in the control of carbohydrates utilization. J. Bacteriol., 100: 902-13, 1969.
85. Michels, C.A. & Romanowski, A. Pleiotropic glucose repression resistant mutation in *Saccharomyces carlsbergensis*. J. Bacteriol., 143: 674-97, 1980.
86. Mitsuhashi, S. & Lampen, J.C. Conversion of D-xylose to D-xylulose in extracts of *Lactobacillus pentosus*. J. Biol. Chem., 204: 1011-8, 1953.
87. Molano, J. & Gancedo, C. Specific inactivation of fructose 1,6 bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* by a protease. Eur. J. Biochem., 44: 213-7, 1974.
88. Monod, J. The growth of bacterial cultures. Ann. Rev. Microbiol., 3: 371-94, 1949.
89. Monod, J. The phenomenon of enzymatic adaptation. Growth, 11: 223-9, 1947. Citado por LAZO, P.S. et alii. Induction and catabolite repression of α -galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. Cell. Mol. Biol., 27(6): 615-22, 1981.
90. Monod, J.; Cohen-Bazine, G.; Cohn, M. Sur la biosynthèse de la β -galactosidase (lactase) chez *Escherichia coli*. La spécificité de l'induction. Biochim. Biophys. Acta., 7: 585-99, 1951.

91. MORET, V. & SPERTI, S. Pentose metabolism by cell-free extracts of *Oospora lactis*. Arch. Biochem Biophys., 98: 124-7, 1962.
92. MOSES, V. & PREVOST, C. Catabolite repression of β -galactosidase synthesis in *Escherichia coli*. Biochem. J., 100: 336-53, 1966.
93. NAKADA, D. & MAGASANIK, B. Catabolite repression and the induction of β -galactosidase. Biochim. Biophys. Acta., 61: 835-7, 1962.
94. _____. The roles of inducer and catabolite repressor in the synthesis of β -galactosidase by *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 8: 105-27, 1964.
95. NIEHAUS Jr., W.G. & DULTS Jr., R.P. Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. J. Bacteriol., 151(1): 243-50, 1982.
96. NORDLIE, R.C. & FROMM, H.J. Ribitol dehydrogenase. II. Studies on the reaction mechanism. J. Biol. Chem., 234: 2523-31, 1959.
97. ONISHI, H. & SAITO, N. Studies on Osmophilic yeasts. Part XIV. Partial purification of polyol dehydrogenase from *Pichia miso* and the properties of this enzyme. Agr. Biol. Chem., 25(4): 245-51, 1962.
98. ONISHI, H. & SUZUKI, T. The production of xylitol, L-arabitol and ribitol by yeasts. Agr. Biol. Chem., 30: 1139-44, 1966.
99. ORTEC INC. MODEL 4.200 ELECTROPHORESIS SYSTEM USER'S MANUAL, Oak Ridge Tennessee, 1969.

100. OUCHTERLONY, O. & NILSON, I.A. Immunodifusion and immuno-electroforesis. In: Weir, D. ed. Handbook of experimental immunology. Oxford, Blackwell, 1978. p. 19.1-19.44.
101. PAIGEN, K. Phenomenon of transient repression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 91: 1201-9, 1966.
102. PAIGEN, K. & WILLIAMS, B. Catabolite repression and other control mechanisms in carbohydrate utilization. Adv. Microbiol. Physiol., 4: 251-324, 1970.
103. PEDRIQUE, M. & CASTILLO, F.J. Regulation of β -D-galactosidase synthesis in *Candida pseudotropicalis*. Appl. Environ. Microbiol., 43(2): 303-10, 1982.
104. PEIXOTO, B.G. & VEIGA, L.A. Phosphorylation of D-xylulose by *Candida albicans*. Arq. Biol. Tecnol., 17: 87-90, 1974.
105. PERLMAN, R.L.; CROMBRUGGHE, B. & PASTAN, I. Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in *Escherichia coli*. Nature, 223: 810-12, 1969.
106. PETERSON, E. & SORBER, H. General preparative procedures. Column chromatography of proteins: substituted celluloses. Methods Enzymol., 5: 3-32, 1962.
107. PURWIN, C.; LEIDUG, F. & HOLZER, H. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun., 107(4): 1482-9, 1982.
108. RIGO, L.U.; MARECHAL, L.R.; VIEIRA, M.M. & VEIGA, L.A. Oxidative pathway for L-rhamnose degradation in *Pullularia pullulans*. Can. J. Microbiol., 31: 817-22, 1985.
109. RUDOLPH, F.B. & FROMM, H.J. Plotting methods for analyzing enzymes rate data. Methods Enzymol., 63: 138-59, 1979.

110. SANCHEZ, J. & HARDISSON, C. Induction of β -galactosidase in *Streptomyces violaceus*. Can. J. Microbiol., 25: 833-40, 1979.
111. SANCHEZ, S. & SMILEY, K.L. Properties of D-xylose isomerase from *Streptomyces albus*. Appl. Microbiol., 29: 745-50, 1975.
112. SCHER, B.M. & HORECKER, B.L. Pentose metabolism in *Candida*. III. The thriphosphopyridine nucleotide-specific polyol dehydrogenase of *Candida utilis*. Arch. Biochem. Biophys., 116: 117-28, 1966.
113. SCHLANDERER, G. & DELLWEG, H. Cyclic AMP and catabolite repression in yeasts. In *Schizosaccharomyces pombe* glucose lowers both intracellular adenosine 3':5'-monophosphate levels and the activity of catabolite-sensitive enzymes. Eur. J. Biochem., 49: 305-16, 1974.
114. SEGEL, I.H. Steady-state kinetics of multireactant enzymes. In: _____. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York, Wiley-Interscience Publication, 1975. p. 505-845.
115. SHAMANNA, D.K. & SANDERSON, K.E. Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT 2. J. Bacteriol., 139: 64-70, 1979.
116. SHAW, D.R.D. Polyol dehydrogenase. 3. Galactitol dehydrogenase and D-iditol dehydrogenase. Biochem. J., 64: 394-405, 1956.
117. SIEGAL, M.R. & SASTER, H.D. Site of action of cicloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. I. Effect of the antibiotic on the cellular metabolism. Biochim. Biophys. Acta., 87: 70-82, 1964.

118. SLEIN, M.W. Xylose isomerase from *Pasteurella pestis*, strain A-1122. J. Am. Chem. Soc., 77: 1663-7, 1955.
119. SMILEY, K.L. & BOLEN, P.L. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. Biotechnol. Lett., 4(9): 607-10, 1982.
120. SPEZIALE, G.A. & van WIJK, R. Cyclic 3':5'-AMP phosphodiesterase of *Saccharomyces carlsbergensis*. Inhibition by adenosine 5'-triphosphate, inorganic pyrophosphate and inorganic polyphosphate. Biochim. Biophys. Acta, 235: 466-72, 1971.
121. SPIEGELMAN, S. & DUNN, R. Interactions between enzyme-forming systems during adaptation. J. Gen. Physiol., 31: 153-73, 1947.
122. SPIEGELMAN, S. & REINER, J.M. Formation and stabilization of an adaptative enzyme in the absence of its substrate. J. Gen. Physiol., 31: 175-93, 1947.
123. SUGAI, J.K. & VEIGA, L.A. Purification and properties of the xylitol dehydrogenase from *Pullularia pullulans*. An. Acad. brasil. Ciên., 53(1): 183-93, 1981.
124. SUZUKI, T. & ONISHI, H. Oxidation and reduction of D-xylose by cell-free extract of *Pichia quercuum*. Appl. Microbiol., 25: 850-2, 1973.
125. _____. Purification and properties of polyol: NADP oxidoreductase from *Pichia quercuum*. Agr. Biol. Chem., 39(12): 2389-97, 1975.
126. SWITZER, R.L. The inactivation of microbial enzymes in vivo. Ann. Rev. Microbiol., 31: 135-57, 1977.
127. SY, J. & RITCHER, D. Content of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and adenyl cyclase in yeast at various growth conditions. Biochemistry, 11: 2788-91, 1972.

128. TOMAZ, V.; ZANCAN, G.T. & FUNAYAMA, S. Regulation of L-lactate dehydrogenase levels in *Dactylium dendroides*. Rev. Microbiol. São Paulo, 14(4): 259-64, 1983.
129. TOMOEDA, M. & HORITSU, H. Pentose metabolism by *Candida utilis*. Part I. Xylose isomerase. Agr. Biol. Chem., 28: 139-43, 1964.
130. TORTORA, P.; BIRTEL, M.; LENZ, A.G. & HOLZER, H. Glucose-dependent metabolic interconversion of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun., 100(2): 688-95, 1981.
131. TYLER, B.; LOOMIS Jr.; W.F. & MAGASANIK, B. Transient repression of the lac operon. J. Bacteriol., 94(6): 2001-11, 1967.
132. VEIGA, L.A. Polyol dehydrogenase in *Candida albicans*. I. Reduction of D-xylose to xylitol. J. Gen. Appl. Microbiol., 14: 65-78, 1968.
133. _____. Polyol dehydrogenase in *Candida albicans*. II. Xylitol oxidation to D-xylulose. J. Gen. Appl. Microbiol., 14: 79-84, 1968.
134. VEIGA, L.A. The biochemical preparation of D-xylulose. Arg. Biol. Tecnol., 17: 65-67, 1974.
135. VEIGA, L.A.; BACILA, M. & HORECKER, B.L. Pentose metabolism in *Candida albicans*. I. The reduction of D-xylose and L-arabinose. Biochim. Biophys. Res. Comm., 2(6): 440-4, 1960.
136. VIEIRA, M.M.; RIGO, L.U.; MARECHAL, L.R. & VEIGA, L.A. Induction and catabolite repression of L-rhamnose dehydrogenase in *Pullularia pullulans*. J. Bacteriol., 138 (1): 55-9, 1979.

137. WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Isolierung and kristallisation des garungs ferments enolase. Biochem. Z., 310: 384-421, 1941.
138. WASHUETTL, J.; RIEDRER, P. & BANCHER, E. Qualitative and quantitative study of sugar alcohols in several foods. J. Food Sci., 38: 1262-3, 1974.
139. WATSON, J.A.; HAYASHI, J.A.; SCHUYTEMA, E. & DOUGHTY, C.C. Identification of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent aldehyde reductase in a *Rhodotorula* strain. J. Bacteriol., 100(1): 110-6, 1969.
140. WEBER, K.; PRINGLE, J.R. & OSBORN, M. Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. Methods Enzymol., 26: 3-27, 1972.
141. WIJK, R. van & KONIJN, T.M. Cyclic 3',5'-AMP in *Saccharomyces carlsbergensis* under various conditions of catabolite repression. FEBBS Lett., 13: 184-6, 1971.
142. WIJK, R. van; OUWEHAND, J.; BOS, T. van de & KONINGSBERGER, V.V. Induction and catabolite repression of α -glucosidase synthesis in protoplast of *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochim. Biophys. Acta., 186: 178-91, 1969.
143. WILLIAMS, L.S. & NEIDHARDT, F.C. Synthesis and inactivation of aminoacyl-transfer RNA synthetases during growth of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 43: 529-50, 1969.
144. WILLIAM-ASHMAN, H.G. & BANKS, J. The ketone reductase of rat liver and accessory sexual organs. Arch. Biochem. Biophys., 50: 513-5, 1954.
145. WRATTEN, C.C. & CLELAND, W.W. Product inhibition studies on yeast and alcohol dehydrogenases. Biochemistry, 2(4): 935-41, 1963.

146. WOOD, T.M. The cellulase of *Fusarium solani*. Resolution of the enzyme complex. Biochem. J.; 115: 457-64, 1969.
147. WOOD, W.E.; NEUBAUER, D.G. & STUTZENBERGER, F.J. Cyclic AMP levels during induction and repression of cellulase biosynthesis in *Thermomonospora curvata*. J. Bacteriol., 160 (3): 1047-54, 1984.
148. WOODS, D.D. Indole formation by bacterium coli. II. The action of washed suspensions of bacterium coli on indole derivatives. Biochem. J., 29(3-4): 649-55, 1935.
149. WU, T.T. Growth of a mutant of *Escherichia coli* K-12 on xylitol by recruiting enzymes for D-xylose and L 1,2-propanediol metabolism. Biochim. Biophys. Acta., 428: 656-63, 1976.
150. YAGIL, G. Quantitative aspects of protein induction. Curr. Top. Cell. Regul., 9: 183-236, 1975.
151. YAMANAKA, K. Purification, crystallization and properties of the D-xylose isomerase from *Lactobacillus brevis*. Biochim. Biophys. Acta., 151: 670-80, 1968.
152. YOSHITAKE, J.; SHIMAMURA, M. & IMAI, T. Xylitol production by a *Corynebacterium* species. Agr. Biol. Chem., 37 (10): 2251-9, 1973.