MÁRCIA HELENA MENDONÇA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR DE **DACTYLIUM DENDROIDES**

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

CURITIBA
1985

Tese Orientada pela

Dra. GLACI THEREZINHA ZANCAN

A DEUS, sob forma de oração e
aos meus pais, com amor.

A MINHA GRATIDÃO

À Dra. Glaci Therezinha Zancan pela confiança, orientação segura, apoio e dedicação constantes com que acompanhou todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Déa Amaral, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e, ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pelo incentivo e sugestões recebidas.

À Dra. Momoyo Nakano, e ao Dr. Shigehiro Funayama pela amizade, sugestões recebidas e pela revisão do presente trabalho.

Ao Dr. Luiz Alberto Veiga pelo fornecimento da D-fucose sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Dr. Aguinaldo Nascimento pelos trabalhos fotográficos.

À Roseli da Rocha Prado pelo carinho e pela assitência técnica no laboratório.

À CAPES pelo apoio financeiro durante todo o período de realização deste trabalho.

Aos professores, funcionários, colegas e amigos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pelo companheirismo, solidariedade e apoio sempre demonstrados.

SUMÁRIO

Página

SUMÁRIO v

LISTA DE TABELAS viii

LISTA DE FIGURAS xi

RESUMO xiii

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. OBJETIVOS DO TRABALHO 8

2. MATERIAIS E MÉTODOS 10

2.1. REAGENTES 10

2.2. MICRORGANISMO 11

2.3. MEIOS DE CULTURA 11

2.4. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E CULTIVO DO *Dactylium dendroides* 13

2.4.1. Conservação das Amostras 13

2.4.2. Preparo do Pré-Inóculo 13

2.4.3. Método de Cultivo do *D. dendroides* em Grande Escala 13

2.5. PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS 14

2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA 15

2.6.1. Dosagem da H_2O_2 (Método Enzimático Acoplado) 15

2.6.2. Determinação do Consumo de Oxigênio (Método do Eletrodo de Oxigênio) 16

2.7. UNIDADE DE ENZIMA E ATIVIDADE ESPECÍFICA 17

Páginas

2.8. CURVA DE CRESCIMENTO 17

2.9. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS 18

2.10. CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA ENZIMA NO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS 18

2.11. PURIFICAÇÃO DA GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR.. 18

2.11.1 Inativação Térmica 19

2.11.2 Fracionamento com Sulfato de Amônio 19

2.11.3 Cromatografia de Afinidade em Sepharose 6B 20

2.12. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 21

2.12.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS.. 22

2.13. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR 22

2.14. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A VELOCIDADE DA REAÇÃO 23

2.15. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA NA VELOCIDADE DA REAÇÃO 23

2.16. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA GALACTOSE OXIDASE 24

2.17. DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DE CATÁLISE 24

2.18. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO 24

2.19. EFEITO DOS INIBIDORES 26

2.19.1 Efeito do Dietilditiocarbamato 26

2.19.2 Efeito da H_2O_2 27

2.20. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIGÊNIO 27

3. RESULTADOS 30

3.1. PURIFICAÇÃO DA GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR DE *D. dendroides* 30

3.2. HOMOGENEIDADE DA ENZIMA 33

Páginas

3.3. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR 33

3.4. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO 34

3.5. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA 34

3.6. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁ - TICA 34

3.7. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA GALACTOSE OXIDASE.. 35

3.8. ESPECIFICIDADE 35

3.9. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA 35

3.10. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIGÊNIO 37

3.11. EFEITO DE INIBIDORES E AGENTES QUELANTES 37

3.11.1 Efeito do Dietilditiocarbamato 38

4. DISCUSSÃO 76

5. CONCLUSÕES 87

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88

LISTA DE TABELAS

Páginas

I TABELA DE PURIFICAÇÃO DA GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR DE *Dactylium dendroides* 39

II ESPECIFICIDADE DA ENZIMA 40

III PARÂMETROS CINÉTICOS DA GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR 41

IV EFEITO DE INIBIDORES 42

Lista de Figuras

Páginas

1. Centro ativo da galactose oxidase extracelular 5

2. Cronograma de purificação da galactose oxidase intracelular de *Dactylium dendroides* 29

3. Síntese da galactose oxidase em função do crescimento 43

4. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima no extrato livre de células 44

5. Perfil de eluição da galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* em coluna de Sepharose 6B 45

6. Homogeneidade da galactose oxidase intracelular em eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 3,6 46

7. Homogeneidade da galactose oxidase intracelular em eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,9 47

8. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida com SDS da enzima desnaturada 48

9. Determinação do peso molecular da galactose oxidase intracelular por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS 49

Páginas

10. Determinação do peso molecular da galactose oxidase por filtração em Biogel P-150.. 50

11. Efeito do tempo de incubação sobre a atividade da galactose oxidase 51

12. Efeito da concentração da galactose oxidase sobre a velocidade da reação enzimática ... 52

13. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática 53

14. Efeito do pH sobre a velocidade da reação enzimática 54

15. Efeito da concentração da D-galactose sobre a atividade enzimática sob tensão de O_2 a 20% 55

16. Gráfico de LINEWEAVER-BURK do efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática 56

17. Gráfico de SCATCHARD do efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática 57

18. Gráfico de HILL do efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática ... 58

19. Efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática sob tensão de O_2 a 60% 59

20. Efeito da concentração da dihidroxiacetona sobre a atividade enzimática 60

Páginas

21. Gráfico de SCATCHARD do efeito da concentração da dihidroxiacetona sobre a atividade enzimá - tica 61

22. Gráfico de HILL do efeito da concentração de dihidroxiacetona sobre a atividade enzimática. 62

23. Efeito da concentração da 2-desoxi-D-galactose sobre a atividade da galactose oxidase 63

24. Efeito da concentração de D-galactosamina so - bre a atividade enzimática 64

25. Efeito da concentração do metil-α-D-galactopi- ranosídeo sobre a atividade enzimática 65

26. Efeito da concentração do o-nitrofenil-β-D-ga- lactopiranosídeo sobre a atividade da galacto- se oxidase 66

27. Efeito da concentração da β-lactose sobre a atividade enzimática 67

28. Efeito da concentração da melibiose sobre a atividade enzimática 68

29. Efeito da concentração da rafinose sobre a ati- vidade da galactose oxidase 69

30. Efeito da concentração da estaquiose sobre a atividade enzimática 70

31. Efeito da concentração do guaran sobre a ativi- dade da galactose oxidase 71

Páginas

32. Efeito da concentração do oxigênio sobre a atividade da galactose oxidase intracelular 72

33. Gráfico de SCATCHARD do efeito da concentração do oxigênio sobre a atividade da galactose oxidase intracelular 73

34. Gráfico de HILL do efeito da concentração de oxigênio sobre a atividade enzimática 74

35. Efeito da concentração do dietilditiocarbamato sobre a atividade da galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* 75

RESUMO

A galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* foi purificada à homogeneidade com um rendimento de 64%. A enzima homogênea é uma proteína monomérica com 72.000 de peso molecular, pH ótimo entre 6,6 - 7,0 e temperatura ótima de 30°C. A galactose oxidase intracelular apresenta ampla especificidade e os valores de Km_{app} determinados para os diferentes substratos foram: D-galactose 40 mM; dihidroxiacetona 35 mM; 2-desoxi-D-galactose 83 mM; D-galactosamina 20 mM; metil-α-D-galactopiranosídeo 37,5 mM; o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo 50 mM; β-lactose 333 mM; melibiose 22 mM; rafinose 60 mM; estaquiose 14 mM e guaran 3,3 mM. A enzima apresenta uma cinética não Michaeliana para a maioria de seus substratos, sendo que os respectivos coeficientes de HILL foram determinados. A galactose oxidase intracelular apresenta cooperatividade cinética positiva para o oxigênio, com um $S_{0,5}$ de 290 μM e coeficiente de HILL (n_H) de 1,66. A enzima é inibida pela H_2O_2; cianeto; iodoacetamida e quelantes de metais como o dietilditiocarbamato, hidroxilamina e azida sódica.

1. INTRODUÇÃO

A galactose oxidase (D-galactose: oxigênio oxidoredutase EC. 1.1.3.9) é uma enzima que catalisa a oxidação da D-galactose a meso-galacto-Hexodialdose concomitantemente com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (11,12) .

A distribuição da galactose oxidase está limitada a um pequeno número de microrganismos, tendo sido evidenciada em *Dactylium dendroides* (9, 11, 12, 24) *Gibberella fujikuroi*, *Aspergillus japonicum*, *Absidia butleri*, *Daedaleopsis styracina*, *Neurospora crassa*, *Penicillium notatum* (1), *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., *Penicillum album*, *Fusarium* sp.(35), *Fusarium graminearum* (20) e *Beltraniella portoricensis* (68), embora somente nos dois primeiros a enzima seja secretada no meio de cultura em quantidades apreciáveis.

A grande maioria das características presentemente conhecidas da galactose oxidase extracelular de *D. dendroides* foram determinadas pelos trabalhos de AMARAL et al (7,9), AVIGAD et al (11, 12) BLUMBERG et al (17) e KELLY-FALCOZ et al (45). Estes investigadores estabeleceram os métodos iniciais para o cultivo do microrganismo e purificação da enzima, que serviram de base aos aperfeiçoamentos posteriores. O meio de composição definida para o cultivo do *D. dendroides* baseia-se na fórmula original estabelecida por AVIGAD et al (12), que contém extrato de levedura, tendo sido aperfeiçoado por MARKUS et al (61) pela adição de sulfato de cobre.

Estudando o efeito das condições do cultivo de *D. dendroides* na produção da galactose oxidase MARKUS et al (61) verificaram que a composição do meio, tamanho e idade do inóculo são fatores que interferem de forma significativa no aparecimento da enzima no meio extracelular. SHATZMAN & KOSMAN (77) constataram o efeito do pH do meio e da densidade da cultura na secreção da galactose oxidase e PEDROSA & ZANCAN (69) demonstraram o efeito das tensões do oxigênio sobre a síntese e a secreção da enzima.

Considerando que a preparação cristalina da galactose oxidase extracelular (7) apresentava contaminantes de origem proteica com atividade proteolítica (42, 43, 53), várias técnicas foram descritas para a obtenção de preparações homogêneas da enzima (42,64,80,82). A presença de isoenzimas da galactose oxidase em preparações comerciais e em concentrados do meio de cultura foi mostrado por KOSMAN et al (53) e TRESSEL & KOSMAN (80).

O peso molecular da enzima apresenta valores que variam de 39.000 a 75.000 (7, 14, 42, 45, 53, 89) sendo que o valor mais aceito é aquele de 68.000 (32) determinado por eletrofo - rese em gel de poliacrilamida (53).

A galactose oxidase extracelular de *D.dendroides* é uma proteína monomérica (53), de caracter básico (32). Os valores de ponto isoelétrico descritos variam de 7,6 (15) a 12,0 (14).

A atividade da galactose oxidase é totalmente inibida pelo dietilditiocarbamato e azida sódica, nas concentrações de 10^{-4} M e 10^{-3} M, respectivamente. Monoânions e ligantes neutros

como o cianeto (10^{-4} M) e hidroxilamina (10^{-3} M) também inibem totalmente a enzima (7,24). Os íons cloreto na concentração de $5x\ 10^{-3}$ M inibem cerca de 75% da atividade enzimática (39). A iodoacetamida (56) e a H_2O_2 (9, 12,39,57) têm forte efeito inibitórios a galactose oxidase. Nenhuma inibição foi observada com outros quelantes como EDTA, o-fenantrolina e α-α-dipiridil(7, 24).

A enzima é rapidamente inativada por β-mercaptoetanol e reativada por exposição ao ar (45). A velocidade da reação catalisada pela galactose oxidase é aumentada pela adição de superóxido ou de agentes como ferricianeto ou hexacloroiridato (23,41). A velocidade de consumo de O_2 diminui na presença de superóxido dismutase e ferrocianeto (40,41). A peroxidase ativa a galactose oxidase pela remoção da água oxigenada formada (55).

A galactose oxidase é uma metaloenzima onde o cobre está presente na proporção de um átomo-grama por mol de enzima (7, 45,53). O cobre se encontra firmemente ligado à enzima sendo somente removido por diálise contra H_2S ou tratamento com dietilditiocarbamato. A remoção do único íon de cobre da galactose oxidase resulta em uma apoenzima inativa. A atividade pode ser recuperada incubando-se a apoenzima com sais de cobre tanto na forma Cu(I) como Cu(II) mas não com outros metais (7). Os coeficientes de sedimentação de 4.76S e 4.8S para o holo e apoenzima, respectivamente sugerem que não haja uma mudança significativa na dimensão molecular com a remoção do cobre (53). O cobre é essencial para a atividade da galactose oxidase e seu papel na catálise tem sido exaustivamente estudado(17,23,27,29,3137,40,41,51,53,56,87).HAMILTON et al(40,41)baseados

em estudos de ressonância paramagnética eletrônica propõem um mecanismo de catálise envolvendo três estados distintos de óxido-redução para o cobre. O mecanismo proposto não é totalmente aceito por ETTINGER & KOSMAN (32) que acreditam sofrer o cobre uma conversão cíclica Cu (II) - Cu (I) durante o processo catalítico.

A composição em aminoácidos revelou a presença de 8 resíduos de histidina por molécula de enzima e de 7 resíduos de cisteína que estariam presentes na enzima nativa como pontes dissulfeto(45). A galactose oxidase extracelular possui 18 resíduos de triptofano(53) dos quais um estaria envolvido na catálise (30, 31, 54, 86). Os estudos de KWIATKOWSKI et al(56) indicam que um resíduo de histidina também estaria envolvido no processo catalítico. Baseados nos dados de ressonância paramagnética eletrônica e ressonância nuclear magnética - ^{19}F ETTINGER & KOSMAN (32) propõem uma estrutura para o centro ativo da galactose oxidase, que se encontra representado na Figura 1.

A especificidade da enzima é ampla, uma vez que derivados da galactose e galactosídeos como melibiose, rafinose, estaquiose e polímeros como guaran são oxidados pela galactose oxidase (9, 12, 13, 23, 74). Os derivados da série L, no entanto não são substratos para a enzima (12). Entre os açúcares, a conformação em C-4 é crítica, sendo que a glucose e seus derivados são completamente inertes (9, 12, 24, 50, 60, 74). As substituições em C_1,C_2,C_3 tem relativamente pouco efeito sobre a velocidade da reação (9,11,23,60,74), entretanto, as modificações em C_4 perturbaram a interação da enzima com o substrato, uma vez o grupo 4-hidroxil da galactopiranose cons-

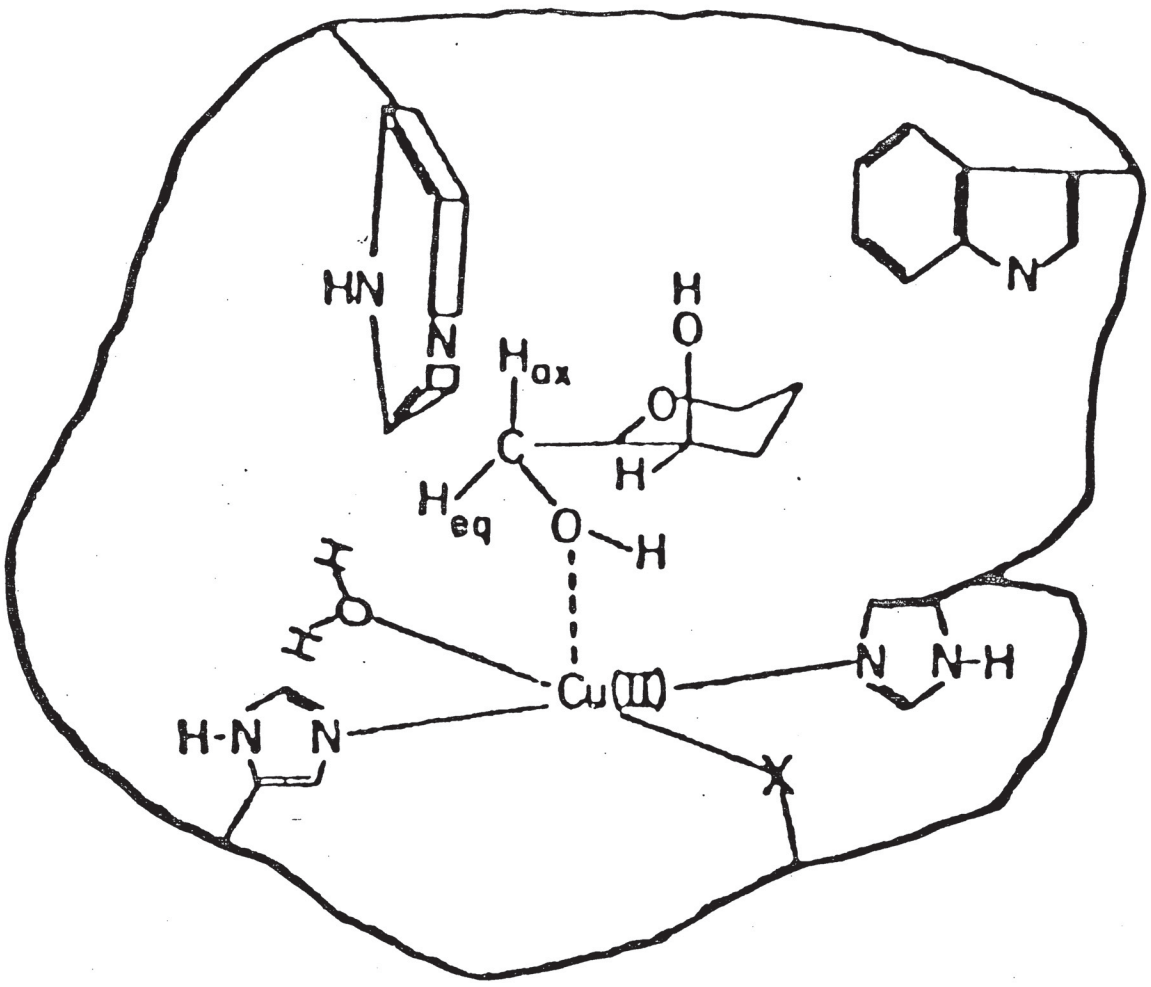


FIGURA 1. Sítio Ativo da Galactose Oxidase Extracelular de *D. dendroides* segundo ETTINGER E KOSMAN(32).

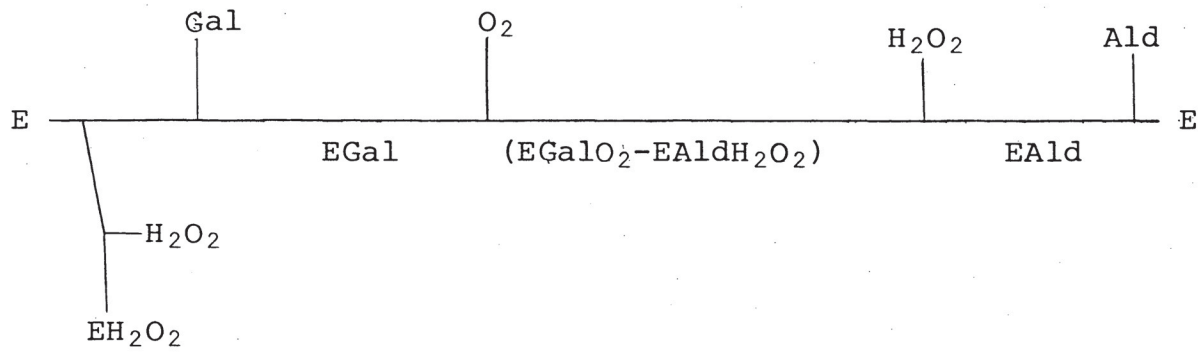
titui um substituinte de dimensão ótima para a interação com a enzima, servindo, provavelmente como âncora na fixação de substrato à superfície da enzima (60). Evidências indicam que o único elemento importante é o próprio grupo alcoólico primário, uma vez que a 6-desoxi-D-galactose (D-fucose) não inibe a oxidação da D-galactose e não afeta as propriedades espectrais do cobre com a enzima (56).

A galactose oxidase catalisa também a oxidação de outros compostos como dihidroxiacetona (90), β-hidroxipiruvato e glicoaldeído (23). Além disso um grande número de alcóois alifáticos e aromáticos, incluindo etilenoglicol (87), 1,3-propanediol, glicerol, álcool salicílico (39), álcool dimetoxibenzílico (55), 2-metileno-1,3-propanediol (23), 3-cloro-1,2-propanediol e 3-bromo-1,2-propanediol(50) são substratos para enzima.

Os estudos sobre o efeito da concentração dos substratos com a galactose oxidase extracelular de *D. dendroides*, mostraram que a enzima tem um comportamento Michaeliano (57). Os valores de Km para D-galactose relatados na literatura variam de 2,8 a 240 mM (12,13,23,38,39,57), enquanto que para o oxigênio o valor obtido foi de 3 mM (57). A constante de dissociação (K_d) para a dihidroxiacetona e para a D-galactose determinadas por MARWEDEL et al (62) são respectivamente 0,059M e 0,145M. Como a galactose oxidase apresenta uma afinidade muito maior para dihidroxiacetona (90) e para galactosídeos e polissacarídeos contendo resíduos terminais de D-galactose (12,23,74) admite-se não ser ela o substrato natural da enzima.

Dos estudos cinéticos realizados, HAMILTON et al (39) e KOSMAN et al (52) propuseram que a reação catalisada pela galactose oxidase obedeceria um mecanismo do tipo ping-pong, em

que a galactose se ligaria primeiro à enzima (29). Já KWIATKOWSKI et al (57) com o mesmo tipo de experimentos encontrou dados indicativos de um mecanismo sequencial, envolvendo um único complexo central, embora os resultados não excluam a possibilidade de um mecanismo "random BiBi". Associando os resultados obtidos nos experimentos cinéticos com aqueles realizados por WINKLER et al (87) e MARWEDEL & KURLAND (62) sobre a ligação dos substratos à enzima, na presença e na ausência de oxigênio, KWIATKOWSKI et al (57) postularam o seguinte mecanismo cinético para a enzima:



Todos os estudos realizados até 1981 envolveram a galactose oxidase extracelular de *Dactylium dendroides*, nesse mesmo ano foi constatado que o fungo *Gibberella fujikuroi* secretava no meio de cultura uma enzima com a mesma especificidade e o mesmo requerimento em cobre (1). Os estudos posteriores realizados indicaram que a enzima de *G. fujikuroi* é uma enzima distinta apresentando um ponto isoelétrico de 3,7, um peso molecular de 90.000 e contém ferro na molécula além de um átomo de cobre que participa da atividade catalítica (1,2). A referida

enzima apresenta cinética não Michaeliana para a D-galactose (3,4) e determinantes antigênicos distintos daqueles da ga - lactose oxidase de *D. dendroides* (64).

1.1. OBJETIVOS DO TRABALHO

A secreção de enzimas em fungos e leveduras tem sido estudada, empregando-se como modelos, principalmente, a inverta - se (65) e a fosfatase ácida (34). Os estudos foram iniciados pela análise comparativa das formas intra e extracelulares das enzimas citadas, verificando-se que as formas extracelulares apresentavam um teor mais elevado em carboidratos do que as formas intracelulares (36,83). O processo de glicosilação de ambas as enzimas é semelhante ao descrito para as enzimas de células animais (71, 88) e as de células vegetais superiores (21) e envolve a participação de derivados do dolicol, como doadores de radicais glicosila (75,78).Porém, em *Achlya ambisexualis* (76) um eucariote primitivo, o mecanismo de glicosila - ção envolve uma proteína doadora de radical glicosila. Portanto, a secreção de enzimas em fungos parece envolver vários mecanismos, fazendo-se necessário ampliar o número de enzimas e microrganismos estudados para que se tenha uma visão completa sobre o assunto (79).

Com o propósito de iniciar os estudos sobre a secre - ção da galactose oxidase em *D. dendroides*, o presente trabalho visa o isolamento e a caracterização da enzima intracelu - lar que até o momento não havia sido submetida a estudos sis -

temáticos, havendo na literatura apenas citações de sua pre - sença (61,64,77).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES

Acrilamida, albumina bovina fração V, 4-aminoantipirina, Azul de dextrana, Azul de Coomassie Brilhante G-250, e R-250, o-dianisidina, dihidroxiacetona, estaquiose, D-fucose, glicolaldeído, β-hidroxipiruvato, iodoacetamida, o-metil-α-D-galactopiranosídeo, MES[Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico], β-mercaptoetanol, o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo, padrões para determinação de peso molecular (albumina bovina "cross linked", albumina bovina, hemoglobina "cross linked", α-lactalbumina, anidrase carbônica, ovoalbumina), peroxidase, SDS (dodecil sulfato de sódio), TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina), TES{Ácido N-tris[(hidroximetil)-metil]-2-aminoetanosulfônico e Ácido 2[(2-hidroxi-1)1 bis(hidroximetil)etil] aminoetano sulfônico}, foram obtidos da Sigma Chemical Company. Bisacrilamida foi obtida da Aldrich Chemical Co. Inc. e Biogel P-150 do Bio-Rad Laboratories. Azida sódica, cianeto de sódio, dietilditiocarbamato, D-glucose e hidroxilamina eram produtos da Merck AG. Darmstadt. D-galactose, β-lactose, melibiose, rafinose provieram da Calbiochem, a 2-desoxi-D-galactose era da Nutritional Biochemicals Corporation. Sepharose 6B foi obtida da Pharmacia Fine Chemicals. Guaran foi cedido gentilmente pela Dra. Déa Amaral. As demais substâncias utilizadas neste trabalho foram obtidas de diversas fontes e consideradas quimica -

camente puras.

A concentração de água oxigenada utilizada nos ensaios foi determinada pelas técnicas de DEL RIO et al (25) e de VOGEL (84).

2.2. MICRORGANISMO

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

O fungo foi classificado originalmente como *Polyporus circinatus* Fr. (24). A classificação foi contestada por NOBLES et al (67) que sugeriu ser o fungo o *Dactylium dendroides*. Entretanto, considerável incerteza persiste quanto à identificação da linhagem produtora da galactose oxidase. Vários estudos (46, 47, 48, 49) foram realizados na tentativa de esclarecer a posição taxonômica do microrganismo e os resultados sugerem fortemente ser o mesmo uma espécie distinta do *Dactylium dendroides*.

2.3. MEIOS DE CULTURA

2.3.1. O meio de cultura sólido empregado foi o ágar malte com a seguinte composição:

Extrato de malte	3,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
Ágar	1,5 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

A esterilização deste meio foi realizada em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos, após o que os tubos foram inclinados.

2.3.2. O meio líquido proposto por MARKUS et al (61) utilizado continha os seguintes componentes:

KH_2PO_4 anidro	9,0 g
Na_2HPO_4 anidro	8,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	2,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,2 g
NH_4NO_3	1,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
$MnSO_4.5H_2O$	2,0 mg
$CuSO_4.5H_2O$	2,5 mg
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O pH final do meio foi corrigido para 5,8 com ácido clorídrico 1:1(v/v). A determinação do pH foi realizada em potenciômetro Metrohn Herisau E 520. O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão durante 20 minutos.

Como fonte de carbono foi empregada a D-glucose, esterilizada separadamente em vapor fluente durante 30 minutos e adicionada assepticamente ao meio de cultura na concentração final

de 1%.

2.4. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E CULTIVO DO *Dactylium dendroides*

2.4.1. Conservação das Amostras

As amostras de *D. dendroides* foram cultivadas em ágar malte a 1,5%, incubadas a 28°C por 3 a 5 dias e, a seguir, estocadas em geladeira a 4°C, sendo feitas transferências tri - mestrais.

2.4.2. Preparo do Pré-Inóculo

Uma amostra de micélio desenvolvido em ágar malte foi transferida para um frasco erlenmeyer de 250 ml de capacidade com 50 ml de meio líquido descrito por Markus et al (61) con - tendo D-glucose a 1%. O crescimento foi efetuado por um período de 48 horas com agitação contínua em agitador rotatório(New Brunswick Scientific Co.) a 100 rpm a 28°C. As culturas assim obtidas constituiram o pré-inóculo.

2.4.3. Método de Cultivo do *D. dendroides* em Grande Escala

O cultivo do *D. dendroides* em grande escala foi efetuado em frascos erlenmeyer de 2 litros com 500 ml de meio líquido de MARKUS et al (61) contendo D-glucose a 1% como fonte de

carbono.

Uma relação de 1:4 entre volume do meio e do frasco foi mantida constante em todos os cultivos realizados durante o trabalho visando evitar variações na influência do teor de oxigênio sobre a produção da enzima.

O pré-inóculo foi homogeneizado à velocidade máxima do liquidificador Waring Blendor por 30 segundos. Dois ml do homogeneizado foram transferidos assepticamente para cada frasco contendo o meio de crescimento. O crescimento do *D. dendroides* foi feito por 36 horas em agitador rotatório (New Brunswick Scientific Co.) a 100 rpm e a temperatura de 28°C. Os micélios foram então colhidos por filtração, sendo lavados com água destilada. Após a remoção do líquido de lavagem por filtração à vácuo, os micélios foram pesados e conservados em congelador a -17°C. O rendimento assim obtido foi de aproximadamente 20 gramas de micélio úmido por litro de meio.

2.5. PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

Os micélios congelados foram suspensos em tampão fosfato 10mM pH 7,0 contendo EDTA 0,5mM na proporção de 1:2(p/v). O rompimento das células foi realizado em prensa (French Press - Aminco Instrument) com o pistão previamente gelado, sob uma pressão de 20.000 PSI (pounds per square inch). A operação na prensa foi realizada duas vezes para cada fração de suspensão micelial(cerca de 40 ml). Os fragmentos celulares e as células intactas foram removidos por centrifugação a 17.600 g por

15 minutos em centrífuga refrigerada (Beckman-Modelo J 21-B). O precipitado foi desprezado e o sobrenadante assim obtido é referido como extrato bruto ou extrato livre de células e continha, em média, 8,0 mg de proteínas por ml. O extrato livre de células foi utilizado diretamente para a determinação de atividade enzimática.

2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da galactose oxidase intracelular foi determinada por dois métodos: pela dosagem da H_2O_2 formada e pelo consumo de oxigênio.

$$\underline{D}\text{-galactose} + O_2 \xrightarrow[\text{galactose oxidase}]{} \text{meso-galacto-Hexodialdose} + H_2O_2.$$

2.6.1. Dosagem da H_2O_2 (método enzimático acoplado)

O método enzimático acoplado empregado foi o de AISAKA & TERADA (1). A decomposição da água oxigenada formada, em presença de peroxidase, neste método acopla oxidativamente a 4-aminoantipirina ao fenol, resultando num produto corado, a quinoneimina, que apresenta absorção máxima a 500nm (6).

O sistema de incubação em um volume de 1 ml continha 15 µmoles de tampão fosfato pH 7,0, 75 µmoles de $\underline{D}$-galactose, 0,48 µmoles de 4-aminoantipirina, 7,0 µmoles de fenol, 6,7 unidades de peroxidase e um volume variável de enzima. A reação sempre foi iniciada pela adição da enzima. Após a incubação a 30°C por 10 minutos a coloração desenvolvida era estimada pela absorbân-

cia a 500 nm em espectrofotômetro Beckman DU-2,equipado com registrador. A conversão das unidades de absorbância em µmoles de H_2O_2 foi realizada pelo emprego de curva padrão (10 a 280 nmoles de H_2O_2). Todos os controles sem enzima e os controles sem substratos foram efetuados na determinação da atividade enzimática. Em ambos os casos não era observado o desenvolvimento da reação colorida.

2.6.2. Determinação de Consumo de Oxigênio (Método do Eletrodo de Oxigênio)

A atividade de galactose oxidase foi determinada pela medida do consumo de oxigênio(8) utilizando-se um oxígrafo Gilson Modelo K-IC, equipado com um eletrodo de Clark,um registrador e um banho termostaticamente controlado para manter a temperatura constante de 30°C. A mistura de reação consistia de 20 µmoles de tampão fosfato pH 7,0, 100 µmoles de D-galactose e um volume adequado de galactose oxidase, para um volume final de 1,4 ml.

Nos ensaios as soluções reagentes foram estabilizadas à temperatura de 30°C por um período de, no mínimo, 15 minutos antes de se iniciar a reação. Para os experimentos realizados com o teor de O_2 a 20%, as soluções envolvidas na reação foram submetidas a borbulhamento com ar durante o mesmo período de 15 minutos.

2.7. UNIDADE DE ENZIMA E ATIVIDADE ESPECÍFICA

Uma unidade (U) de galactose oxidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de H_2O_2 por minuto ou que consome 1 μmol de O_2 por minuto nas condições do ensaio e a atividade específica como a razão entre unidade de enzima e miligrama de proteína.

2.8. CURVA DE CRESCIMENTO

Para determinar o crescimento do fungo em função do tempo, volumes de 500 ml do meio de MARKUS et al (61) foram distribuídos em erlenmeyers de 2000 ml de capacidade, autoclavados e adicionados posteriormente da fonte de carbono. Cada um destes meios foi inoculado com 2 ml do pré-inóculo homogeneizado e incubados a 28°C sob agitação contínua (100 rpm). Em intervalos de tempo pré-determinados, entre 12 e 84 horas, alíquotas de 50 ml do meio de cultivo foram filtradas em discos de papel Wheaton de peso conhecido e adaptados em aparelho de filtração Millipore. Os filtros contendo os micélios foram secados em estufa a 60°C até peso constante.

Paralelamente, a cada intervalo de tempo, o restante dos micélios foi colhido por filtração e procedeu-se ao preparo do extrato livre de células, como anteriormente descrito. O aparecimento da galactose oxidase na massa micelial, em função do tempo, foi monitorada pela determinação da atividade enzimática, pelo método enzimático acoplado, nos extratos livres de

células correspondentes aos diferentes tempos de crescimento.

2.9. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação de proteínas foi realizada pelo método proposto por LOWRY et al (59), utilizando-se um padrão soro albumina bovina. A dosagem de proteínas nas frações eluídas da coluna de Sepharose 6B foi realizada segundo o método de WARBURG & CHRISTIAN (85).

2.10. CINÉTICA DA INATIVAÇÃO TÉRMICA DA ENZIMA NO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS.

A estabilidade técnica da galactose oxidase no extrato livre de células determinada submetendo-se frações de 5ml do mesmo à diferentes temperaturas (0^{o} a $80^{o}C$) por 5 minutos. As amostras foram então rapidamente resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 17.600 g por 15 minutos. Alíquotas de 20 µl dos sobrenadantes foram tomadas para a determinação da atividade enzimática e alíquotas de igual volume para a dosagem das proteínas.

2.11. PURIFICAÇÃO DA GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR

O cronograma de purificação da galactose oxidase intracelular está apresentado na Figura 2.

Todas as operações descritas foram realizadas em baixa

temperatura, utilizando-se banho de gelo ou câmara de refri - geração a 4°C com exceção da etapa de inativação térmica.

O extrato livre de células (390 ml) obtido por compres - são-descompressão de 160 g de micélios foi submetido às seguintes etapas de purificação:

2.11.1. Inativação Térmica

Após ensaios prévios que demonstraram ser a enzima relativamente estável a 60°C durante 5 minutos (Figura 4), o ex - trato livre de células (390 ml) foi submetido à estas condi - ções em frações, de aproximadamente 50 ml, com controle rigoroso de tempo e temperatura. Após a inativação as frações foram rapidamente resfriadas por imersão em banho de gelo e sal. O precipitado foi removido por centrifugação a 17.600 g por 15 mi - nutos e uma alíquota do sobrenadante foi reservada para a de - terminação da atividade enzimática e da concentração em pro - teínas.

2.11.2. Fracionamento com Sulfato de Amônio

Ao sobrenadante da etapa anterior (370 ml) foi adicionado $(NH_4)_2SO_4$ sólido gradualmente e sob agitação suave até a saturação de 45%. A solução foi mantida em repouso por 10 mi - nutos e após a centrifugação a 17.600 g por 15 minutos, o precipitado foi removido e ao sobrenadante (400 ml) foi novamente adicionado sulfato de amônio sólido até 65% de saturação. A mis-

tura foi deixada em repouso por 10 minutos e centrifugada a 17.600 g por 15 minutos. O precipitado contendo a enzima foi ressuspenso em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, em um volume de aproximadamente 1/40 (10 ml) do volume de extrato inicial, e dialisado contra tampão acetato de amônio 100 mM pH 7,2 contendo $CuSO_4$ 0,5 mM por 15 horas.

2.11.3. Cromatografia de Afinidade em Sepharose 6B

O dialisado (171 mg de proteínas) contendo a enzima foi cromatografado em uma coluna de Sepharose 6B (2 x 18 cm) previamente equilibrada com tampão acetato de amônio 100mM pH 7,2 com um fluxo constante de 0,5 ml/min. As proteínas contaminantes foram eluídas com um volume de 250 ml do mesmo tampão ou até que a concentração de proteínas nas frações (5 ml) coletadas com auxílio de um coletor de frações (Ultrorac Fraction Collector LKB 7000), apresentassem concentração de proteínas inferior a 0,0025 mg/ml. O eluente foi substituído por uma solução de D-fucose 100mM em tampão acetato de amônio 100mM pH 7,2, passando-se a coletar frações de 2 ml. As frações contendo de 20 a 50 unidades de enzima foram reunidas, distribuídas em frações de 0,5 ml e conservadas a - 17°C.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima temendo-se a interferência da D-fucose, a preparação enzimática foi submetida à diálise contra tampão acetato de amônio 10 mM pH 7,2 pelos períodos de 4 e 15 horas. A enzima apresentou elevada perda de atividade, da ordem de 35% e 49%, respectivamente, mantendo o mesmo comportamento cinético que apresentava antes de

ser submetida à diálise. Considerando-se estes resultados op - tou-se por conservar a enzima em D-fucose, uma vez que a sua presença contribuia para a estabilidade da enzima.

2.12. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de poliacrilamida para a verifi - cação da homogeneidade da enzima foi realizada utilizando-se gel a 8% (18) em pH 3,6 e 8,9 à temperatura de 4°C. Em pH 8,9 a eletroforese foi realizada em tampão Tris-borato 65 mM e corrente de 2 mA/gel (0,5 x 8 cm) durante 2,5 a 3,0 horas. O marcador de corrida empregado foi o azul de bromo fenol a 1%. Em pH 3,6 a eletroforese foi realizada em tampão glicina-HCl 100mM e corrente de 2 mA por gel (0,5 x 8 cm) durante 4,5 a 5,0 ho - ras. O indicador de corrida utilizado foi o verde de metila a 1%. A corrida foi realizada até o indicador atingir o limite do gel. As frações enzimáticas foram concentradas à vácuo em concentrador rotatório, após diálise contra H_2O destilada com agitação durante 3 horas.

A revelação para proteínas foi feita em ambos os casos com Azul de Coomassie Brilhante G-250 (16). Os géis empregados para a verificação da atividade da galactose oxidase foram preparados com a adição de D-galactose a 1%. A atividade enzimática nos géis foi então observada pela incubação dos mesmos a 30°C por 30 a 60 minutos em tampão fosfato 100mM pH 7,0 contendo o-dianisidina e peroxidase na concentração de 0,1 mg/ml cada uma (7,12). Um gel preparado sem substrato foi usado como controle em todos experimentos.

Para as corridas eletroforéticas utilizou-se uma fonte de energia para eletroforese Ortec.

2.12.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS

A galactose oxidase intracelular purificada foi tratada com SDS a 2,5% e β-mercaptoetanol a 2,0% e, incubada por 15 minutos em banho-maria fervente segundo o método proposto por FAIRBANKS (33). A amostra, bem como os padrões de albumina e hemoglobina "cross linked" previamente desnaturados, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS a 0,1%. A corrida eletroforética foi efetuada em tampão Tris-acetato 50 mM pH 7,4 contendo 1 mM de SDS a 4°C durante 2,5 a 3,0 horas. Durante os primeiros 10 minutos foram aplicados 4 mA/gel (0,5 x 8,0 cm) e após este período até o fim da corrida a corrente aplicada foi de 8 mA/gel. A revelação de proteínas foi feita com Azul de Coomassie Brilhante R-250 por 12 horas, e a descoloração foi feita com uma solução de metanol, ácido acético glacial e água destilada (3:1:6).

2.13. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

O peso molecular da galactose oxidase intracelular foi também determinado por filtração em coluna de Biogel P-150 (1,0 x 41,0 cm) de acordo com o método de ANDREWS (10). A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato 50 mM pH 7,2. Para a calibração da coluna foram utilizados os seguintes padrões de

peso molecular: α- lactalbumina (14.200); anidrase carbônica (29.000); ovoalbumina (45.000); monômero e dímero da soro albumina bovina (66.000) e (132.000), respectivamente. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão mantendo-se um fluxo constante de 0,4 ml/min a uma pressão hidrostática de 15 cm. A galactose oxidase intracelular foi determinada pela atividade enzimática, os padrões de peso molecular pela medida espectrofotométrica em 280 nm e, finalmente, o Azul de dextrana em 625 nm.

2.14. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A VELOCIDADE DA REAÇÃO

O sistema reação contendo 75 µmoles de D-galactose, 15 µmoles de tampão fosfato pH 7,0 e 0,06 µg de enzima foi incubado a 30°C por diferentes períodos de tempo (0 a 30 minutos). Nos diferentes tempos procedeu-se a estimativa da H_2O_2 produzida, pelo método enzimático acoplado.

2.15. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA NA VELOCIDADE DA REAÇÃO

O efeito da concentração da galactose oxidase intracelular sobre a velocidade de oxidação da D-galactose foi determinada pelo método enzimático acoplado em sistema contendo 300 µmoles de D-galactose e quantidades crescentes de enzima (0,13 a 0,65 µg). O sistema foi incubado a 30°C por 10 minutos. A velocidade da reação foi avaliada pela produção de H_2O_2.

2.16. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA GALACTOSE OXIDASE

Para a determinação da temperatura ótima para a atividade da enzima, alíquotas de 0,30 µg de galactose oxidase foram incubados durante 10 minutos em diferentes temperaturas, empregando-se o sistema de incubação e o método descritos no ítem 2.6.1.

2.17. DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DE CATÁLISE

A determinação do pH ótimo para a atividade da galactose oxidase foi realizada em um sistema de incubação análogo ao descrito no ítem 2.6.1. contendo 15 mM de tampão fosfato (pH 5,5 a 8,0), ou 15 mM de tampão MES (pH 5,0 a 6,7) ou tampão TES (pH 6,7 a 8,2). Os valores de pH foram aferidos antes e depois de se processar a reação, com um microeletrodo de vidro, em potenciômetro Metrohn Herisau E 520. A reação foi iniciada pela adição de 0,3 µg de enzima, tendo sido o sistema de incubação pré-termostatizado a 30°C por 10 minutos. A velocidade da reação foi avaliada pela produção de H_2O_2.

2.18. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

Com a finalidade de se determinar as constantes cinéticas da galactose oxidase intracelular a preparação enzimática purificada foi ensaiada frente à diversos substratos tais co-

mo: D-galactose,dihidroxiacetona, ácido β-hidroxipirúvico, D-galactosamina, β-lactose, melibiose, rafinose, estaquiose,glicerol, 2-desoxi-D-galactose, glicolaldeído, metil- α -D-galactopiranosídeo, o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo e guaran. O sistema de reação foi aquêle descrito no ítem 2.6.1., variando-se a concentração do substrato. A reação foi iniciada pela adição da enzima e o sistema reacional foi estabilizado por prévia incubação a 30°C por 10 minutos. A reação enzimática foi seguida a 500 nm em intervalos de 1 minuto, durante 5 minutos para se determinar as velocidades iniciais. O Km app e a Vmáx da galactose oxidase intracelular para os diferentes substratos foram calculados pelos gráficos duplos recíprocos de LINEWEAVER-BURK (58). As constantes cinéticas para a D-galactose e a dihidroxiacetona foram também determinadas pelo método polarográfico, medindo-se diretamente o consumo de oxigênio de forma a eliminar as possíveis interferências advindas do sistema acoplado (23, 32, 39, 55, 81).

Todos os resultados apresentados são a média de 3 experimentos, com exceção da D-galactose e dihidroxiacetona que representam a média de 5 experimentos no sistema enzimático acoplado e de 4 no método polarográfico. As curvas apresentadas para a determinação dos Kms aparentes, nos gráficos duplos recíprocos, bem como as presentes nos gráficos de HILL (44), foram traçadas pelo método dos mínimos quadrados.

2.19. EFEITO DOS INIBIDORES

Foram analisados os efeitos da iodoacetamida, azida sódica, hidroxilamina, dietilditiocarbamato, cianeto de sódio e peróxido de hidrogênio sobre a oxidação da D-galactose pela galactose oxidase. Para evitar as interferências devidas à peroxidase (23, 55, 81) do sistema de reação, o método polarográfico foi empregado para medir o efeito dos inibidores, com exceção da iodoacetamida e do cianeto, que provocam o envenenamento do eletrodo. O ensaio controle consistia de 20 µmoles de tampão fosfato pH 7,0; 420 µmoles de D-galactose; 0,65 µg de galactose oxidase intracelular para um volume final de 1,4 ml em sistema saturado de ar (20% O_2) à 30°C. Nos ensaios de inibição foram utilizadas concentrações fixas dos inibidores que foram determinadas experimentalmente. A enzima era sempre pré-incubada com o inibidor na mistura de reação, sendo a reação iniciada pela adição de D-galactose.

2.19.1. Efeito do Dietilditiocarbamato

O efeito do dietilditiocarbamato foi efetuado pelo método polarográfico num sistema contendo concentração fixa de D-galactose (300 mM) e concentrações crescentes de inibidor. As concentrações de dietilditiocarbamato variaram de 1×10^{-7} M a 1×10^{-5} M.

2.19.2. Efeito da H_2O_2

Para o estudo do efeito da concentração da H_2O_2 sobre a velocidade da reação enzimática foram usadas nas concentrações finais de 2 mM e 3 mM. Considerando-se a decomposição espontânea do peróxido de hidrogênio e conseqüente produção de O_2 foi efetuado um ensaio em branco que consistia do sistema completo saturado de ar, com as referidas concentrações finais de H_2O_2, porém sem a presença da enzima. A produção de O_2 decorrente da decomposição espontânea da H_2O_2 e o consumo de O_2 dos sistemas de incubação completo permitem o cálculo da velocidade diferencial de consumo de O_2, que era praticamente constante para uma determinada concentração de H_2O_2. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições descritas no ítem 2.19.

2.20. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIGÊNIO

O efeito das concentrações crescentes de 5,0 a 80% de O_2 foi determinado pelo método polarográfico tendo sido determinadas apenas as velocidades iniciais a cada concentração de oxigênio. As concentrações de oxigênio menores que 20% foram obtidas pelo borbulhamento de argônio no sistema de incubação até que a concentração de O_2 baixasse ao nível desejado. As concentrações superiores a 20% foram obtidas pelo borbulhamento direto de O_2 no sistema.

O sistema de reação continha 20 µmoles de tampão fosfato pH 7,0; 420 µmoles de D-galactose e 1,0 µg de galactose oxidase

num volume final de 1,4 ml. Em cada ponto da curva foi efetuado um ensaio sem a adição da enzima para se determinar o consumo endógeno de oxigênio.

As preparações enzimáticas purificadas utilizadas nos ensaios cinéticos foram submetidas ao ensaio de ELSTNER et al (28), modificado por PEDROSA & ZANCAN (69) para a determinação da atividade da superóxido dismutase. Foram ensaiadas concentrações de 1,0 2,0 e 5,0 µg de galactose oxidase intracelular não tendo sido evidenciada contaminação das preparações enzimáticas pela superóxido dismutase.

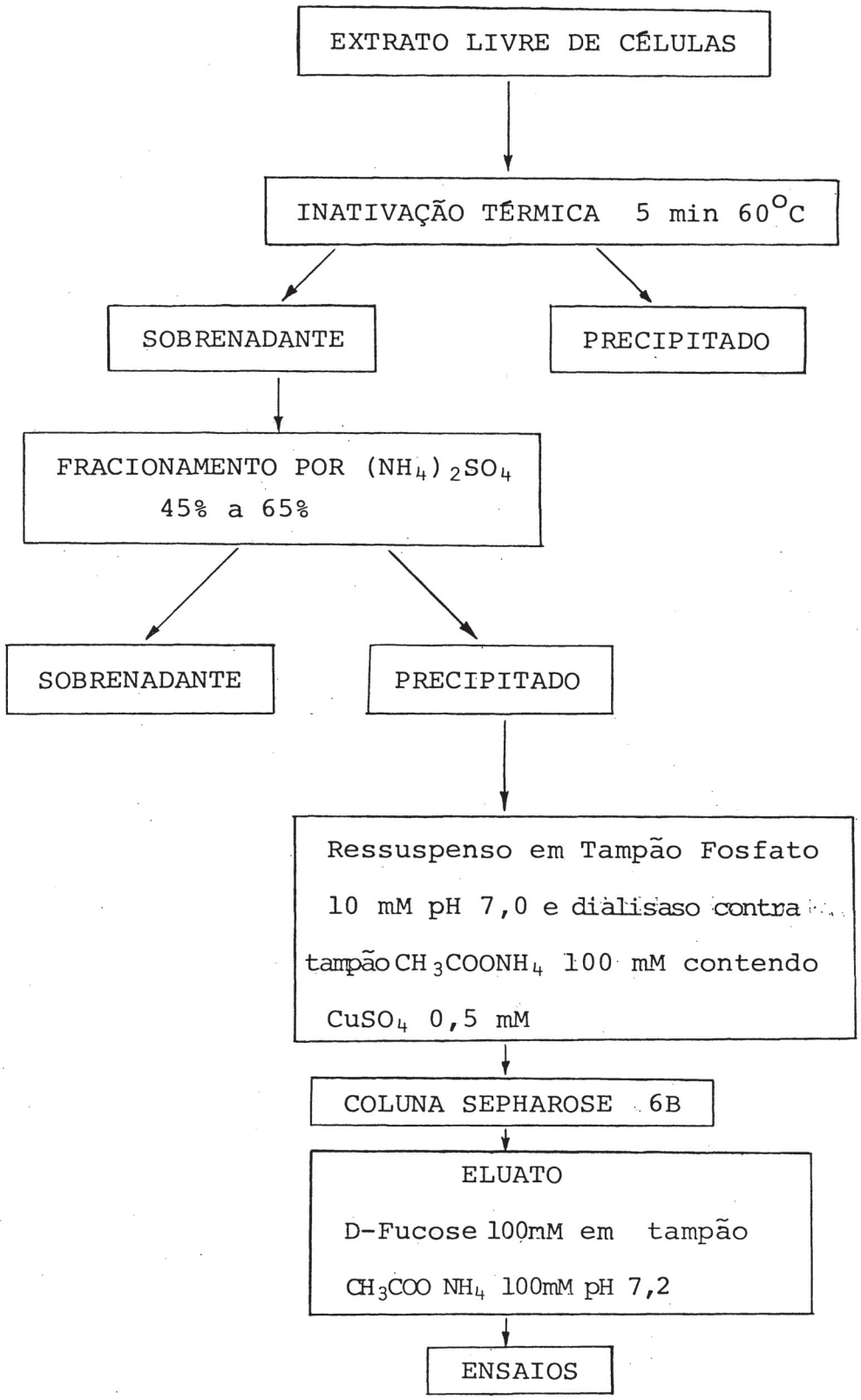


FIGURA 2. Cronograma de Purificação da Galactose Oxidase Intracelular de *Dactylium dendroides*

3. RESULTADOS

3.1. PURIFICAÇÃO DA GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR DE *D. dendroides*.

O nível da galactose oxidase intracelular do fungo *Dactylium dendroides* aumenta simultaneamente com o crescimento do microrganismo, que atinge o máximo em 60 horas. Após este período há redução da massa micelial e decréscimo na atividade da enzima intracelular. Por esta razão os micélios do fungo visando a obtenção da enzima intracelular foram cultivados durante 36 horas, período em que coincidem o final da fase exponencial de crescimento do microrganismo e o início da fase estacionária no aparecimento da enzima micélial. Estes resultados podem ser verificados na Figura 3, que ilustra o crescimento do fungo e o teor da galactose oxidase na massa micelial em função do tempo.

Na determinação da estabilidade da enzima no extrato livre de células (Figura 4) foi verificado que entre 30° e 60°C, há uma redução lenta e gradual da atividade enzimática. Além desta temperatura houve rápida inativação. Para a etapa de inativação térmica na purificação da galactose oxidase intracelular a temperatura escolhida foi 60°C porque, embora o extrato tratado à esta temperatura sofresse uma perda de aproximadamente 14% de sua atividade, ainda assim, apresentava atividade específica

consideravelmente maior que os submetidos à 40° e 50°C.

Antes que a metodologia para a purificação da enzima ficasse estabelecida, uma série de tentativas foram realiza - das, com base nos processos empregados anteriormente por ou - tros autores. O tratamento com DEAE-celulose equilibrada em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, tanto em "batch" (80), como em coluna (7, 9, 11, 12), mesmo com a aplicação de um gradiente linear de tampão fosfato pH 7,0 de 10 a 100 mM mostraram-se ineficazes, uma vez que cerca de 50% da atividade permanecia retida na resina. Também a cromatografia em CM-celulose,equi- librada em tampão fosfato 10 mM, foi realizada em diferentes pHs; 5,6; 7,0(41) e 7,8(53),mas não se mostrou efetiva resultando respectivamente, na recuperação de 0; 38 e 24% da atividade enzimática, quando a eluição era realizada com gra- diente linear de tampão fosfato. O emprego de gradiente de NaCl, de 10 a 100 mM em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, melho - rou o perfil de eluição, embora as preparações enzimáticas resultassem bem menos estáveis. A cromatografia em fosfoce - lulose equilibrada em tampão fosfato 10 mM, pH 7,8 e eluição em gradiente linear de tampão fosfato, (10 a 100 mM), con - forme proposta por TRESSEL & KOSMAN (80,82) repetiu os mes - mos resultados observados com as outras resinas. A baixa re- cuperação da atividade enzimática nestas resinas trocadoras de íons, sugeria que de alguma forma a enzima permanecia re- tida em suas matrizes. A substituição do fosfato pelo NaCl no gradiente de força iônica para a eluição da enzima das colu- nas de fosfocelulose, resultou na obtenção de um melhor ren- dimento. No entanto, a enzima se apresentava instável, per - dendo 80% de sua atividade após 15 horas na geladeira ou 25%

na diálise de 3 horas contra tampão acetato de amônio 100mM pH 7,2, contendo $CuSO_4$ 0,5 mM. Além disto, as preparações enzimáticas não se apresentavam homogêneas, sendo que muitas proteínas contaminantes eram eluídas juntamente com a enzima. A cromatografia de afinidade em Sepharose 6B, como originalmente proposta por HATTON & REGOECZI (42,43) não apresentou resultado para a enzima intracelular porque esta não era eluída no próprio tampão de equilíbrio como a forma extracelular, necessitando de eluição específica.

Igualmente infrutíferas foram as tentativas de concentrar a enzima por ultracentrifugação em membranas Diaflo PM 10 ou em membranas de Millipore ou mesmo em saco de diálise, por gradiente de concentração, uma vez que a enzima aderia fortemente a estes materiais. Estes resultados sugerem que a galactose oxidase intracelular apresente uma afinidade significativamente maior por matrizes contendo resíduos de carboidratos do que a forma extracelular o que explicaria a purificação insatisfatória da enzima pelos processos preconizados na literatura especializada para a purificação da galactose oxidase extracelular de *D. dendroides*.

O processo de purificação utilizado neste trabalho constou de uma etapa de inativação térmica a 60°C por 5 minutos, seguido de fracionamento com sulfato de amônio (45 a 65%) e de uma cromatografia de afinidade em Sepharose 6B (Tabela I). O perfil cromatográfico da galactose oxidase intracelular em coluna de Sepharose 6B está mostrado na Figura 5. A enzima foi eluída com D-fucose (6-desoxi-D-galactose) em tampão acetato de amônio 100 mM pH 7,2. A enzima assim obtida manteve-se estável por no mínimo 6 meses a -17°C. Este processo permitiu a

obtenção de preparações com um teor de purificação da ordem de 1104 vêzes e um rendimento de 64%.

3.2. HOMOGENEIDADE DA ENZIMA

As frações enzimáticas resultantes dos processos efetuados para a purificação da galactose oxidase intracelular foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em dois valores de pH: 3,6 (Figura 6) e 8,9 (Figura 7). A preparação enzimática final apresentou-se homogênea tanto em pH 3,6 como em pH 8,9 revelando-se em ambos os casos como uma única banda protêica bem definida, coincidente com a banda de atividade enzimática. Devido ao alto ponto isoelétrico da enzima, esta não migra em pH 8,9 permanecendo na origem.

3.3. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

A preparação enzimática obtida por cromatografia de afinidade previamente desnaturada por tratamento com SDS e mercaptoetanol, foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS apresentando uma banda única de proteína (Figura 8). A Figura 9 mostra a migração relativa das proteínas em eletroforese em gel de poliacrilamida permitindo extrapolar um valor de peso molecular para a galactose oxidase intracelular de 72.000.

O peso molecular da proteína nativa determinado por filtração em Biogel P-150 foi de 72.000 conforme o demonstrado na Figura 10. Os resultados indicam que a galactose oxidase intra-

celular é uma proteína monomérica com peso molecular da ordem de 72.000.

3.4. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO

A Figura 11 ilustra o efeito do tempo de incubação sobre a velocidade da reação à temperatura de 30°C. A reação é linear em função do tempo até 30 minutos.

3.5. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

O efeito da concentração da galactose oxidase na velocidade da reação enzimática verificada pela medida da água oxigenada formada está apresentado na Figura 12. A atividade da galactose oxidase foi linear com a concentração de proteínas na faixa de 0,1 a 0,65 µg de proteínas. Quando se usou o método polarográfico para a medida do consumo de oxigênio a reação se mostrou, também linear na faixa de 0,2 a 2,0 µg de proteínas.

3.6. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática está demonstrado na Figura 13. A temperatura ótima observada para a galactose oxidase intracelular é de 30°C.

3.7. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA GALACTOSE OXIDASE

O comportamento da enzima em diferentes pHs está mos - trado na Figura 14. Os resultados demonstram que o pH ótimo de catálise para a galactose oxidase intracelular está na faixa de 6,6 - 7,0.

3.8. ESPECIFICIDADE

A especificidade da galactose oxidase intracelular foi determinada e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela II. Dos compostos de 3 carbonos testados apenas a dihidroxiacetona é oxidada pelo oxigênio em presença da enzima. Glicerol, e β-hidroxipiruvato não são substratos para a enzima. Todos os compostos derivados da D-galactose com o carbono 6 livre, que foram ensaiados, são substratos para a enzima intracelular.

3.9. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito da concentração de diversos substratos sobre a atividade da galactose oxidase estão apresentados nas Figuras 15,19,20,23 a 31. A galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* apresenta uma cinética não Michaeliana para D-galactose (Figura 15,16) D-galactosamina (Figura 24), metil- α-D-galactopiranosídeo (Figura 25), o-nitro-β-D-galactopiranosídeo (Figura 26), β-lactose (Figura 27), rafinose (Figura 29) e guaran (Figura 31). Para a dihidroxiacetona (Figura 20), 2-D-de -

soxigalactose (Figura 23), a melibiose (Figura 28) e estaquiose (Figura 30) o efeito é menos marcante, aproximando-se da cinética Michaeliana.

Com a finalidade de confirmar o caráter sigmoidal obtido foram determinadas as velocidades de consumo de oxigênio em presença de D-galactose (Figura 15) e dihidroxiacetona (Figura 20). Não houve alteração do comportamento cinético com a variação do método de medida da atividade enzimática. Os valores de Km app determinados pelo método de LINEWEAVER-BURK (58) foram de 40 mM e 36 mM para a D-galactose e 35 mM e 37 mM para a dihidroxiacetona, respectivamente, pelo método enzimático acoplado e pelo método polarográfico.

Os dados constantes das Figuras 15, 19, 20, 23 a 31 foram analisados pelo método gráfico de SCATCHARD (73). Os gráficos referentes ao efeito da D-galactose e da dihidroxiacetona são apresentados nas Figuras 17 e 21, respectivamente. Os demais substratos apresentaram comportamento semelhante ao da galactose com exceção da melibiose e da estaquiose cujos gráficos são lineares.

Os dados foram, ainda submetidos ao tratamento gráfico de Hill (44), obtendo-se coeficientes de Hill (n_H) maiores que 1,0 em todos os casos (Tabela III). Os gráficos relativos à D-galactose e à dihidroxiacetona estão apresentados nas Figuras 18 e 22. Para todos os substratos foram calculados os valores de n_H e $S_{0,5}$ constatando apresentarem eles a mesma ordem de grandeza que os valores de Km app calculados pelo método de LINEWEAVER-BURK.

O efeito da D-galactose sobre a atividade enzimática, foi medida sob uma tensão de O_2 de 60% e os resultados são apresentados na Figura 19. Os duplos recíprocos dos dados confir -

mam a sigmoicidade observada quando a tensão de 0_2 era de 20% (Figura 16). Os valores de n_H e de $S_{0,5}$ são 1,43 e 35,5mM respectivamente, não diferindo significativamente dos resultados apresentados na Figura 18.

3.10. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIGÊNIO

O efeito de diversas concentrações de oxigênio sobre a atividade da galactose oxidase foi verificado e encontra - se ilustrado na Figura 32. A enzima apresenta curva de saturação sigmoidal para o oxigênio e o gráfico duplo-recíproco se ex - pressa como uma curva voltada para cima. A constante de MICHAELIS-MENTEN determinada é de 0,40 mM e a velocidade máxima é de 200 µmoles de 0_2. min^{-1}. O gráfico de SCATCHARD (Figura 33) para o oxigênio desvia-se bastante da linearidade. Na Figura 34 pode-se verificar que os valores do coeficiente de HILL e de $S_{0,5}$ são respectivamente de 1,66 e 0,29 mM.

3.11. EFEITO DE INIBIDORES E AGENTES QUELANTES

O efeito de inibidores e agentes quelantes sobre a velocidade da reação enzimática está registrado na Tabela IV. Fo - ram ensaiados agentes quelantes de metais como o dietilditio - carbamato, a azida sódica e hidroxilamina. Inibidores que competem com o oxigênio, como o cianeto e inibidores de grupamentos SH, como a iodoacetamida foram estudados. O efeito da H_2O_2, produto da reação enzimática foi também testado sobre a velo -

cidade de oxidação da D-galactose. Os resultados mostraram que a galactose oxidase intracelular era inibida por todos os inibidores estudados.

3.11.1. Efeito do Dietilditiocarbamato

O dietilditiocarbamato, agente quelante específico para o cobre, na concentração de 1×10^{-5} M inibe 94% da atividade enzimática, (Figura 35) sugerindo forte envolvimento do íon cobre no sítio ativo da enzima e, por conseqüência, que a galactose oxidase intracelular, assim como a extracelular (7), seja uma cobre-enzima.

TABELA I. PURIFICAÇÃO DA GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR DE *D. dendroides*

ETAPAS	Volume ml	Unidades (μmoles H_2O_2 . min^{-1} . ml^{-1})	Proteínas ($mg.ml^{-1}$)	Atividade Específica ($U.mg^{-1}$)	Purificação	Rendimento %
Extrato bruto	390,0	0,810	7,680	0,105	-	100
Inativação térmica	370,0	0,735	1,900	0,387	3,68	86
Sulfato de amônio 45 a 65%	9,5	20,760	18,000	1,153	10,95	62
Sepharose 6B	10,0	20,300	0,175	116,000	1104,00	64

TABELA II ESPECIFICIDADE DA ENZIMA

SUBSTRATO (mM)	ATIVIDADE RELATIVA (%)
D-galactose	100
Dihidroxiacetona	179
2-Desoxi-D-Galactose	52
D-Galactosamina	60
Metil- α-D-Galactopiranosídeo	170
o-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosídeo	40
β-Lactose	11
Melibiose	68
Rafinose	144
Estaquiose	161
Guaran	47

Ensaios foram realizados pela técnica enzimática acoplada, usando 0,13 µg de proteínas e 100 µmoles de substrato e as condições descritas no ítem 2.6.1. de Materiais e Métodos. A atividade relativa foi calculada tomando-se como referência a velocidade de oxidação da D-galactose (66 nmoles $H_2O_2 \cdot min^{-1}$). A concentração do guaran foi calculada como o descrito por AVI-GAD et al (11).

TABELA III PARÂMETROS CINÉTICOS DA GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR

SUBSTRATOS	V máx (nmoles $H_2O_2.min^{-1}$)	Km_{app} (mM)	n_H	$S_{0,5}$ (mM)
Dihidroxiacetona	150	35	1,23	26
D-Galactose	86	40	1,36	36
2-Desoxi-D-Galactose	176	83	1,28	52
D-Galactosamina	121	20	1,58	14
Metil- α-D-Galacto-piranosídeo	150	37,5	1,42	29
o-Nitrofenil-β-D-Galac-topiranosídeo	92	50	2,12	46
β-Lactose	75	333	2,20	140
Melibiose	55	22	1,16	20,5
Rafinose	133	60	2,43	52
Estaquiose	125	14	1,10	14,5
Guaran	47	3,3	2,63	1,2
Oxigênio	200	0,40	1,66	0,29

Os ensaios foram realizados usando o método enzimático acoplado. Dados referentes às Figuras 15 a 32.

TABELA IV EFEITO DE INIBIDORES

INIBIDORES	CONCENTRAÇÃO	% INIBIÇÃO
Azida Sódica	0,1 mM	54
	0,5 mM	100
*Cianeto	10,0 μM	37
	50,0 μM	100
Dietilditiocarbamato	5,0 μM	87
	10,0 μM	96
EDTA	0,5 mM	0
*Iodoacetamida	0,1 mM	22
	1,0 mM	100
Hidroxilamina	50,0 μM	47
	0,1 mM	94
	0,5 mM	100
H_2O_2	2,0 mM	42
	3,0 mM	60

Atividade medida pelo consumo de O_2 (V máx de 97 nmoles $O_2 . min^{-1}$)

*Atividade medida pela produção de H_2O_2 (V máx de 102 nmoles $H_2O_2 . min^{-1}$).

Os ensaios foram realizados em concentração saturante de D-galactose (300 mM), com 0,16 μg e 0,80 μg de enzima, respectivamente para os ensaios enzimático acoplado e polarográfico.

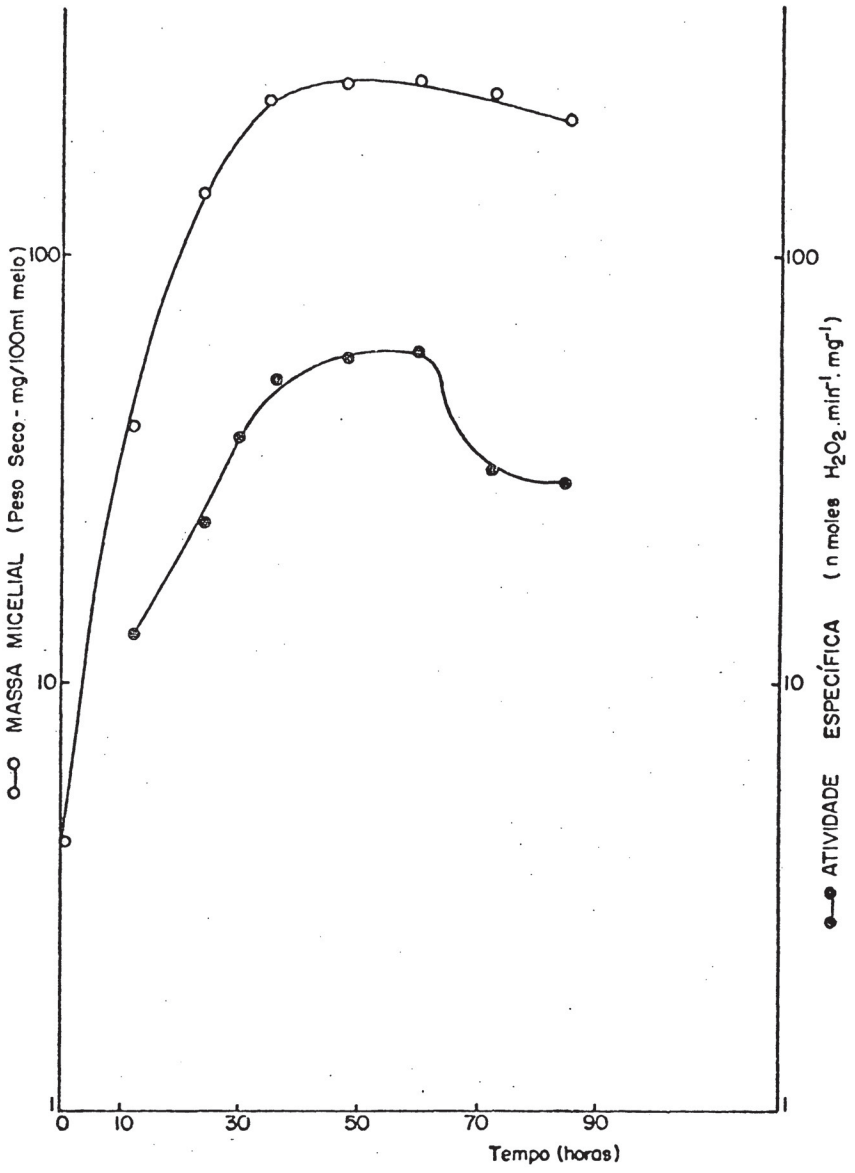


FIGURA 3. Síntese da galactose oxidase em função do crescimento, em condições experimentais conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS ítem 2.8.

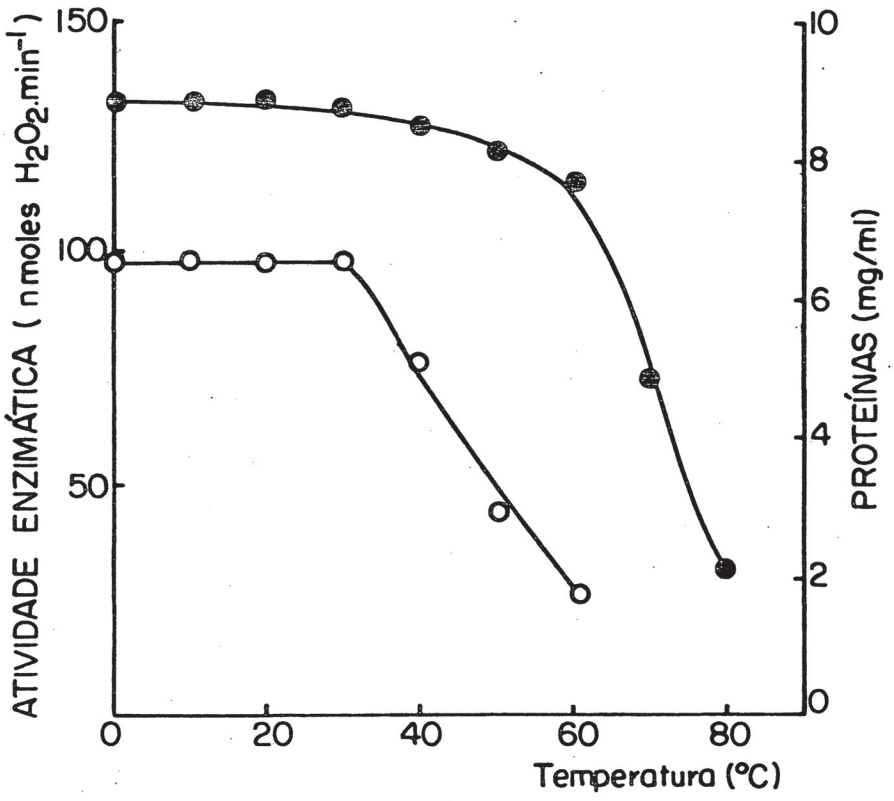


FIGURA 4. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima no extrato livre de células.

O extrato livre de células,em frações de 5 ml, foi submetido à diferentes temperaturas (0° a 80°C) durante 5 minutos, após o que foram retiradas alíquotas para a determinação da atividade enzimática e da concentração em proteínas, conforme os ítens 2.6.1. e 2.9. de MATERIAIS E MÉTODOS.

Símbolos: ●-● Atividade enzimática

o-o Proteínas

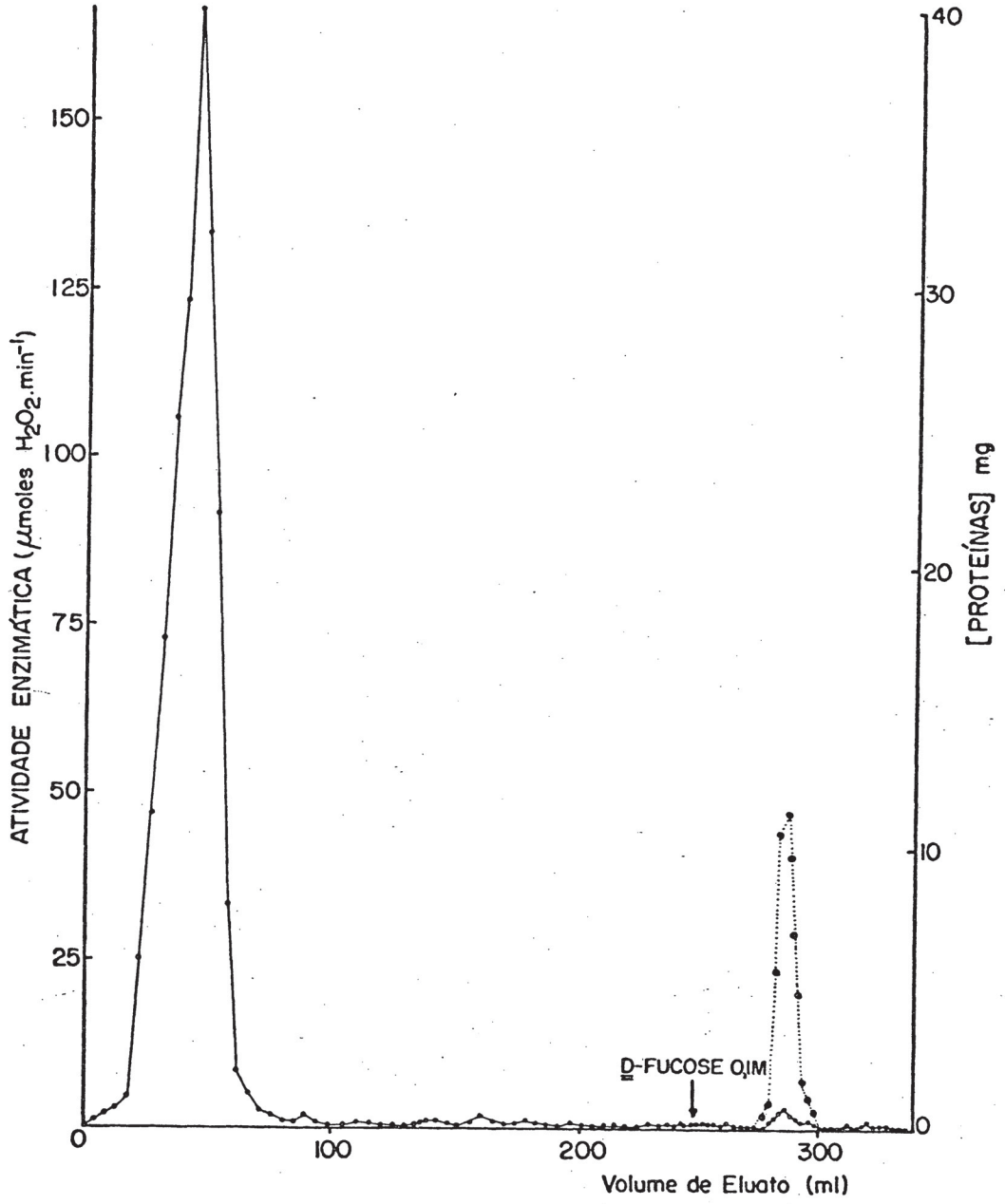


FIGURA 5. Perfil de eluição da galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* em coluna de Sepharose 6B.

A coluna (2 x 18 cm) foi equilibrada com tampão acetato de amônio 0,1 M pH 7,2 e as proteínas contaminantes foram eluídas com o mesmo tampão. A eluição da galactose oxidase foi feita com D-fucose 0,1 M no tampão de equilíbrio. Proteínas (•—•), atividade enzimática (●—●).

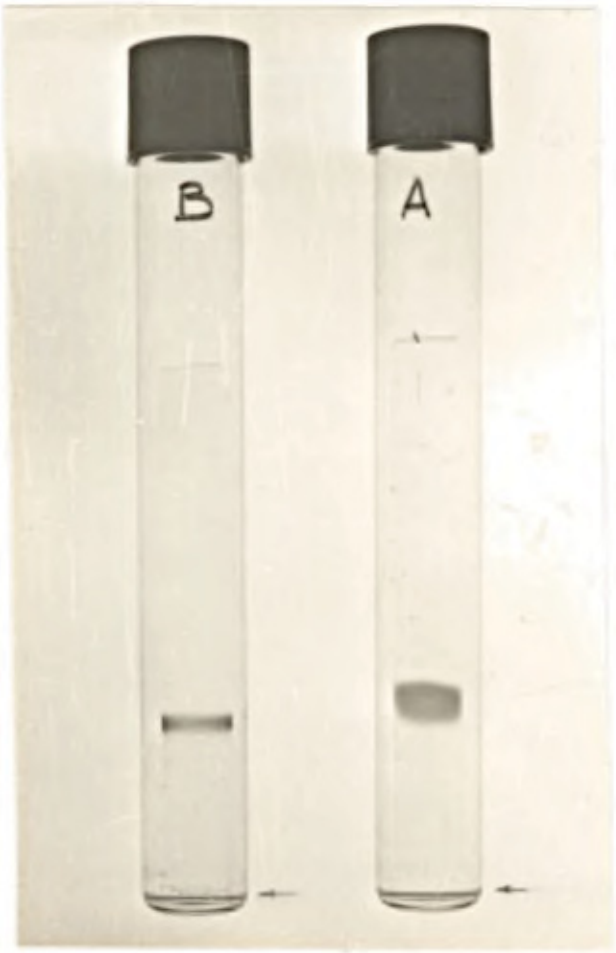


FIGURA 6. Homogeneidade da galactose oxidase intracelular em eletroforese em gel em poliacrilamida a pH 3,6.

A eletroforese foi efetuada em gel a 8% conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (ítem 2.12). A seta indica a origem da migração.

A - Proteínas (100 µg de proteínas);

B - Atividade enzimática (20 µg de proteínas).

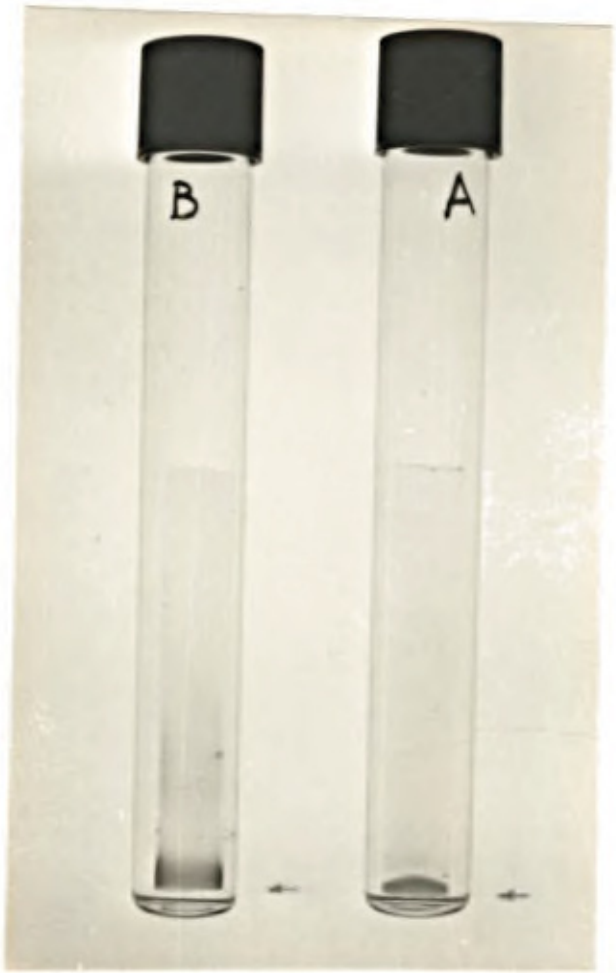


FIGURA 7. Homogeneidade da galactose oxidase intracelular em eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,9

A eletroforese foi efetuada conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (ítem 2.12.). A seta indica a origem da migração.

A - Proteínas (100 µg de proteínas)

B - Atividade enzimática (20 µg de proteínas)

FIGURA 8. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida com SDS da enzima desnaturada.

A enzima previamente desnaturada (20 µg) foi submetida à ele - troforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo 0,1% de SDS, conforme descrito no ítem 2.12.1. A seta indica a origem da migração.

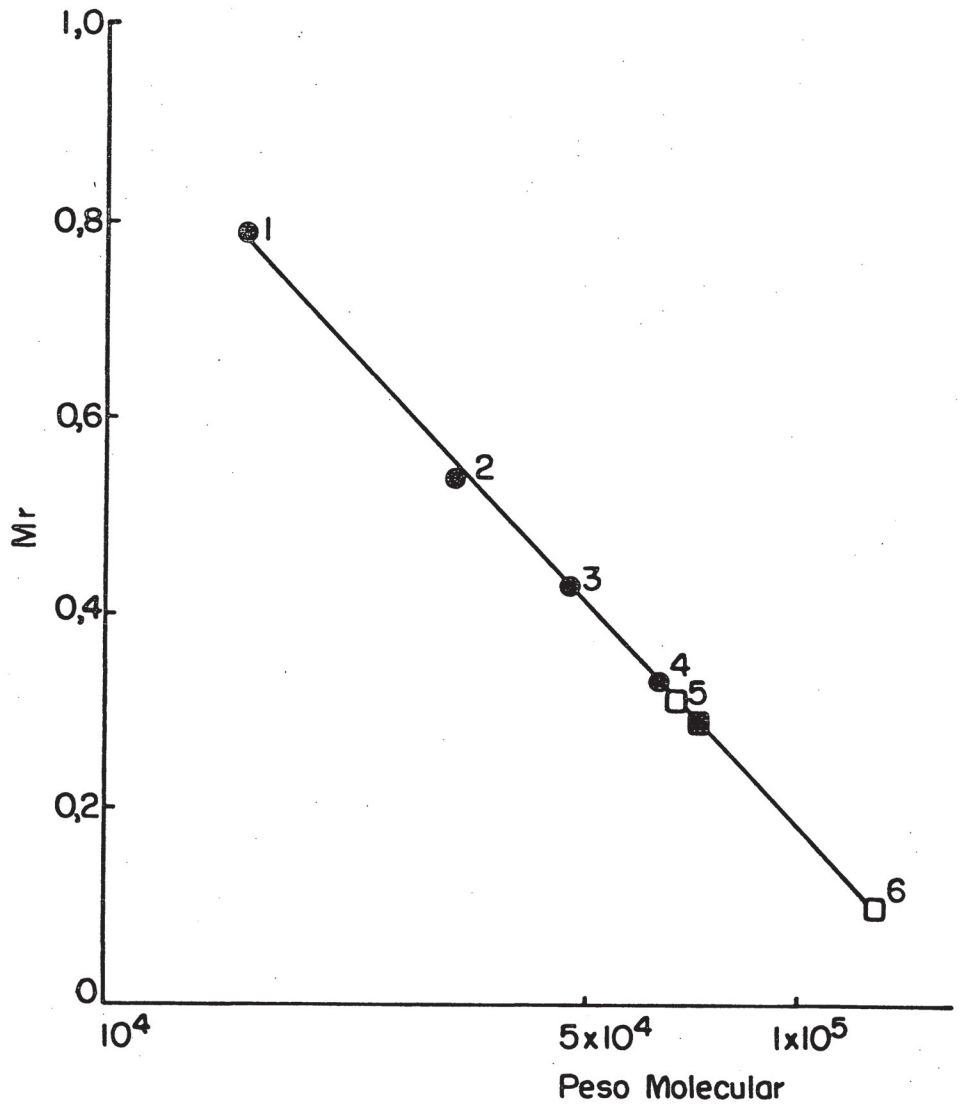


FIGURA 9. Determinação do peso molecular da galactose oxidase intracelular por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.

A eletroforese foi realizada conforme descrita no ítem 2.12.1. de MATERIAIS E MÉTODOS, sendo que 20 µg de diferentes proteínas foram aplicados aos géis.

Padrões utilizados: ● - Hemoglobina (1-16.000;2-32.000;3-48.000 4-64.000); □ - Soro Albumina Bovina (5-66.000; 6-132.000); ■-Galactose Oxidase Intracelular.

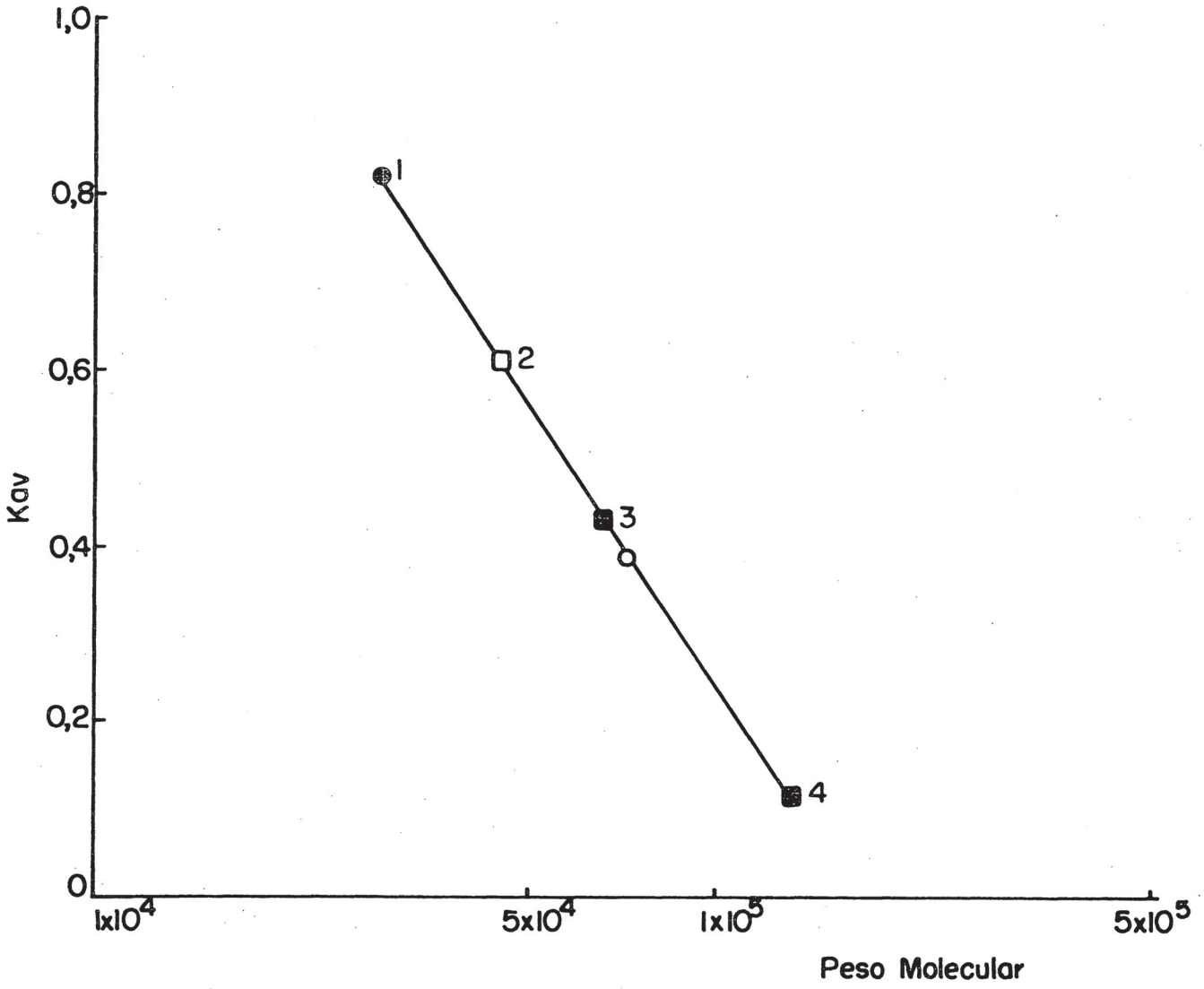


FIGURA 10. Determinação do peso molecular da galactose oxidase por filtração em Biogel P-150.

Filtração em coluna de Biogel P-150 (1 x 41 cm) previamente equilibrada e eluída com tampão fosfato 50 mM, pH 7,2 com fluxo constante de 0,4 ml/min. Foram aplicados à coluna 500 μg de galactose oxidase e 600 μg da mistura de padrões. Os padrões utilizados foram:

● - ANIDRASE CARBÔNICA (1 - 29.000); □- OVOALBUMINA (2 -45.000);

■- SORO ALBUMINA BOVINA (3-66.000; 4-132.000), monômetro e dímero, respectivamente, e Azul de dextrana ($2x10^6$); o - galactose oxidase intracelular.

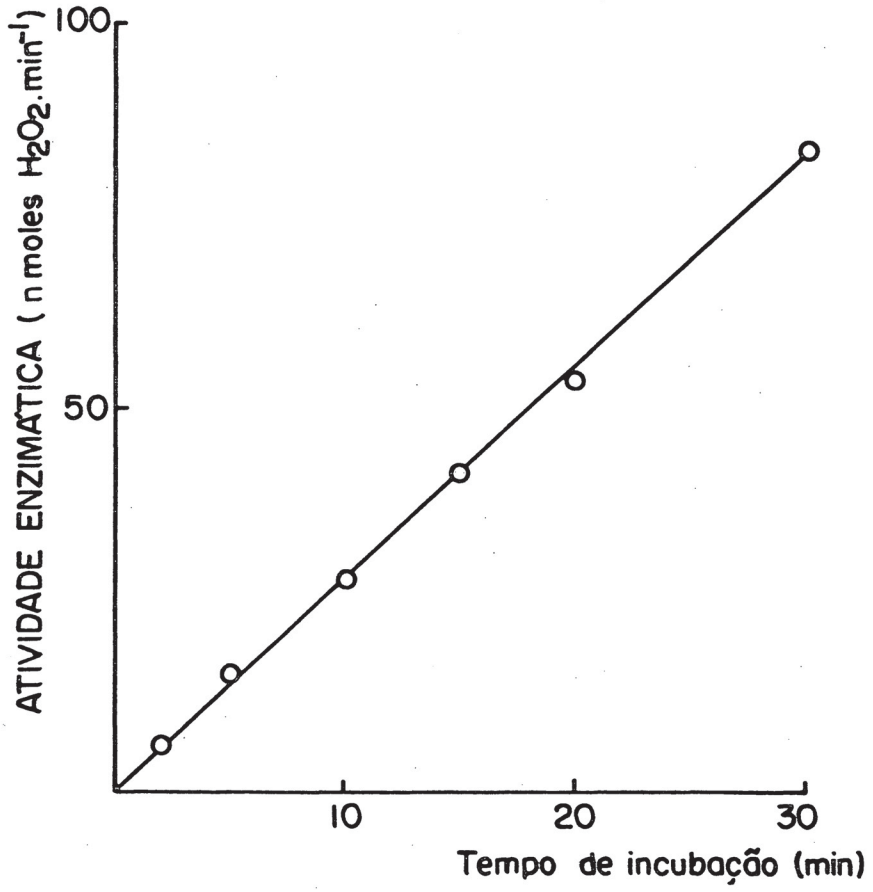


FIGURA 11. Efeito do tempo de incubação sobre a atividade da galactose oxidase.

O sistema de reação (1,0 ml) contendo: 0,06 µg de enzima, 75 µmoles de D-galactose, 0,48 µmoles de 4-aminoantipirina, 7,0 µmoles de fenol, 15 µmoles de tampão fosfato pH 7,0 e 6,7 unidades de peroxidase, foi incubado a 30°C por diferentes pe - ríodos de tempo.

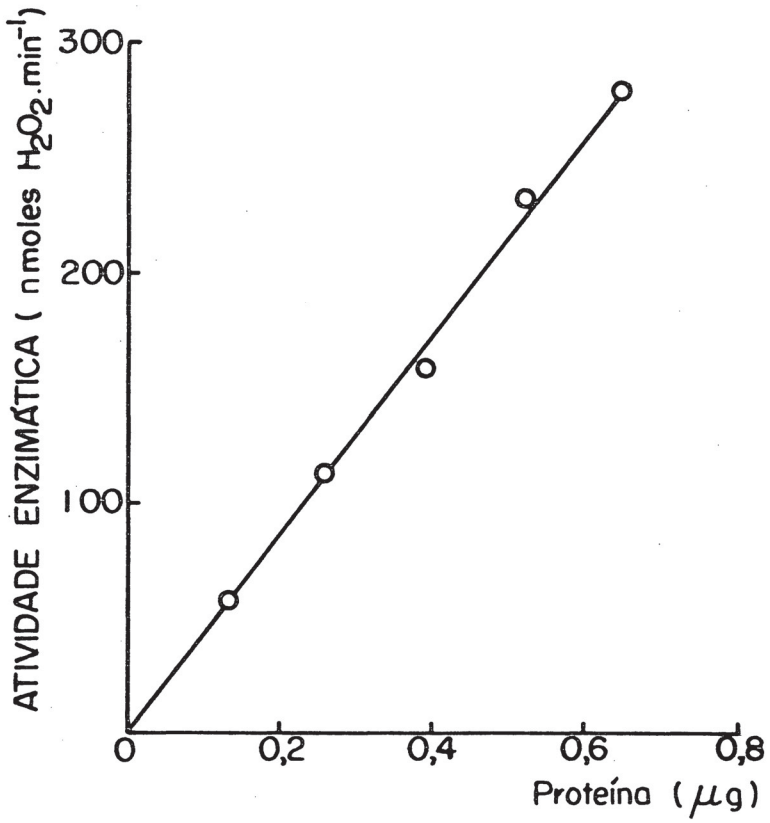


FIGURA 12. Efeito da concentração da galactose oxidase sobre a velocidade da reação.

O efeito da concentração de proteína foi verificado pela incubação de quantidades crescentes da enzima no sistema convencional de reação, conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (ítem 2.15).

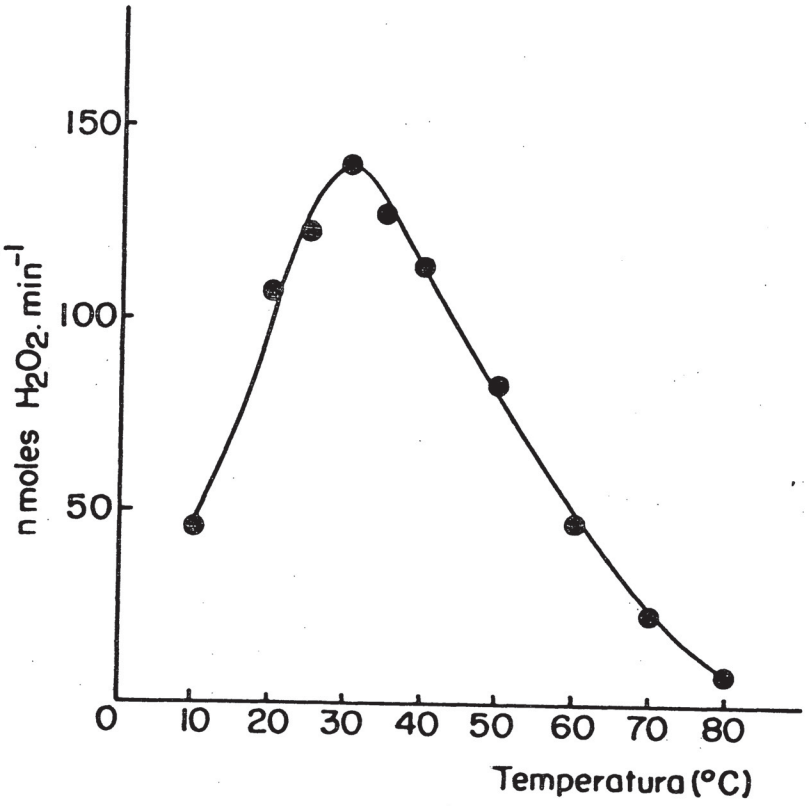


FIGURA 13. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

Os sistemas de reação contendo 0,30 µg de galactose oxidase foram incubados a diferentes temperaturas, conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (ítem 2.16.).

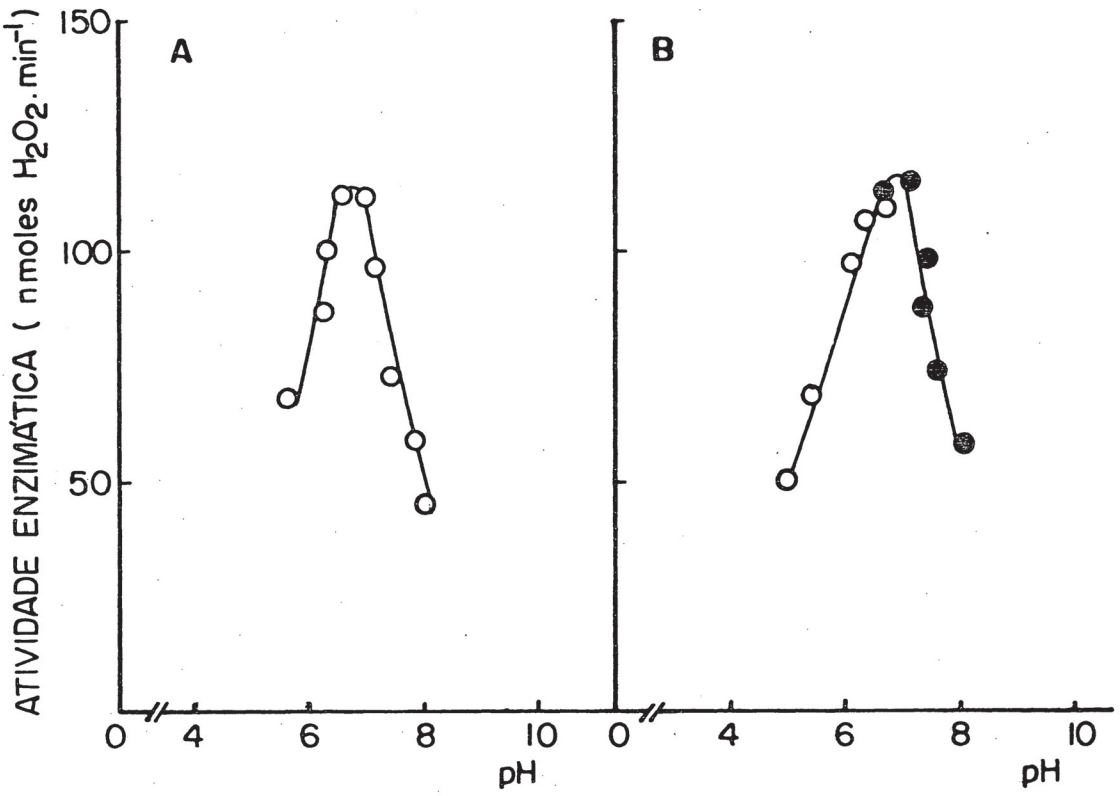


FIGURA 14. Efeito do pH sobre a velocidade da reação enzimática.

A mistura de incubação continha 0,3 µg de enzima e 15 µmoles de tampão nos pH indicados nas Figuras e os demais reagentes e condições conforme o descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (ítem 2.17.).

A - Tampão Fosfato (pH 5,5 a 8,0);

B - o-o Tampão MES (pH 5,0 a 6,7);

●-● Tampão TES (pH 6,7 a 8,2).

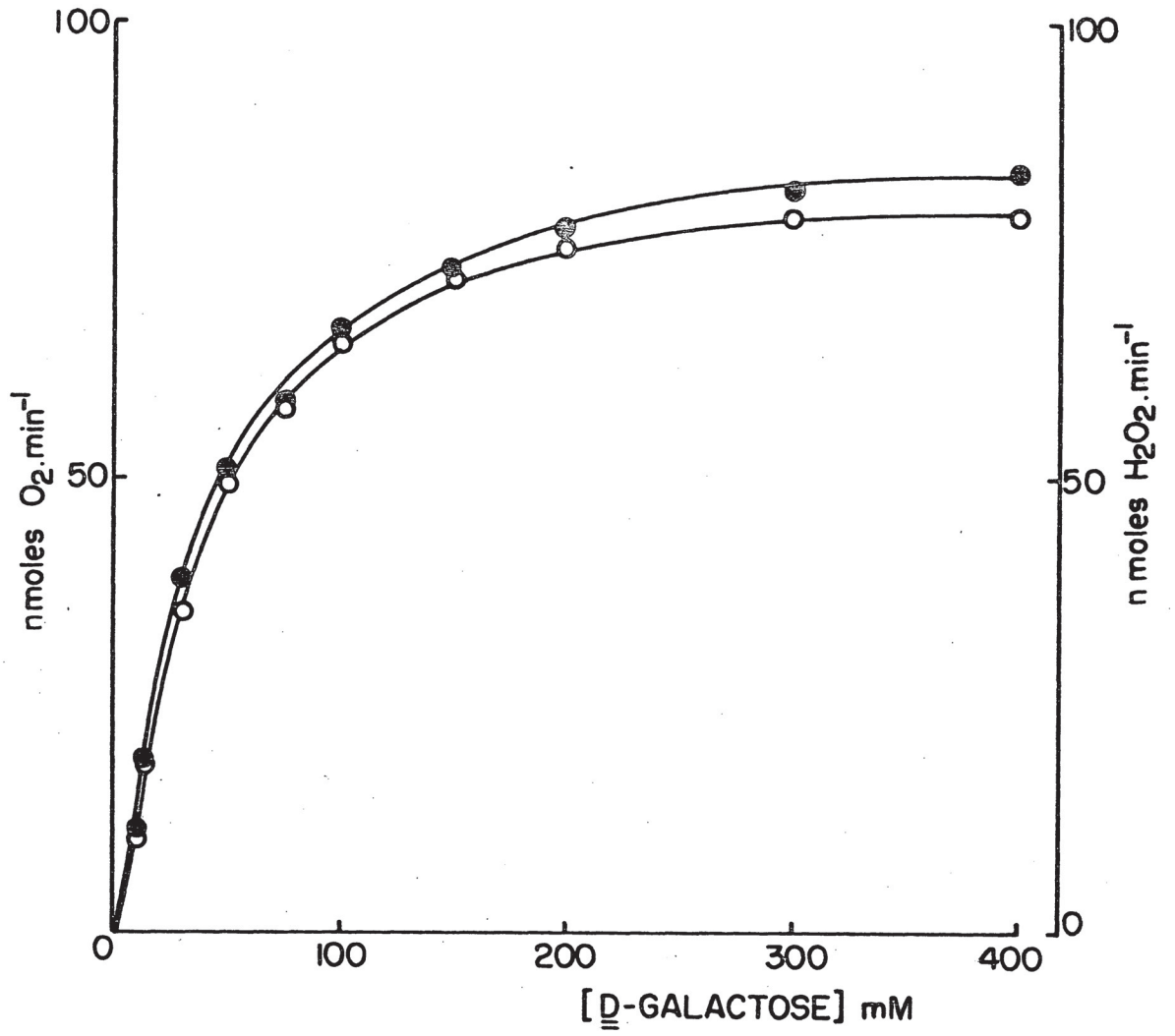


FIGURA 15. Efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática sob tensão de 0_2 a 20%.

O efeito da concentração da D-galactose sobre a velocidade da reação enzimática foi determinada tanto pela medida de H_2O_2 formada, como pela velocidade de consumo de 0_2.

●-● - Método enzimático acoplado; sistema de incubação: (1,0ml) 15 µmoles de tampão fosfato pH 7,0;0,48 µmoles de 4-aminoantipirina; 7,0 µmoles de fenol; 6,7 unidades de peroxidase;0,13 µg de galactose oxidase intracelular e quantidades variáveis de D-galactose.

o-o - Método do eletrodo de oxigênio; sistema de reação:(1,4ml) 20 µmoles de tampão fosfato pH 7,0; 0,65 µg de galactose oxidase intracelular e quantidades variáveis de substrato.

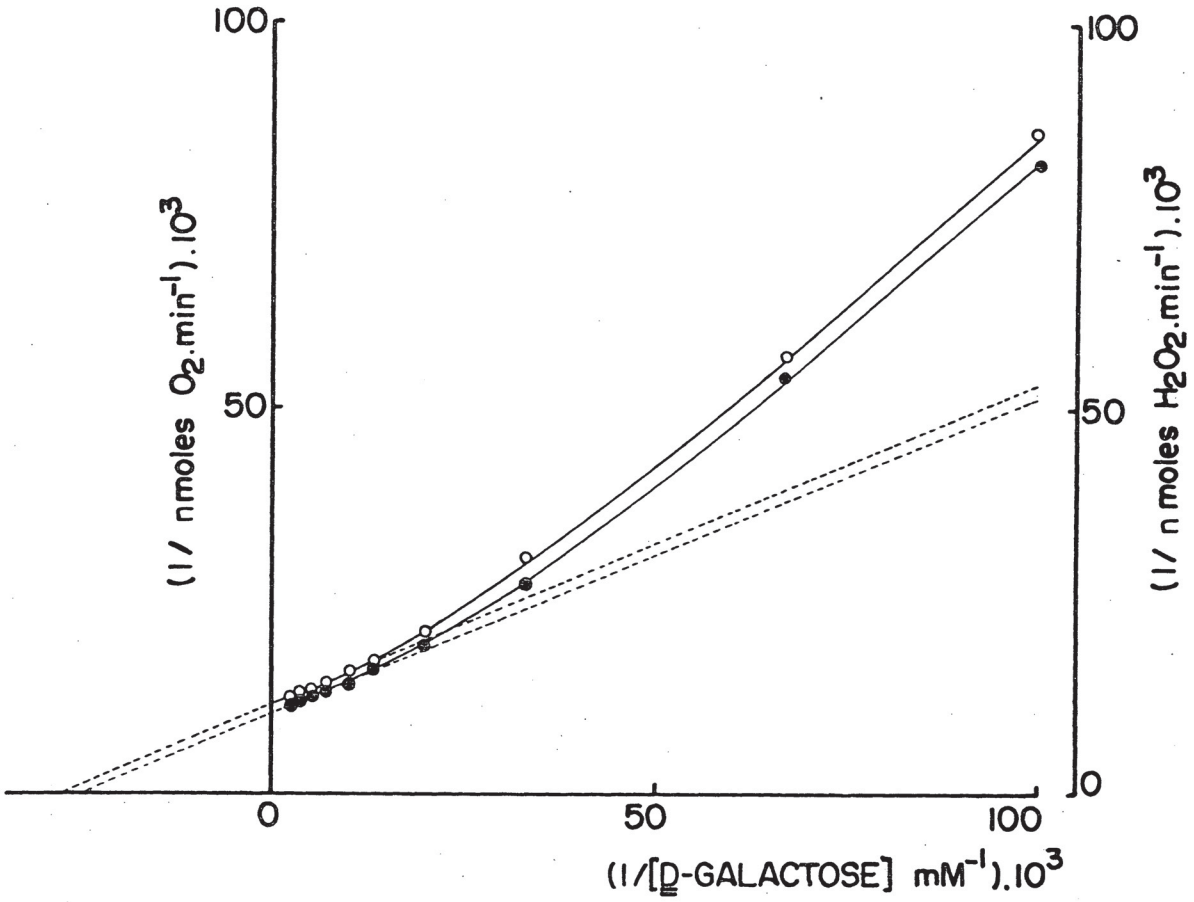


FIGURA 16. Gráfico de LINEWEAVER-BURK do efeito da concentração da D-galactose sobre a atividade enzimática.

●-● - Método enzimático acoplado (nmoles H_2O_2.min^{-1}).

o-o - Método do eletrodo de oxigênio (nmoles O_2.min^{-1}).

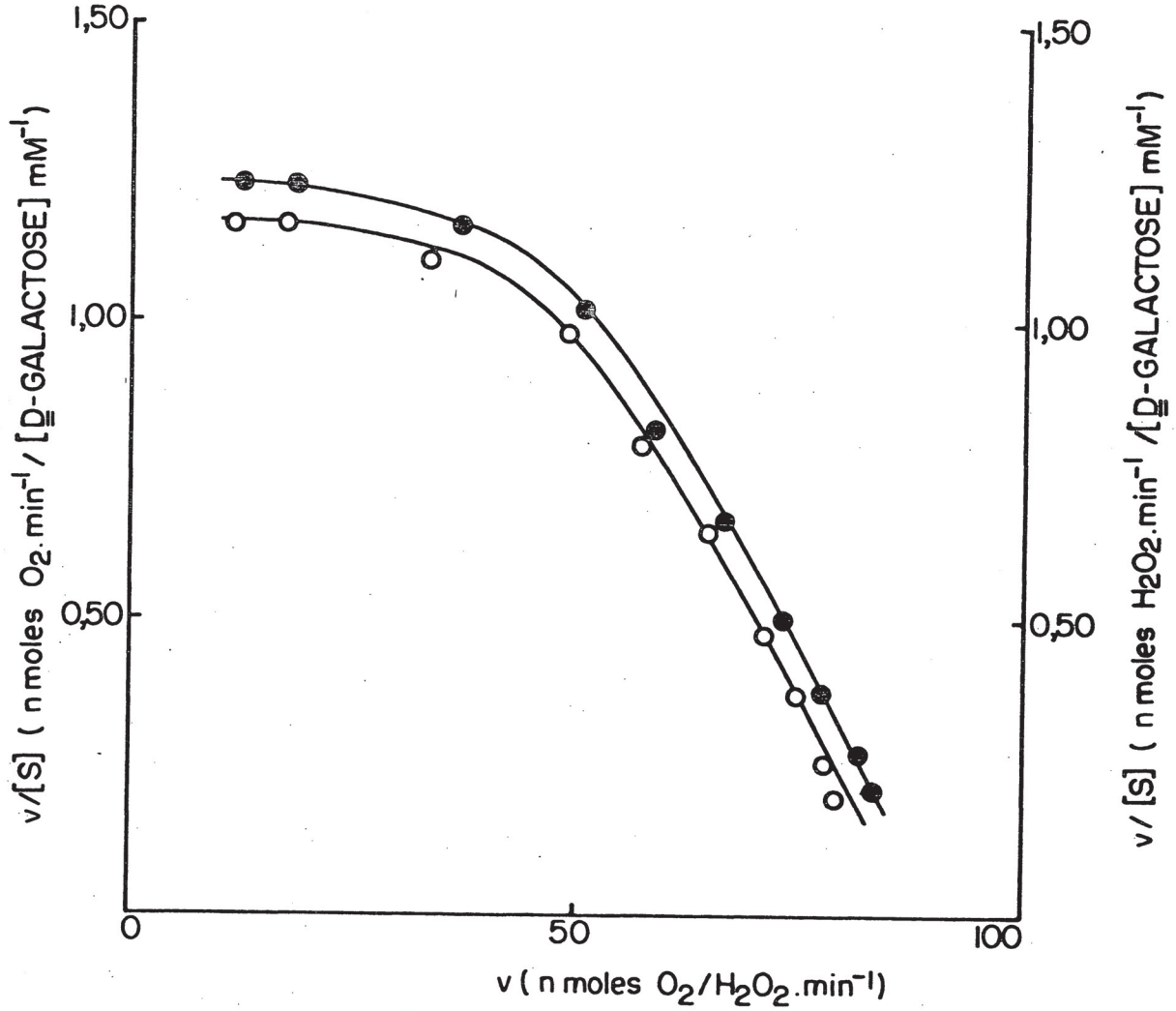


FIGURA 17. Gráfico de SCATCHARD do efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática.

●-● - Método enzimático acoplado (nmoles $H_2O_2.min^{-1}$);

o-o - Método do eletrodo de oxigênio (nmoles $O_2.min^{-1}$).

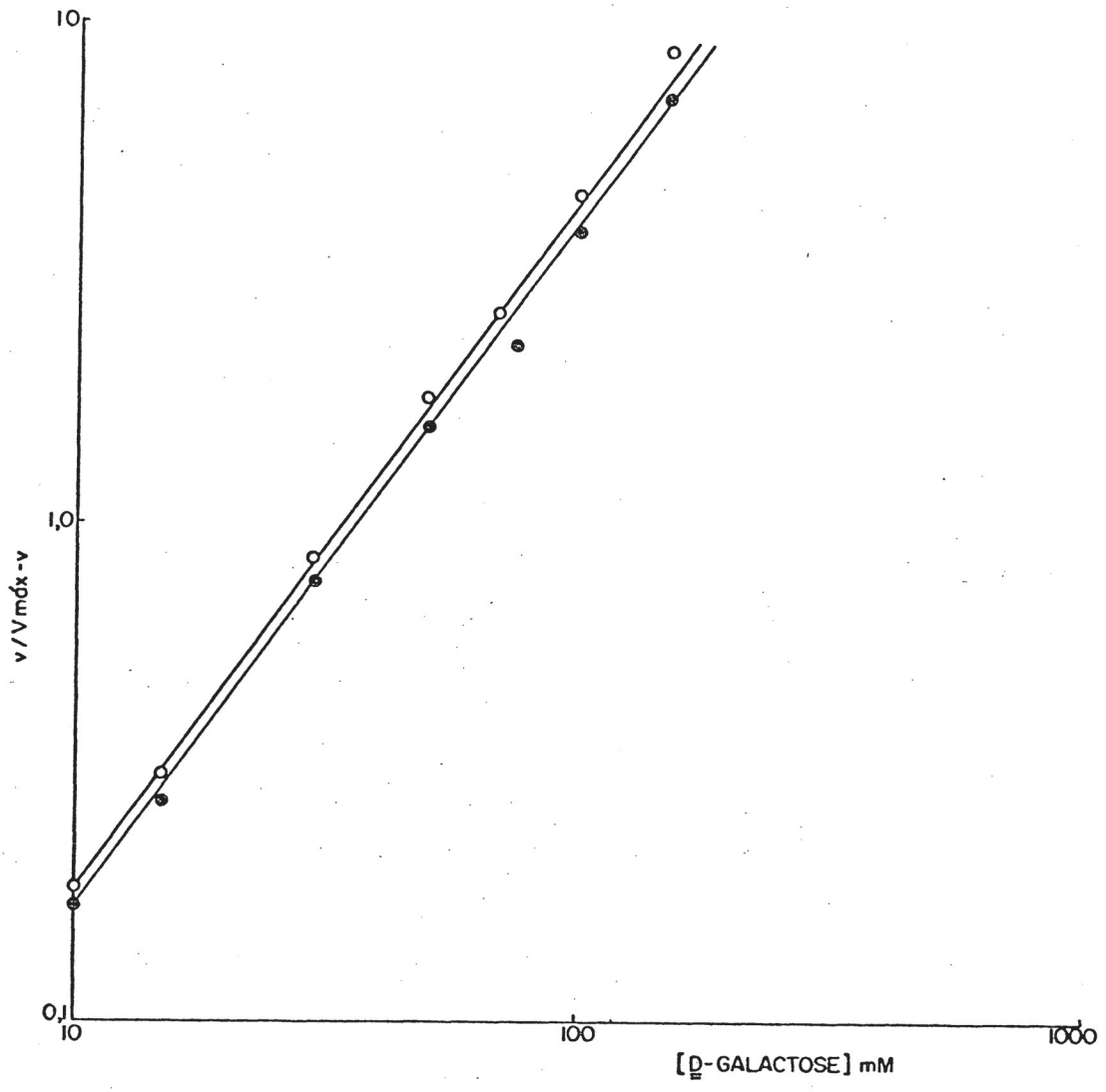


FIGURA 18. Gráfico de HILL do efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática.

●-● - Método enzimático acoplado (nmoles $H_2O_2.min^{-1}$);

o-o - Método do eletrodo de oxigênio (nmoles $O_2.min^{-1}$).

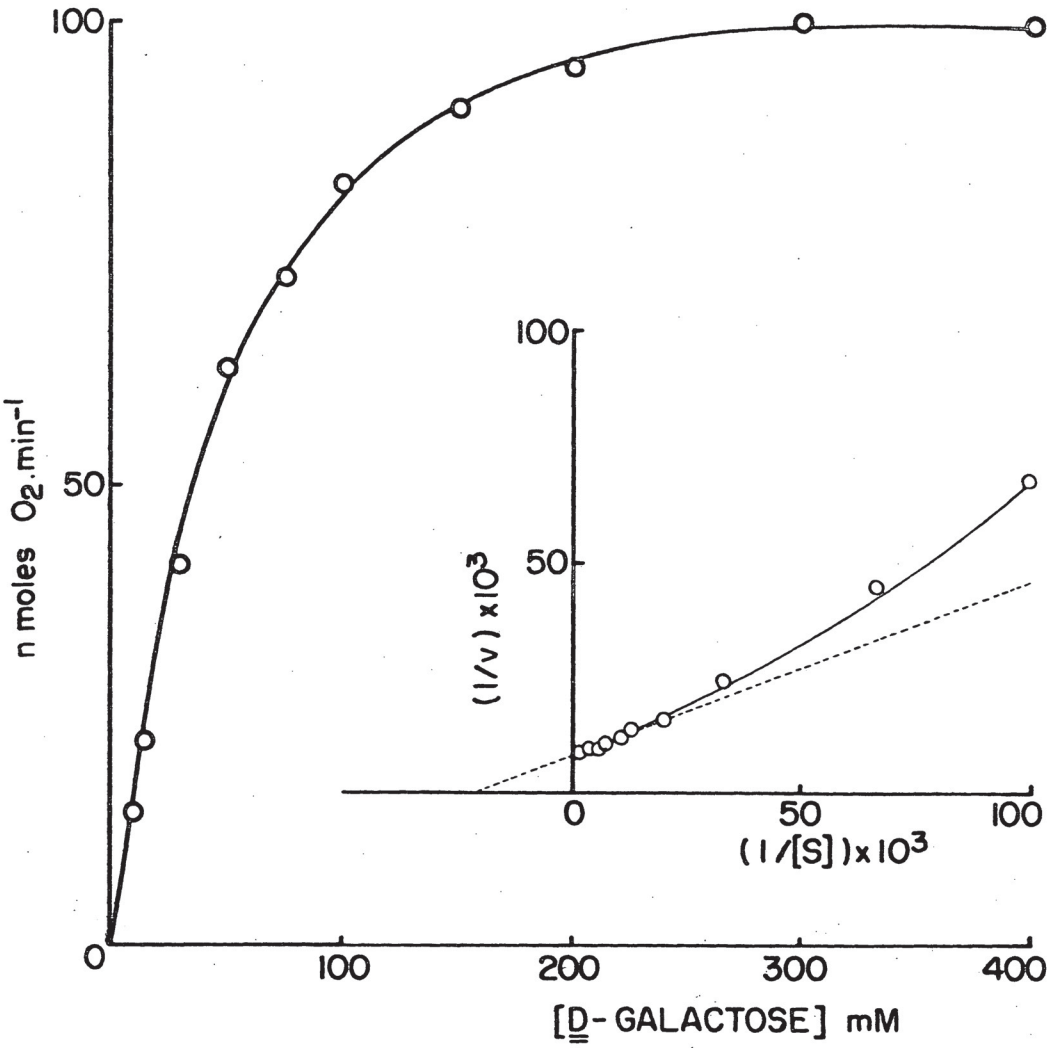


FIGURA 19. Efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática sob tensão de 0_2 de 60%.

O efeito da concentração de D-galactose sobre a velocidade da reação enzimática sob tensão de 0_2 a 60% foi determinada pela medida do consumo de 0_2. O sistema de reação (1,4 ml) consistia de 20 µmoles de tampão fosfato pH 7,0, 0,65 µg de galac - tose oxidase intracelular e concentrações variáveis de subs - trato. A concentração de 0_2 a 60% foi obtida conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (ítem 2.20.).

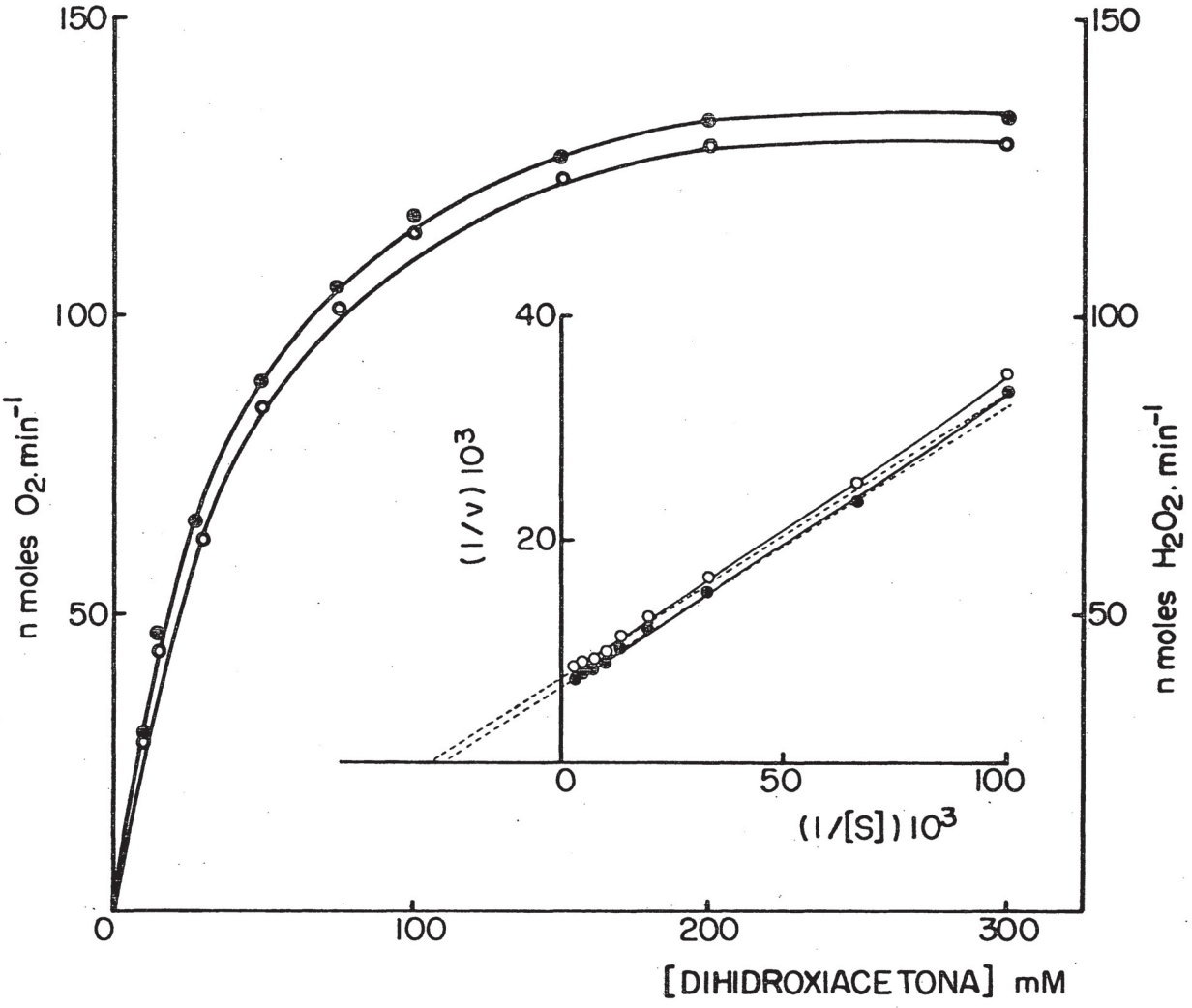


FIGURA 20. Efeito da concentração da dihidroxiacetona sobre a atividade enzimática.

O efeito da concentração da dihidroxiacetona sobre a atividade enzimática foi determinado tanto pela medida da H_2O_2 formada como pelo consumo de O_2.

●-● - Método enzimático acoplado, sistema de incubação conforme descrito na Figura 15, com 0,13 µg de galactose oxidase e concentrações variáveis de dihidroxiacetona.

o-o - Método do eletrodo de oxigênio; sistema de incubação conforme descrito na Figura 17, contendo 0,65 µg de galactose oxidase e concentrações variáveis de dihidroxiacetona.

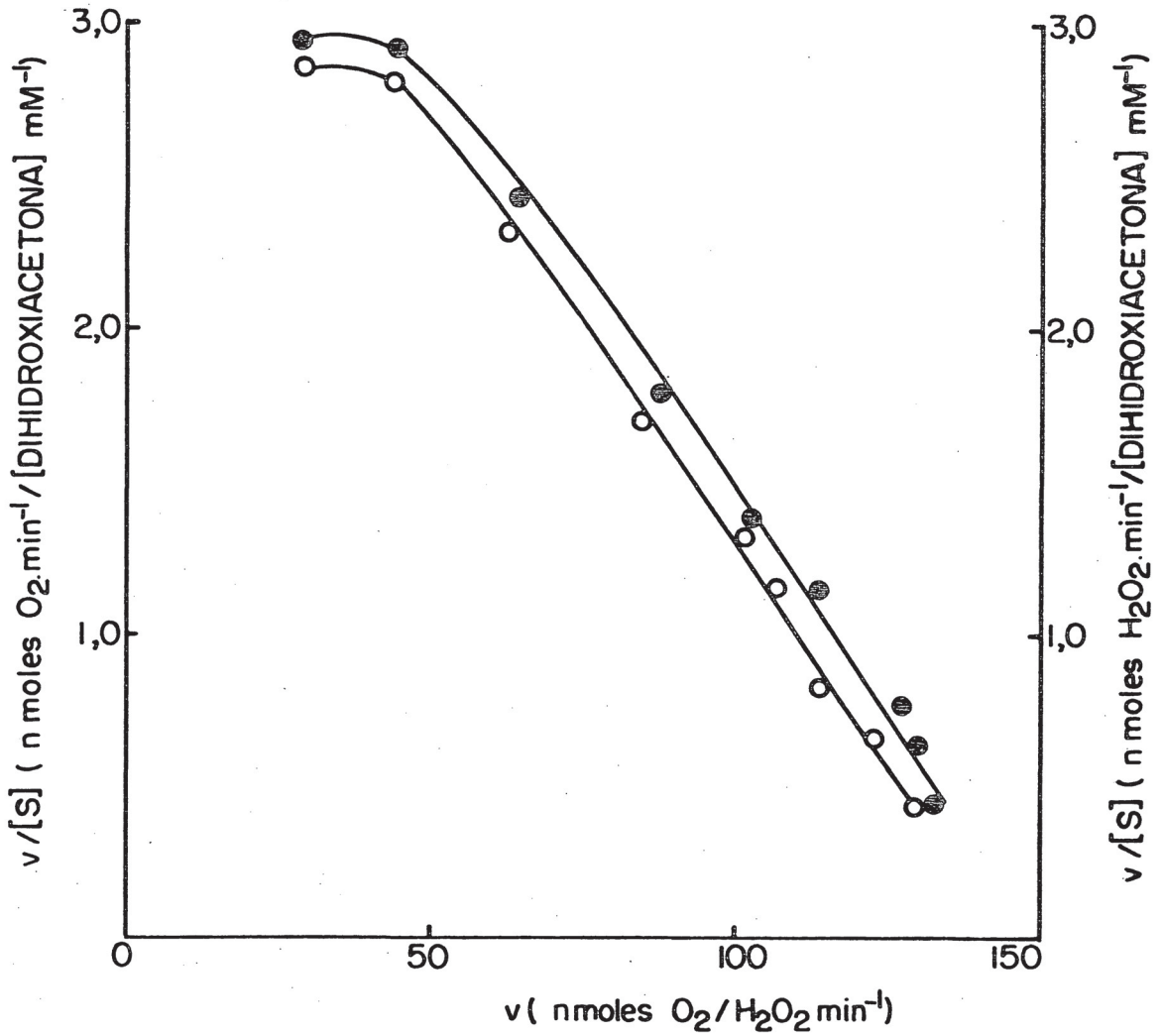


FIGURA 21. Gráfico de SCATCHARD do efeito da concentração de dihidroxiacetona sobre a atividade enzimática.

●-● - Método enzimático acoplado (nmoles $H_2O_2.min^{-1}$);

o-o - Método do eletrodo de oxigênio (nmoles $O_2.min^{-1}$).

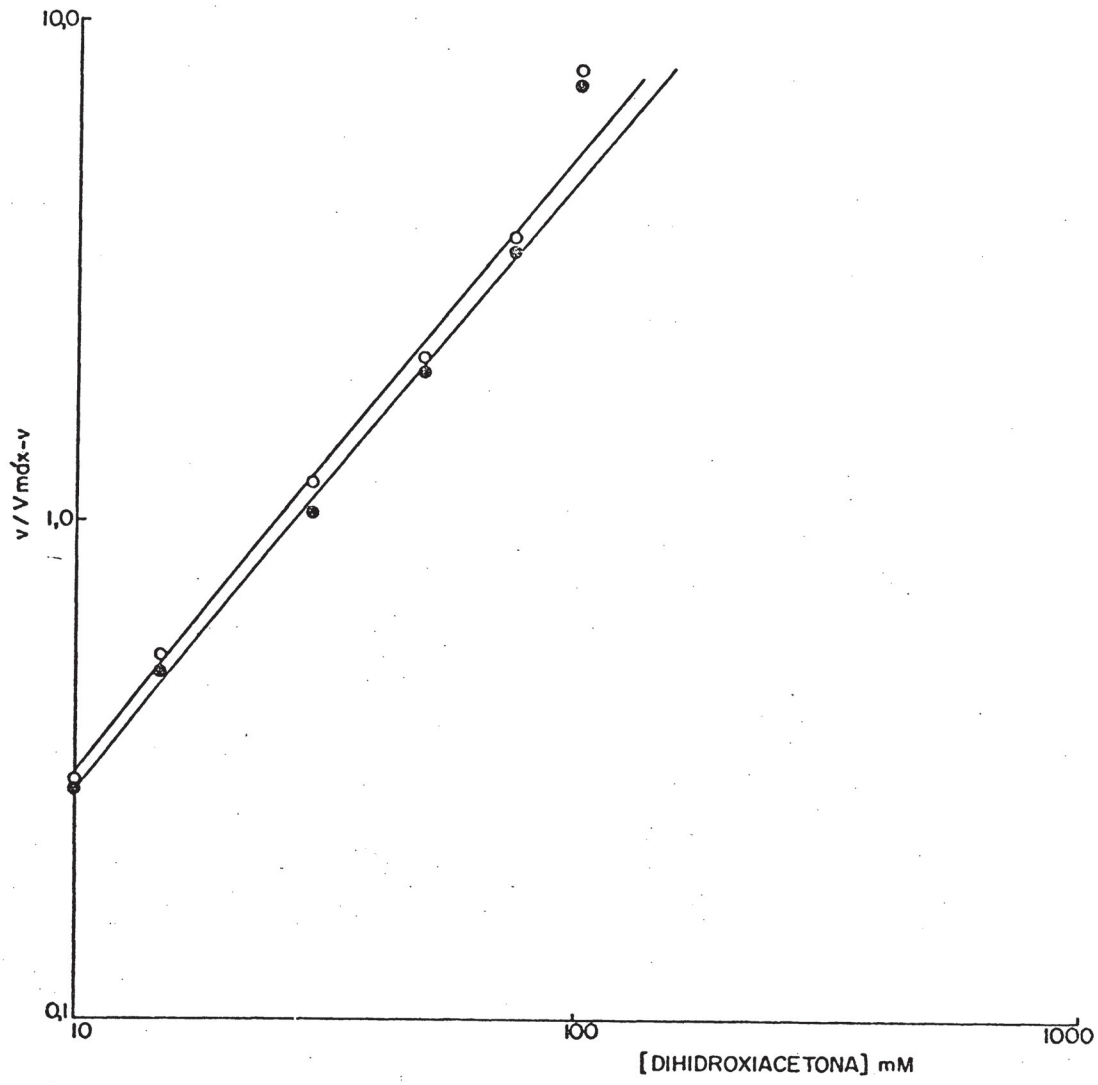


FIGURA 22. Gráfico de HILL do efeito da concentração de di - hidroxiacetona sobre a atividade enzimática.

●-● - Método enzimático acoplado (nmoles $H_2O_2.min^{-1}$);

o-o - Método do eletrodo de oxigênio (nmoles $O_2.min^{-1}$).

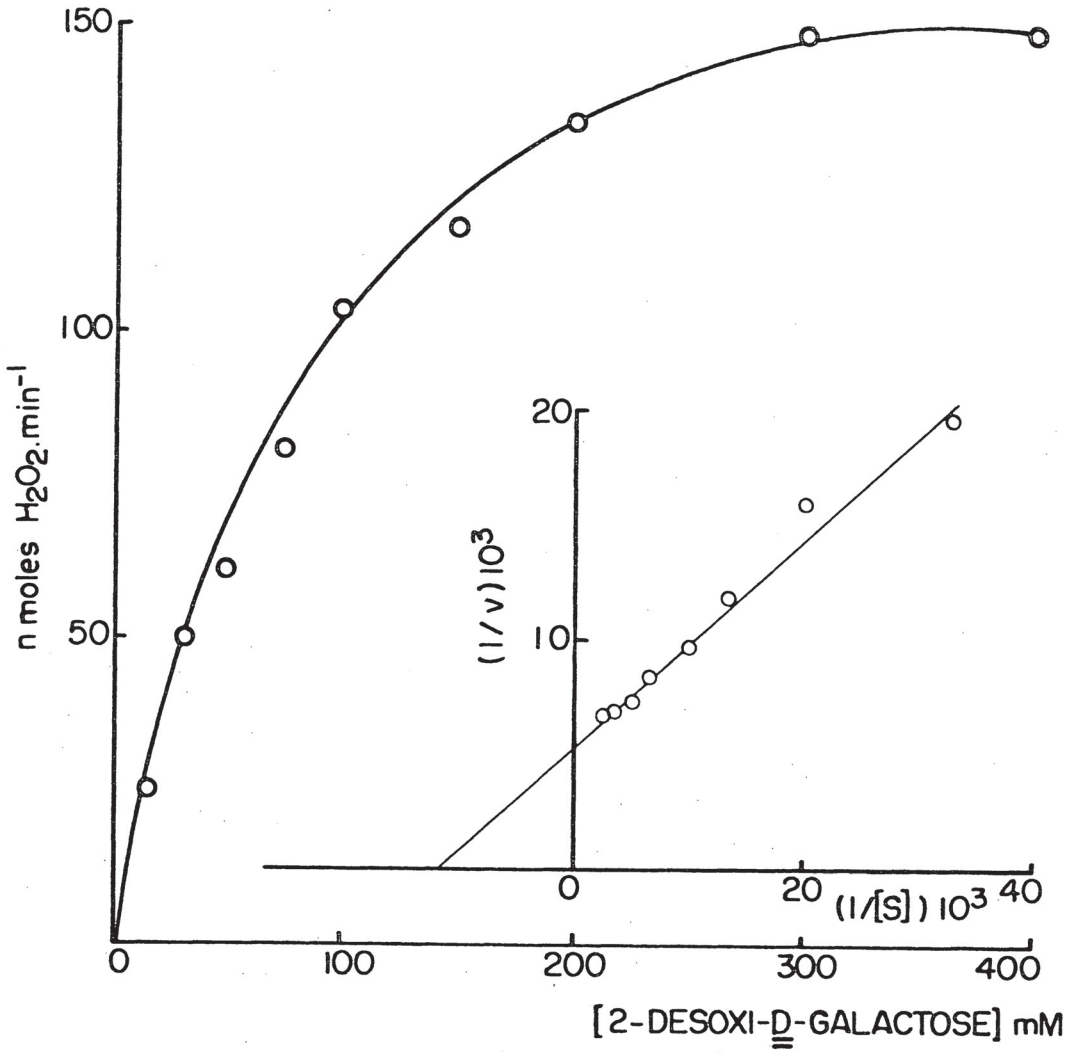


FIGURA 23. Efeito da concentração da 2-desoxi-D-galactose sobre a atividade da galactose oxidase.

O efeito da concentração da 2-desoxi-D-galactose sobre a atividade da enzima foi verificado pelo método enzimático acoplado. O sistema de incubação empregado foi o descrito na Figura 15, contendo 0,30 µg de galactose oxidase e concentrações variáveis de substrato .

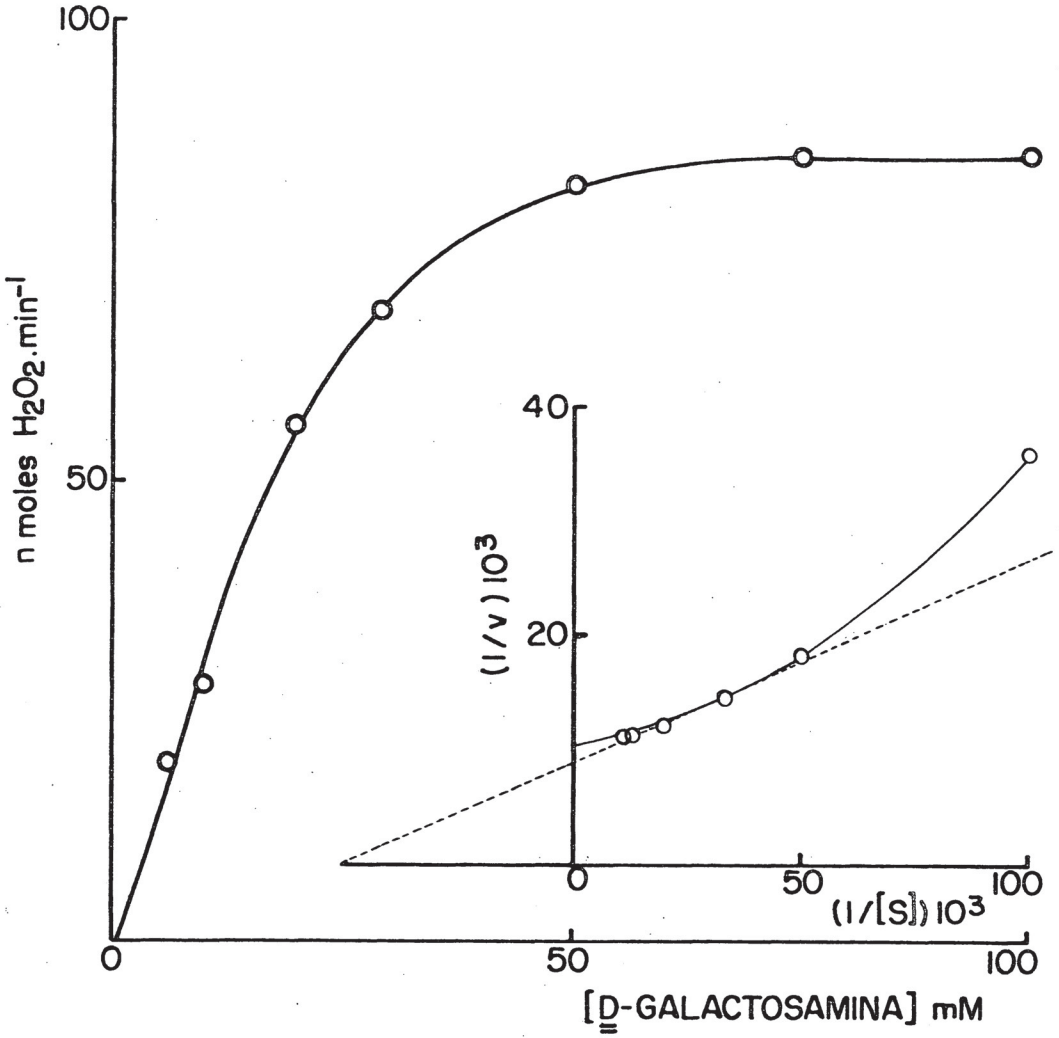


FIGURA 24. Efeito da concentração da D-galactosamina sobre a atividade enzimática.

O efeito da concentração da D-galactosamina sobre a atividade da enzima foi verificado pelo método enzimático acoplado. O sistema de incubação empregado foi o descrito na Figura 15, contendo 0,26 µg de galactose oxidase e concentrações variáveis de D-galactosamina.

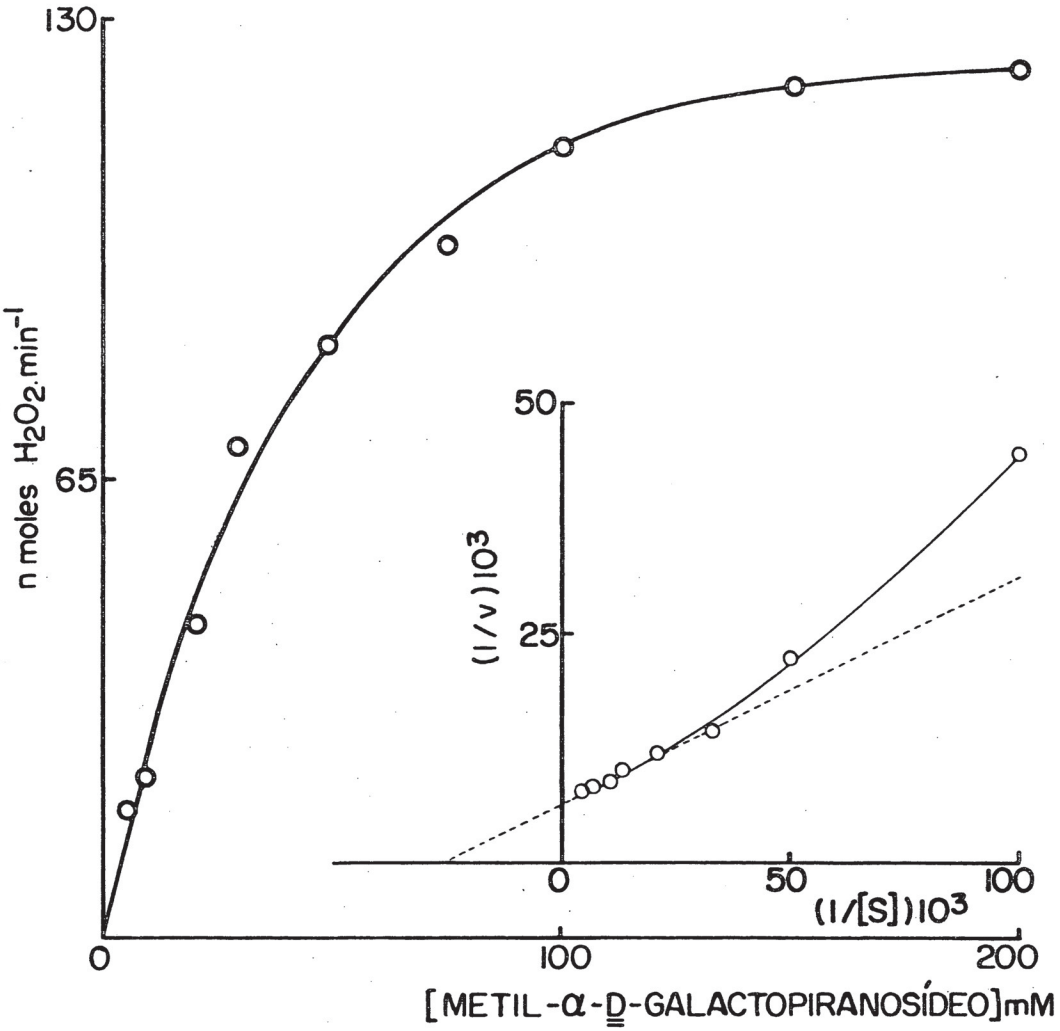


FIGURA 25. Efeito da concentração do Metil- α-D-galactopiranosídeo sobre a atividade enzimática.

O efeito da concentração do metil- α-D-galactopiranosídeo sobre a atividade da galactose oxidase foi determinado pelo método enzimático acoplado, conforme descrito na Figura 15, contendo 0,13 μg de enzima e quantidades variáveis de substrato.

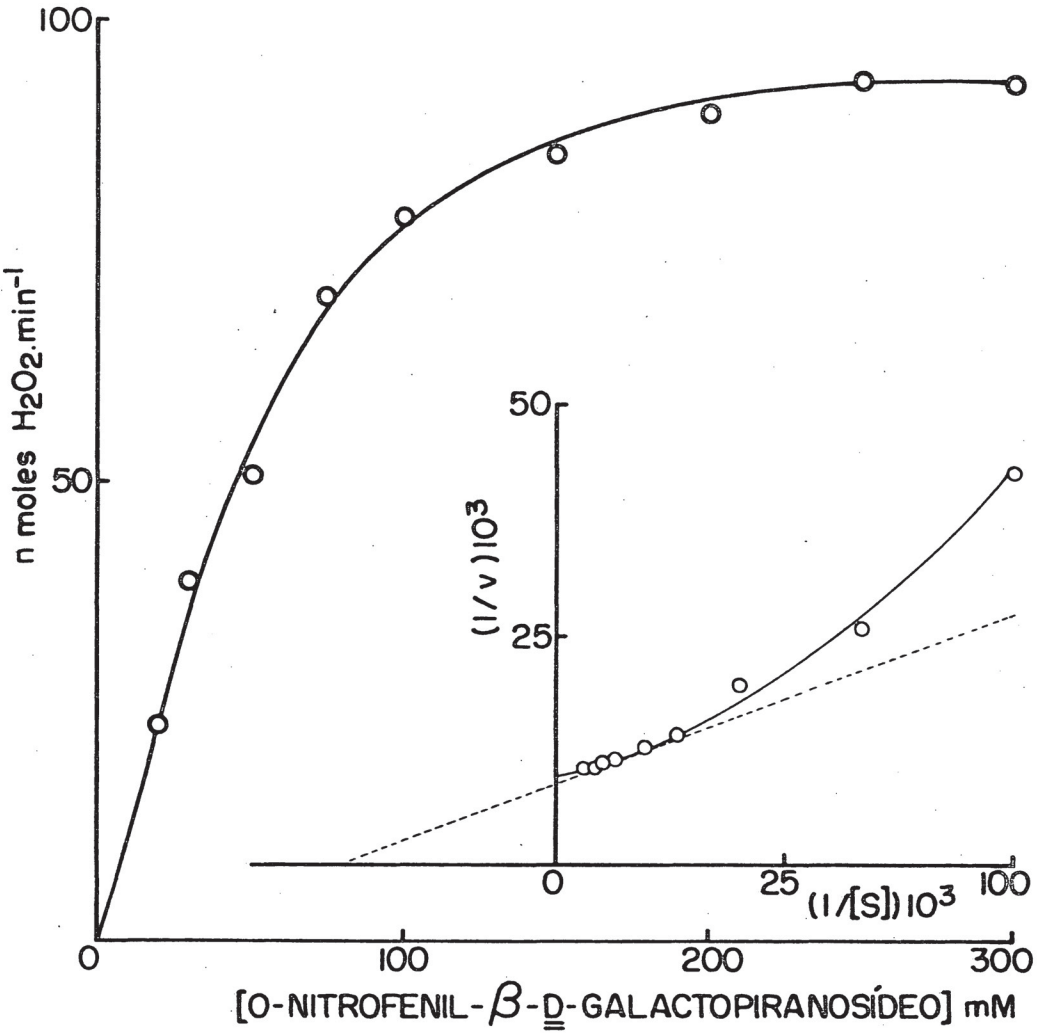


FIGURA 26. Efeito da concentração do o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo sobre a atividade da galactose oxidase.

O efeito da concentração do o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo foi verificado pelo método enzimático acoplado. O sistema de incubação empregado foi o descrito na Figura 15, contendo 0,3 µg de enzima e concentrações variáveis de substrato.

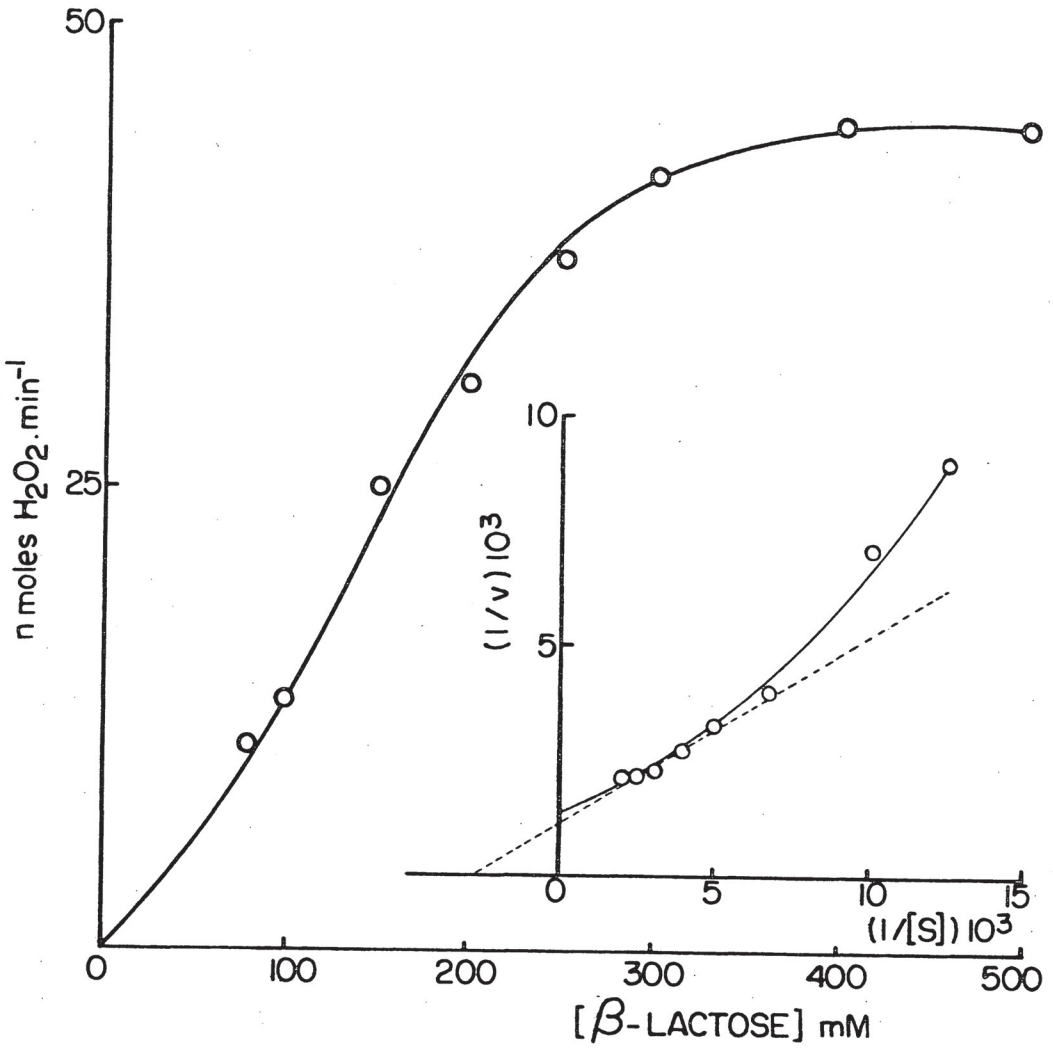


FIGURA 27. Efeito da concentração da β-lactose sobre a atividade enzimática.

O efeito da concentração da β-lactose sobre a atividade da galactose oxidase foi determinado pelo método enzimático acoplado, conforme descrito na Figura 15., contendo 0,26 µg de enzima e concentrações de variáveis substrato.

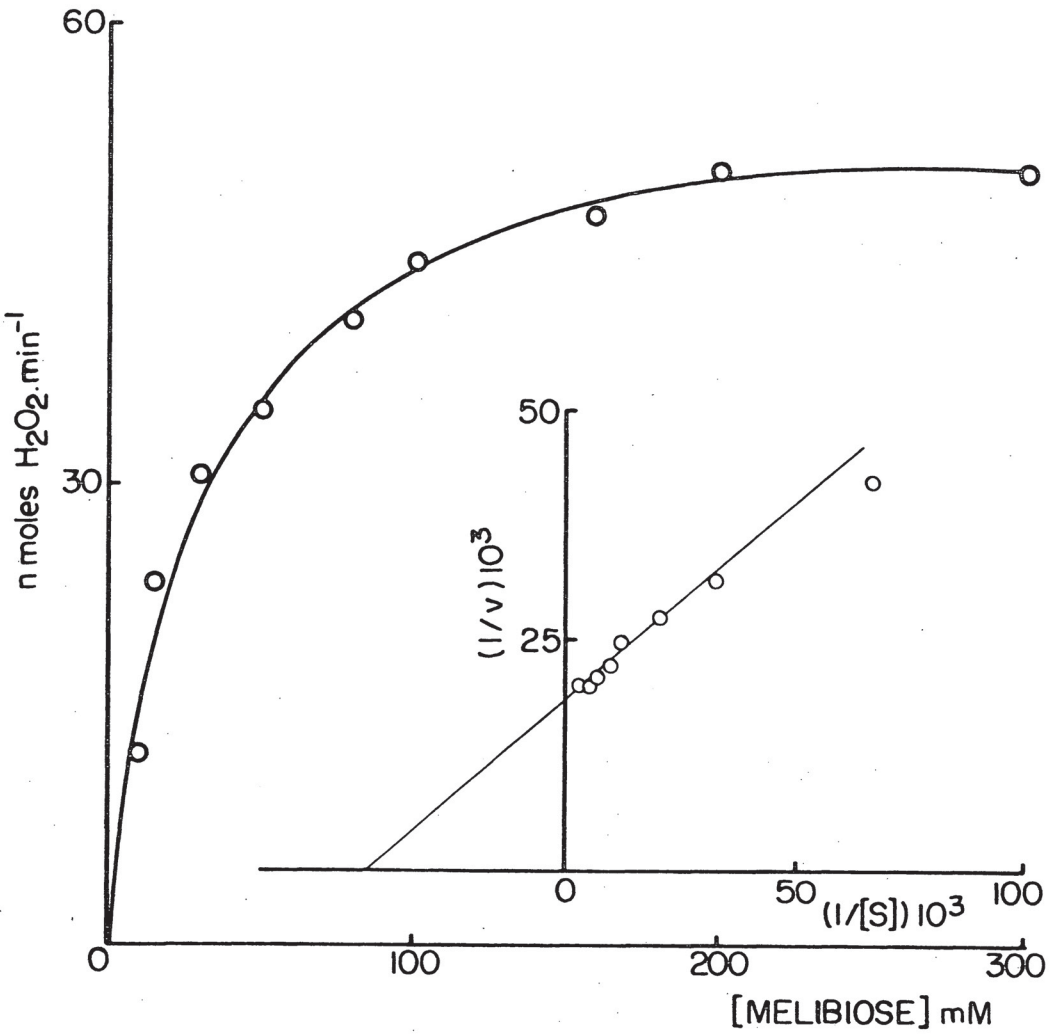


FIGURA 28. Efeito da concentração da melibiose sobre a atividade enzimática.

O efeito da concentração da melibiose sobre a atividade enzimática foi verificado pelo método enzimático acoplado. O sistema de incubação foi o descrito na Figura 15, contendo 0,13µg de galactose oxidase e concentrações variáveis de substrato.

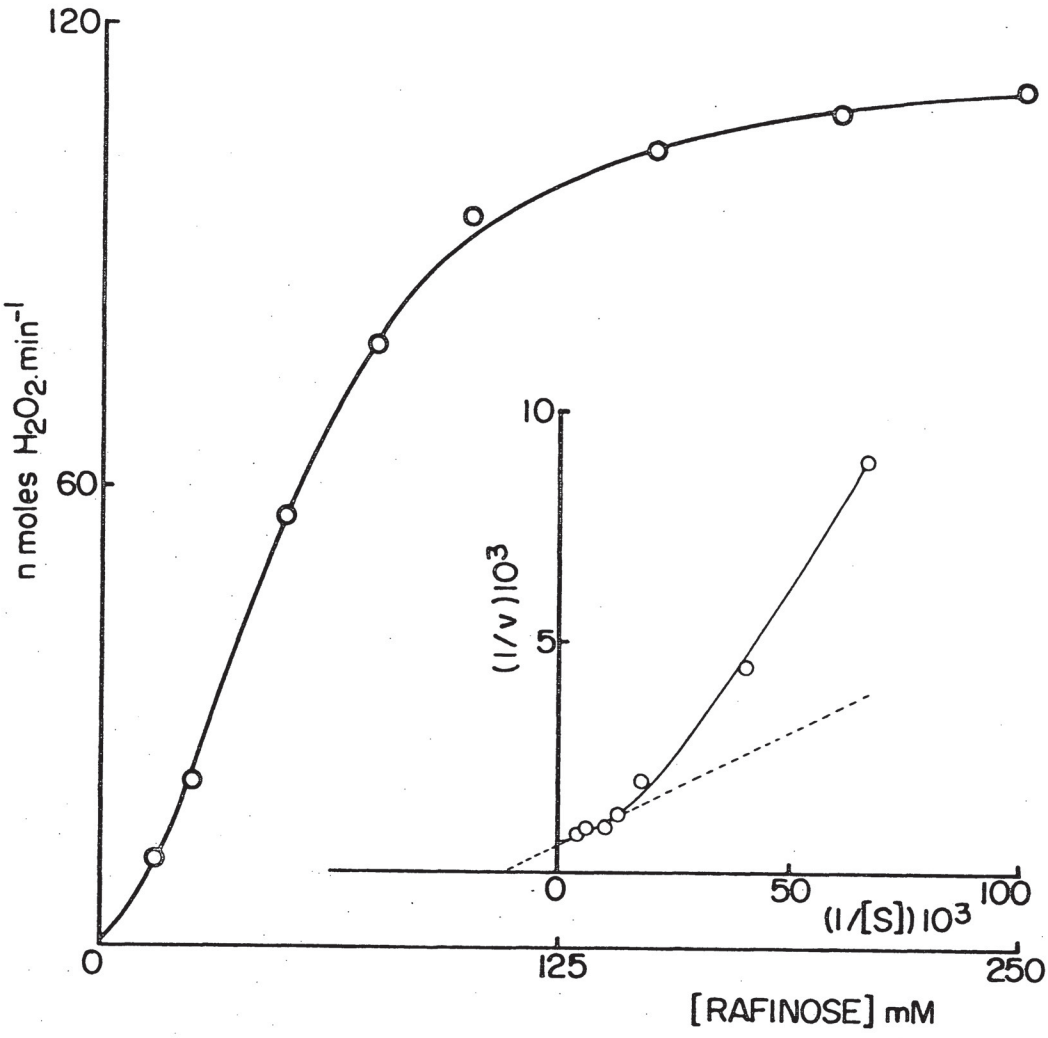


FIGURA 29. Efeito da concentração da rafinose sobre a atividade da galactose oxidase.

O efeito da concentração da rafinose sobre a velocidade enzimática foi verificado pelo método enzimático acoplado. O sistema de incubação foi o descrito na Figura 15, contendo 0,13 µg de enzima e concentrações variáveis de rafinose.

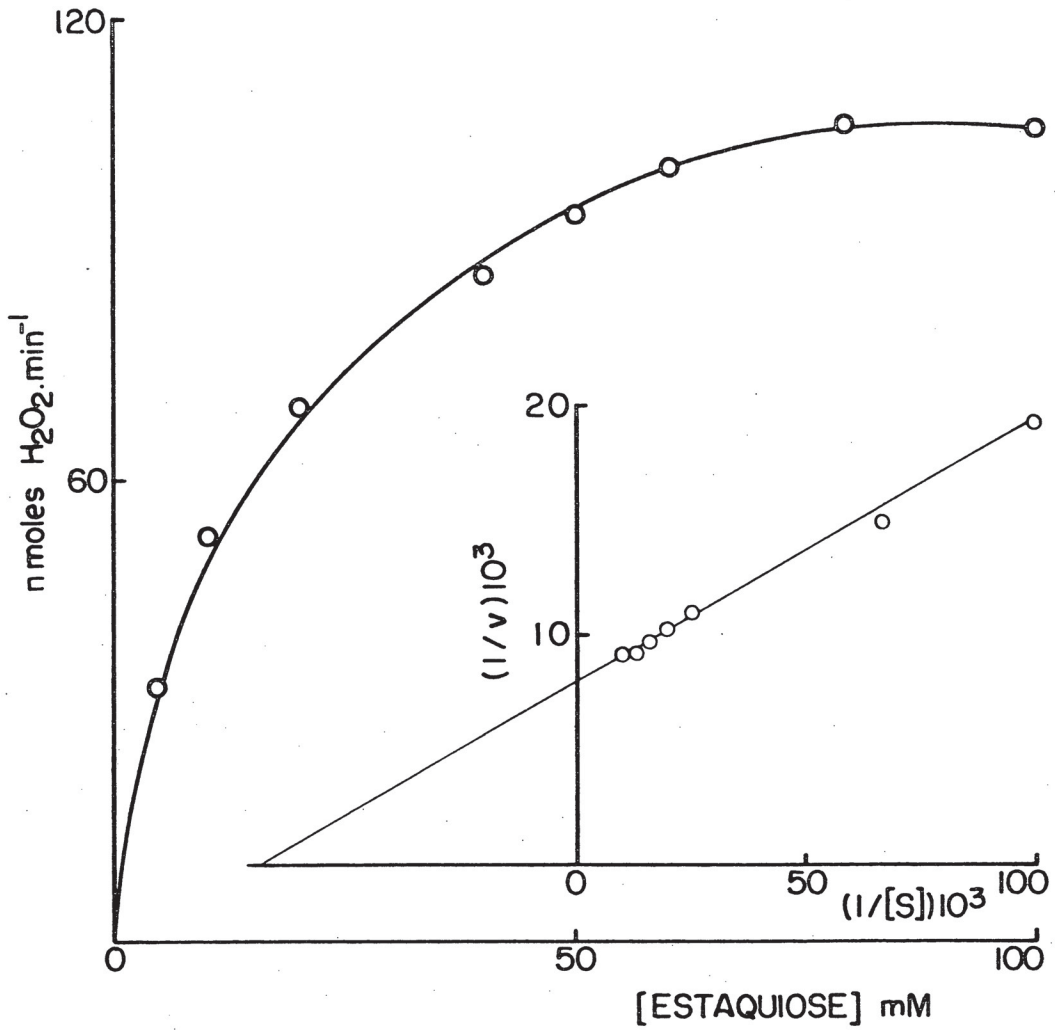


FIGURA 30. Efeito da concentração da estaquiose sobre a atividade enzimática.

O efeito da concentração, da estaquiose sobre a atividade enzimática foi determinado pelo método enzimático acoplado, conforme descrito na Figura 15, contendo 0,13 µg de galactose oxidase e concentrações variáveis de substrato.

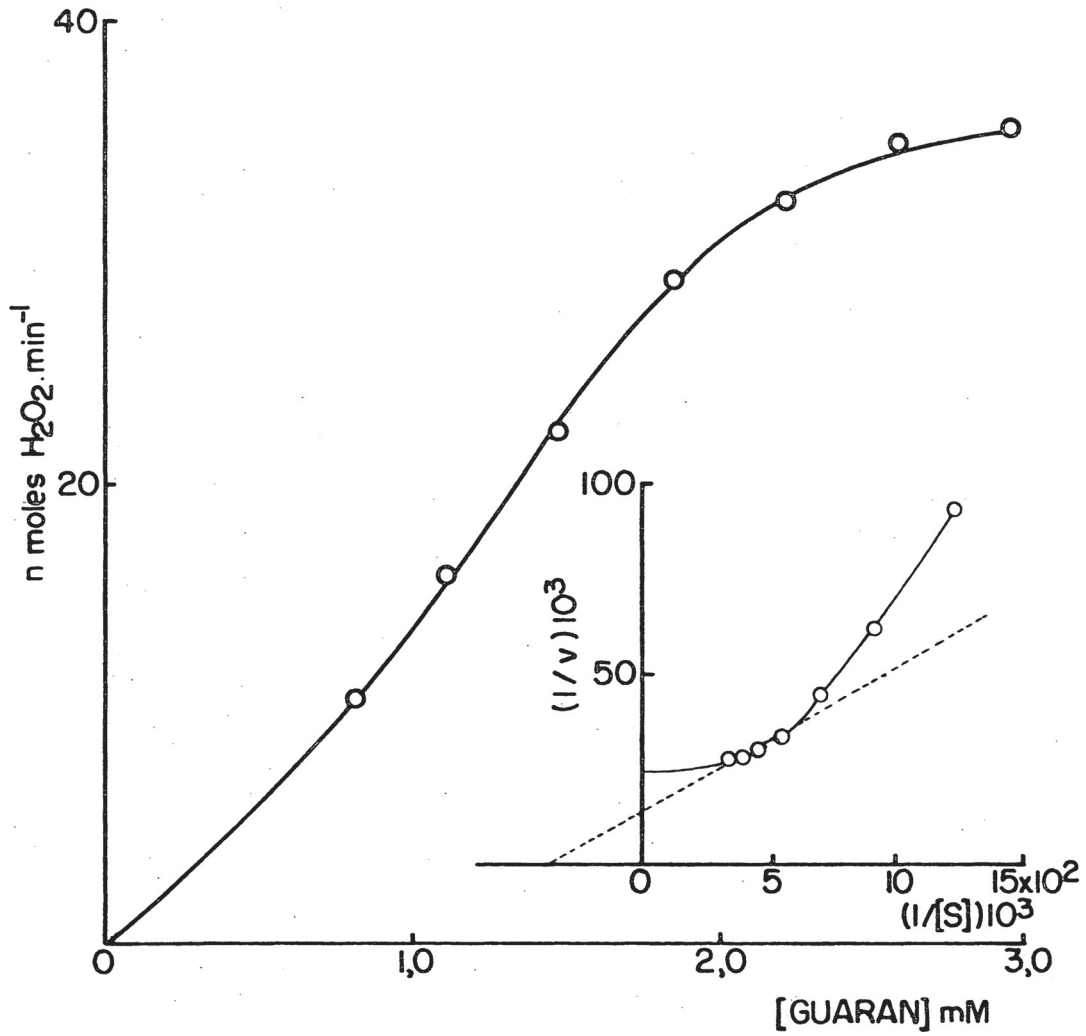


FIGURA 31. Efeito da concentração do guaran sobre a atividade da galactose oxidase.

O efeito da concentração do guaran sobre a velocidade enzimática foi determinado pelo método enzimático acoplado. O sistema de incubação empregado foi o descrito na Figura 15, contendo 0,13 µg de galactose oxidase e concentrações variáveis de guaran.

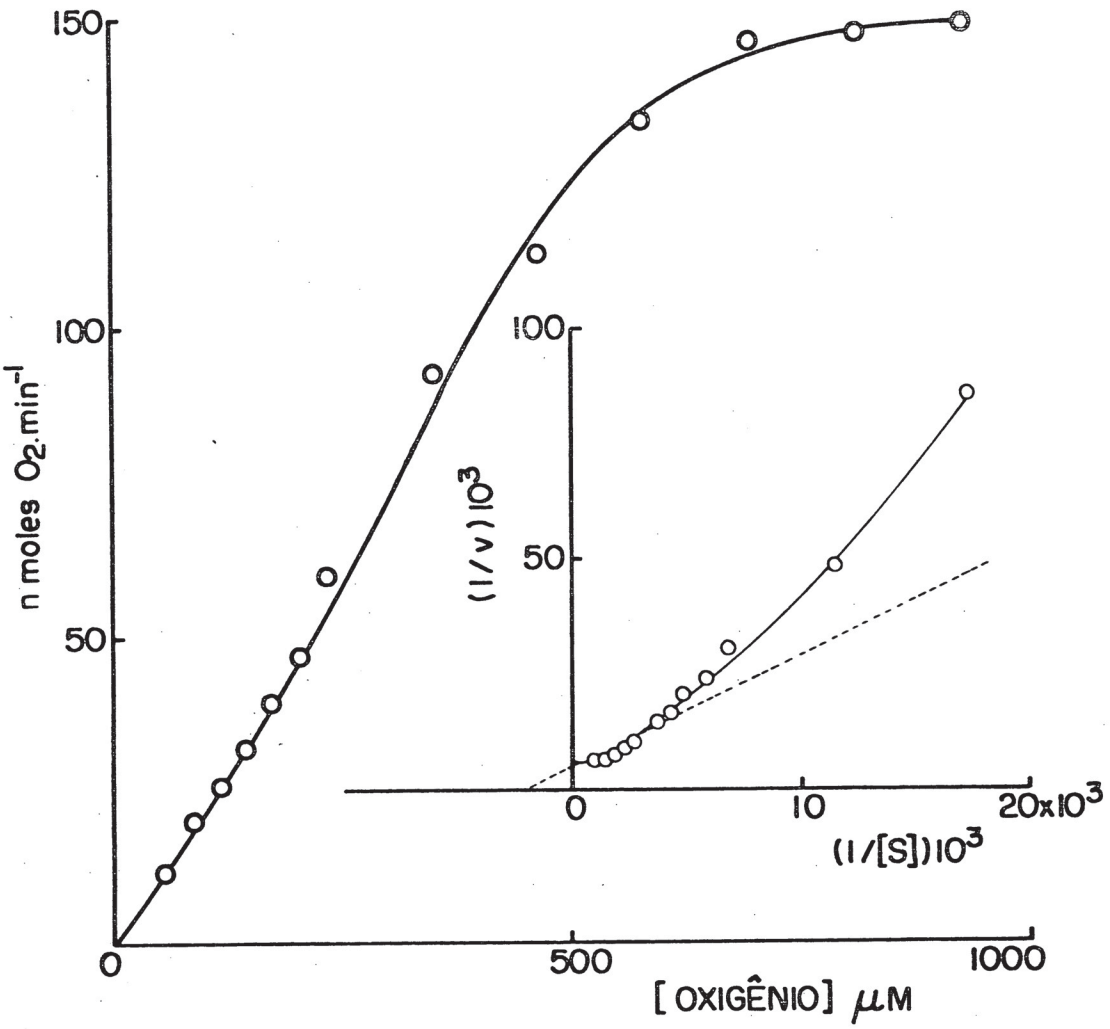


FIGURA 32. Efeito da concentração de oxigênio sobre a atividade da galactose oxidase intracelular.

O efeito da concentração do oxigênio sobre a atividade enzimática foi determinado conforme descrito no ítem 2.21.de MATERIAIS E MÉTODOS. O sistema de incubação (1,4 ml) consistia de 20 μmoles de tampão fosfato pH 7,0, 420 μmoles de D-galactose e 1,0 μg de galactose oxidase a 30°C, com concentração de oxigênio variando de 5,0 a 80%.

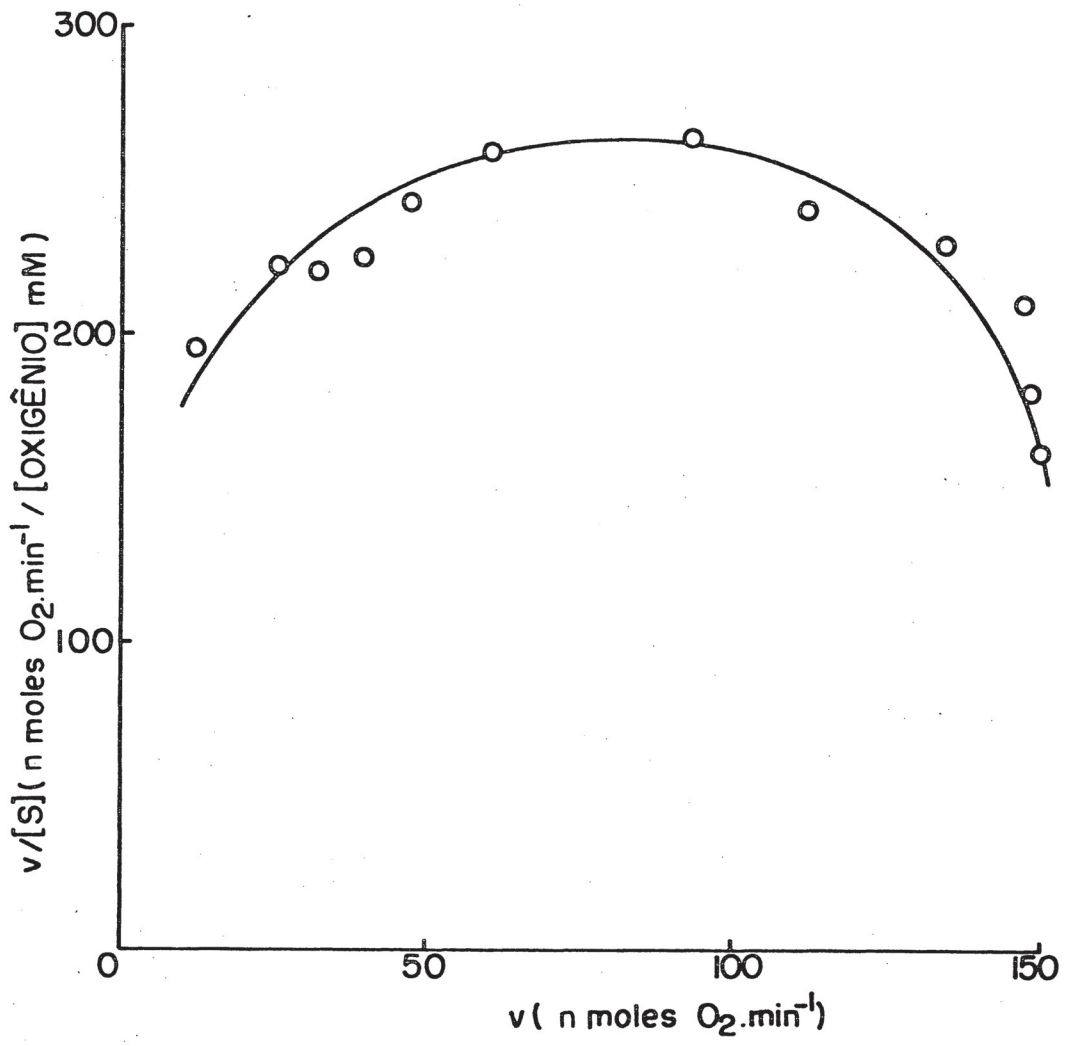


FIGURA 33. Gráfico de SCATCHARD do efeito da concentração de oxigênio sobre a atividade da galactose oxidase intracelular.

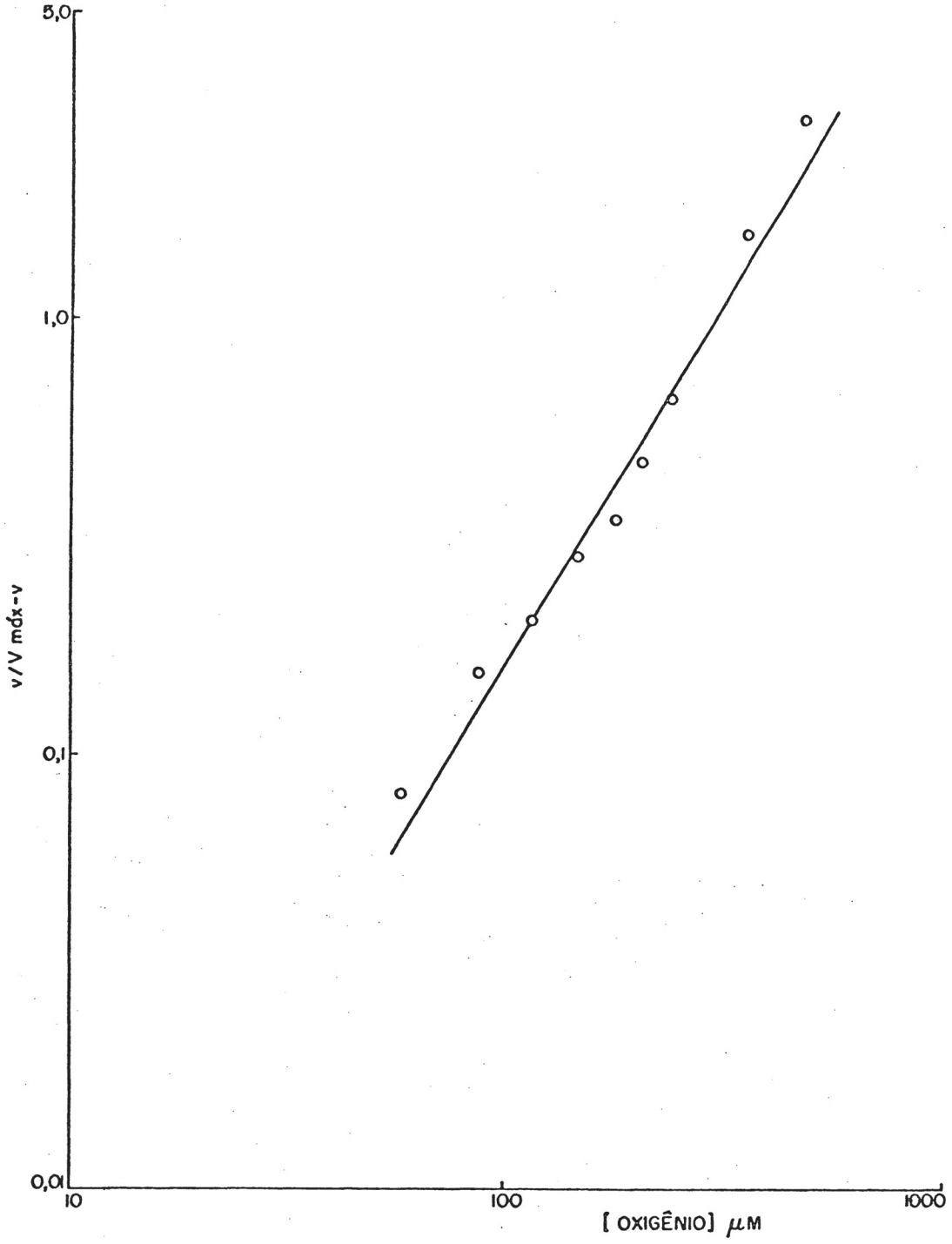


FIGURA 34. Gráfico de HILL do efeito da concentração de oxigênio sobre a atividade enzimática.

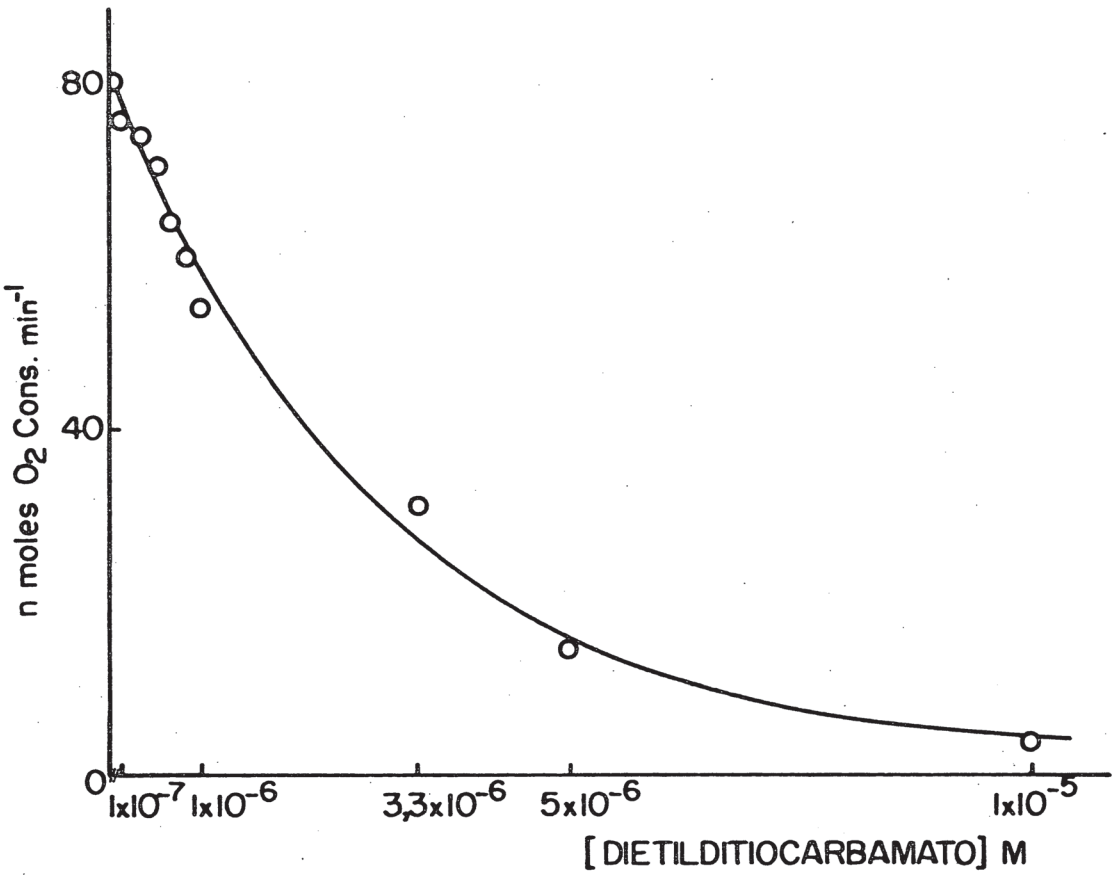


FIGURA 35. Efeito da concentração do dietilditiocarbamato sobre a atividade da galactose oxidase intra - celular de *D. dendroides*.

O efeito da concentração do dietilditiocarbamato foi determinado pelo método polarográfico, a 30°C, em um sistema de 1,4ml, contendo 20 µmoles de tampão fosfato pH 7,0; 420 µmoles de D-galactose; 0,65 µg de galactose oxidase e concentrações variáveis de dietilditiocarbamato. A enzima foi pré-incubada com o tampão e o dietilditiocarbamato, e a reação iniciada pela adição do substrato.

4. Discussão

A síntese da galactose oxidase é concomitante ao desenvolvimento de *D. dendroides*, sendo a enzima sintetizada durante a fase logarítmica do crescimento (Figura 3). O aparecimento da galactose oxidase extracelular também ocorre paralelamente ao crescimento do fungo (61,77), embora a enzima só seja encontrada em quantidades significativas no meio após 40 horas de cultivo. O fato dos níveis intracelulares da enzima se manterem constantes de 36 a 60 horas, período no qual se verificam aumentos nos níveis extracelulares, indica que a enzima sintetizada é efetivamente secretada.

A purificação da galactose oxidase intracelular foi realizada por cromatografia de afinidade em Sepharose 6B. A agarose (Sepharose 6B) é um polissacarídeo constituído de uma seqüência alternada de resíduos de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose, com ligações do tipo β (1→4) e α(1→3) podendo ser reconhecida como substrato pela galactose oxidase. Consequentemente, a enzima será retida pela matriz e eluída separadamente das proteínas contaminantes que não apresentam afinidade pela agarose. A afinidade de galactose oxidase pela agarose é influenciada pela natureza do tampão de equilíbrio, sendo que com o tampão acetato de amônio 100mM pH 7,2 a enzima extracelular é eluída num volume correspondente a 5 - 6 vêzes o volume morto da coluna (42, 43). Entretanto, a enzima intracelular não é eluída mesmo depois de passado um volume correspondente a 10 - 12 vêzes o volume morto da coluna. Este resultado sugere que a

forma intracelular da galactose oxidase apresente uma afinidade significativamente maior pelo polissacarídeo, uma vez que a enzima se liga à matriz, fazendo-se necessário uma eluição seletiva. O emprego da D-galactose como eluente resultou na obtenção de preparações altamente instáveis, perdendo a enzima intracelular a sua atividade em tempos inferiores a 12 horas. Este comportamento poderia ser justificado pelo fato da galactose oxidase extracelular ser inibida pela água oxigenada durante a catálise (39, 41, 57). A substituição por um análogo desprovido do grupo alcoólico primário na posição C_6, D-fucose, permitiu a eluição seletiva da galactose oxidase intracelular (Figura 5), obtendo-se uma preparação enzimática estável e homogênea (Figura 6 e Figura 7) com 64% de rendimento (Tabela I).

A galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* é uma proteína monomérica (Figura 8 e 10) semelhante ao descrito por KOSMAN et al (53) para a enzima extracelular.

O peso molecular da enzima intracelular é de 72.000 determinado tanto por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (Figura 9) como por filtração em Biogel P-150 (Figura 10), em contraste com os valores díspares descritos para a enzima extracelular (7, 14, 42, 45, 53, 89). O grande intervalo de pesos moleculares, de 39.000 (42) a 72.000 (53), encontrados para a enzima extracelular quando se utiliza permeação em gel poderia ser esperado em função da tendência da enzima em aderir à matrizes de resinas contendo carboidratos, o que não aconteceu no presente caso devido ao uso de gel com matriz de poliacrilamida. Por outro lado, a determinação do peso molecular da galactose oxidase extracelular por equilíbrio de

sedimentação também apresenta resultados discordantes (14,45, 53). Com o emprego de gel de poliacrilamida contendo SDS, os valores variaram de 65.000 a 69.000 (53,64).O peso molecular da galactose oxidase intracelular, pode ser, portanto, considerado ligeiramente superior ao da enzima extracelular.

Em todos os ensaios realizados com a enzima intracelular não foram observados períodos de latência ou de ativação quando se analisou o efeito do tempo de incubação sobre a atividade da enzima, seja pelo método enzimático acoplado ou pelo método polarográfico. Este comportamento é distinto daquele registrado por HAMILTON et al (41) que descreveram para a enzima extracelular a existência de períodos de latência e de ativação que poderiam durar de 2 à 30 minutos. Esses resultados levaram os autores a sugerir que a galactose oxidase extracelular se apresentaria sob duas formas: uma cataliticamente ativa e outra inativa ou menos ativa.

O efeito da concentração da galactose oxidase intracelular sobre a velocidade da reação (Figura 12) é semelhante ao descrito por AVIGAD et al para a enzima extracelular (12). A velocidade da oxidação do substrato é linear com a concentração da enzima para ambas as formas enzimáticas, independentemente do método utilizado para a determinação da atividade da galactose oxidase.

A temperatura ótima para a atividade da galactose oxidase intracelular é de 30^{o}C (Figura 13), sendo que em temperaturas superiores ocorre a sua inativação. Observou-se que a temperatura de 60^{o}C é crítica no processo de inativação pela análise dos dados na representação gráfica de ARRHENIUS (26). Os

ensaios de inativação térmica realizados com os extratos livres de células indicam que a concentração de proteínas é fundamental na estabilidade da galactose oxidase intracelular frente a temperatura.

O pH ótimo para a atividade da galactose intracelular é de 6,6-7,0 (Figura 14) e apresenta razoável concordância com os valores de pH de 6,7 e 7,0 determinados, respectivamente, por KWIATKOWSKI et al (56) e COOPER et al (24) para a enzima extracelular.

As formas intra e extracelulares da galactose oxidase de *D. dendroides* comportam-se de maneira análoga quanto à especificidade, embora oligossacarídeos como a rafinose e polímeros como o guaran seja oxidados na presença da enzima intracelular (Tabela III) a uma velocidade relativamente menor do que a observada para a enzima extracelular (12). Outra diferença significativa observada é relativa à oxidação de álcoois com 3 carbonos. O glicerol (39) e o β-hidroxipiruvato(23) descritos como substratos para a enzima extracelular, não sofrem oxidação na presença da enzima intracelular. Apenas a dihidroxiacetona serviu como substrato para a enzima entre os compostos de 3 C estudados. A explicação poderia ser dada na suposição de que a forma dimérica da dihidroxiacetona fosse o substrato real, uma vez que apenas o grupo alcoólico primário estaria livre em uma conformação semelhante a da D galactose.

Embora a galactose oxidase de *Gibberella fujikuroi* e a galactose oxidase intracelular de *Dactylium dendroides* apresentem propriedades moleculares distintas (2), muito se assemelham quanto à sua especificidade. Para a enzima de *G. fujikuroi*, no entanto, os oligossacarídeos como a rafinose e esta -

quiose são substratos menos eficientes do que a D galactose.

O valor de Km_{app} para a D-galactose determinado pelo método enzimático acoplado é da ordem de 40 mM (Tabela III), valor este semelhante ao obtido por AISAKA et al (3) para a enzima de *G. fujikuroi* utilizando o mesmo sistema de aceitadores de elétrons. Para a enzima extracelular, no entanto, com o mesmo tipo de ensaio, só que empregando outros agentes cromogênicos, os valores relatados variam de 2,8 mM (38), a 240 mM (12). Quando o ensaio foi realizado pela medida do consumo de oxigênio, o valor do Km_{app} para a D-galactose foi de 38 mM, valor semelhante ao obtido por HAMILTON et al (39) para a enzima extracelular. Deve ser salientado que este valor é totalmente distinto daqueles descritos por CLEVELAND et al (23) e KWIATKOWSKI et al (56) que obtiveram valores de 8 mM (23) e 175 mM (56), respectivamente. Os valores díspares relatados para os diversos substratos com a enzima extracelular poderiam ser atribuídos à diferença na sensibilidade dos diversos métodos empregados na determinação da atividade enzimática (12, 13, 23, 38, 39, 57), tornando-se difícil comparar os dados cinéticos das formas intra e extracelulares da enzima. Os valores de Km_{app} obtidos (Tabela III) são indicativos de que a enzima intracelular apresenta afinidades distintas para os diversos substratos.

A análise das Figuras 15, 19, 24, 25,27,29,31, mostra que a galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* apresenta cinética não Michaeliana com a maioria de seus substratos. A curvatura para cima apresentada pelos gráficos de duplosrecíprocos (16, 20, 24, 25, 26,27, 29 e 31), os des -

vios da linearidade apresentados nos gráficos de SCATCHARD(Figuras17 e 21) bem como os valores dos coeficientes de HILL superiores a 1,0 (Tabela III) são indicativos de cooperatividade cinética positiva (66). O fato de terem sido obtidos valores n_H (Tabela III) distintos para cada substrato sugere que os mesmos apresentem interações diferenciadas com a enzima.

Os valores do coeficiente de HILL encontrados para a D-galactose, dihidroxiacetona, 2-desoxi-D-galactose e melibiose próximos a 1, estão dentro dos limites teóricos propostos por AINSLIE et al (5) para as enzimas que apresentam lentas transições moleculares, induzíveis pelo substrato, como é o caso da hexoquinase de germen de trigo (19,63,70) e da ribonuclease I de pâncreas bovino (72), ambas enzimas monoméricas com um único sítio ativo. Os autores procuraram explicar os dados obtidos como consequência da cooperatividade entre dois estados conformacionais da enzima. Usando o mesmo raciocínio poder-se-ia explicar os dados cinéticos obtidos com a enzima intracelular como decorrentes da existência de 2 formas da enzima, nas quais o estado de óxido - redução do cobre seria distinto. Esta hipótese parece pouco viável por não terem sido observados períodos de latência ou de ativação quando se determinou o efeito do tempo na velocidade da reação catalisada pela galactose oxidase intracelular (Figura 11), como seria de se esperar caso houvessem transições moleculares (5).

Uma segunda alternativa para a explicação do comportamento não Michaeliano da galactose oxidase intracelular envolveria uma das possibilidades levantadas por KWIATKOWSKI et al (57), a partir da análise cinética de seus resultados com a

enzima extracelular, de que o mecanismo da galactose oxidase fosse "Random BiBi". Dentro desta linha de raciocínio os dados obtidos (Figura 15), poderiam ser explicados pelo fato do oxigênio não estar presente em concentrações saturantes, nos ensaios realizados. No entanto, quando os ensaios foram realizados em concentrações mais elevadas de oxigênio (Figura 19) o mesmo efeito cooperativo foi observado sugerindo que o oxigênio não afeta a interação da galactose à enzima.

A terceira hipótese para explicar a cooperatividade cinética observada seria a existência de dois sítios de encaixe para o substrato. A ligação de uma molécula de substrato em um dos sítios provocaria uma alteração conformacional facilitando a catálise, semelhante ao que ocorre no efeito homotrópico observado com enzimas oligoméricas (66). Os valores de n_H obtidos para o o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo, β-lactose rafinose e guaran suportam esta alternativa. Esta hipótese está de acordo com o mecanismo proposto por AISAKA et al (3,4) para explicar a cinética obtida com a enzima de *Gibberella fujikuroi*.

Deve ser salientado, no entanto, a comprovação de que qualquer das hipóteses que se proponha para explicar os resultados obtidos, requer uma análise cinética detalhada, acompanhada do estudo do estado de óxido - redução do cobre na enzima em repouso e na enzima cataliticamente ativa, o que não foi feito para a galactose oxidase de *G. fujikuroi*, que apresenta o mesmo comportamento cinético da enzima intracelular de *D. dendroides*, ora em estudo.

A curva de saturação da galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* pelo oxigênio, em concentração saturan-

te de D-galactose, é indicativa de cooperatividade positiva, conforme pode ser visualizado nos gráficos de duplos-recí - procos (Figura 32), no gráfico de SCATCHARD (Figura 33) e no gráfico de HILL (Figura 34). O valor de $S_{0,5}$ (290 µM) obtido corresponde a uma tensão de 25% de O_2. Os dados sugerem que o oxigênio possa interagir com a enzima em dois sítios dis - tintos, provocando a alteração conformacional responsável pe- la cooperatividade observada. Os dados cinéticos para o oxi- gênio obtidos por KWIATKOWSKI et al (57) com a enzima extra- celular são, entretanto, indicativo de um comportamento Mi - chaeliano com um valor de Km de 3 mM, superior à saturação com o oxigênio (1,3 mM). Nestas condições os estudos de me - canismo de reação (37, 39, 57) para a galactose oxidase ex - tracelular devem ser interpretados com cautela uma vez que foram realizados com a enzima parcialmente saturada pelo oxi- gênio.

O dietilditiocarbamato, quelante específico para o co- bre, exerce forte efeito inibitório sobre a galactose oxidase intracelular, que é totalmente inibida por uma concentração 10 vêzes menor de inibidor (Figura 35) do que registrado para a enzima extracelular (7, 24). Outros quelantes de metais como a hidroxilamina e a azida sódica inibem a enzima intracelular em concentrações cerca de 2,5 vêzes menores (Tabela IV) do que aquelas necessárias para promover o mesmo grau de inibi - ção na galactose oxidase extracelular de *D. dendroides* (7,24). A enzima de *G. fujikuroi* (2) apresenta a mesma sensibilidade aos quelantes de metais que a enzima intracelular de *D. den - droides*. A enzima intracelular é totalmente inibida pelo cia - neto de sódio na concentração de 0,05 mM (Tabela IV) demons -

trando uma sensibilidade maior que a extracelular que neces - sita o dobro de concentração do inibidor (7,24). A galactose oxidase intracelular de *D. dendroides*, portanto, é mais susceptível à ação dos quelantes de metais e ao cianeto, agentes que envolvem o cobre em seu mecanismo de inibição,do que a extracelular, o que sugere que o cobre na primeira talvez esteja mais exposto.

A iodoacetamida inibe totalmente a galactose oxidase intracelular na concentração de 1,0 mM (Tabela IV), o mesmo ocorrendo para a enzima de *G. fujikuroi* (2). À primeira vista, a inibição por iodoacetamida sugere o envolvimento de um grupamento - SH no sítio ativo da enzima (26), no entanto,KWIATKOWSKI et al (56) demonstraram que a galactose oxidase extracelular é rapidamente inativada pela iodoacetamida devido à alquilação seletiva de um resíduo de histidina envolvido na catálise. Face ao fato de que concentrações menores de ini - bidor promovem uma inativação significativamente maior da galactose oxidase intracelular é de se supor que a enzima apresente o sítio ativo mais exposto, tornando o resíduo de his - tidina mais disponível à alquilação.

A água oxigenada, produto da reação enzimática, também promove inativação significativa da galactose oxidase intra - celular em concentrações a partir de 2 mM (Tabela IV), efeito semelhante ao descrito por AVIGAD et al (12) e HAMILTON et al (39,41) para a enzima extracelular. O efeito observado poderia ser explicado pelo fato da H_2O_2 alterar o estado de óxido -redução do cobre que é fundamental para a catálise (32). KWIATKOWSKI et al (57) propõem, no entanto, que a água oxigenada se ligue à enzima em dois sítios formando um complexo inativo.

A galactose oxidase intracelular de *D. dendroides*, bem como a extracelular de *G. fujikuroi* é, de maneira geral, mais sensível à ação de inibidores do que a enzima extracelular de *D. dendroides*. Isto poderia ser explicado se o sítio ativo de ambas as enzimas se apresentassem mais distendidos do que na enzima extracelular de *D. dendroides*, de modo que o cobre e os aminoácidos envolvidos na catálise estivessem mais dispo - níveis à ação dos inibidores.

Os resultados indicam que, embora apresentando dife - renças em algumas propriedades moleculares (2) e determinan - tes antigênicos distintos (64), as enzimas intracelular de *D. dendroides* e extracelular de *G. fujikuroi* se assemelham quanto à seu comportamento cinético e sensibilidade à ação de inibidores.

Os estudos realizados indicam que, apesar de apresen - tar determinantes antigênicos comuns à forma extracelular (64), a galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* é distinta em seu comportamento cinético frente aos substratos e na sensi - bilidade aos inibidores. O fato da enzima dar reação imunoló- gica com anticorpos antigalactose oxidase extracelular não exclui a possibilidade da enzima possuir, por exemplo, um teor de carboidrato distinto, pois as formas glicosiladas e não glicosiladas da invertase reagem igualmente frente ao respec- tico anticorpo (22). Um maior teor de carboidratos na enzima intracelular poderia ser responsável por alterações conforma- cionais que afetariam o comportamento cinético da enzima e sua afinidade por matrizes contendo resíduos de carboidratos.

Para completar os estudos de caracterização da galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* é fundamental que se determine a

sua composição em aminoácidos, metais e açúcares, bem como se proceda a uma análise cinética detalhada juntamente com os estudos de ressonância paramagnética eletrônica indispensáveis à avaliação do papel do cobre na catálise. Especialmente os dados sobre a composição orientarão os estudos futuros sobre a secreção da enzima.

5. Conclusões

1. A galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* foi purificada até a homogeneidade.
2. A enzima é uma proteína monomérica com 72.000 de peso molecular.
3. A enzima apresenta uma pH ótimo de 6,6 - 7,0 e uma temperatura ótima de 30°C.
4. A galactose oxidase intracelular apresenta ampla especificidade. Os valores de Km_{app} determinados variaram de 3,3 a 333 mM, conforme o substrato utilizado.
5. A galactose oxidase intracelular de *D. dendroides* apresenta cinética não Michaeliana para a D galactose e para o oxigênio. A enzima apresenta o mesmo comportamento cinético para a D-galactosanina, metil-α-D-galactopiranosídeo, o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo, β-lactose, rafinose e guaran.
6. A galactose oxidase intracelular é inibida pela H_2O_2, cianeto, iodoacetamida e por agentes quelantes de metais como o dietilditiocarbamato, azida sódica e hidroxilamina.

6. Referências Bibliográficas

1. AISAKA,K. & TERADA,O. Production of galactose oxidase by Gibberella fujikuroi.Agric.Biol.Chem.,45:2311-2316, 1981.

2. AISAKA,K. & TERADA,O. Purification and properties of galactose oxidase from Gibberella fujikuroi.Agric.Biol.Chem.,46:1191-1197, 1981.

3. AISAKA,K.; UWAJIMA,T. & TERADA,O. Kinetic properties of galactose oxidase from Gibberella fujikuroi. Agric.Biol.Chem.,48: 1425-1431, 1983.

4. AISAKA,K.; UWAJIMA,T. & TERADA,O. Catalytic properties of Gibberella galactose oxidase. Agric.Biol.Chem.,49:1201-1202, 1985.

5. AINSLIE,R.G.; SHILL,J.P. & NEET,K.E. Transients and cooperativy. A slow transition model for relating transients and cooperative kinetics of enzymes. J.Biol.Chem.,247:7088-7096, 1972.

6. ALLAIN,C.C.; POON,L.S.; CHAN,C.S.G.; RICHMOND,W. & FU.P.C. Enzymatic determination of total cholesterol. Clin.Chem., 20: 470-475, 1974.

7. AMARAL,D.; BERNSTEIN,L.; MORSE,D. & HORECKER,B.L. Galactose oxidase of Polyporus circinatus: a copper enzyme. J.Biol.Chem., 238: 2281-2284, 1963.

8. AMARAL,D. & BACILA,M. Determinação da galactose oxidase pelo eletródio de oxigênio. Arq.Biol.Tecnol.,12:179-186, 1966.

9. AMARAL,D.; KELLY-FALCOZ,F. & HORECKER,B.L. Galactose oxidase of Polyporus circinatus.Methods in Enzymology, 9: 87-92, 1966.

10. ANDREWS,P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. Biochem.J.,91:222-233, 1964.

11. AVIGAD,G.; ASENCIO,C.; AMARAL,D. & HORECKER,B.L. Galacto-dialdose production with an enzyme from the mold Polyporus circinatus.Biochem. Biophys.Res.Commun., 4:474-477, 1961.

12. AVIGAD,G.; AMARAL,D.; ASENCIO,C. & HORECKER,B.L. The D-Galactose oxidase of Polyporus circinatus. J.Biol.Chem.,237:2736-2743, 1962.

13. AVIGAD,G. An NADH coupled assay system for galactose oxidase. Anal.Biochem., 86:470-476, 1978.

14. BAUER,S.; BLAUER,G. & AVIGAD,G. Some properties of crystaline galactose oxidase. Israel J.Chem., 5:126, 1967.

15. BERNHEIMER,A.W. Resolution of mixtures of proteins by means of zone electrophoresis in sucrose density gradients. Arch.Biochem. Biophys., 96:226-232, 1962.

16. BLAKESLEY,R.W. & BOEZI,J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G 250. Anal. Biochem.,82:580-582, 1977.

17. BLUMBERG,W.E.; HORECKER,B.L.; KELLY-FALCOZ,F. & PEISACH,J. The role of copper in galactose oxidase. Biochim. Biophys.Acta., 96:336-338, 1965.

18. BRUENING,G.; CRIDDLER,R.; PREISS,J. & RUDERT,F. Electrophoresis of proteins in polycrylamide gels. In: Biochemical Experiments. Wiley-Interscience, New York. 314 p. 1970.

19. BUC,J.; RICARD,J. & MEUNIER,J.C. Enzyme memory. 2-Kinetics and thermodynamics of the slow conformation changes of wheat-germ hexokinase LI. Eur.J.Biochem.,80:593-601, 1977.

20. BUGLOVA,T.T. & KIRILENKO,T.S. Effect of medium composition and culture conditions on the galactose oxidase activity of Fusarium graminearum. Mikrol.Fitopatol.,17:122-123, 1983. In: Chemical Abstracts, 99:448-20884, 1983.

21. CHRISPEELS,M.J. Biosynthesis, intracellular transport and secretion of extracellular macromolecules. Ann.Rev.Plant. Physiol., 27:19-38, 1976.

22. CHU,F.K. & MALEY,F. The effect of glucose on the synthesis and glycosylation of the polypeptide moiety of yeast external invertase. J.Biol.Chem., 255:6392-6397, 1980.

23. CLEVELAND,L.; COFFMAN,R.E.; COON,P. & DAVIS,L. An investigation of the role of the copper in galactose oxidase. Biochemistry, 14:1108-1115, 1975.

24. COOPER,J.A.D.; SMITH,W.; BACILA,M. & MEDINA,H. Galactose oxidase from Polyporus circinatus. Fr. J.Biol.Chem.,234:445-448, 1959.

25. DEL RÍO,L.A.; ORTEGA,G.; LÓPEZ,A.L. & GORGE,J.L. A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. Anal.Biochem., 80:409-415, 1977.

26. DIXON,M. & WEBB,E.C. Enzymes. 2nd Ed. Academic Press, New York 950 p., 1964.

27. DYRKACZ,G.R.; LIBBY,D.R. & HAMILTON,G.A. Trivalent copper as a probable intermediate in the reaction catalyzed by galactose oxidase. J.Am.Chem.Soc., 98:626-628, 1976.

28. ELSTNER,E.F. & HEUPEL,A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium-chloride. A simple assay for superoxide dismutase. Anal.Biochem., 70:616-620, 1976.

29. ETTINGER,M.J. & KOSMAN,D.J. Circular dichroism spectra of copper enzymes: interaction of galactose oxidase with its substrates. Fed.Proc.,32:1829, 1973.

30. ETTINGER,M.J. Spectral properties of "non-blue" cupric copper in proteins. Dichroism and optical spectra of galactose oxidase. Biochemistry, 13:1242-1246, 1974.

31. ETTINGER,M.J. & KOSMAN,D.J. Circular dichroism spectra of the copper enzyme, galactose oxidase, in the presence of its substrates and products. Biochemistry, 13:1247-1251, 1974.

32. ETTINGER,M.J. & KOSMAN,D.J. Chemical and catalytic properties of galactose oxidase. Met.Ions.Biol., 3:221-261, 1981.

33. FAIRBANKS,G.; STECK,T.L. & WALLACH,D.F.H. Eletrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, 10:2606-2617, 1971.

34. FIELD,C. & SCHEKMAN,R. Localized secretion of acid phosphatase reflects the pattern of cell surface growth in Saccharomyces cerevisiae. J.Cell.Biol., 86:123-128, 1980.

35. GANCEDO,J.M.; GANCEDO, C. & ASENCIO,C. Widespread occurrence of galactose oxidase and glucose oxidase in fungi. Arch.Biochem.Biophys., 119:588-589, 1967.

36. GASCÓN,S.; NEUMAN,N.P. & LAMPEN,J.O. Comparative study of the propérties of the purified internal and external invertases from yeast. J.Biol.Chem., 243:1573-1577, 1968.

37. GIORDANO,R.S.; BEREMAN,R.D.; KOSMAN,D.J. & ETTINGER,M.J. Stereoeletronic properties of metalloenzymes. II-Effects of ligand coordination on the electron spin resonance spectrum of ga - lactose oxidase as a probe of structure and function.J.Am. Chem.Soc., 96:1023-1026, 1974.

38. GUILBAULT,G.G.; BRIGNAC,P.J. & JUNEAU,M. New substrates for fluorometric determination of oxidative enzymes. Anal.Chem., 40:1256-1263, 1968.

39. HAMILTON,G.A.; DE JERSEY,J. & ADOLF,P.K. Galactose oxidase. The complexities of a simple enzyme. In:Oxidases and related redox systems. KING,T.E.; MASON,H.S. & MORRISON,M.; Eds. University Park Press, Baltimore,Md. 103-124, 1973.

40. HAMILTON,G.A.; LIBBY,D.R. & HARTZELL,C.R. The valence of copper and the role of superoxide in the D-galactose oxidase catalyzed reaction. Biochem.Biophys.Res.Comm., 55:333-340, 1973.

41. HAMILTON,G.A.; ADOLF,P.K.; JERSEY,J.; DUBOIS,G.C.; DYRKACZ,G.R. & LIBBY,D.R. Trivalent copper, superoxide and galactose oxidase. J.Am.Chem.Soc., 100:1899-1912, 1978.

42. HATTON,M.W.C. & REGOECZI,E. The proteolitic nature of com - mercial samples of galactose oxidase. Purification of the enzyme by a simple affinity method. Biochim.Biophys.Acta, 438:339-346, 1976.

43. HATTON,M.W.C. & REGOECZI,E. Galactose oxidase from commercial samples. Methods in Enzymology, 89: 172-176, 1982.

44. HILL,A.V. Relative velocities of difusion in aqueous solution of rubidium and cesium chlorides: Note on the use of the experimental method. J.Physiol., 40: Proceedings iv, 1910.

45. KELLY-FALCOZ,F.; GREENBERG,H. & HORECKER,B.L. Galactose oxidase studies on the structure and role of disulfide linkages. J. Biol. Chem., 240:2966-2970, 1965.

46. KEMMELMEIER,C. & ZANCAN,G.T. Taxonomy of galactose oxidase producer fungi strain. Arq.Biol.Tecnol., 19:25-30, 1976.

47. KEMMELMEIER,C. & ZANCAN,G.T. Studies on the taxonomy of a mold producing galactose oxidase II. Arq.Biol.Tecnol., 21: 75-85, 1978.

48. KEMMELMEIER,C. & ZANCAN,G.T. Chemical and immunological properties of galactoglucomannans from Dactylium dendroides.Exp. Mycol., 5:339-348, 1981.

49. KEMMELMEIER,C. & ZANCAN,G.T. Serological differentiation of the galactose oxidase producer mold from Dactylium dendroides Arq.Biol.Tecnol., 26:403-408, 1983.

50. KLIBANOV,A.M.; ALBERTI,B.N. & MARLETTA,M.A. Stereospecific oxidation of aliphatic alcohols by galactose oxidase.Biochem. Biophys.Res.Comm., 108:804-808, 1982.

51. KOSMAN,D.J.; BEREMAN,D.; ETTINGER,M.J. & GIORDANO,R.S. On the role of a cuprous ion intermediate in the galactose oxidase reaction. Biochem.Biophys.Res.Comm., 54:856-861, 1973.

52. KOSMAN,D.J.; KWIATKOWSKI,L.D.; ETTINGER,M.J. & BRODIE,J.D. Kinetic and chemical aspects of catalysis by galactose oxidase.Fed.Proc., 32:550, 1973.

53. KOSMAN,D.J.; ETTINGER,M.J.; WEINER,R.E. & MASSARO,E.J. The molecular properties of the copper enzyme galactose oxidase. Arch.Biochem.Biophys., 165:456-467, 1974.

54. KOSMAN,D.J.; ETTINGER,M.J.; BEREMAN,R.D. & GIORDANO,R.S. Role of tryptophan in the spectral and catalytic properties of the cooper enzyme, galactose oxidase. Biochemistry, 16:1597-1601, 1977.

55. KWIATKOWSKI,L.D. & KOSMAN,D.J. On the role of superoxide radical in the mechanism of action of galactose oxidase. Biochem.Biophys.Res.Comm., 53:715-721, 1973.

56. KWIATKOWSKI,L.D.; SICONOLFI,L.; WEINER,R.E.; GIORDANO,R.S.; BEREMAN,R.D.; ETTINGER,M.J. & KOSMAN,D.J. Histidine as an essential residue in the active site of the copper enzyme galactose oxidase. Arch.Biochem.Biophys., 182:712-722, 1977.

57. KWIATKOWSKI,L.D.; ALDEMAN,M.; PENNELY,R. & KOSMAN,D.J. Kinetic mechanism of the Cu(II) enzyme galactose oxidase. J.Inorg. Biochem., 14:209-222, 1981.

58. LINEWEAVER,H. & BURK,D. The determination of enzyme dissociation constants. J.Am.Chem.Soc., 56:658, 1934.

59. LOWRY,O.R.; ROSEBROUGH,N.J.; FARR,A.L. & RANDALL,R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem.,193: 265-275, 1951.

60. MARADUFU,A. & PERLIN,A.S. A non-hydrogen bonding role for the 4-hydroxyl group of D-galactose in its reaction with D-galactose oxidase. Carbohyd.Res., 32:93-99, 1974.

61. MARKUS,Z.; MILLER,G. & AVIGAD,G. Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by Dactytilium dendroides. Appl.Microbiol., 13:686-693, 1965.

62. MARWEDEL,B.J. & KURLAND,R.J. Fluoride ion as an NMR relaxation probe of galactose oxidase-substrate binding. Biochem.Biophys. Acta., 657:495-506, 1981.

63. MEUNIER,J.C.; BUC,J.; NAVARRO,A. & RICARD,J. Regulatory behavior of monomeric enzymes. 2-A wheat-germ hexokinase as a mnemonical enzyme. Eur.J.Biochem., 49:209-223, 1974.

64. MIYAGUI,D. Métodos alternativos de purificação e propriedades imunológicas da galactose oxidase de Dactylium dendroides. Curitiba, 1984. 49. p. Tese Mestrado,Universidade Federal do Paraná.

65. MORMENEO,S. & SENTANDREU,R. Regulation of invertase synthesis by glucose in Saccharomyces cerevisiae. J.Bacteriol., 152:14-18, 1982.

66. NEET,K.E. Cooperativity in enzyme function: equilibrium and kinetic aspects. Methods in Enzymology, 64:139-192, 1980.

67. NOBLES,M.K. & MADHOSINGH,C. Dactylium dendroides (Bull)Fr. misnamed as Polyporus circinatus Fr. Biochem.Biophys.Res. Comm., 12:146-147, 1963.

68. NUNOKAWA,Y. Galactose oxidase from Beltraniella potoricensis. Shionogi & Co.Ltda. Appl 8017 (147):6., 1980. In:Chemical Abstracts 96 :506-507,33374 K, 1982.

69. PEDROSA,F.O. & ZANCAN,G.T. Effect of oxygen on galactose oxidase synthesis and secretion in Dactylium dendroides. Exp. Mycol., in press.

70. RICARD,J.; BUC,J. & MEUNIER,J.C. Enzyme memory. 1-A transient kinetic study of wheat-germ hexokinase LI. Eur.J.Biochem.,80: 581-592, 1977.

71. ROTHMAN,J.E. & LUDISH,H.F. Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. Nature. 269: 775-780, 1977.

72. RUBSAMEN,H.; KHANDKER,R. & NITZEL,H. Sigmoid kinetics of the monomeric ribonuclease I due to ligand-induced shifts of conformation equilibria. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.,355: 687-708, 1974.

73. SCATCHARD,G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann.N.Y.Acad.Sci., 51:660-672, 1949.

74. SCHLEGEL,R.A.; GERBEK,C.M. & MONTGOMERY,R. Substrate specificity of D-galactose oxidase. Carbohyd. Res., 7:193-199, 1968.

75. SCWARZ,R.T. & DATEMA,R. Inhibitors of trimming:new tools in glycoprotein research. Trends Biochem.Sci. 9:32-34, 1984.

76. SENGUPTA,C.; BRANDHORST,B.P. & VERMA,D.P. Synthesis, glycosylation and rapid secretion of a glycoprotein by Achlya a primitive eucaryote. Biochim.Biophys.Acta., 674:105-117, 1981.

77. SHATZMAN,A.R. & KOSMAN,D.J. Regulation of galactose oxidase synthesis and secretion in Dactylium dendroides. Effects of pH and culture density. J.Bacteriol., 130:455-463, 1977.

78. SPEAKE,B.K.; MALLEY,D.J. & HEMMING,W.F. The effect of tunicamycin on secreted glucosidase of Aspergillus niger. Arch. Biochem.Biophys., 210:110-117, 1981.

79. TAYLOR,D. ASM Conference Report: Genetics and molecular biology of industrial microrganisms, 1984. ASM News, 51: 135-138, 1985.

80. TRESSEL,P. & KOSMAN,D.J. A simplified purification procedure for galactose oxidase. Anal.Biochem., 105:150-153, 1980.

81. TRESSEL,P. & KOSMAN,D.J. o-o Dityrosine in native and horseradish peroxidase (HRP) - activated galactose oxidase. Biochem. Biophys.Res.Comm., 92 :781-786, 1980.

82. TRESSEL,P. & KOSMAN,D.J. Galactose oxidase from Dactylium dendroides. Methods in Enzymology., 89:163-171, 1982.

83. VILLA,T.G.; NOTARIO,V. & VILLANUEVA,J.R. Direct chemical proof of different glycosylation patterns for yeast exo- and endo - 1,3- β-D-glucanases. J.Gen.Microb., 109:371-374, 1978.

84. VOGEL,A.I. Analysis of hydrogen peroxide. In: Quantitative Inorganic Analysis. London, 2nd ed. Richard Clay and Company Ltd, 1951, p. 283.

85. WARBURG,O. & CHRISTIAN,W. Isolierug und kristallisation des garungs ferments enolase. Biochem.Z., 310:384-421, 1941.

86. WEINER,R.E.; ETTINGER,M.J. & KOSMAN,D.J. Fluorescence properties of the copper enzyme galactose oxidase and its tryptophan-modified derivatives. Biochemistry, 16 :1602-1606, 1977.

87. WINKLER,M.E.; BEREMAN,R.D. & KURLAND,R.J. Kinetic and magnetic resonance studies of substrate binding to galactose oxidase copper (II). J.Inorg.Biochem., 14:223-235, 1981.

88. WICKNER,W. Assembly of proteins into membranes. Science, 210: 861-868, 1980.

89. YIP,M.C.M. & DAIN,J.A. The inhibition of galactose oxidase. Enzymolologia, 35:368-376, 1968.

90. ZANCAN,G.T. & AMARAL,D. New substrate for galactose oxidase. Biochim.Biophys.Acta, 198:146-147, 1970.