

ADRIANA LACERDA TWERDOCHLIB

Metabolismo de $\underline{\text{L}}$ -Rhamnose em *Pichia stipitis*
(Pignal, 1967)

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

CURITIBA
1991

ADRIANA LACERDA TWERDOCHLIB

METABOLISMO DE L-RHAMNOSE EM *Pichia stipitis* (PIGNAL, 1967)

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Profa. Liu Un Rigo - UFPR

Profa. Momoyo Nakano - UFPR

Prof. Luis Alberto da Silva Veiga - UFPR

Curitiba, 5 de dezembro de 1991.

ORIENTADORES:

Dra. Liu Un Rigo

Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

Às pessoas que me deram amor,
carinho e apoio, meus pais
Theodoro e Cecília,
e Mário Antônio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Liu Un'Rigo e ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, pela orientação desta tese.

Agradeço ao Dr. Shigehiro Funayama, pelas sugestões, acompanhamento do trabalho e leitura da tese.

Agradeço à Dra. Momoyo Nakano, pela orientação durante o período de Iniciação Científica.

Agradeço aos coordenadores que estiveram na chefia do curso de pós-graduação durante estes anos.

Agradeço ao Dr. Luis Alberto da Silva Veiga pela amizade e pela solidariedade no empréstimo de equipamentos.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Bioquímica, que colaboraram com sugestões, empréstimos de reativos e equipamentos.

Agradeço a todos os amigos pela solidariedade demonstrada, José Maurício, Eneida, Iara, Hidevaldo, Emanuel e Maria Berenice.

Agradeço a todos os colegas da minha turma, com suas demonstrações de amizade.

Agradeço aos meus pais, que sempre me deram a segurança necessária nos momentos de desafio.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
 1 INTRODUÇÃO.....	 1
1.1 MICRORGANISMO.....	1
1.2 METABOLISMO DE L-RHAMNOSE.....	3
1.3 OBJETIVOS DO TRABALHO.....	10
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1 MICRORGANISMO.....	11
2.2 MEIOS DE CULTURA.....	11
2.3 ENZIMAS.....	13
2.4 REAGENTES QUÍMICOS.....	13
2.5 CONSERVAÇÃO DAS CULTURAS.....	13
2.6 PREPARO DO INÓCULO.....	14
2.7 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE GERAÇÃO.....	14
2.8 CULTIVO EM LARGA ESCALA.....	15
2.9 PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS.....	16
2.10 TRATAMENTO COM SULFATO DE PROTAMINA.....	16
2.11 SÍNTESES.....	16
2.11.1 SÍNTESE QUÍMICA DO ÁCIDO L-RHAMNÔNICO.....	17
2.11.2 SÍNTESE QUÍMICA DE D E L-LACTALDEÍDO.....	18
2.11.3 SÍNTESE BIOLÓGICA DO ÁCIDO RHAMNÔNICO: ISOLAMENTO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE.....	19
2.11.4 SÍNTESE BIOLÓGICA DO 2-CETO-3-DESOXI- L-RHAMNONATO.....	19

2.11.4.1	ISOLAMENTO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA L-RHAMNOATO DESIDRATASE.....	20
2.11.4.2	ISOLAMENTO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE (SENTIDO SÍNTESE).....	20
2.11.5	SÍNTESE BIOLÓGICA DE L-LACTATO.....	21
2.12	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	21
2.12.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE.....	21
2.12.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA L-RHAMNONO- Γ - LACTONASE.....	22
2.12.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE.....	23
2.12.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA 2-CETO-3-DESOXI- L-RHAMNONATO ALDOLASE NO SENTIDO DA SÍNTESE..	24
2.12.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE.....	25
2.12.6	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DA L- RHAMNOSE ISOMERASE E L-RHAMNULOSE QUINASE.....	25
2.13	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	26
2.13.1	DETERMINAÇÃO DE NADH.....	26
2.13.2	DETERMINAÇÃO DE LACTONAS.....	26
2.13.3	DETERMINAÇÃO DE L-RHAMNOSE.....	26
2.13.4	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES.....	27
2.13.5	DETERMINAÇÃO DE 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO (L-KDR).....	27
2.13.6	DETERMINAÇÃO DE α -CETO-ÁCIDOS.....	27
2.13.7	DETERMINAÇÃO DE PIRUVATO E L-LACTATO.....	28
2.13.8	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	29
2.13.9	DETERMINAÇÃO DE D E L-LACTALDEÍDOS.....	29
2.13.10	CROMATOGRAFIA UNIDIMENSIONAL ASCENDENTE EM PAPEL.....	29
3	RESULTADOS.....	31
3.1	CRESCIMENTO E UTILIZAÇÃO DA L-RHAMNOSE COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO E ENERGIA POR <i>Pichia sp.</i>	31
3.2	DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA VIA METABÓLICA DA L-RHAMNOSE EM <i>Pichia stipitis</i>	

NRC 5568.....	31
3.2.1 <u>L</u> -RHAMNOSE DESIDROGENASE.....	32
3.2.1.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	32
3.2.1.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO.....	32
3.2.1.3 EFEITO DO pH.....	33
3.2.1.4 EFEITO DE NUCLEOTÍDEOS PIRÍDINICOS OXIDADOS E REDUZIDOS.....	33
3.2.1.5 ESPECIFICIDADE PELO SUBSTRATO.....	33
3.2.1.6 EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO.....	34
3.2.1.7 ATIVADORES E INIBIDORES.....	34
3.2.2 <u>L</u> -RHAMNONO- Γ -LACTONASE.....	34
3.2.3 <u>L</u> -RHAMNONATO DESIDRATASE.....	35
3.2.3.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	35
3.2.3.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO.....	35
3.2.3.3 EFEITO DO pH.....	36
3.2.3.4 EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO.....	36
3.2.3.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS ÍONS Mg^{++}	36
3.2.4 2-CETO-3-DESOXI- <u>L</u> -RHAMNONATO ALDOLASE.....	36
3.2.4.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	37
3.2.4.2 EFEITO DO pH.....	37
3.2.4.3 ESPECIFICIDADE.....	37
3.2.4.4 EFEITO DA VARIAÇÃO DO TEMPO.....	38
3.2.4.5 ESTEQUIOMETRIA.....	38
3.2.5 LACTALDEÍDO DESIDROGENASE.....	38
3.2.5.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	39
3.2.5.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO.....	39
3.2.5.3 COENZIMAS.....	40
3.2.5.4 EFEITO DO pH.....	40
3.2.5.5 ESPECIFICIDADE.....	40
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS DO METABOLISMO DA <u>L</u> -RHAMNOSE.....	41
3.3.1 IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA <u>L</u> - RHAMNOSE DESIDROGENASE.....	41
3.3.2 IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA <u>L</u> -RHAMNONATO DESIDRATASE.....	41
3.3.3 IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA 2-CETO-3-DESOXI- <u>L</u> -RHAMNONATO ALDOLASE.....	42

3.3.3.1	SENTIDO DA CLIVAGEM.....	42
3.3.3.2	SENTIDO DA SÍNTESE.....	43
3.3.4	IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE.....	43
3.4	ENZIMAS DO METABOLISMO DE <u>L</u> -RHAMNOSE EM <i>Pichia pseudopolymorpha</i> 1747 E NO MUTANTE PR1 DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	44
3.5	EFEITO DA FONTE DE CARBONO SOBRE OS NÍVEIS DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE <u>L</u> - RHAMNOSE EM <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568, MUTANTE PR1 E <i>Pichia pseudopolymorpha</i> 1747.....	45
3.5.1	<u>L</u> -RHAMNOSE DESIDROGENASE.....	45
3.5.2	<u>L</u> -RHAMNONATO DESIDRATASE.....	45
3.5.3	<u>L</u> -KDR ALDOLASE.....	46
3.5.4	LACTALDEÍDO DESIDROGENASE.....	46
3.6	EFEITO DA <u>L</u> -RHAMNOSE SOBRE A SÍNTESE DA <u>L</u> -RHAMNOSE DESIDROGENASE, <u>L</u> -RHAMNONATO DESIDRATASE E <u>L</u> -KDR ALDOLASE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568 E PR1 EM CRESCIMENTO..	47
3.6.1	CRESCIMENTO E UTILIZAÇÃO DE <u>L</u> -RHAMNOSE.....	47
3.6.2	<u>L</u> -RHAMNOSE DESIDROGENASE.....	47
3.6.3	<u>L</u> -RHAMNONATO DESIDRATASE.....	48
3.6.4	2-CETO-3-DESOXI- <u>L</u> -RHAMNONATO ALDOLASE.....	48
3.7	REPRESSÃO DA SÍNTESE DA <u>L</u> -RHAMNOSE DESIDROGENASE, <u>L</u> -RHAMNONATO DESIDRATASE E 2-CETO-3-DESOXI- <u>L</u> -RHAMNONATO ALDOLASE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568 E PR1 EM CRESCIMENTO POR <u>D</u> -GLUCOSE.....	49
3.7.1	CRESCIMENTO E UTILIZAÇÃO DE <u>D</u> -GLUCOSE E <u>L</u> - RHAMNOSE.....	49
3.7.2	<u>L</u> -RHAMNOSE DESIDROGENASE.....	49
3.7.3	<u>L</u> -RHAMNONATO DESIDRATASE.....	50
3.7.4	2-CETO-3-DESOXI- <u>L</u> -RHAMNONATO ALDOLASE.....	50
4	DISCUSSÃO.....	99
5	CONCLUSÃO.....	111
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

LISTA DE FIGURAS

1. CURVAS DE CRESCIMENTO DE *Pichia stipitis* (NRC 5568 E MUTANTE PR1) E *Pichia pseudopolymorpha* 1747 EM L-RHAMNOSE..... 51
2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NA ATIVIDADE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE DE *Pichia stipitis* NRC 5568..... 52
3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE DE *Pichia stipitis* NRC 5568..... 53
4. EFEITO DA VARIAÇÃO DE pH NA ATIVIDADE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE DE *Pichia stipitis* NRC 5568..... 54
5. EFEITO DO TEMPO NA ATIVIDADE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE DE *Pichia stipitis* NRC 5568..... 55
6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NA ATIVIDADE DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE DE *Pichia stipitis* NRC 5568..... 56
7. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE DE *Pichia stipitis* NRC 5568..... 57
8. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE DE *Pichia stipitis* NRC 5568..... 58
9. EFEITO DO TEMPO NA ATIVIDADE DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE DE *Pichia stipitis* NRC 5568..... 59
10. EFEITO DO ÍON MAGNÉSIO NA ATIVIDADE DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE DE *Pichia stipitis* NRC 5568..... 60

11.	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NA ATIVIDADE DA 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE DE <i>Pichia</i> <i>stipitis</i> NRC 5568.....	61
12.	EFEITO DA VARIAÇÃO DE pH NA ATIVIDADE DA 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE DE <i>Pichia</i> <i>stipitis</i>	62
13.	EFEITO DO TEMPO NA ATIVIDADE DA 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE DE <i>Pichia</i> <i>stipitis</i>	63
14.	REVERSIBILIDADE E EQUILÍBRIO DA REAÇÃO DA 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE DE <i>Pichia</i> <i>stipitis</i> NRC 5568.....	64
15.	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NA ATIVIDADE DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	65
16.	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	66
17.	EFEITO DA VARIAÇÃO DE pH NA ATIVIDADE DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	67
18.	ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO DERIVADO OBTIDO A PARTIR DO PRODUTO DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE.....	68
19.	ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO DERIVADO OBTIDO A PARTIR DO PRODUTO DA 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE..	69
20.	IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO CATALISADA PELA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE.....	70

21.	EFEITO DA L-RHAMNOSE SOBRE A SÍNTESE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568 EM CRESCIMENTO.....	71
22.	EFEITO DA L-RHAMNOSE SOBRE A SÍNTESE DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568 EM CRESCIMENTO.....	72
23.	EFEITO DA L-RHAMNOSE SOBRE A SÍNTESE DA 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568 EM CRESCIMENTO.....	73
24.	EFEITO DA L-RHAMNOSE SOBRE A SÍNTESE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> PR1 EM CRESCIMENTO.....	74
25.	EFEITO DA L-RHAMNOSE SOBRE A SÍNTESE DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> PR1 EM CRESCIMENTO.....	75
26.	EFEITO DA L-RHAMNOSE SOBRE A SÍNTESE DA 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> PR1 EM CRESCIMENTO.....	76
27.	REPRESSÃO DA SÍNTESE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE POR D-GLUCOSE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	77
28.	REPRESSÃO DA SÍNTESE DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE POR D-GLUCOSE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	78
29.	REPRESSÃO DA SÍNTESE DA 2-CETO - 3 - DESOXI -L-RHAMNONATO ALDOLASE POR D-GLUCOSE EM CÉLULAS DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	79

30. REPRESSÃO DA SÍNTESE DA $\underline{\underline{L}}$ - RHAMNOSE DESIDROGENASE
POR $\underline{\underline{D}}$ -GLUCOSE EM CÉLULAS DE *Pichia stipitis* PR1... 80

31. REPRESSÃO DA SÍNTESE DA $\underline{\underline{L}}$ -RHAMNONATO DESIDRATASE
POR $\underline{\underline{D}}$ -GLUCOSE EM CÉLULAS DE *Pichia stipitis* PR1... 81

32. REPRESSÃO DA SÍNTESE DA 2 - CETO - 3 - DESOXI- $\underline{\underline{L}}$ -
RHAMNONATO ALDOLASE POR $\underline{\underline{D}}$ -GLUCOSE EM CÉLULAS DE
Pichia stipitis PR1..... 82

LISTA DE TABELAS

I	ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS ENZIMAS DA VIA METABÓLICA DA $\underline{\text{L}}$ -RHAMNOSE EM <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	83
II	EFEITO DE DIFERENTES NUCLEOTÍDEOS PIRIDÍNICOS OXIDADOS E REDUZIDOS NA ATIVIDADE DA $\underline{\text{L}}$ -RHAMNOSE DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	84
III	EFEITO DE DIFERENTES SUBSTRATOS NA ATIVIDADE DA $\underline{\text{L}}$ -RHAMNOSE DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	85
IV	EFEITO DE DIFERENTES REAGENTES NA ATIVIDADE DA $\underline{\text{L}}$ -RHAMNOSE DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	86
V	EFEITO DE DIFERENTES ALDEÍDOS NA ATIVIDADE DA 2-CETO-3-DESOXI- $\underline{\text{L}}$ -RHAMNONATO ALDOLASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	87
VI	EFEITO DE DIFERENTES NUCLEOTÍDEOS OXIDADOS E REDUZIDOS NA ATIVIDADE DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	88
VII	EFEITO DE DIFERENTES ALDEÍDOS NA ATIVIDADE DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	89
VIII	VALOR DE Rf DO PRODUTO ENZIMÁTICO DA $\underline{\text{L}}$ -RHAMNOSE DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568.....	90
IX	DETERMINAÇÃO DO PRODUTO DA $\underline{\text{L}}$ -RHAMNONATO DESIDRATASE POR DIFERENTES MÉTODOS.....	91

X	VALORES DE Rf DOS PRODUTOS ENZIMÁTICOS DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE E 2-CETO-3-DESOXI- L-RHAMNONATO ALDOLASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568...	92
XI	VALORES DE Rf DO PRODUTO ENZIMÁTICO DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE.....	93
XII	ATIVIDADES DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE L-RHAMNOSE EM EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS DO MUTANTE PR1 DE <i>Pichia stipitis</i> E <i>Pichia pseudopolymorpha</i> 1747.....	94
XIII	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568, MUTANTE PR1 E <i>Pichia</i> <i>pseudopolymorpha</i> 1747.....	95
XIV	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568, MUTANTE PR1 E <i>Pichia</i> <i>pseudopolymorpha</i> 1747.....	96
XV	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA 2 - CETO - 3-DESOXI-L- L-RHAMNONATO ALDOLASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568, MUTANTE PR1 E <i>Pichia pseudopolymorpha</i> 1747	97
XVI	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE DE <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568, MUTANTE PR1 E <i>Pichia</i> <i>pseudopolymorpha</i> 1747.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

Atm	- Atmosfera
ATP	- Adenosina trifosfato
BSA	- Soro albumina bovina
°C	- Temperatura em graus Celsius
D.O.	- Densidade ótica
Dowex 1 - X8	- Resina aniônica
Dowex 50- X8	- Resina catiônica
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetracético
g	- Grama
g	- Força centrífuga
h	- Hora
<u>L</u> -KDA	- 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -arabonato
<u>L</u> -KDR	- 2-ceto-3-desoxi- <u>L</u> -rhamnonato
l	- Litro
LDH	- Desidrogenase láctica
M	- Molar
m	- mili
min	- Minuto
NAD ⁺	- β -nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	- β -nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	- β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	- β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
nm	- Nanômetro
PR1	- Mutante de <i>Pichia stipitis</i> NRC 5568 resistente à repressão por <u>D</u> -glucose
Rf	- Coeficiente de migração relativa
rpm	- Rotações por minuto
μ	- Micro
U. K.	- Unidades Klett
v/v	- Volume por volume

Resumo

O crescimento de *Pichia stipitis* estirpe NRC 5568 em meio contendo L-rhamnose como única fonte de carbono, induz a síntese das enzimas que degradam este desoxiaçúcar (6-desoxi-L-manose). L-Rhamnose é inicialmente oxidada por uma L-rhamnose desidrogenase NAD^+ - dependente. A L-rhamnono- δ -lactona é o produto imediato da reação e devido a sua instabilidade, é hidrolisada espontaneamente convertendo-se em L-rhamnonato, o produto final desta oxidação. O L-rhamnonato é, por sua vez, desidratado a 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato, pela rhamnonato desidratase. Este produto, o 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato, é clivado em piruvato e L-lactaldeído por ação da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase. Finalmente, devido uma lactaldeído desidrogenase NAD^+ - dependente, o lactaldeído é oxidado a lactato. Portanto a via de degradação da L-rhamnose é oxidativa direta, não envolvendo intermediários fosforilados. A existência das enzimas desta via oxidativa, foi também confirmada no mutante regulatório PR1 de *Pichia stipitis* NRC 5568 e em *Pichia pseudopolymorpha* 1747.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICRORGANISMO

O termo levedura se aplica a um grupo heterogêneo de microrganismos pertencentes ao Reino Fungi (48). Leveduras podem ser definidas como microrganismos unicelulares, com células hialinas e que com exceção dos gêneros *Sterigmatomyces* e *Schizosacharomyces*, se reproduzem por brotamento. Alguns gêneros podem se dividir por um processo que é intermediário entre brotamento e fissão, processo este chamado de "brotamento-fissão" (48).

As leveduras são conhecidas pelo homem desde épocas pré-históricas. Duas das mais antigas indústrias, de panificação e cervejeira, são baseadas no uso de leveduras como agentes fermentativos (62). O termo inglês "yeast", para levedura, é derivado da palavra teuta "gist", que significa espumar, fato este observado na infusão de cereais quando eram convertidos em bebidas alcólicas pelo processo fermentativo (49). Esta capacidade fermentativa é uma característica que pode ou não estar presente, de acordo com a espécie de levedura (48). Quando presente, uma variedade de carboidratos serve como substrato para este processo, sendo os mais utilizados a glucose, galactose, sacarose, maltose, lactose e, ocasionalmente a rafinose, melibiose e inulina (48).

Em 1967, Pignat descreveu uma nova espécie de levedura, do gênero *Pichia*, isolada de besouro que vive em madeira em

decomposição. Esta espécie foi denominada *Pichia stipitis*, sendo que a cepa CBS 5773 foi designada a padrão para a espécie (43).

Pichia stipitis pertence à família Saccharomycetaceae, apresenta gemulação, forma pseudomicélio com 2 esporos por asco e a assimilação de carboidratos pode ser tanto oxidativa como fermentativa. Entre outras, utiliza como fonte de carbono a D-glucose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose, sacarose, maltose, lactose e glicerol. A D-glucose, D-galactose e a maltose são os substratos de maior eficiência para o processo fermentativo (48).

Atualmente, tanto a *Candida shehatae*, levedura pertencente à família Criptococaceae, como a *Pichia stipitis*, têm sido alvos de vários trabalhos de fermentação da D-xilose de materiais lignocelulósicos (61). Estas duas espécies, quando empregadas isoladamente para este processo, fermentam D-xilose de forma mais rápida, com maior produção de etanol e menor taxa de formação de xilitol que outros organismos comumente empregados. Esta eficiência está relacionada positivamente com fatores nutricionais, temperatura, pH, concentração de substrato e de produto, suprimento de oxigênio e negativamente com fatores tóxicos presentes nos hidrolisados de hemicelulose e a ocorrência de outros açúcares (20, 29, 33, 35, 58, 59, 60, 61, 67, 80, 87).

Devido a similaridades fisiológicas e morfológicas e o fato de que muitas cepas terem sido isoladas das mesmas fontes naturais, Kreger van Rij propôs que *Candida shehatae*

seria na verdade uma forma imperfeita de *Pichia stipitis* (43). Entretanto, pesquisas recentes indicam que estas leveduras são pouco relacionadas. Diferenças foram encontradas nos padrões eletroforéticos de polipeptídeos de *Candida shehatae* ATCC 22984 e *Pichia stipitis* CBS 5776, bem como no DNA nuclear, indicando que estas duas leveduras são espécies distintas (44, 61). Apesar destas evidências, foi possível a obtenção de híbridos estáveis, através da técnica de fusão de protoplastos, entre *Pichia stipitis* CBS 7126 e *Candida shehatae* CBS 2779 ou CSIR Y981. Muitas cepas híbridas resultantes apresentaram um potencial fermentativo maior para D-xilose e L-manose do que as cepas parentais (33).

Outra característica diferencial significativa, é o fato de que *Pichia stipitis* é capaz de assimilar L-rhamnose como fonte de carbono, enquanto que a *Candida shehatae* é incapaz de utilizar este desoxiaçúcar (61).

1.2 METABOLISMO DE L-RHAMNOSE

Dentre as desoxihexoses, a L-rhamnose (6-desoxi-L-manose) e a L-fucose (6-desoxi-L-galactose), são as mais estudadas e de maior importância bioquímica. A rhamnose na sua configuração L é a mais amplamente distribuída na natureza, não sendo encontrada em tecidos animais. A L-fucose é encontrada em substâncias de grupos sanguíneos. Ambas, L-rhamnose e L-fucose, podem ser utilizadas como única fonte de carbono e energia por

diversos microrganismos (32, 65).

L-Rhamnose foi inicialmente isolada de quercitrina, podendo ser encontrada sob a forma livre na natureza, em glicosídeos (quercitrina), nucleotídeos açúcares (57), em lipopolissacarídeos de origem bacteriana (36), em polissacarídeos sob a forma de gomas e mucilagens de plantas (18, 36, 42, 88) e saponinas (36). A quercitrina é encontrada em produtos comerciais como pó de quercitron, extrato de quercitron, flavina e flavina limão, que são usados na indústrias de corantes. Da flavina limão pode se extrair a L-rhamnose pura (88).

Além de ser objeto de trabalhos sobre o metabolismo de microrganismos (11, 12, 22, 24, 25, 65, 68, 74, 75, 76) e de análises cristalográficas (5), a L-rhamnose também tem despertado interesse para estudos nas áreas imunológica (9, 79) e odontológica (83).

Os primeiros trabalhos de metabolismo de L-rhamnose, foram realizados com mutantes da bactéria *Pasteurella pestis*, por Englesberg em 1957 (24, 25). Num primeiro trabalho, a partir da cepa selvagem que não utilizava L-rhamnose, Englesberg obteve mutantes Rha⁺, capazes de metabolizar L-rhamnose, e isolou pequenas quantidades de L-lactaldeído, como produto final de degradação (24). Em um segundo trabalho, Englesberg determinou a presença de duas enzimas, a L-rhamnose isomerase e a L-rhamnulose quinase, em extrato livre de células do mutante Rha⁺, quando crescido em meio contendo apenas L-rhamnose como fonte de carbono. Foi determinado que a L-rhamnose isomerase convertia a

L-rhamnose em um ceto-açúcar, a L-rhamnulose, e a L-rhamnulose quinase fosforilava a L-rhamnulose a L-rhamnulose 1-P (25).

Em pesquisa realizada por Wilson & Ajl em 1957 (85, 86), também ficou demonstrado que o passo inicial no metabolismo de L-rhamnose em *Escherichia coli* B, é a conversão da L-rhamnose para a L-rhamnulose, pela L-rhamnose isomerase (85).

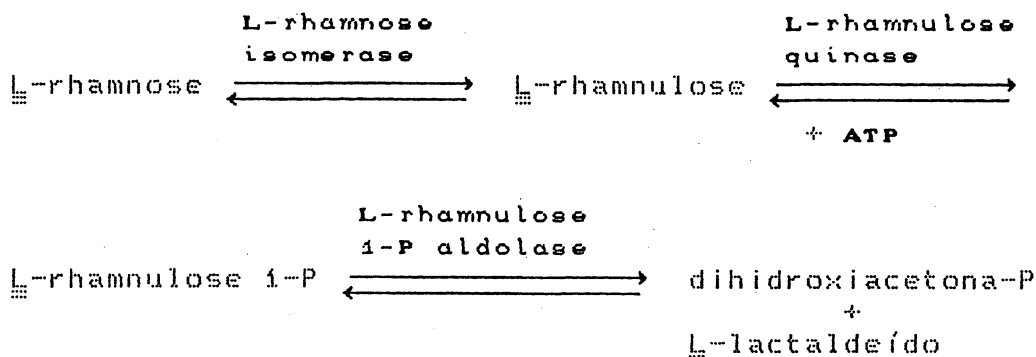
A primeira evidência de uma enzima que fosforilava a L-rhamnulose a L-rhamnulose 1-P, em extratos de células de *Escherichia coli* B, foi obtida por Wilson & Ajl (86) e Takagi & Sawada (74). Em 1964, realizando trabalhos paralelos, Takagi & Sawada (75) e Chiu & Feingold (11), purificaram a L-rhamnulose quinase, enzima responsável por esta fosforilação.

A enzima seguinte da via, L-rhamnulose 1-P aldolase, que catalisa a clivagem de L-rhamnulose 1-P a L-lactaldeído e dihidroxiacetona fosfato, foi estudada por Sawada & Takagi (68) e Chiu & Feingold (12) em *Escherichia coli* B e por Domagk & Heinrich (22) em células de *Lactobacillus plantarum*.

Em 1976, Levinson & Krulwich, estudaram o metabolismo de L-rhamnose em *Arthrobacter piridinolis* (46)., Esta bactéria apresenta uma L-rhamnose isomerase e uma L-rhamnulose quinase induzidas e uma L-rhamnulose 1-P aldolase constitutiva. Resultados com mutantes, que não metabolizavam L-rhamnose, sugeriram a presença de uma L-rhamnulose 1-P fosfatase, a qual formaria L-rhamnose livre

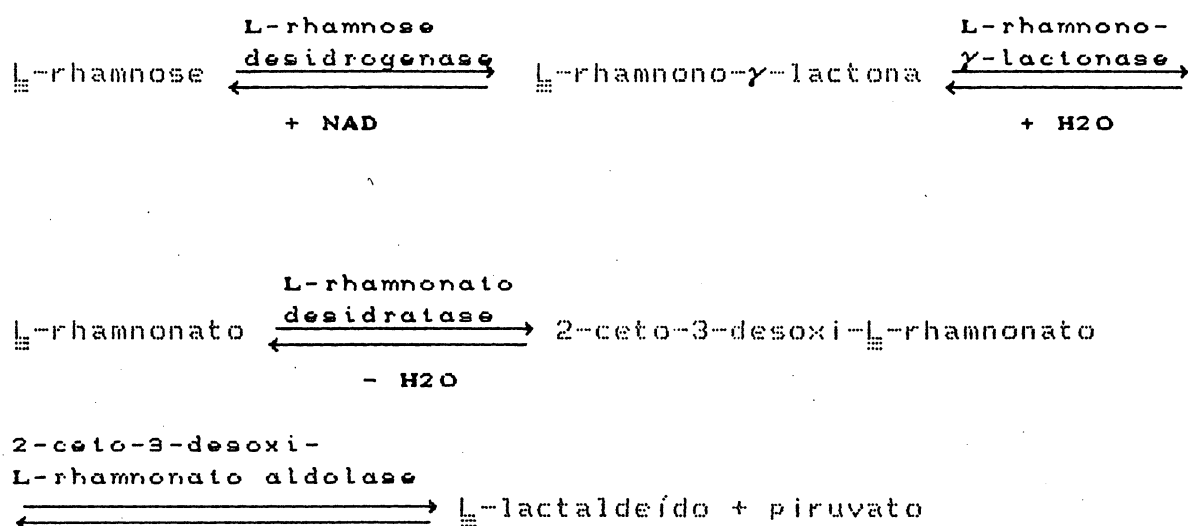
pela hidrólise de L-rhamnulose 1-P.

A via de degradação fosforilativa de L-rhamnose em bactérias, envolve, portanto, as seguintes reações:



A primeira evidência da existência de uma via oxidativa de degradação da L-rhamnose foi obtida por Veiga et al em 1974 (81). Neste trabalho, foi detectada a atividade de uma L-rhamnose desidrogenase induzível no fungo leveduriforme *Pullularia pullulans*, cultivado em meio contendo L-rhamnose como fonte única de carbono. Esta enzima, NAD^+ dependente catalizava a oxidação da L-rhamnose à L-rhamnono- γ -lactona. Devido a ausência de atividade de L-rhamnose isomerase ou L-rhamnulose quinase, os autores propuseram que a L-rhamnose seria degradada neste fungo, através de uma via oxidativa envolvendo intermediários não fosforilados. Estudos da indução da síntese da L-rhamnose desidrogenase em *Pullularia pullulans*, bem como estudos da repressão catabólica causado por D-glucose e D-galactose foram realizadas por Vieira et al em 1979 (82). As etapas preliminares da degradação oxidativa da L-rhamnose em *Pullularia pullulans*, foram confirmadas por Rigo et al em 1985 (65). Estas etapas consistem na oxidação da L-rhamnose à L-rhamnono- γ -lactona

pela L-rhamnose desidrogenase, a qual é hidrolisada pela L-rhamnono- γ -lactona ao L-rhamnonato, que é desidratado ao ácido 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnônico pela L-rhamnonato desidratase e finalmente sofrendo ação da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase é clivado a piruvato e L-lactaldeído:

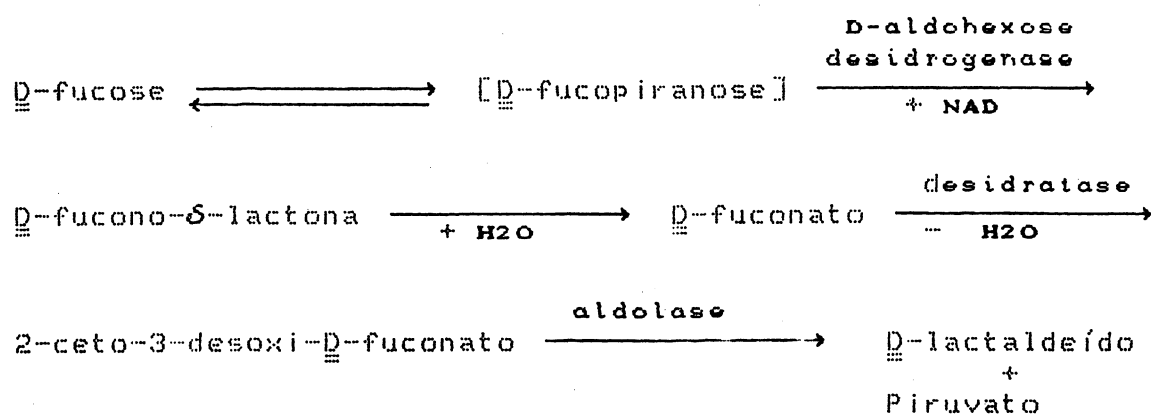


Em estudos feitos com *Escherichia coli* (27, 28, 37, 40), ficou demonstrado que a L-fucose, assim como a L-rhamnose, é degradada através de uma via fosforilativa, neste organismo. Nesta via, a L-fucose é isomerizada a L-fuculose, fosforilada a L-fuculose 1-P e clivada em dihidroxiacetona 1-P e L-lactaldeído.

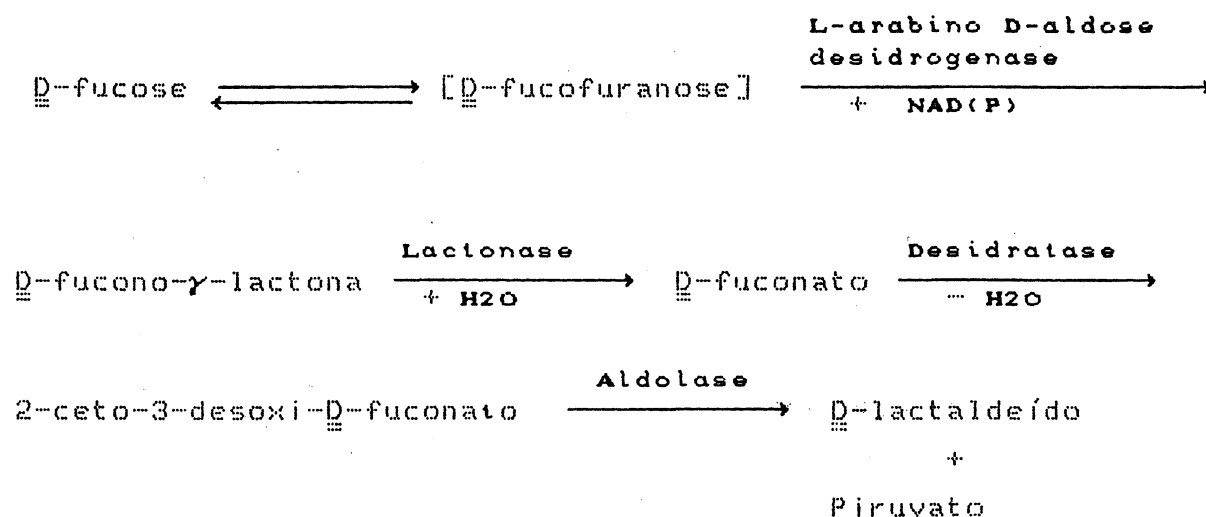
Em 1961, Eagon (23) realizou um estudo comparativo entre 18 espécies bacterianas capazes de metabolizar L-desoxi açúcares (L-fucose e/ou L-rhamnose). A maioria das espécies bacterianas foram capazes de utilizar estas metilpentoses, com uma isomerização destas para as cetose correspondentes seguido de uma fosforilação. A ausência de atividade de isomerase e de quinase, levou a sugestão de uma

segunda via de utilização destes desoxiaçúcares em *Sarcina lutea*, *Gafkia tetragena*, *Bacillus megaterium* e *Rhizobium leguminosarum*, entre estas bactérias das 18 estudadas.

Em 1972, Dahms & Anderson (14-17) descreveram uma via de degradação oxidativa direta de D-fucose em uma *pseudomona* de solo. Nessa via não fosforilativa foram evidenciadas a ação de duas desidrogenases: uma D-aldose desidrogenase NAD^+ dependente, específica para D-aldose que catalisa a oxidação às δ -lactonas correspondentes e uma L-arabino D-aldose desidrogenase $\text{NAD}^+(\text{P})$ dependente, que catalisa a oxidação de aldoses que apresentam a mesma configuração da L-arabinose formando γ -lactonas. Ambos os produtos das desidrogenases são hidrolisados ao ácido hexônico correspondente, por ação de lactonase, em se tratando de γ -lactona ou espontaneamente, no caso da δ -lactona. O ácido hexônico formado é desidratado enzimaticamente e o produto, 2-ceto-3-desoxi-D-fuconato, é clivado por ação de uma 2-ceto-3-desoxi-D-fuconato aldolase, resultando na formação de piruvato e D-lactaldeído:



Ou:



Em 1973, Guimarães & Veiga (30) estudando o metabolismo de L-fucose no fungo *Pullularia pullulans*, determinaram a atividade da enzima $\text{L-fucose desidrogenase}$, que oxida a L-fucose à $\text{L-fucono-}\delta\text{-lactona}$, que devido a sua instabilidade sofre hidrólise espontânea, originando o ácido correspondente. Esta observação indicou a ocorrência de uma via oxidativa da L-fucose em fungo, semelhante a já descrita em *pseudomonas* para D-fucose . A caracterização desta via foi realizada por Guimarães (32), em 1990. As etapas desta degradação consistem na oxidação da L-fucose à $\text{L-fucono-}\delta\text{-lactona}$, a qual é hidrolisada ao L-fuconato , que é desidratado ao ácido 2-ceto-3-desoxi- L-fucônico e finalmente clivado em piruvato e L-lactaldeído .

Em células de *Escherichia coli* crescidas aerobicamente, o L-lactaldeído representa um dos produtos finais da degradação de L-rhamnose como de L-fucose (2). Para entrar no metabolismo geral, L-lactaldeído sofre uma oxidação enzimática, sendo convertido a L-lactato . A enzima

responsável por esta conversão é a lactaldeído desidrogenase, que foi primeiramente purificada e parcialmente caracterizada por Shiridhara & Wu, em 1969 (71). O gene estrutural responsável pela expressão desta enzima foi mapeado, localizando-se a 31 min do cromossomo de *Escherichia coli*, bem como o gene regulador ligado a este gene estrutural (2).

Estudos iniciais realizados em nossos laboratórios (78) demonstraram que a levedura *Pichia stipitis*, cresce em L-rhamnose como única fonte de carbono. Nos extratos livre de células desta levedura, crescidas em L-rhamnose, foi evidenciada a presença de uma enzima, L-rhamnose desidrogenase NAD^+ dependente, provavelmente a primeira enzima de uma via oxidativa.

1.3 OBJETIVOS DO TRABALHO

O presente trabalho teve por objetivo, determinar a via metabólica da L-rhamnose em *Pichia stipitis*, através da determinação de atividades enzimáticas usando substratos adequados e identificação dos intermediários metabólitos produzidos no processo. A indução da síntese das enzimas da via também foi analisada em um mutante regulatório de *Pichia stipitis* NRC 5568, assim como em *Pichia pseudopolymorpha* 1747.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

A cepa de *Pichia stipitis* NRC 5568 utilizada neste trabalho, foi gentilmente cedida pelo Dr. José Domingos Fontana do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. O mutante PR1, derivado da cepa de *Pichia stipitis* NRC 5568, resistente à repressão por D-glucose e capaz de utilizar 2-desoxi-D-glucose, foi obtido e cedido por Eneida Haman Pardo (56). A cepa de *Pichia pseudopolymorpha* 1747 foi gentilmente cedida pelo professor Wlandemir de Albuquerque Cavalcante do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

2.2 MEIOS DE CULTURA

Pichia stipitis foi crescida em meio líquido de Olson & Johnson (55) modificado por Gancedo (26), sendo que a L-asparagina proposta foi substituída por casaminoácidos neste trabalho, ficando com a seguinte composição em g. l⁻¹:

KH ₂ PO ₄	6
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
(NH ₄)NO ₃	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
NaCl	0,25
Oligoelementos:	

ZnSO ₄	1.8×10^{-3}
Fe(NH ₄)SO ₄ · 6H ₂ O	1×10^{-3}
CuSO ₄	1×10^{-4}
Biotina	2×10^{-5}
Inositol	10×10^{-2}
Tiamina	4×10^{-6}
Piridoxina	1×10^{-3}
Casaminoácidos	5×10^{-2}

O pH final do meio de cultura, sem oligoelementos e casaminoácidos, foi ajustado para 5,5 com NaOH 2 M em potenciômetro Micronal B 375. O meio foi esterilizado por autoclavação a 1 atm (121°C) durante 20 min. As soluções de oligoelementos foram esterilizados por filtração em filtro Millipore HAWP (0.45 μ). As soluções dos açúcares, utilizados como fonte de carbono, L-rhamnose 20 %, D-glucose 20 %, D-galactose 20 %, glicerol 50 % ou lactato 50 %, foram esterilizados por autoclavação em vapor fluente durante 30 min e adicionados assepticamente ao meio na concentração final de 0,2 % no caso de L-rhamnose, D-glucose ou D-galactose ou 0,4 % no caso de glicerol ou lactato.

O meio de cultura sólido empregado para a manutenção das cepas foi YEPD (70) com a seguinte composição:

Extrato de levedura	1 %
Peptona	2 %
Glucose	2 %
Agar	1,5 %

O meio foi esterilizado por autoclavação a 1 atm (121°C) e, em seguida, alíquotas de 15 ml foram distribuídas

em tubos estéreis. Estes foram inclinados e após a solidificação foram utilizados para crescimento e manutenção das diferentes estirpes de leveduras.

2.3 ENZIMAS

Lactato desidrogenase tipo II de músculo de coelho, D-glucose-oxidase tipo II de *Aspergillus niger*, peroxidase "horseradish" e piruvato quinase foram obtidas Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

2.4 REAGENTES QUÍMICOS

Os cofatores NAD^+ , NADH, NADP^+ e NADPH, ácido-2-tiobarbitúrico, etileno diamino tetracetato (EDTA), soroalbumina bovina cristalina, L-rhamnose, glicolaldeído, metilglioxal e piruvato de sódio foram fornecidos pela Sigma Company, St. Louis, Missouri, U.S.A. Tris (hidroximetil) aminometano, cisteína, formaldeído, semicarbazida e ortofenilenodiamina foram obtidos da E. Merck, Darmstadt, Germany. Casaminoácidos foram provenientes da DIFCO. Os demais reagentes apresentavam grau de pureza pró-análise.

2.5 CONSERVAÇÃO DAS CULTURAS

A estirpe selvagem de *Pichia stipitis* NRC 5568 a

estirpe mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* estirpe 1747, foram estocadas em glicerol 50 % a -20°C onde permaneceram viáveis por 2 anos. As cepas também foram estocadas no meio sólido à temperatura de 4°C , onde permaneceram viáveis por pelo menos 1 ano. Culturas em meio líquido, mantidas em temperatura ambiente, permaneciam viáveis até 7 dias.

2.6 PREPARO DO INÓCULO

Células de *Pichia stipitis* cultivadas em meio sólido, foram transferidas com alça de platina para o meio líquido (50 ml) contendo glicerol 0,4 %, contidos em frascos Erlenmeyer 250 ml. O crescimento foi feito a 28°C sob agitação contínua de 120 r.p.m. durante 24 horas ou até que a cultura atingisse a fase exponencial de crescimento (400 U.K.).

2.7 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE GERAÇÃO

Pichia stipitis NRC 5568, a estirpe mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* foram crescidas em meio líquido suplementado com glicerol 0,4 % e inoculadas em 50 ml de meio líquido suplementado com L-rhamnose 0,2 % contidos em frascos Erlenmeyer (250 ml) adaptados lateralmente com tubo fotocolorimétrico. O crescimento foi acompanhada pelo aumento da turbidez do meio, determinado em fotocolorímetro Klett-Summerson com filtro verde nº 54 (500-570 nm), em

intervalos de tempo de 1 hora. O tempo de duplicação (t_d) foi determinado pela equação (52):

$$t_d = 0.3 \times (t_2 - t_1) / (\log N_2 - \log N_1)$$

onde N_2 e N_1 correspondem ao número de células presentes nos tempos t_2 e t_1 , respectivamente. N_2 e N_1 foram substituídos por suas respectivas Unidades Klett (U.K.).

2.8 CULTIVO EM LARGA ESCALA

Para a obtenção de massa celular a ser empregada no preparo do extrato livre de células, as leveduras foram crescidas em frascos Erlenmeyer de 2 litros contendo 500 ml de meio líquido, complementado com a fonte de carbono adequada a cada experimento, com a concentração final de 0,2 % no caso de L-rhamnose, D-glucose ou D-galactose e 0,4 % para glicerol ou lactato. Nos experimentos de repressão da síntese enzimática, o cultivo foi realizado com a adição simultânea de L-rhamnose 0,2 % e D-glucose 0,2 %. Após a adição do inóculo (2 % v/v) crescido em glicerol, as culturas foram incubadas num agitador rotativo a 120 r.p.m. à temperatura de 28°C por 22 horas ou até que a densidade de células atingisse uma leitura de 320 Unidades Klett (U.K.). As células foram coletadas por centrifugação a 2800 x g por 15 min, a 4°C, em centrífuga Beckman J-21 B. As células coletadas foram lavadas duas vezes com KCl 0,154 M. O rendimento em peso úmido foi de 3 g/l. As células foram conservadas a -15°C até sua utilização.

2.9 PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

Células congeladas de *Pichia stipitis* (1 g) foram trituradas, por 10 min, em gral, com 2 g de "glass beads" (tipo 909.5005 Minnesota Mining Mineral Corp.) em 2 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 contendo EDTA 1 mM e centrifugadas a 15.200 x g por 15 min, em centrífuga Spin I (Incibrás). O sobrenadante foi empregado como fonte de enzimas. Todas as operações foram realizadas à temperatura entre 0°C - 4°C.

2.10 TRATAMENTO COM SULFATO DE PROTAMINA

A etapa de purificação parcial do extrato livre de células, foi realizado com a adição de sulfato de protamina na concentração final de 0,08 % em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 com EDTA 1 mM. Após esta adição, a mistura foi agitada e centrifugada por 3 min em centrífuga Spin I (Incibrás) a 15200 x g e o sobrenadante usado para a identificação das enzimas da via e isolamento dos respectivos produtos. Todas as operações foram realizadas à temperatura entre 0°C - 4°C.

2.11 SÍNTESES DOS INTERMEDIÁRIOS

Os intermediários potenciais da via de oxidação da L-rhamnose por *Pichia stipitis* foram sintetizados química ou bioquimicamente:

2.11.1 SÍNTESE QUÍMICA DO ÁCIDO L-RHAMNÔNICO

O ácido L-rhamnônico foi preparado pelo método de Moore & Link (53) : A 8 ml de uma solução de L-rhamnose a 50 % foram adicionados 50 ml de metanol absoluto e misturados a 160 ml de solução metanólica de iodo a 7,12 %. A mistura foi aquecida a 40°C e em seguida 230 ml de KOH 4 % em metanol absoluto, foram adicionados gota a gota, durante 20 minutos, sob agitação constante. A solução foi concentrada sob pressão reduzida, solubilizada em 25 ml de H₂O e o pH ajustado para 7,0 com ácido fórmico concentrado. Os cátions desta solução foram removidos passando por uma coluna (2 x 36 cm) de Dowex 50 W (200-400 mesh) forma H⁺. A coluna foi eluída com 500 ml de água destilada e o ácido rhamnônico foi detectado como L-rhamnono-lactona no eluato, pelo método de Hestrin (38). As frações contendo L-rhamnono-lactona foram concentradas sob pressão reduzida até o volume de 10 ml e passadas por uma coluna aniônica (2,3 x 36,5 cm) de Bio-Rad-AG 1 x-8 (100-200 mesh) forma formiato, para eliminar compostos neutros e cátions. A coluna foi lavada primeiro com 300 ml de H₂O, depois com 300 ml de ácido fórmico 0,25 M. As frações eluídas com ácido fórmico, contendo L-rhamnono-lactona foram concentradas sob pressão reduzida, até xarope. Este xarope foi solubilizado em H₂O e concentrado sob pressão reduzida várias vezes, até que não se notasse mais a presença de ácido fórmico. O material foi então concentrado até a secura e adicionado 2 ml de metanol e 20 ml de éter de petróleo, para

cristalização da L-rhamnono-lactona. Os cristais de L-rhamnono-lactona foram removidos por filtração e secos em estufa a 37°C. O rendimento foi de 1,0 g.

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

2.11.2 SÍNTESE QUÍMICA DE D E L-LACTALDEÍDO

O L-lactaldeído foi sintetizado pela desaminação oxidativa de D-treonina conforme o método de Huff & Rudney (41): à uma solução de 5,0 g de D-treonina dissolvida em 500 ml de água destilada, foram adicionados 7,0 g de ninhidrina e incubada a 95°C por 5 minutos. A solução foi resfriada à temperatura ambiente, e adicionada de 9,83 g de bicarbonato de sódio. O precipitado floculento marrom formado foi removido por centrifugação e o sobrenadante tratado com 25,27 g de carvão ativado para remover a ninhidrina remanescente e produtos coloridos formados durante a síntese. A suspensão foi filtrada em papel Whatman nº 1 e o filtrado contendo L-lactaldeído foi passado através de uma coluna de Dowex 50 W (200-400 mesh) forma H⁺ (2,5 x 27 cm) para remover os íons sódio e o excesso de D-treonina. O eluato foi concentrado sob pressão reduzida, ajustado a pH 7,0 com NaOH 0,1 N e usado para as reações da aldolase no sentido da síntese. D-lactaldeído foi preparado da mesma maneira que L-lactaldeído a partir de L-treonina. D e

L-lactaldeídos foram demonstrados ser cromatograficamente puros. Piruvaldeído, acetaldeído e formaldeído foram obtidos comercialmente.

2.11.3 SÍNTESE BIOLÓGICA DO ÁCIDO RHAMNÔNICO: ISOLAMENTO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE

O produto da reação da L-rhamnose desidrogenase foi preparado incubando-se em 173 μ moles de tampão carbonato bicarbonato pH 9,5, com 20 μ moles de L-rhamnose, 5 μ moles de NAD^+ , 300 μ g de proteína da fração de sulfato de protamina em um volume total de 5 ml. Após a incubação de 24 horas a 30°C, a reação foi interrompida pela a adição de Dowex 50 W (200-400 mesh) forma H^+ . A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 15200 $\times$ g em centrífuga Spin I (Incibrás). O sobrenadante foi liofilizado, o resíduo seco foi solubilizado em 1,0 ml de H_2O e identificado cromatograficamente como L-rhamnonato. O rendimento obtido foi de 10 μ moles de formação de L-rhamnonato a partir dos 20 μ moles de L-rhamnose.

2.11.4 SÍNTESE BIOLÓGICA DO 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO

O 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato foi sintetizado por dois métodos diferentes, pela ação da L-rhamnonato desidratase sobre o L-rhamnonato e pela ação da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase sobre o L-lactaldeído e piruvato (sentido da síntese).

2.11.4.1 ISOLAMENTO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA L-RHAMNONATO DESIDRATASE

O produto da reação da L-rhamnonato desidratase foi preparado incubando-se em 100 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 100 μ moles de L-rhamnonato com 100 μ moles de $MgSO_4$ e 10 mg de proteína da fração de sulfato de protamina num volume total de 10 ml. Após 5 horas, a reação foi interrompida pela adição de 2 volumes de etanol e centrifugada. O sobrenadante foi passado por uma coluna (2 x 35,5 cm) forma H^+ , Dowex 50 W (200-400 mesh), o material isento de cátions foi eluído da coluna com 400 ml de água deionizada. O eluato foi concentrado e aplicado em uma coluna (2 x 37,5) de Dowex 1 - x 8 - 400 forma formiato (200-400 mesh). O produto foi eluído com um gradiente linear de ácido fórmico de 0 a 1 N (1000 ml). As frações identificadas contendo L-KDR (entre 0,9 e 1 N de ácido fórmico) foram reunidas e concentradas até a secura para remover o ácido fórmico. O sólido amorfo foi solubilizado em 5 ml de H_2O e submetido a processos cromatográficos e químicos de identificação.

2.11.4.2 ISOLAMENTO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE (SENTIDO DA SÍNTESE)

O sistema de incubação empregado continha 80 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 30 μ moles de piruvato de sódio, 50 μ moles de L-lactaldeído, 3 mg de proteína da fração de

sulfato de protamina num volume total de 2 ml. A mistura foi incubada a 30°C por 5 horas. A reação foi interrompida pela adição de 2 volumes de etanol e centrifugada. A purificação do produto da aldolase no sentido da síntese foi realizado da mesma maneira que para o produto obtido da reação da L-rhamnonato desidratase. O produto foi submetido a métodos cromatográficos e químicos de identificação.

2.11.5 SÍNTESE BIOLÓGICA DE L-LACTATO: ISOLAMENTO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE

O produto da reação da lactaldeído desidrogenase foi preparado incubando-se em 500 μ moles de tampão glicina pH 9,0, 5 μ moles de L-lactaldeído com 10 μ moles de NAD^+ e 900 μ g de proteína da fração de sulfato de protamina em um volume total de 5 ml. Após a incubação de 6 horas a 25°C, a reação foi interrompida com a adição de Dowex 50 W (200-400 mesh) forma H^+ . A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 15 200 $\times g$ e o sobrenadante liofilizado. O resíduo seco foi solubilizado em 1 ml de H_2O e submetido a métodos químicos e cromatográficos de identificação.

2.12 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

2.12.1 DETERMINAÇÃO DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE

Para a medida da atividade desta desidrogenase NAD^+ dependente, o sistema de incubação (1,0 ml) continha: 35

μ moles de tampão carbonato bicarbonato, pH 9,5, 2 μ moles de L-rhamnose, 1 μ mol de NAD^+ , e enzima em quantidade apropriada. A redução de NAD^+ foi acompanhada em 340 nm em espectrofotômetro Varian Techtron, modelo 635-D, a 25°C. Foram feitos controles em que se omitiu a L-rhamnose

Uma unidade de enzima (U), foi definida como a quantidade de enzima capaz de reduzir 1 μ mol de NAD^+ por minuto. A atividade específica foi expressa em unidades de enzima por miligrama de proteína.

2.12.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACTONASE

A atividade da lactonase foi determinada no seguinte sistema de incubação (0,4 ml): 25 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 5 μ moles de L-rhamnono-lactona e enzima em quantidade apropriada. Tubos contendo o sistema de reação foram incubados a 30°C. A cada intervalo de tempo de 15 minutos, durante 1 hora, um dos sistemas de incubação foi interrompido pela adição de 2,0 ml de hidroxilamina-NaOH, que reage com a lactona residual e a cor foi desenvolvida com HCl-FeCl_3 (38). Os controles para a hidrólise não enzimática continham enzima desnaturada pelo calor.

A absorbância do hidroxamato (cromógeno) formado foi medida a 540 nm em fotocolorímetro Bausch & Lomb. Como padrão foi utilizado a L-rhamnono- γ -lactona sintetizada quimicamente.

Uma unidade de enzima (U), foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de lactona

por minuto. A atividade específica foi expressa em unidades de enzima por miligrama de proteína.

2.12.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA L - RHAMNONATO DESIDRATASE

Na determinação da atividade da L-rhamnonato desidratase foi usado o seguinte sistema de incubação (1,0 ml): 40 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 10 μ moles de sulfato de magnésio, 5 μ moles de L-rhamnonato de sódio e enzima em quantidade apropriada. A mistura foi incubada por 1 hora, a 30°C e interrompida a 100°C por 3 minutos. Alíquotas de 0,2 ml foram submetidas ao teste de Weissbach & Hurwitz (84) para compostos 2-ceto- 3-desoxi. O método consiste na adição de 0,25 ml de HIO_4 0,025 N em H_2SO_4 0,125 N. Depois de 20 minutos à temperatura ambiente, 0,5 ml de arsenito de sódio 2% em HCl 0,5 N foi adicionado com agitação. Após 2 minutos, 2,0 ml de ácido 2-tiobarbitúrico (pH 2,0) foram adicionados e após agitação, a mistura foi aquecida a 100°C por 10 minutos. A cor desenvolvida foi medida a 548 nm em espectrofotômetro Varian. Foram feitos controles em que se omitiu o L-rhamnonato ou com a enzima desnaturada.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de formar 1 μ mol de L-KDR por hora. A atividade específica foi expressa em unidades de enzima por miligrama de proteína. Para o cálculo da concentração do L-KDR formado, foi empregado um valor de

coeficiente de extinção molar igual a 20 000 (64) a 548 nm, seguindo o método de Weissbach & Hurwitz (84).

2.12.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE NO SENTIDO DA SÍNTESE

A atividade desta aldolase foi determinada no sentido da síntese como descrito por Rigo et al (64). O sistema de incubação (0,5 ml) continha: 12 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 4 μ moles de L-lactaldeído, 5 μ moles de piruvato e enzima em quantidade apropriada. A mistura foi incubada por 1 hora a 30°C. A reação foi interrompida por aquecimento a 100°C por 3 minutos. Alíquotas de 0,2 ml coletadas no período foram utilizadas na determinação do 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato (L-KDR) formado (84).

Controles onde se omitiu cada um dos substratos ou ambos substrato ou continha enzima desnaturada pelo calor, foram realizados para demonstrar a necessidade dos três componentes para a síntese do L-KDR.

Uma unidade enzima (U), foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 μ mol de L-KDR por hora. A atividade específica foi expressa em unidades de enzima por miligrama de proteína. A concentração do L-KDR foi determinada como no item anterior (2.12.3).

2.12.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE

A atividade da lactaldeído desidrogenase foi determinada seguindo a velocidade de redução de NAD^+ a 340 nm em espectrofotômetro Varian, a 25°C. O sistema de incubação continha (1,0 ml): 100 μmoles de tampão glicina pH 9,0, 2,5 μmoles de NAD^+ , 1 μmol de L-lactaldeído e enzima em quantidade apropriada. Foram feitos controles em que se omitiu o L-lactaldeído.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de reduzir 1 μmol de NAD^+ por minuto. A atividade específica foi expressa em unidades de enzima por miligrama de proteína.

2.12.6 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DA L-RHAMNOSE ISOMERASE E L-RHAMNULOSE QUINASE

As atividades da isomerase e da quinase foram verificadas em extratos livre de células, segundo os métodos de determinação descritos por Takagi & Sawada (74, 75).

2.13 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.13.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO NADH

A concentração de NADH foi determinada a 340 nm no espectrofotômetro Varian Tehtron, modelo 635-D, a 25°C, utilizando um coeficiente de extinção molar de $6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (39).

2.13.2 DETERMINAÇÃO DE LACTONAS

A concentração de lactonas foi determinada pelo método de Hestrin (38). L-Rhamnono-lactona como descrito em 2.11.1 foi empregada como padrão. A absorbância do produto colorido formado, foi determinado a 540 nm em espectrofotômetro, imediatamente após a reação. Os ácidos aldônicos foram determinados como lactonas pelo mesmo método, após lactonização por fervura em HCl 0,1 M por 5 minutos (14).

2.13.3 DETERMINAÇÃO DE L-RHAMNOSE

A concentração de L-rhamnose foi determinada quimicamente pelos métodos de Dische & Shettles (21) ou enzimaticamente em um método espectrofotométrico usando a L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis*. O sistema continha amostra com 5 até 30 μg de L-rhamnose em 35 μmoles de tampão carbonato bicarbonato com 2 μmoles de NAD^+ e 180

mg de proteína. A redução do NAD^+ foi acompanhada como descrito no item 2.13.1 .

2.13.4 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogyi (69) & Nelson (54), usando D-glucose como padrão.

A D-glucose foi alternativamente determinada pela glucose oxidase acoplada à peroxidase e O-anisidina em tampão Tris-HCl 25mM pH 8,0 (13). A medida da absorbância foi feita a 420 nm em espectrofotômetro Bausch & Lomb, sendo usada α -D-glucose como padrão.

2.13.5 DETERMINAÇÃO DE 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO (L-KDR)

A concentração de L-KDR foi determinada pelo método periodato-Ácido tiobarbitúrico de Weissbach & Hurwitz (84).

2.13.6 DETERMINAÇÃO DE α -CETO-ÁCIDOS

A concentração de α -ceto-ácidos foi determinada pelo método da semicarbazona de Mc Gee & Doudoroff (51) e pelo método de Lanning & Cohen da O-fenilenodiamina (45).

2.13.7 DETERMINAÇÃO DO PIRUVATO E LACTATO

Piruvato foi determinado enzimaticamente por um método espectrofotométrico usando lactato desidrogenase de músculo de coelho (72). O sistema de incubação (1,0 ml) continha 91 μ moles de tampão fosfato pH 7,3, 0,28 μ moles de NADH, amostra contendo de 0,1 a 0,9 μ g de piruvato e 0,5 unidade de enzima (desidrogenase láctica). O sistema foi incubado a 25°C. A oxidação de NADH foi acompanhada em espectrofotômetro a 340 nm, até a estabilização da densidade ótica.

O L-lactato foi também determinado enzimaticamente pela lactato desidrogenase (34). O sistema de incubação (1,0 ml) continha 85 μ moles de tampão glicina pH 9,5 com 340 μ moles de hidrazina, 1,5 μ mol de NAD^+ , 3 U de enzima (desidrogenase láctica) e 0,1 ml de amostra contendo no máximo 0,128 μ moles de lactato. Após 90 min de incubação a 25°C, a absorbância de NADH formada foi determinada a 340 nm.

O L-lactato foi indiretamente determinado pelo método da 2,4-dinitrofenilhidrazina (63), para medida de piruvato. Numa primeira etapa, ocorreu a conversão enzimática do L-lactato para piruvato, sendo que o sistema para esta reação continha 50 μ moles de tampão glicina pH 9,5, 1 μ mol de NAD^+ , 1 U de lactato desidrogenase de músculo de coelho e amostra contendo até 1 μ mol de L-lactato, num volume final de 1,0 ml. Após 6 h de incubação a 25°C, o piruvato formado durante esta reação foi quantificado pela formação de

ozazonas pelo método da 2,4-dinitrofenilhidrazina. Piruvato de sódio 2 mM foi usado como padrão.

2.13.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína nos extratos livres de células e nos extratos livres de células tratadas com sulfato de protamina foi determinada pelo método de Lowry et al (50), tendo soro albumina bovina como padrão.

2.13.9 DETERMINAÇÃO DE D- E L-LACTALDEÍDOS

D- e L-lactaldeídos foram determinados espectrofotometricamente pelo método de Barker & Summerson (3).

2.13.10 CROMATOGRAFIA UNIDIMENSIONAL ASCENDENTE EM PAPEL

Os ácidos aldônicos e suas lactonas foram caracterizados por cromatografia unidimensional ascendente em papel Whatman nº1. Os sistemas de solventes empregados nas corridas cromatográficas foram: a) n-butanol: piridina: água na proporção de 6:4:3 b) n-propanol: ácido fórmico: água na proporção de 6:3:1 c) etanol: clorofórmio: amônia: H₂O na proporção de 7:4:2:0,2.

Os açúcares foram detectados nos cromatogramas com nitrato de prata (77), as lactonas foram visualizadas pela formação de ácidos hidroxâmicos (1); os ácidos

2-ceto-3-desoxi-aldônicos foram visualizados usando o reativo periodato-tiobarbitúrico de Warren (8). O L-lactato foi detectado pelo método glucose-nitrato de prata (19).

3 RESULTADOS

3.1 CRESCIMENTO E UTILIZAÇÃO DE L-RHAMNOSE COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO E ENERGIA POR *Pichia sp.* :

A estirpe selvagem e o mutante PR1 de *Pichia stipitis* NRC 5568 e a estirpe selvagem de *Pichia pseudopolymorpha* 1747, utilizam L-rhamnose como única fonte de carbono e energia (Figura 1). Os tempos de duplicação de *Pichia stipitis* NRC 5568, do mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747, foram de 1 h 15 min, 1 h 37 min e 4 h 40 min, respectivamente. Estes valores foram obtidos entre os intervalos de crescimento de 7 h às 10 h para *Pichia stipitis* NRC 5568, de 5 h às 8 h para o mutante PR1 e de 16 h às 21 h para *Pichia pseudopolymorpha* 1747.

3.2 DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA VIA METABÓLICA DA L-RHAMNOSE EM *Pichia stipitis* NRC 5568.

As primeiras enzimas das duas vias já descritas para o metabolismo de L-rhamnose, L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnose isomerase e L-rhamnulose quinase (11, 12, 22, 24, 25, 46, 65, 68, 74, 75) foram ensaiadas em extratos livre de células de *Pichia stipitis* NRC 5568 crescida em meio suplementado com 0.2 % de L-rhamnose. A atividade da L-rhamnose desidrogenase em extrato livre de células, foi da ordem de 0,064 μ moles de NADH formado. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$ (Tabela I). Atividades de L-rhamnose isomerase e

proteína⁻¹ (Tabela I). Atividades de L-rhamnose isomerase e L-rhamnulose quinase, não foram detectadas (dados não mostrados).

As atividades das outras enzimas envolvidas na via oxidativa da L-rhamnose como a L-rhamnonato desidratase, 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase e L-lactaldeído desidrogenase foram encontradas em *Pichia stipitis* NRC 5568 (Tabela I). A presença da enzima L-rhamnono- γ -lactonase não foi detectada.

3.2.1 L-RHAMNOSE DESIDROGENASE (E. C. 1. 1. 173)

O tratamento realizado no extrato livre de células com sulfato de protamina aumentou a atividade específica de 1,6 vezes (Tabela I).

3.2.1.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A atividade da L-rhamnose desidrogenase é dependente da concentração de proteína no sistema de incubação, ocorrendo um aumento proporcional na atividade (Figura 2).

3.2.1.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

O efeito da concentração de L-rhamnose sobre a velocidade de reação catalisada pela L-rhamnose desidrogenase está apresentado na Figura 3. A velocidade

máxima da reação foi da ordem de $0,013 \mu\text{moles de NADH formado. min}^{-1}$ e o K_m é de $0,66 \times 10^{-3} \text{ M}$. Ambos parâmetros cinéticos foram determinados graficamente pelo método dos duplos recíprocos de Lineweaver & Burk (47).

3.2.1.3 EFEITO DO pH

O efeito do pH sobre a atividade da L-rhamnose desidrogenase está mostrada na Figura 4. A atividade enzimática sofreu uma forte influência do pH do sistema de incubação e a atividade ótima da enzima se encontra em pH 9,5.

3.2.1.4 EFEITO DE NUCLEOTÍDEOS PIRIDÍNICOS OXIDADOS E REDUZIDOS

A L-rhamnose desidrogenase é NAD^+ dependente, não ocorrendo atividade enzimática na presença dos outros nucleotídeos piridínicos testados (Tabela II). Mesmo em diferentes pHs não foi determinada atividade desta desidrogenase, quando NADP^+ , NADPH ou NADH foram empregados como cofatores (dados não demonstrados).

3.2.1.5 ESPECIFICIDADE PELO SUBSTRATO

A especificidade da enzima foi determinada, substituindo-se L-rhamnose no sistema de incubação padrão

por uma série de D e L aldoses na concentração de 2 mM. L-manose, L-arabinose, L-fucose, D-glucose, D-galactose, D-manose ou D-frutose não foram utilizados como substratos quando adicionados no sistema de incubação (Tabela III).

3.2.1.6 EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO

A atividade da enzima é linear em função do tempo e a velocidade se manteve constante nos primeiros 10 min, pelo menos. Neste período o substrato e o cofator estavam em concentrações saturantes e a enzima se manteve estável nestas condições (Figura 5).

3.2.1.7 ATIVADORES E INIBIDORES

A L-rhamnose desidrogenase não depende da presença de cátions divalentes como Ca^{++} , Mg^{++} , Cu^{++} e Mn^{++} ou de ânions como Cl^- e SO_4^- . O íon amônio NH_4^+ aparentemente ativa a enzima. A enzima exibe maior atividade na presença de $\text{H}_3\text{C}-\text{COONa}$ devido a presença do radical acetato, já que o íon Na^+ inibe a atividade da enzima. O EDTA ativa a enzima provavelmente por quelar algum cátion inibidor como Zn^{++} (Tabela IV).

3.2.2 L-RHAMNONO- γ -LACTONASE

Em células de *Pichia stipitis* NRC 5568 crescidas na presença de L-rhamnose, não foi detectada a presença de L-rhamnono- γ -lactonase (Tabela I).

3.2.3 L-RHAMNONATO DESIDRATASE

A atividade da L-rhamnonato desidratase em extrato livre de células crescidas em L-rhamnose foi de $0,5 \mu\text{mol}$ de L-KDR formado. hora^{-1} . mg de proteína $^{-1}$. Após tratamento com sulfato de protamina, a atividade específica da enzima foi de $0,83 \mu\text{moles}$ de L-KDR formado. hora^{-1} . mg de proteína $^{-1}$. A atividade específica aumentou de 1,66 vezes, quando comparada com a atividade do extrato bruto (Tabela I).

3.2.3.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A atividade da L-rhamnonato desidratase é dependente da concentração de proteína no sistema de incubação ocorrendo um aumento proporcional na atividade (Figura 6). A linearidade é mantida em concentrações de até 1 mg de proteína.

3.2.3.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

O comportamento cinético da L-rhamnonato desidratase na presença de concentrações crescentes de L-rhamnonato está apresentado na Figura 7. A velocidade máxima do sistema foi de $1 \mu\text{mol}$ de L-KDR formados. h^{-1} e o K_m de $2,7 \times 10^{-3} \text{ M}$,

como determinados graficamente pelo método de Lineweaver & Burk (47).

3.2.3.3 EFEITO DO pH

A atividade da L-rhamnonato desidratase sofre forte influência do pH (Figura 8). A atividade ótima da enzima ocorreu em pH 7,0.

3.2.3.4 EFEITO DO TEMPO

A velocidade da reação catalisada pela L-rhamnonato desidratase é diretamente proporcional ao tempo de incubação (Figura 9). A linearidade é mantida por pelo menos 150 min.

3.2.3.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS ÍONS Mg^{++}

A atividade da L-rhamnonato desidratase aumentou significativamente na presença de íons Mg^{++} (Figura 10). Estes aumentos são de até 69 % em relação a velocidade máxima atingida pelo sistema.

3.2.4 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE

Extrato livres de células de *Pichia stipitis* NRC 5568 crescidas em L-rhamnose apresentaram atividade de 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase da ordem de 2 μ moles de L-KDR formado por hora⁻¹.mg de proteína⁻¹. Após o tratamento

com sulfato de protamina esta atividade foi da ordem de 3,3 μ moles de L-KDR formado. hora⁻¹. mg de proteína⁻¹. A atividade específica sofreu um aumento de 1,65 vezes quando comparada com a obtida no extrato livre de células (Tabela I).

3.2.4.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A velocidade de reação da aldolase é diretamente proporcional à concentração de proteína empregada no sistema de incubação (Figura 11). A linearidade da reação foi mantida de 0,1 a 0,5 mg de proteína.

3.2.4.2 EFEITO DO pH

A atividade da aldolase sofreu influência do pH, tendo o seu pH ótimo de atividade em 7,0 (Figura 12).

3.2.4.3 ESPECIFICIDADE

A especificidade da enzima frente a uma série de aldeídos, foi determinada (Tabela V). Na presença de D-lactaldeído como substato, a enzima exibe uma atividade 25 % menor do que com L-lactaldeído como substrato. A enzima apresentou uma atividade bastante alta quando o piruvaldeído foi utilizado como substrato. Esta atividade era 3 vezes maior do que com o próprio L-lactaldeído substrato natural da

via. Dentre os aldeídos testados o formaldeído não foi substrato para aldolase.

3.2.4.4 EFEITO DO TEMPO

A atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase foi proporcional ao tempo até 20 min (Figura 13).

3.2.4.5 ESTEQUIOMETRIA

A clivagem do 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato pela aldolase é uma reação reversível como demonstrado pela formação de 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato (L-KDR) a partir de L-lactaldeído e piruvato (Figura 14). A velocidade de consumo do piruvato correspondeu a velocidade de formação do 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato em função do tempo. Aos 20 min de reação, 1,38 μ moles de piruvato haviam sido consumidos e 1,62 μ moles de L-KDR formados, sugerindo que a reação de formação de L-KDR foi estequiométrica com o consumo de piruvato.

3.2.5 LACTALDEÍDO DESIDROGENASE

Uma atividade da lactaldeído desidrogenase, NAD^+ dependente, que catalisa a oxidação de L-lactaldeído a L-lactato, foi detectada em extrato livre de células de *Pichia stipitis* NRC 5568 crescidas em L-rhamnose. A atividade específica foi da ordem de 0,02 μ moles de NADH formado por

$\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Com o tratamento de sulfato de protamina esta atividade aumentou para $0,03 \mu\text{moles de NADH formado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ o que corresponde a um aumento de 1,5 vezes (Tabela I).

3.2.5.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A velocidade de reação catalisada pela L-lactaldeído desidrogenase foi proporcional à concentração de proteína. A linearidade desta reação é mantida de $0,075$ a $0,4 \text{ mg de proteína}$ (Figura 15).

3.2.5.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

Níveis de L-lactaldeído ou glicocaldeído superiores a 2 mM provocaram um decréscimo na velocidade de reação da lactaldeído desidrogenase, sugerindo uma inibição da enzima pelo substrato. A velocidade máxima da reação foi da ordem de $0,016 \mu\text{moles de NADH formados} \cdot \text{min}^{-1}$ e o K_m foi de $2,7 \times 10^{-3} \text{ Molar}$, utilizando L-lactaldeído como substrato (Figura 16 A). Para o glicocaldeído como substrato, a velocidade máxima da reação foi da ordem de $0,009 \mu\text{moles de NADH formados} \cdot \text{min}^{-1}$ e o K_m foi de $0,34 \times 10^{-3} \text{ M}$ (Figura 16 B). Os parâmetros cinéticos foram determinados graficamente pelo método dos duplos recíprocos de Lineweaver & Burk (47).

3.2.5.3 COENZIMAS

Dos nucleotídeos piridínicos testados, apenas NAD^+ atuou como coenzima da lactaldeído desidrogenase, não ocorrendo atividade de L-lactaldeído desidrogenase na presença de outros nucleotídeos como NADP, NADH ou NADPH (Tabela VI).

3.2.5.4 EFEITO DO pH

O estudo do efeito pH sobre a atividade da lactaldeído desidrogenase demonstrou que a atividade máxima da enzima ocorre em pH 9,0 (Figura 17).

3.2.5.5 ESPECIFICIDADE

A atividade da lactaldeído desidrogenase foi determinada frente a vários aldeídos como substratos (Tabela VII). A atividade da enzima é 25 % maior tendo L-lactaldeído como substrato do que o D-lactaldeído. O glicocaldeído e o acetaldeídos acusaram um aumento de 75 % da atividade enzimática, quando comparados com o L-lactaldeído. Entretanto o piruvaldeído e o formaldeído, como substratos, apresentaram somente 30 % e 1,25 % de atividade da lactaldeído desidrogenase.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS DO METABOLISMO DA L-RHAMNOSE

3.3.1 IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE

O produto da reação da L-rhamnose desidrogenase foi isolado e submetido a técnicas de identificação, conforme descrito em Materiais e Métodos.

O produto da reação da desidrogenase foi cromatografado nos solventes a e b (item 2. 13. 10) e migrou como ácido L-rhamnônico sintetizado quimicamente. O ácido L-rhamnônico foi lactonizado "in situ" e revelado como lactona pelo método de Abdel Akher & Smith (1). Os valores de Rfs do produto enzimático e dos padrões de L-rhamnono- γ -lactona e de ácido L-rhamnônico foram 0,33, 0,83 e 0,33, respectivamente (Tabela VIII). O Rf do produto da reação da desidrogenase foi idêntico ao padrão de ácido L-rhamnônico sintetizado quimicamente.

3.3.2 IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA L-RHMANONATO DESIDRATASE

O produto da L-rhamnonato desidratase foi isolado conforme Materiais e Métodos. O composto foi cromatografado nos solventes b e c e visualizado com o revelador periodato-tiobarbitúrico de Warren (8). Os valores de Rf para o solvente b foram 0,85 e solvente c 0,4 (Tabela X). Os

α -ceto-ácidos formam compostos com espectro de absorção característicos com a semicarbazida (51), a O-fenilenodiamina (45) e o periodato-tiobarbiturato (84). A reação do produto da desidratase com semicarbazida (51) resultou em um composto com λ máximo característico em 250 nm, e a reação com O-fenilenodiamina (45) produziu um composto em que a taxa de leitura 330 nm/360nm foi de 1,4 (sensibilidade até 1,5). Com periodato-tiobarbiturato produziu um cromógeno com absorção máxima em 548 nm (Figura 18). Esta absorção é característica do complexo ácido 2-tiobarbitúrico- β -formilpiruvato. O β -formilpiruvato é um dos produtos da reação do periodato com ácidos 2-ceto-3-desoxi aldônicos (84). A redução do produto da desidratase com NaBH_4 produziu um composto periodato-tiobarbiturato negativo como era de se esperar, uma vez que formil lactato, resultante da oxidação pelo periodato dos ácidos metassacarínicos (produto da redução do 2-ceto-3-desoxi- $\underline{\text{L}}$ -rhamnonato) não reage com ácido 2-tiobarbitúrico para formar cromógeno (84). A Tabela IX mostra a determinação quantitativa do produto da desidratase da reação pelos métodos de semicarbazida (51) e periodato-tiobarbitúrico (84).

3.3.3 IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA 2-CETO-3-DESOXI- $\underline{\text{L}}$ -RHAMNONATO ALDOLASE

3.3.3.1 SENTIDO DA CLIVAGEM

A clivagem de 2-ceto-3-desoxi- $\underline{\text{L}}$ -rhamnonato não pode ser

demonstrada pela caracterização dos produtos da reação, piruvato e L-lactaldeído, uma vez que não foi possível a síntese química do L-KDR.

3.3.3.2 SENTIDO DA SÍNTESE

O produto da reação da aldolase no sentido da síntese, tendo como substrato L-lactaldeído e piruvato, foi isolado conforme Materiais e Métodos. O composto foi cromatografado nos solventes b e c e apresentou um R_f semelhante ao produto da reação da L-rhamnonato desidratase nesses mesmos solventes (Tabela X). Este produto reagiu com os reagentes periodato-tiobarbiturato, formando um cromógeno cujo o espectro de absorção foi idêntico ao derivado obtido a partir do produto da L-rhamnonato desidratase (Figura 19).

3.3.4 IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA LACTALDEÍDO DESIDROGENASE

O produto da reação da lactaldeído desidrogenase sobre o L-lactaldeído foi isolado e submetido a técnicas de identificação conforme descrito em Materiais e Métodos. O composto foi cromatografado nos solventes a e b e visualizado pela técnica de glucose-nitrato de prata (19). Este produto apresentou valores de R_f bastante semelhantes aos de L-lactato (Tabela XI). O produto desta reação foi

quantificado pelo método da lactato desidrogenase-hidrazina (Materiais e Métodos item 2.11.5), específico para L-lactato. Foi determinada por esta técnica a formação de 72 % de L-lactato a partir de L-lactaldeído. Por outro lado, o L-lactato formado na reação da lactaldeído desidrogenase, sofreu conversão enzimática para piruvato, sendo este submetido ao método da 2,4-dinitrofenilhidrazina (63). O cromógeno formado apresentou um espectro de absorção semelhante ao padrão de piruvato, com maior absorção entre 435 nm e 445 nm (Figura 20). Estes resultados sugeriram que o L-lactato é o produto imediato da lactaldeído desidrogenase.

3.4 ENZIMAS DO METABOLISMO DE L-RHAMNOSE EM *Pichia pseudopolymorpha* 1747 E NO MUTANTE PR₁ DE *Pichia stipitis*

As enzimas da via de degradação oxidativa da L-rhamnose em *Pichia stipitis* NRC 5568 foram encontradas também em *Pichia pseudopolymorpha* 1747, outra espécie de *Pichia* capaz de utilizar L-rhamnose como fonte de carbono, e no mutante PR₁ de *Pichia stipitis* NRC 5568, resistente a repressão por D-glucose (Tabela XII). Além dessas enzimas, foi encontrada atividade da L-rhamnono- γ -lactonase em *Pichia pseudopolymorpha* 1747.

3.5 EFEITO DA FONTE DE CARBONO SOBRE OS NÍVEIS DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE L-RHAMNOSE EM *Pichia stipitis* NRC 5568, MUTANTE PR1 E *Pichia pseudopolymorpha* 1747

3.5.1 L-RHAMNOSE DESIDROGENASE

A indução da L-rhamnose desidrogenase foi estudada em *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *P. pseudopolymorpha* 1747, cultivadas em D-glucose, D-galactose, glicerol ou lactato como fonte única de carbono. Apenas as células crescidas em L-rhamnose apresentaram atividade desta desidrogenase (Tabela XIII).

3.5.2 L-RHAMNONATO DESIDRATASE

A Tabela XIV mostra as atividades relativas de L-rhamnonato desidratase dos extratos livres de células de *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747 crescidas na presença de diferentes fontes de carbono. D-Glucose, D-galactose, glicerol e lactato foram incapazes de induzir a síntese de L-rhamnonato desidratase em níveis superiores a 8 % das atividades específicas determinadas das células destas cepas crescidas em L-rhamnose.

3.5.3 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE

O efeito de diferentes fontes de carbono na expressão da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase de *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747, está apresentado na Tabela XV. D-Glucose, D-galactose, glicerol e lactato não induziram a síntese da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase em níveis superiores a 8 e 9 % das atividades específicas determinadas das células das cepas selvagem e mutante PR1 de *Pichia stipitis* crescidas em L-rhamnose. Entretanto em *Pichia pseudopolymorpha* 1747, os açúcares D-glucose, D-galactose e glicerol, induziram a síntese da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase, cerca de 25 %, comparando-se com a atividade específica determinada das células crescidas em L-rhamnose.

3.5.4 LACTALDEÍDO DESIDROGENASE

A indução da lactaldeído desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747 somente ocorreu em células crescidas na presença de L-rhamnose como fonte de carbono. Outras fontes de carbono foram incapazes de induzir a síntese desta enzima (Tabela XVI).

3.6 EFEITO DA L-RHAMNOSE SOBRE A SÍNTESE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE, L-RHAMNONATO DESIDRATASE E 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE EM CÉLULAS DE *Pichia stipitis* NRC 5568 E PR1 EM CRESCIMENTO

3.6.1 CRESCIMENTO E UTILIZAÇÃO DE L-RHAMNOSE

Crecimento de *Pichia stipitis* NRC 5568 dependente de L-rhamnose como fonte única de carbono, está mostrado nas Figuras 21, 22 ou 23. As células alcançaram a fase estacionária de crescimento num período de 28 h, o que correspondeu a um valor determinado de turbidez de 228 Unidades Klett. Durante este período cerca de 90 % da L-rhamnose do meio já havia sido consumida.

As células do mutante PR1 alcançaram a fase estacionária de crescimento após 25 h de crescimento e o valor medido de turbidez correspondeu a 236 Unidades Klett. Paralelamente ao crescimento, determinou-se que neste período 80 % da L-rhamnose do meio já havia sido consumida (Figuras 24, 25 ou 26).

3.6.2 L-RHAMNOSE DESIDROGENASE

As células de *Pichia stipitis* NRC 5568 e do mutante PR1 cultivadas na presença de L-rhamnose como fonte única de carbono passaram a apresentar atividades da L-rhamnose desidrogenase (Figuras 21, 24). As atividades enzimáticas

foram detectadas a partir de 5 h de crescimento da estirpe selvagem e 10 h de crescimento do mutante PR1. A atividade máxima alcançada após 30 h de crescimento de *Pichia stipitis* NRC 5568 foi de $0,13 \text{ U.mg}^{-1}$ e após 25 h de crescimento do mutante PR1 foi de $0,15 \text{ U.mg}^{-1}$.

3.6.3 L-RHAMNONATO DESIDRATASE

As Figuras 22 e 25 mostram que as células de *Pichia stipitis* NRC 5568 e do mutante PR1 crescidas em presença de L-rhamnose induzem a síntese da L-rhamnonato desidratase. As atividades foram detectadas a partir de 5 h de crescimento da cepa selvagem e 10 h de crescimento do mutante PR1. As atividades máximas alcançadas após 20 h de crescimento da cepa selvagem e após 25 h de crescimento do mutante PR1, foram $0,33 \text{ U.mg}^{-1}$ e $0,41 \text{ U.mg}^{-1}$, respectivamente.

3.6.4 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE

As Figuras 23 e 26 mostram que as células de *Pichia stipitis* NRC 5568 e do mutante PR1 crescidas em meio contendo L-rhamnose, apresentam atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase. As atividades passam a ser detectadas a partir de 5 h de crescimento da cepa selvagem e 10 h de crescimento do mutante PR1. Os níveis máximos de atividade alcançados após 20 h de crescimento para *Pichia stipitis* NRC 5568 e mutante PR1 foram de $1,5 \text{ U.mg}^{-1}$ e $2,6 \text{ U.mg}^{-1}$, respectivamente.

3.7 REPRESSÃO DA SÍNTESE DA L-RHAMNOSE DESIDROGENASE, L-RHAMNONATO DESIDRATASE E 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE POR D-GLUCOSE EM CÉLULAS DE *Pichia stipitis* NRC 5568 E PR1 EM CRESCIMENTO

3.7.1 CRESCIMENTO E UTILIZAÇÃO DE D-GLUCOSE E L-RHAMNOSE

As células de *Pichia stipitis* NRC 5568 e do mutante PR1 foram cultivadas na presença de 0,2 % de L-rhamnose e 0,2 % D-glucose (Figuras 27, 28 ou 29; 30, 31 ou 32). O consumo de L-rhamnose por *Pichia stipitis* NRC 5568 e mutante PR1 foi lento até 20 h de cultivo quando a D-glucose foi exaurida do meio. As culturas da cepa selvagem e mutante alcançaram a fase estacionária de crescimento após 30 h, restando apenas 3 % de L-rhamnose no meio de cultura.

3.7.2 L-RHAMNOSE DESIDROGENASE

A atividade da L-rhamnose desidrogenase passou a ser detectada após 26 h de crescimento de *Pichia stipitis* NRC 5568 (Figura 27). A atividade específica aumentou com o tempo e atingiu o seu nível máximo de $0,192 \text{ U.mg}^{-1}$ em 37 h de crescimento. A atividade desta desidrogenase passou a ser determinada a partir de 22 h de crescimento do mutante PR1 (Figura 30). A atividade máxima foi alcançada em 26 h de crescimento, atingindo o nível de $0,274 \text{ U.mg}^{-1}$ e

diminuindo para $0,254 \text{ U.mg}^{-1}$ após 11 horas.

3.7.3 L-RHAMNONATO DESIDRATASE

Em *Pichia stipitis* NRC 5568, os níveis da L-rhamnonato desidratase só foram detectados a partir de 17 h de crescimento, atingindo um nível máximo de $0,54 \text{ U.mg}^{-1}$ em 17 h de crescimento (Figura 28). Em células do mutante PR1, a atividade da L-rhamnonato desidratase passou a ser detectada a partir de 17 h de crescimento (Figura 31). A atividade máxima alcançada foi de $0,8 \text{ U.mg}^{-1}$ em 26 h de crescimento e diminuindo para $0,57 \text{ U.mg}^{-1}$ nas 11 h seguintes.

3.7.4 2-CETO-3-DESOXI-L-RHAMNONATO ALDOLASE

Em *Pichia stipitis* NRC 5568, os níveis de atividade desta aldolase passaram a ser detectados em 13 h de crescimento. O nível máximo de $4,1 \text{ U.mg}^{-1}$ foi atingido em 37 h de (Figura 29). Da mesma forma, no mutante PR1 detectou-se atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase a partir de 13 h de (Figura 32). A atividade máxima foi de $4,03 \text{ U.mg}^{-1}$ em 26 h de crescimento, ocorrendo uma queda para $2,12 \text{ U.mg}^{-1}$ após 11 h.

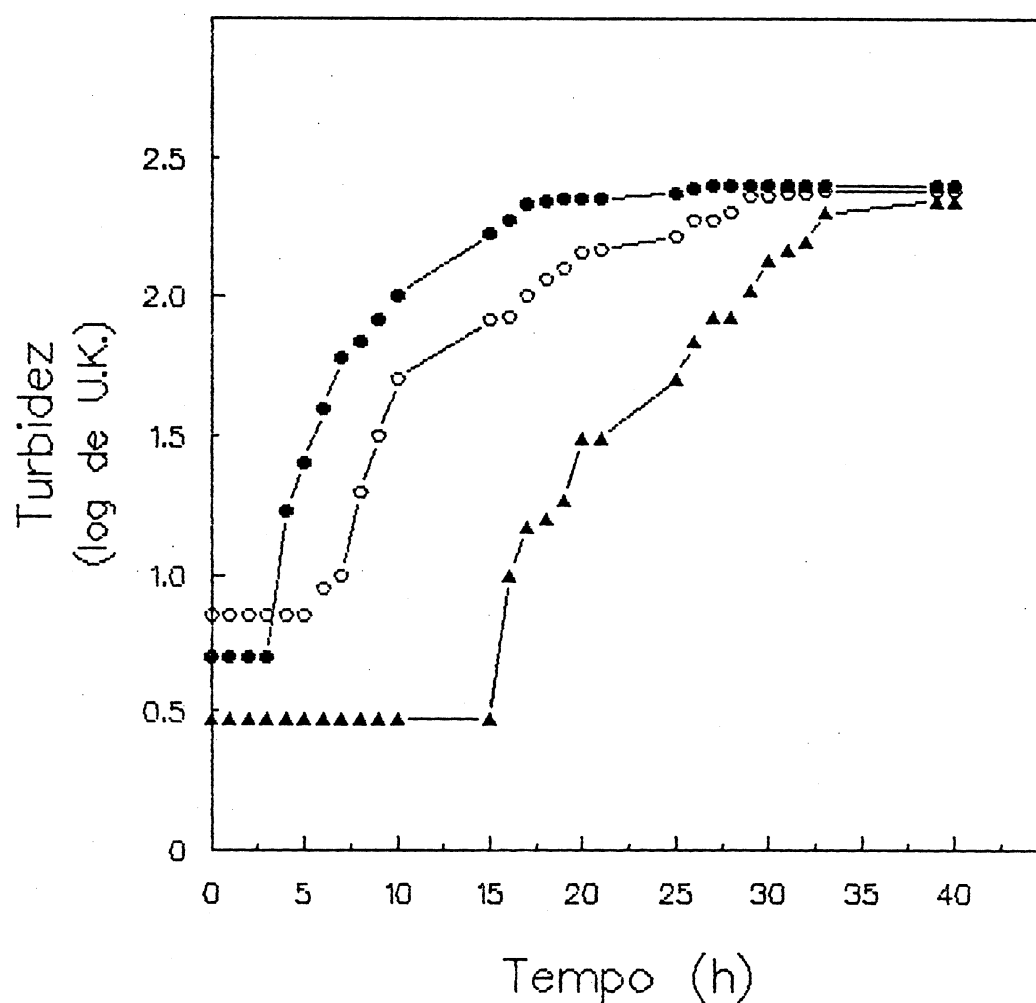


FIGURA 1 - Curvas de crescimento de *Pichia stipitis* (NRC 5568 e PR1) e *Pichia pseudopolymorpha* 1747 em L-rhamnose.

Os crescimentos das células foram realizados conforme descritos em Materiais e Métodos utilizando-se frascos Erlenmeyer de 200 ml com 50 ml de meio. O meio foi suplementado com 0,2% de L-rhamnose como única fonte de carbono.

Pichia stipitis NRC 5568 (○)
Pichia stipitis PR1 (●)
Pichia pseudopolymorpha (▲)

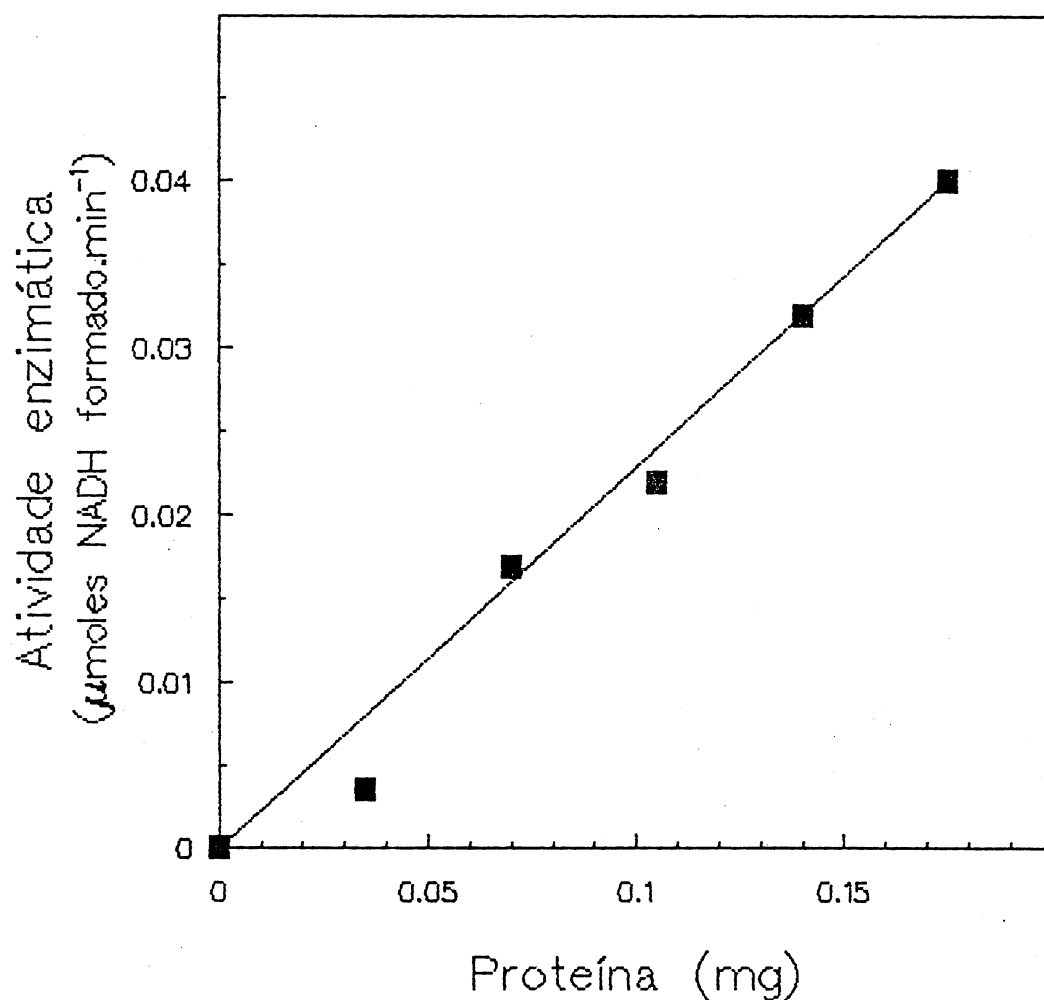


FIGURA 2- Efeito da concentração de proteína na atividade da L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1.0 ml) continha 35 µmoles de tampão carbonato bicarbonato pH 9,5, 2 µmoles de L-rhamnose, 1 µmol de NAD⁺ e proteína da fração sulfato de protamina como especificada na figura. A incubação foi realizada a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrito em Materiais e Métodos.

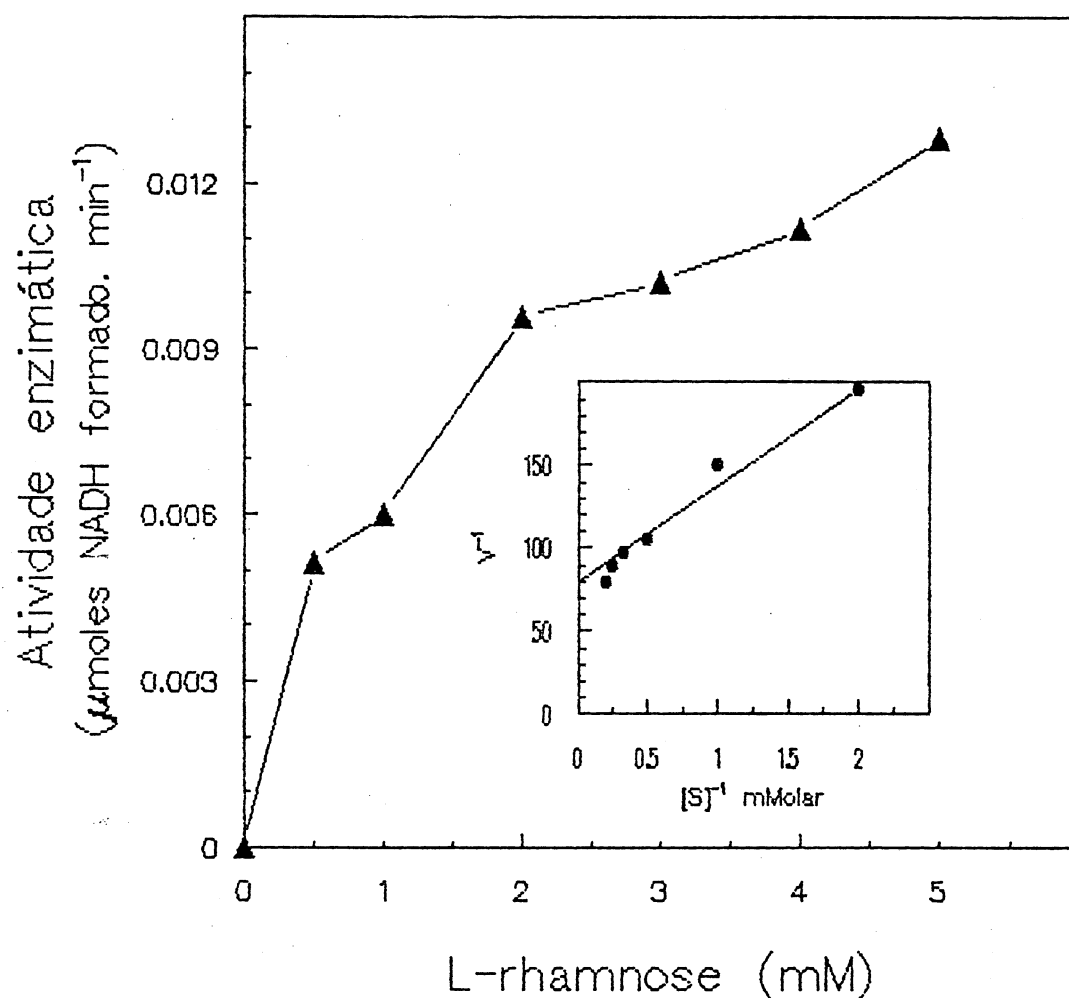


FIGURA 3 - Efeito da concentração de substrato na atividade da L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha 35 μmoles de tampão carbonato-bicarbonato, 1 μmol de NAD⁺, L-rhamnose como especificado na figura e 0,08 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi realizada a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrito em Materiais e Métodos.

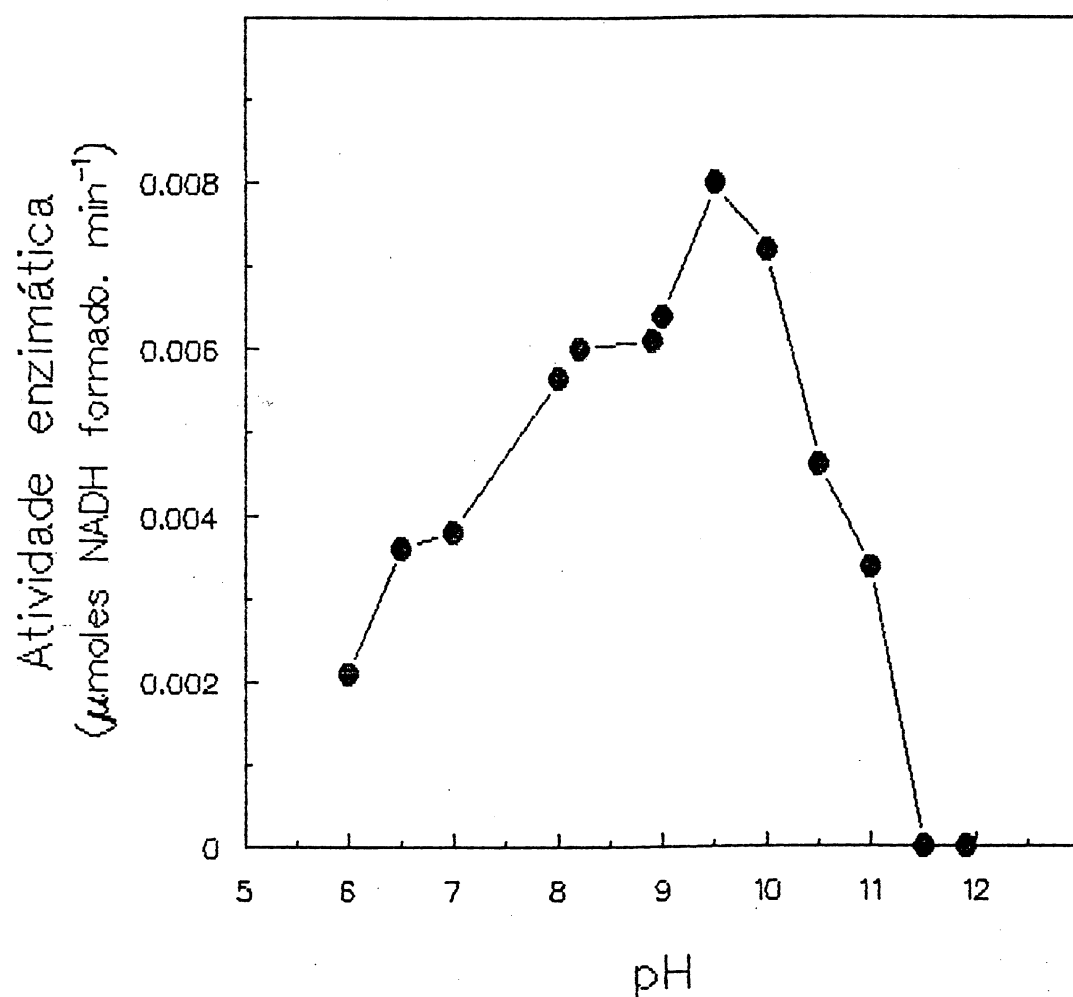


FIGURA 4 - Efeito da variação de pH na atividade da L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha 35 μmoles de tampão no pH especificado na figura, 2 μmoles de L-rhamnose, 1 μmol de NAD^+ e 0,06 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi realizada a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrito em Materiais e Métodos.

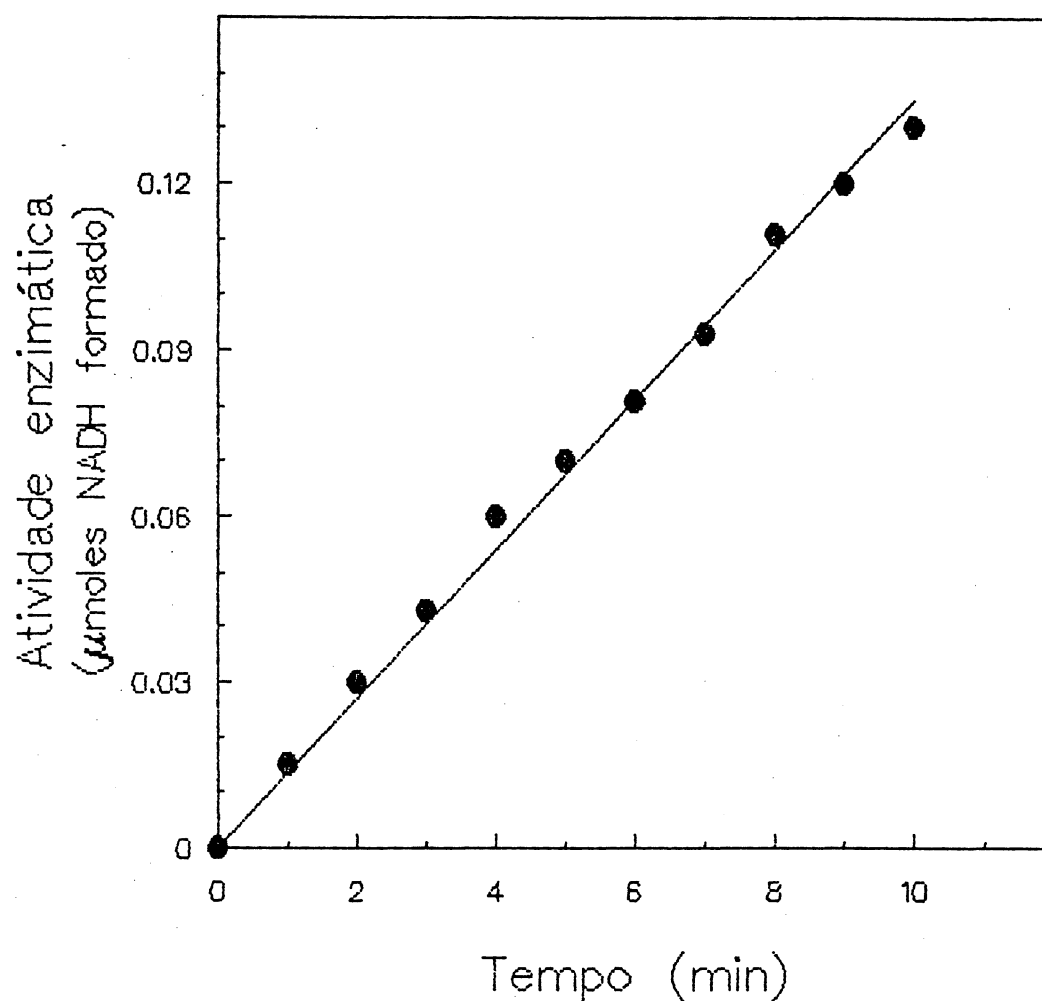


FIGURA 5 - Efeito do tempo na atividade da L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha 35 μmoles de tampão carbonato- bicarbonato pH 9,5, 2 μmoles de L-rhamnose, 1 μmol de NAD^+ e 0,06 mg de proteína (fração sulfato de protamina). O tempo de incubação está especificado na figura. A incubação foi realizada a 25°C e a formação de NADH foi acompanhado como descrito em Materiais e Métodos.

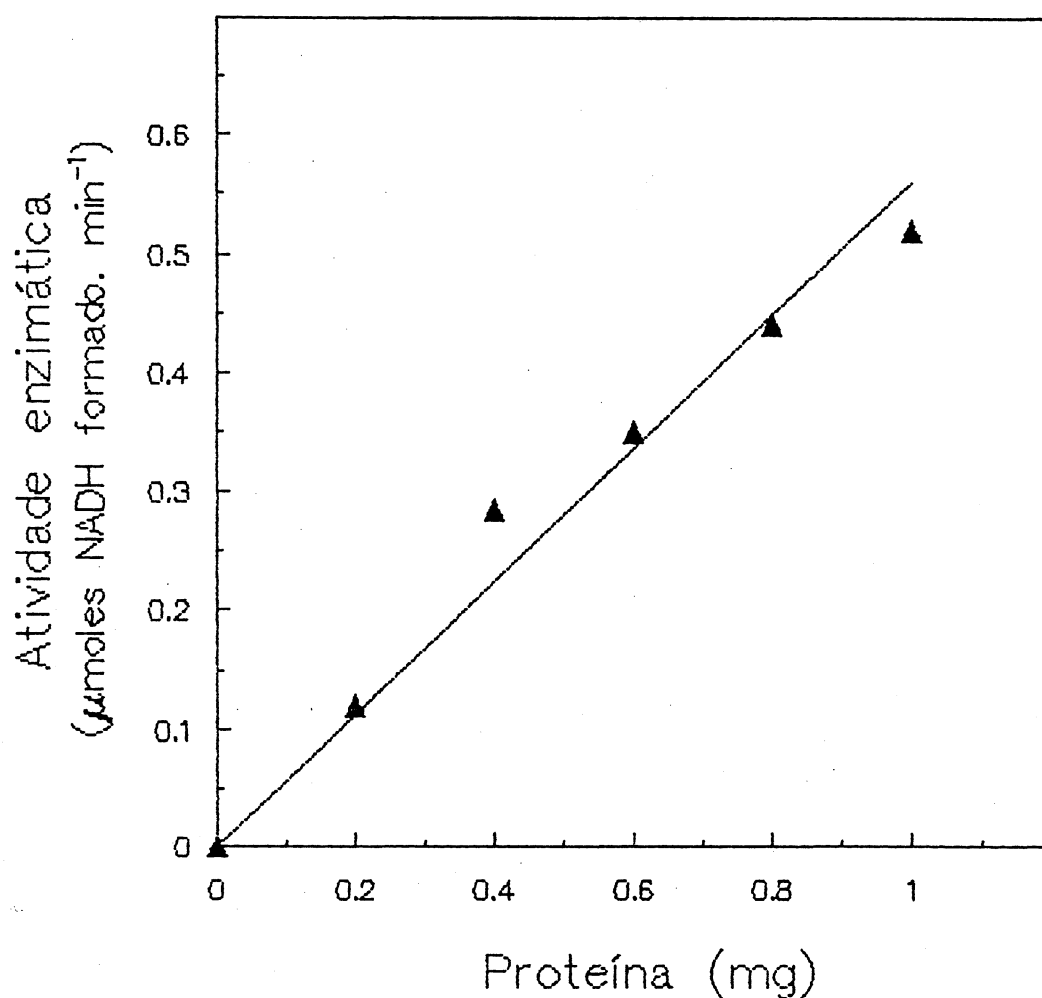


FIGURA 6 - Efeito da concentração de proteína na atividade da L-rhamnonato desidratase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha 40 µmoles de tampão fosfato pH 7,0, 5 µmoles de L-rhamnonato de sódio, 10 µmoles de MgSO₄ e proteína como especificado na figura. A incubação foi realizada a 30°C por 1 h e a formação de L-KDR foi acompanhada pelo método de Weissbach & Hurwitz (84).

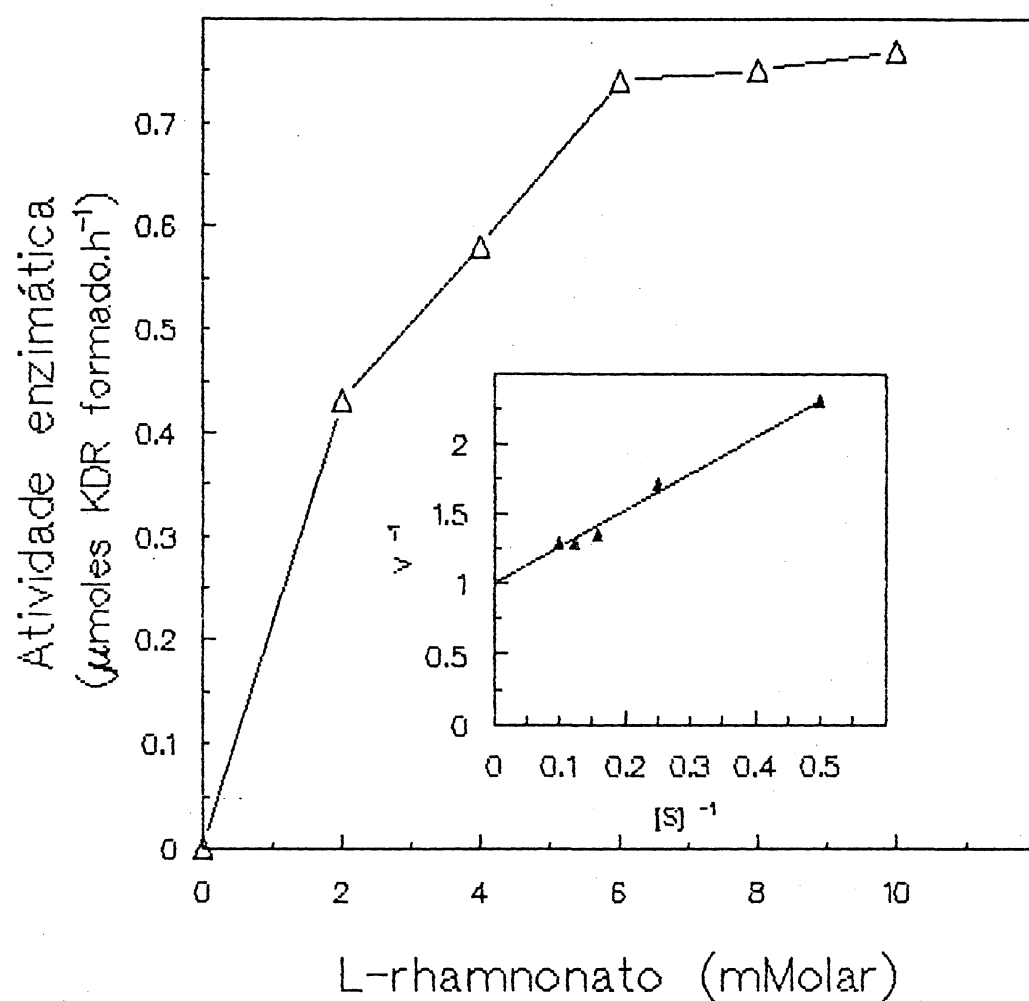


FIGURA 7 - Efeito da concentração de substrato na atividade da L-rhamnonato desidratase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha 40 μmoles de tampão fosfato pH 7,0, 10 μmoles de MgSO₄, L-rhamnonato de sódio como indicado na figura e 1 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi realizada a 30°C e a formação de L-KDR foi acompanhada pelo método de Weissbach & Hurwitz (84).

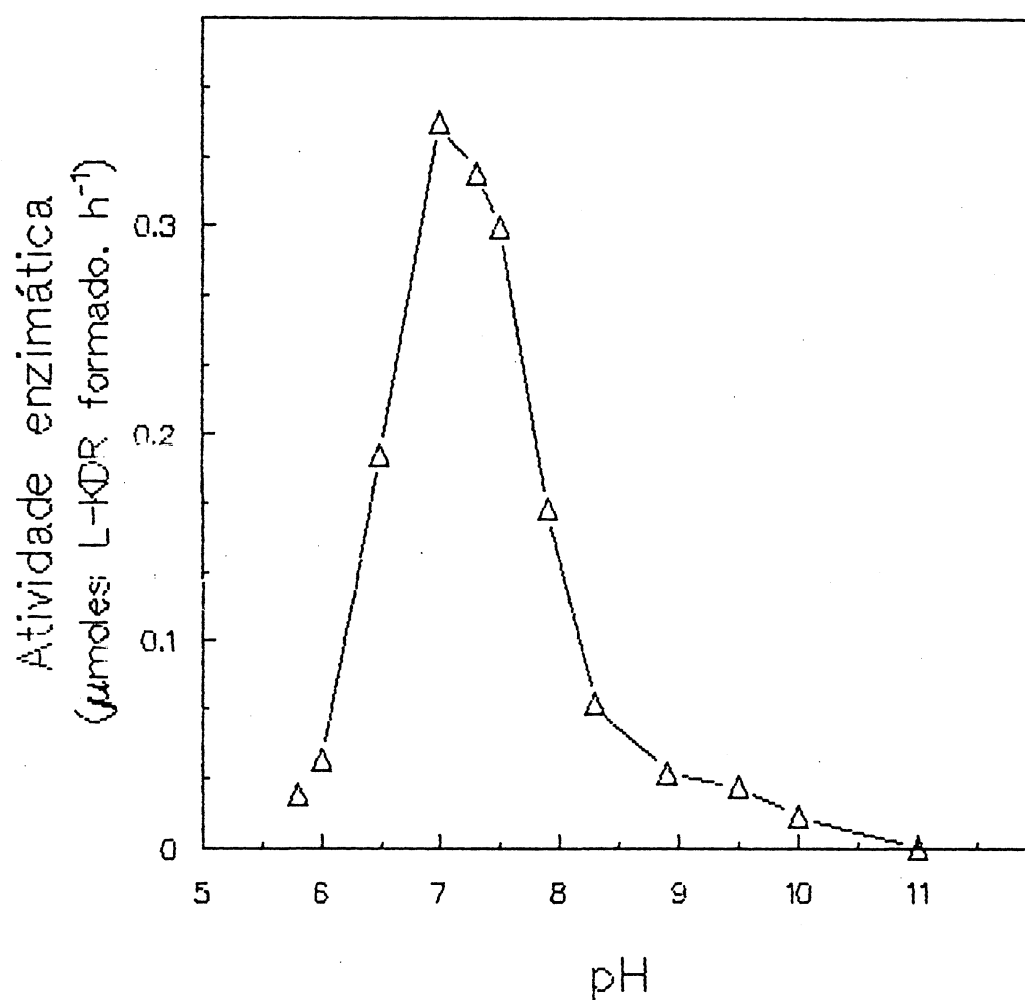


FIGURA 8 - Efeito da variação de pH na atividade da L-rhamnonato desidratase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha 40 μmoles de tampão no pH especificado na figura, 10 μmoles de MgSO_4 , 5 μmoles de L-rhamnonato de sódio e 0,5 mg de protamina (fração sulfato de protamina). A incubação foi realizada a 30°C por 1 h e a formação de L-KDR foi acompanhada pelo método de Weissbach & Hurwitz (84).

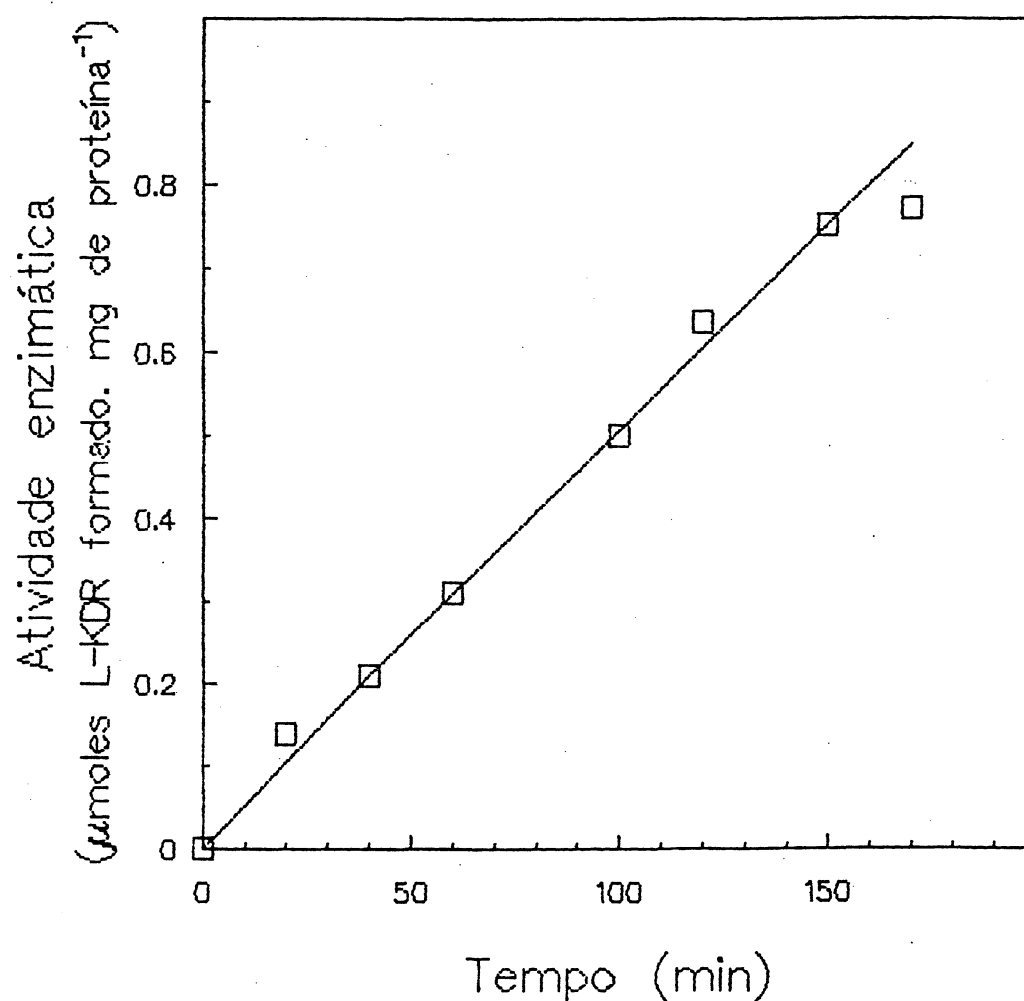


FIGURA 9 - Efeito do tempo na atividade da L-rhamnonato desidratase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha: 40 μmoles de tampão fosfato pH 7,0, 10 μmoles de MgSO₄, 5 μmoles de L-rhamnonato de sódio e 0,5 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi realizada a 30°C nos tempos determinados na figura e a formação de L-KDR foi acompanhada pelo método de Weissbach & Hurwitz (84).

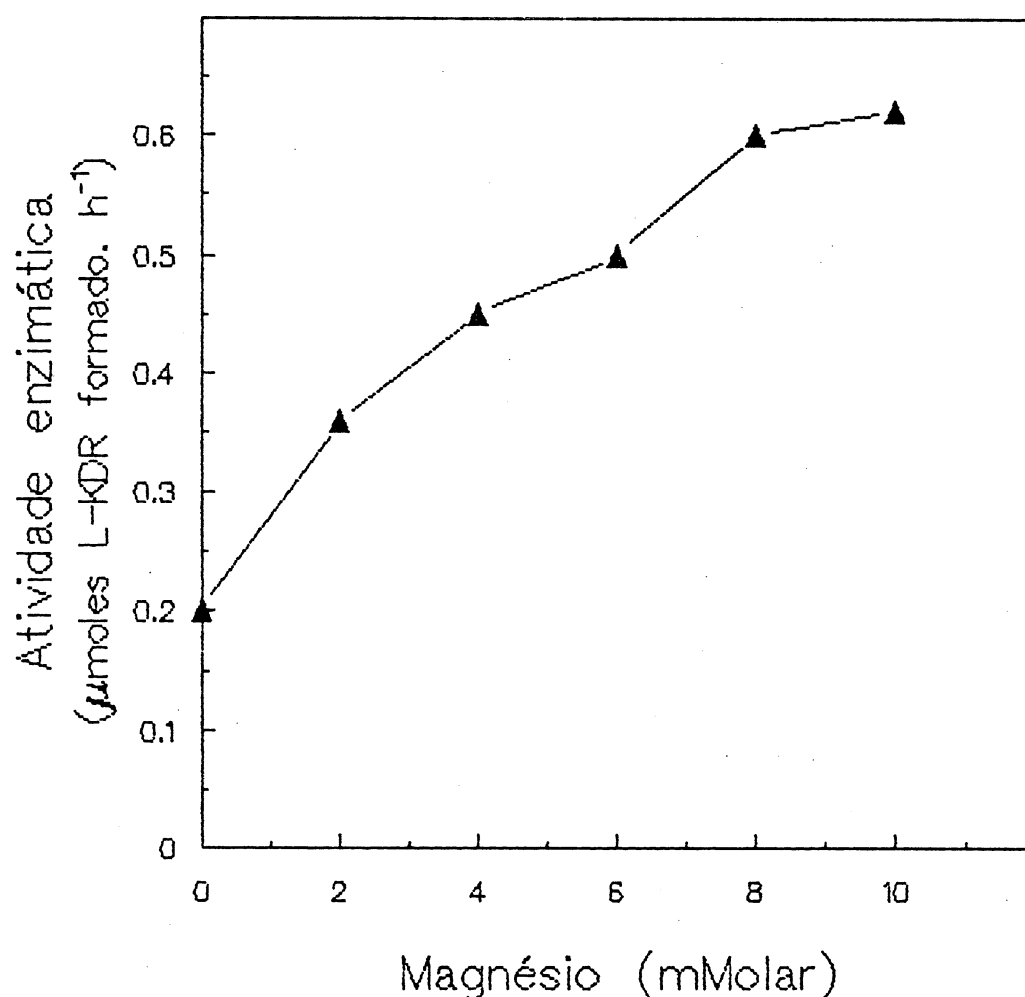


FIGURA 10 - Efeito do íon magnésio na atividade da L-rhamnonato desidratase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha 40 μmoles de tampão fosfato pH 7,0, 5 μmoles de L-rhamnonato de sódio, Mg²⁺ nas concentrações indicadas na figura e 1 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi realizada a 30°C por 1 h e a formação de L-KDR, foi acompanhada pelo método de Weissbach & Hurwitz (84).

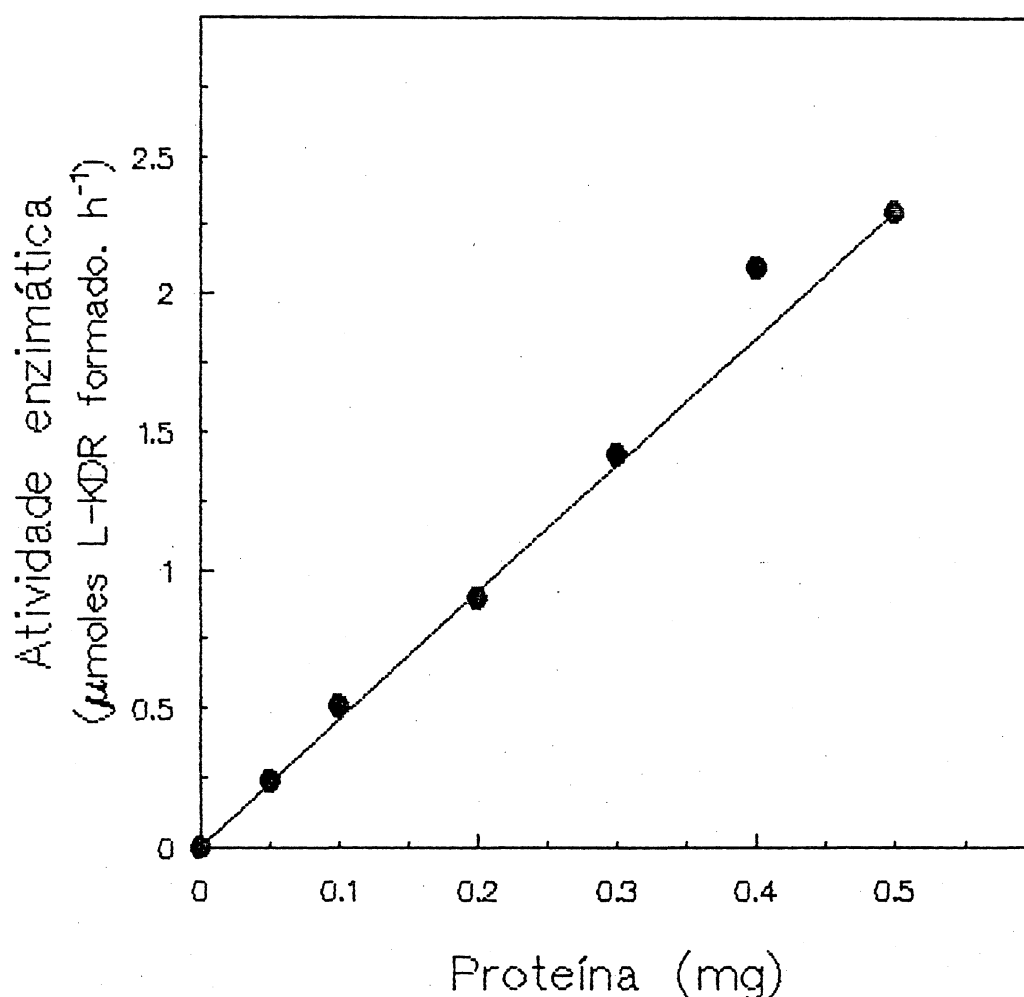


FIGURA 11 - Efeito da concentração de proteína na atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (0,5 ml) continha 12 μmoles de tampão fosfato pH 7,0, 5 μmoles de piruvato de sódio, 4 μmoles de L-lactaldeído e proteína nas quantidades indicadas na figura. A incubação foi realizada a 30°C por 1 h e a formação de L-KDR foi acompanhada pelo método de Weissbach & Hurwitz (84).

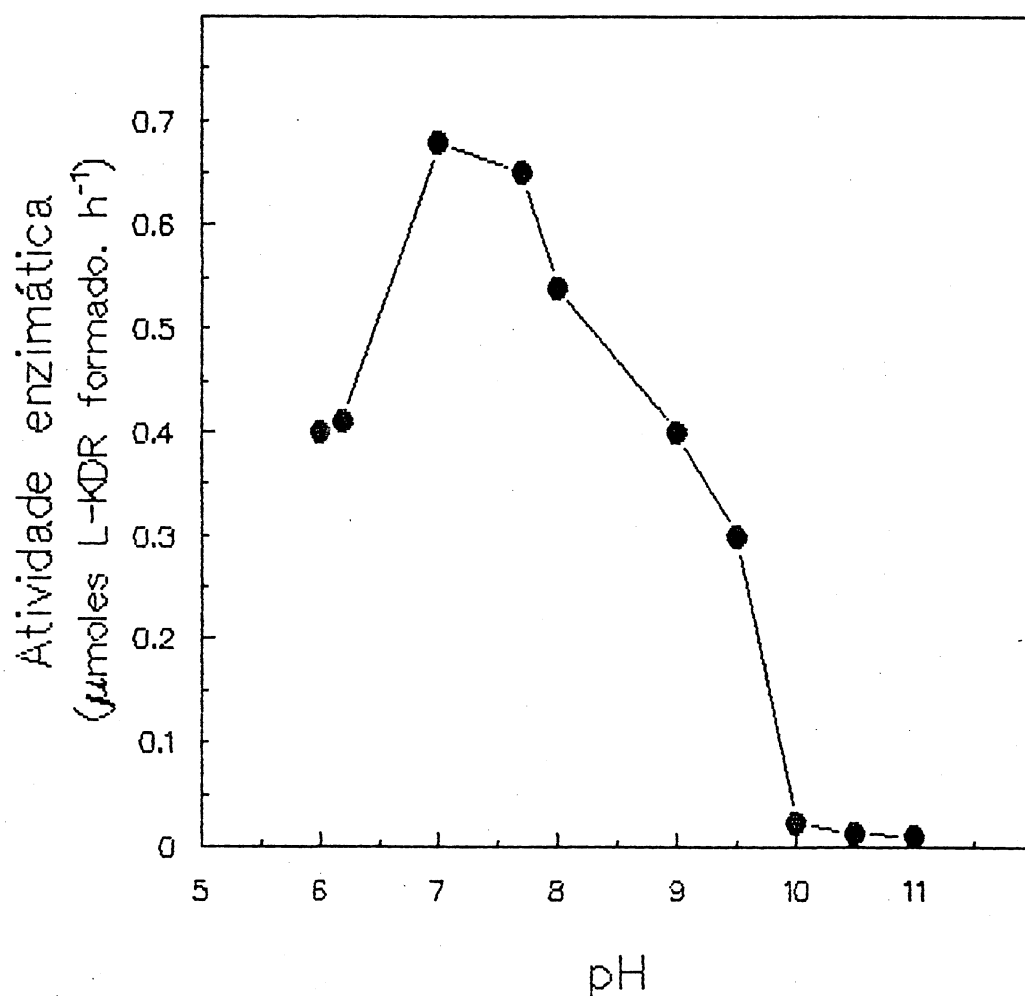


FIGURA 12 - Efeito da variação de pH na atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (0,5 ml) continha 5 µmoles de piruvato de sódio, 4 µmoles de L-lactaldeído, 12 µmoles de tampão no pH especificado pela figura e 0,2 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi realizada por 1 h a 30°C, a formação de L-KDR foi acompanhada pelo método de Weissbach & Hurwitz (84).

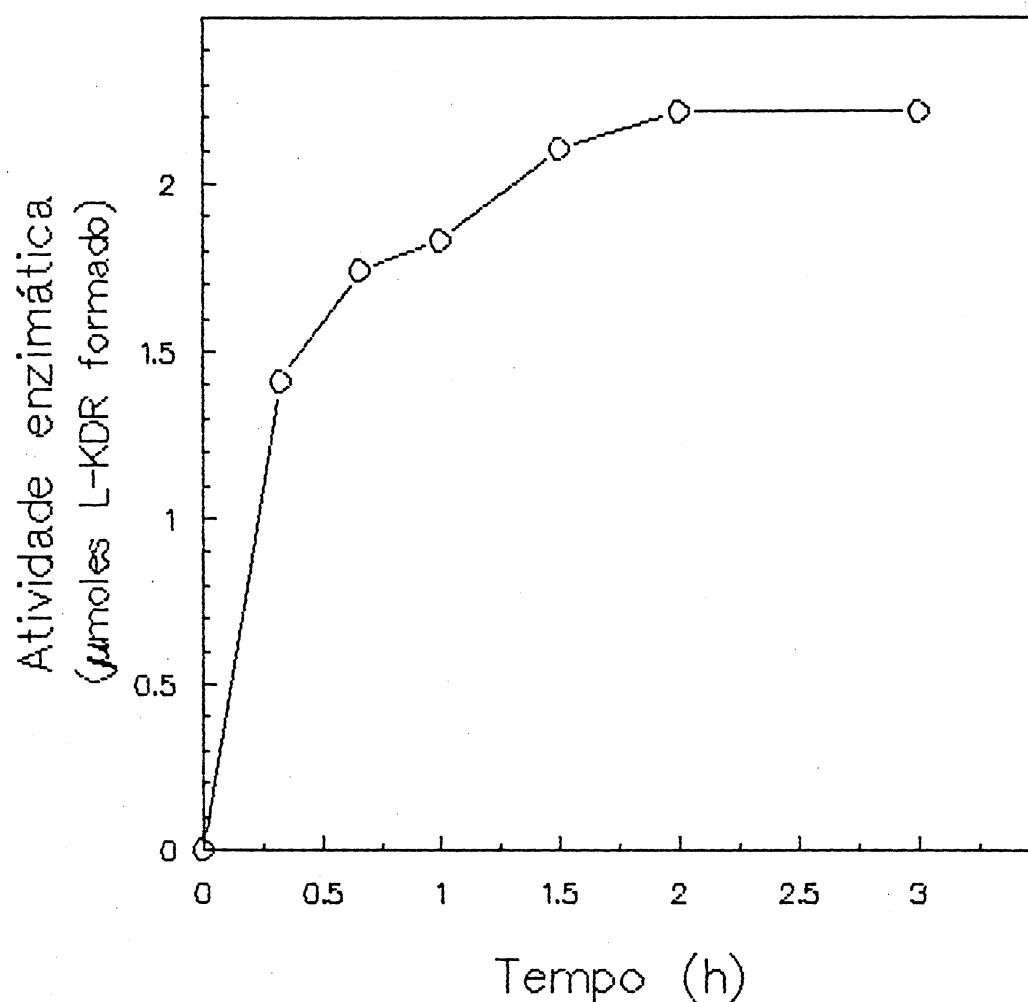


FIGURA 13 - Efeito do tempo na atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (0,5 ml) continha 12 μmoles de tampão fosfato pH 7,0, 5 μmoles de L-lactaldeído e 0,3 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi realizada nos tempos indicados na figura a 30°C, a formação de L-KDR foi acompanhada pelo método de Weissbach & Hurwitz (84).

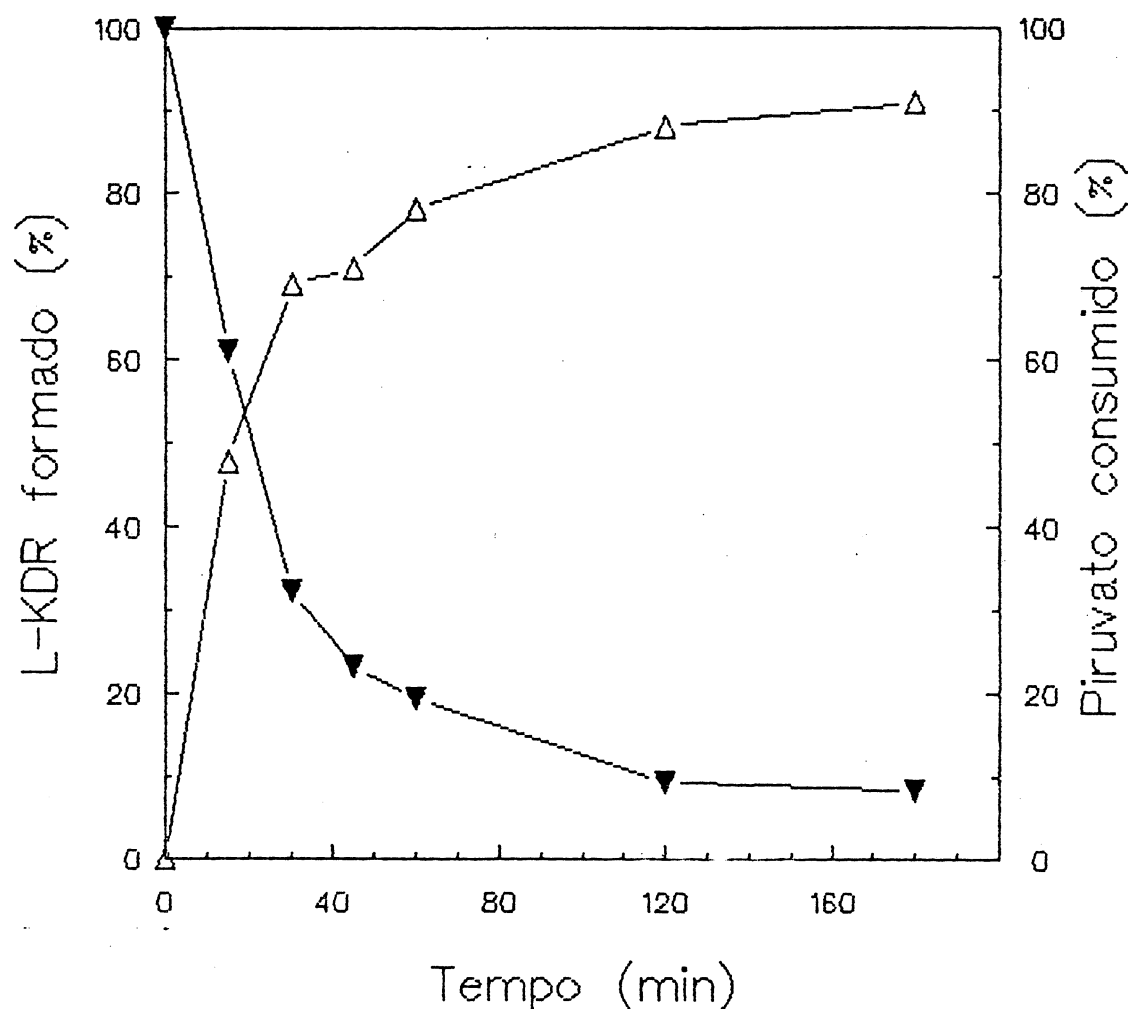


FIGURA 14 - Reversibilidade e equilíbrio da reação da L-KDR aldolase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

A mistura de incubação (0,5 ml), para cada tempo continha 12 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 3 μ moles de piruvato, 2 μ moles de L-lactaldeído e 0,5 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi realizada a 30°C nos tempos indicados na figura. Piruvato foi determinado por LDH (72) e L-KDR pelo método de Weissbach & Hurwitz (84).

L-KDR (Δ)

Piruvato ($\blacktriangledown$)

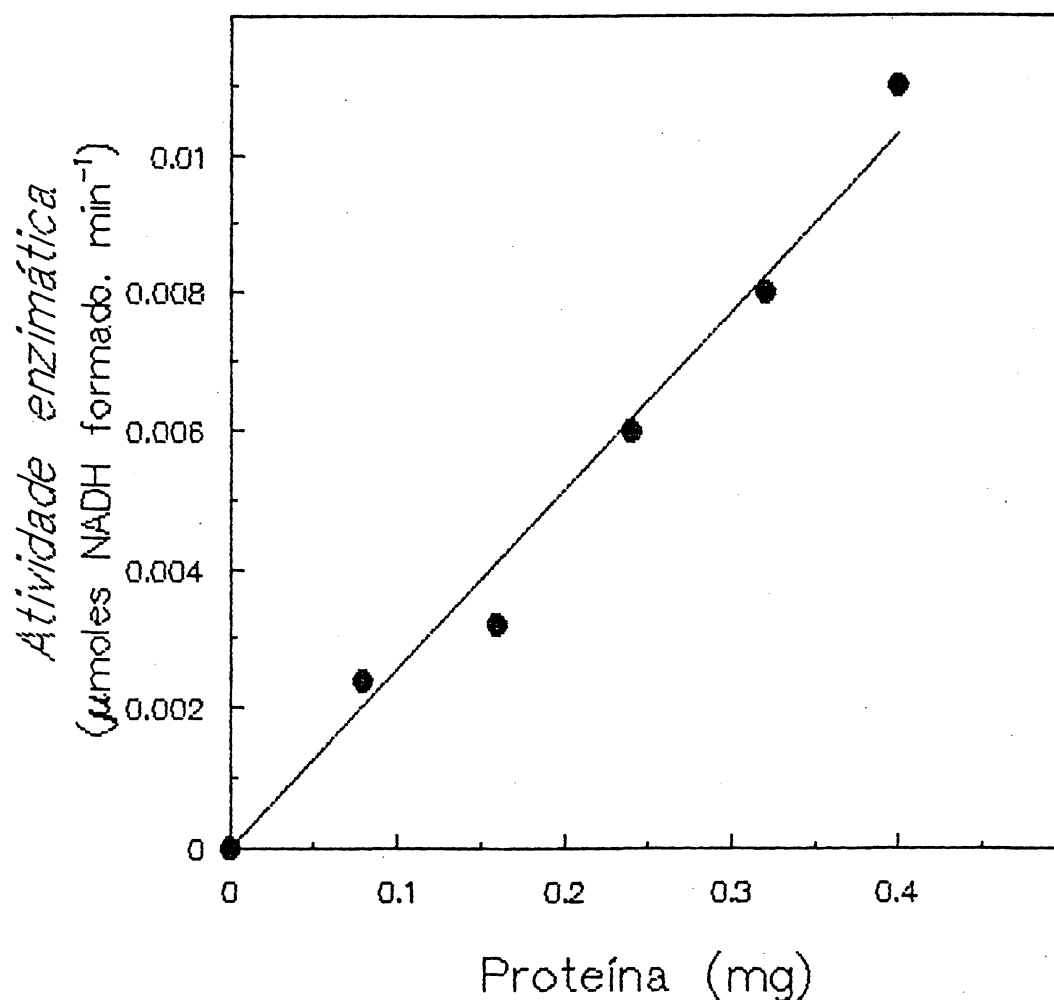


FIGURA 15 - Efeito da concentração de proteína na atividade da lactaldeído desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha 100 μmoles de tampão glicina pH 9,0, 2 μmoles de NAD⁺, 1 μmol de L-lactaldeído e proteína nas quantidades indicadas na figura. A incubação foi realizada a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrito em Materiais e Métodos.

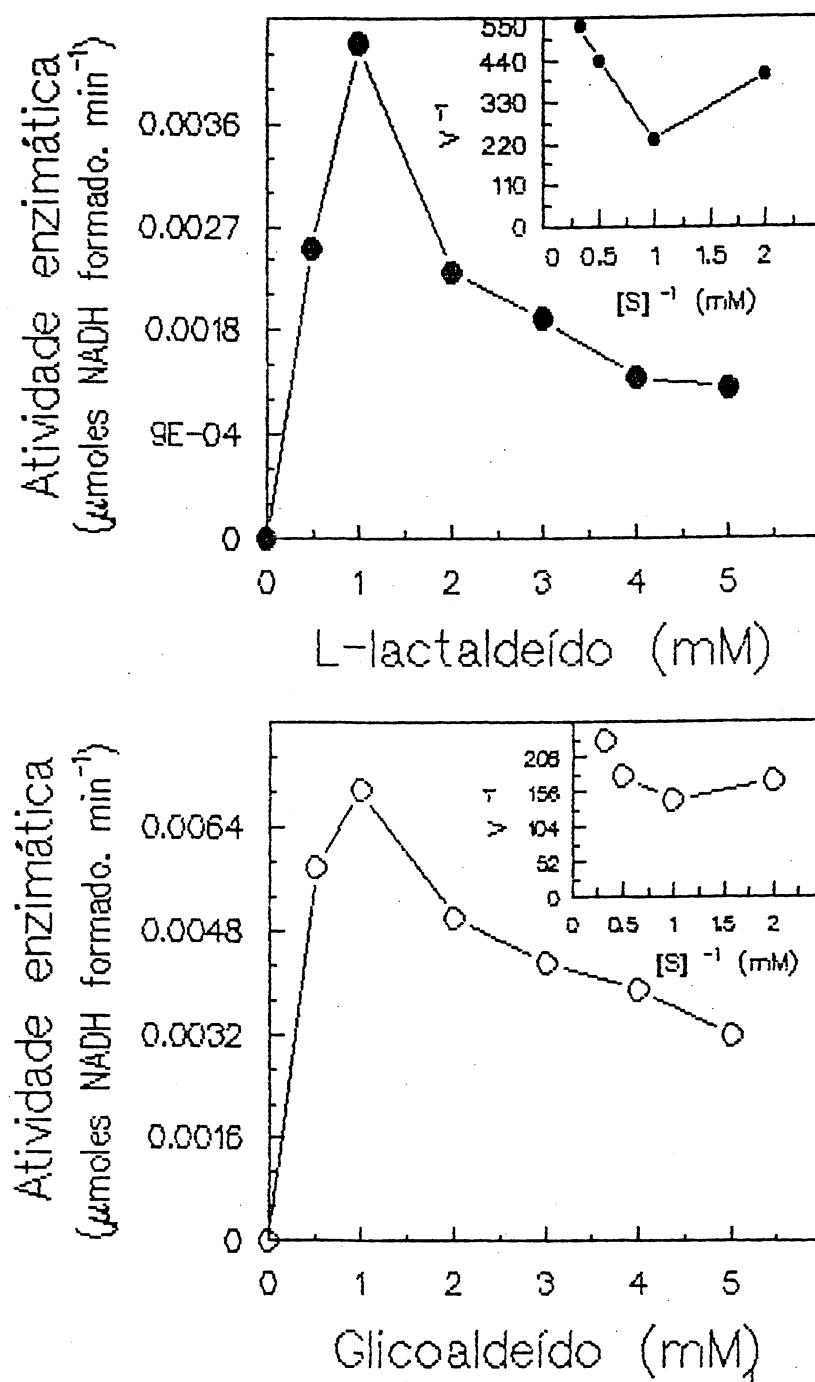


FIGURA 16 - Efeito da concentração de substrato na atividade da lactaldeído desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha 100 μmoles de tampão glicina, 2 μmoles de NAD^+ , 0,16 mg de proteína (fração sulfato de protamina) e L-lactaldeído ou glicolaldeído nas concentrações indicadas. A incubação foi realizada a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrito em Materiais e Métodos.

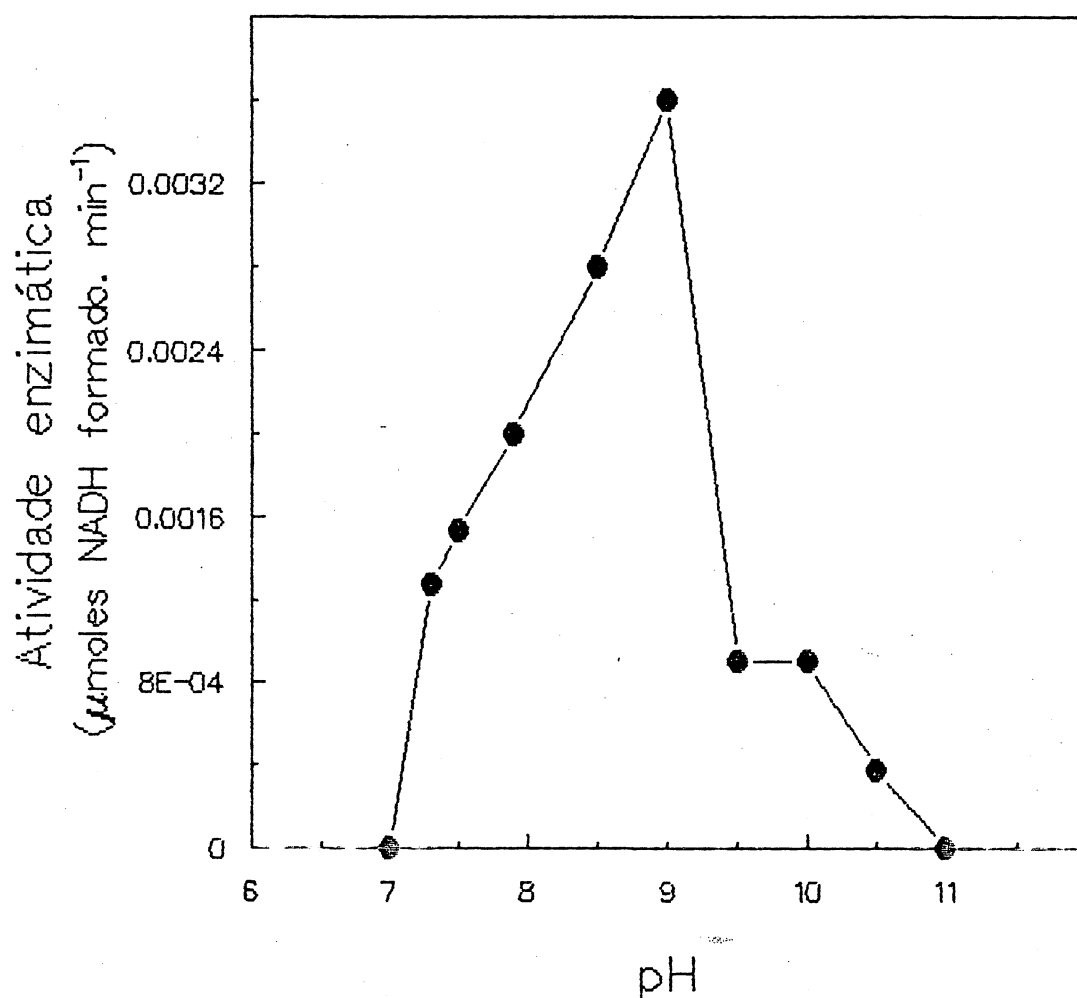


FIGURA 17 - Efeito da variação de pH na atividade da lactaldeído desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568.

O sistema de incubação (1,0 ml) continha 100 μmoles de tampão no pH indicado na figura, 2 μmoles de NAD⁺, 1 μmol de L-lactaldeído e 0,12 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi realizada a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrito em Materiais e Métodos.

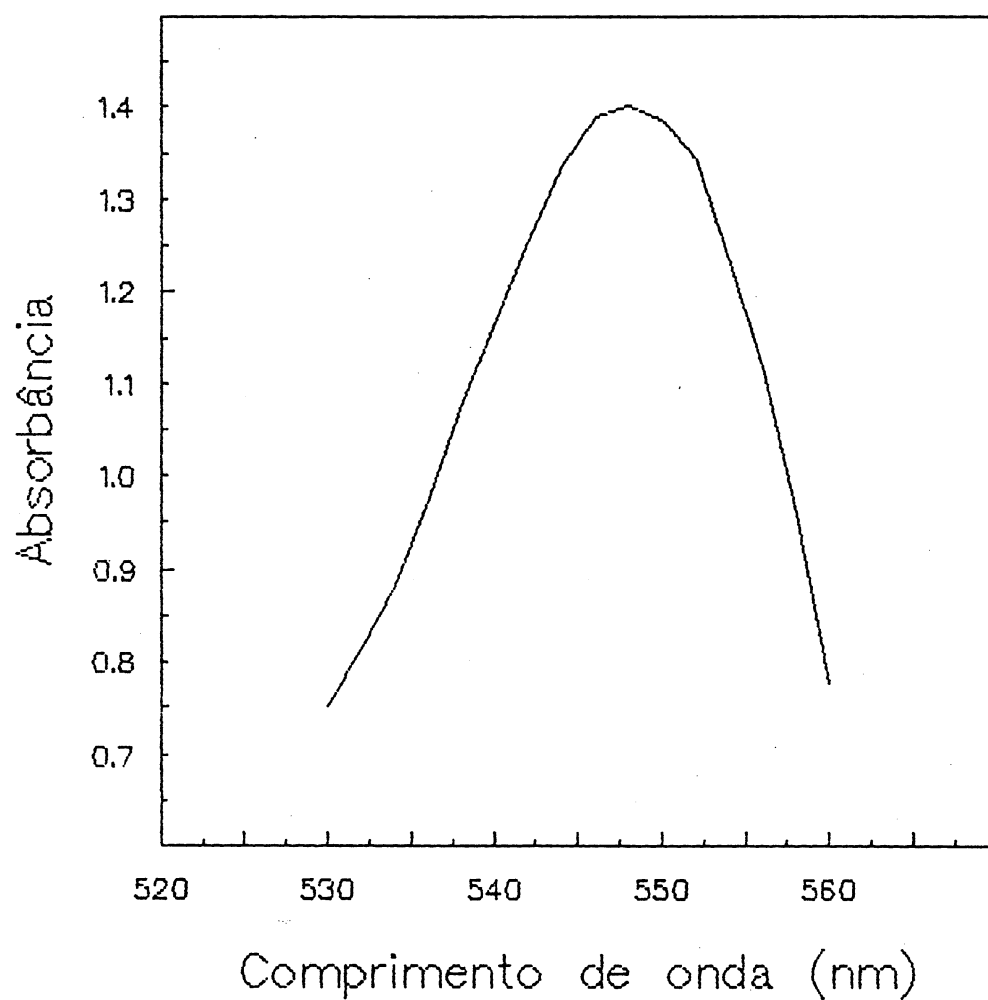


FIGURA 18 - Espectro de absorção do derivado obtido a partir do produto reação catalisada pela L-rhamnonato desidratase.

O cromógeno foi preparado segundo a técnica de Weissbach & Hurwitz (84).

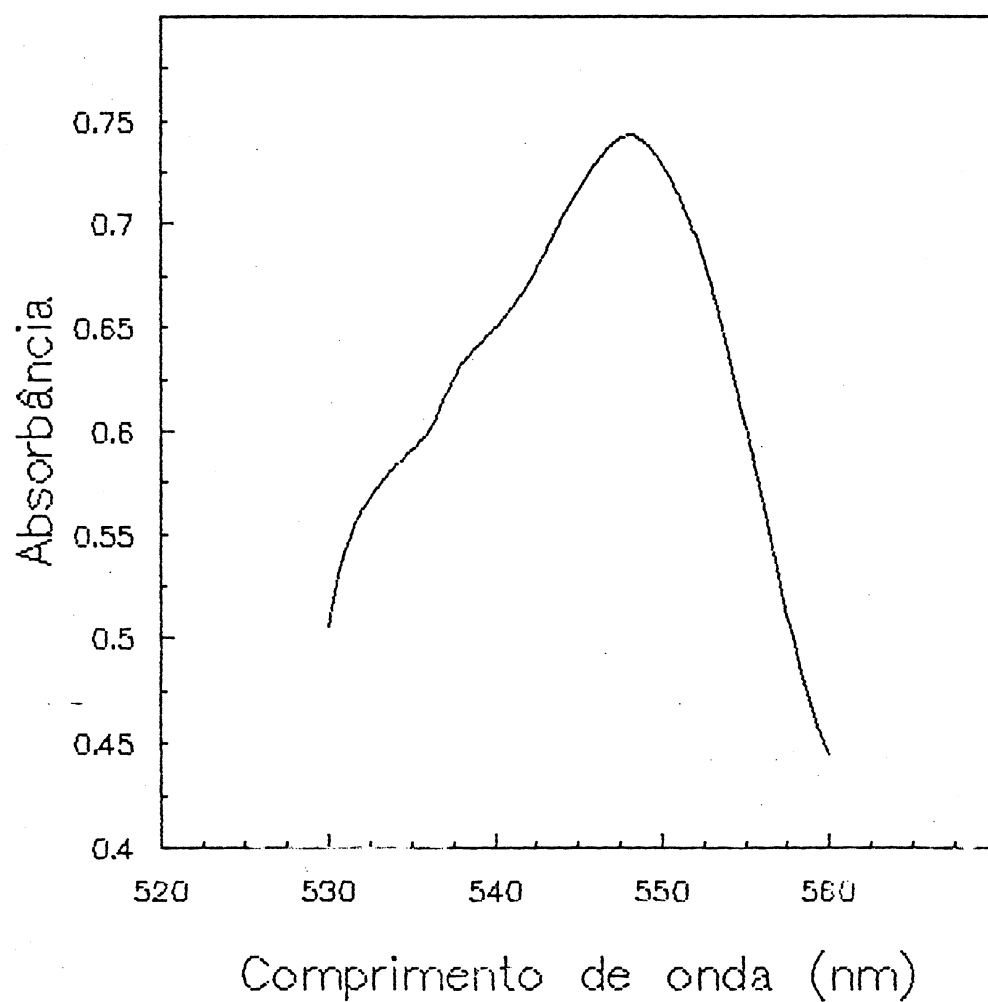


FIGURA 19 - Espectro de absorção do derivado obtido a partir do produto da reação catalisada pela 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase.

O cromógeno foi preparado segundo a técnica de Weissbach & Hurwitz (84).

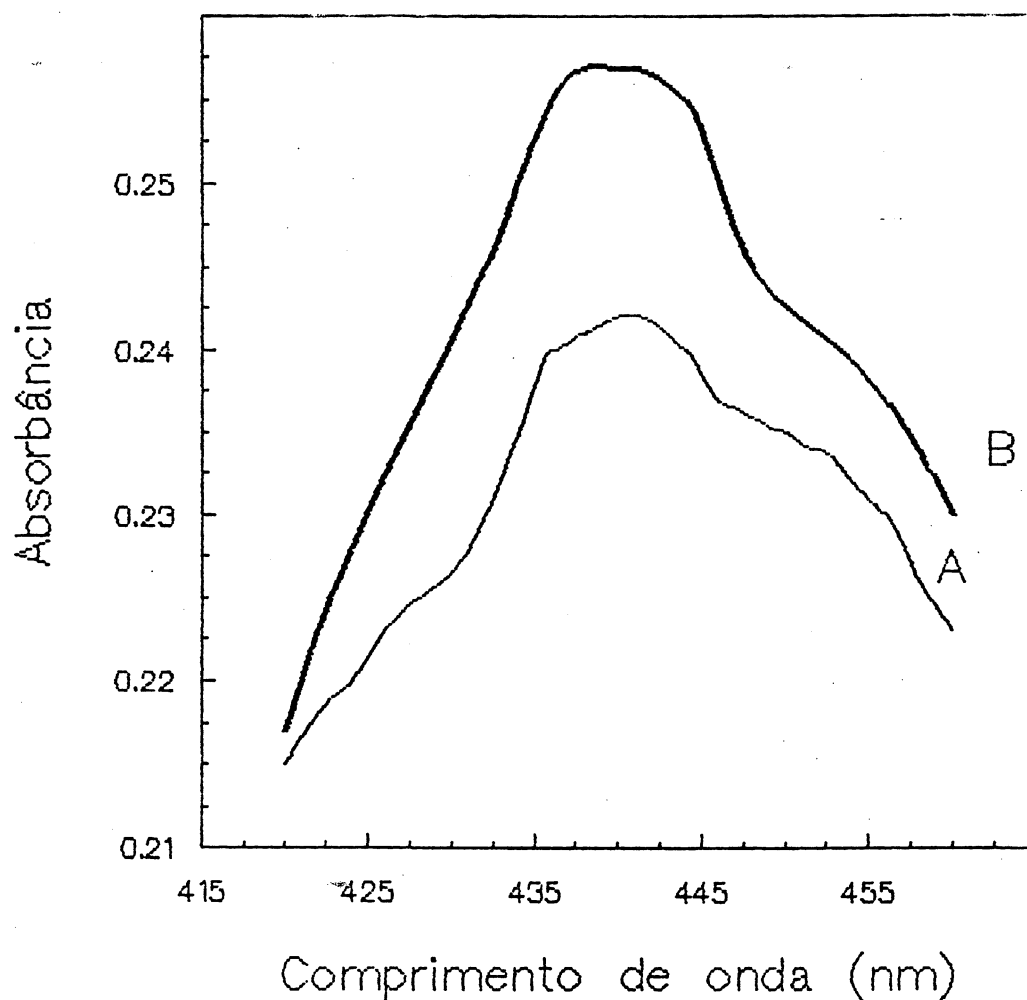


FIGURA 20 - Identificação do produto da reação catalisada pela lactaldeído desidrogenase

A lactaldeído desidrogenase foi ensaiada de acordo com Materiais e Métodos. O produto desta reação foi tratado com excesso de lactato desidrogenase e após 6 h de incubação a mistura foi submetida a técnica da 2,4-dinitrofenilhidrazina (63).

a) Fenilhidrazona do produto da reação da lactaldeído desidrogenase.

b) Fenilhidrazona do piruvato padrão.

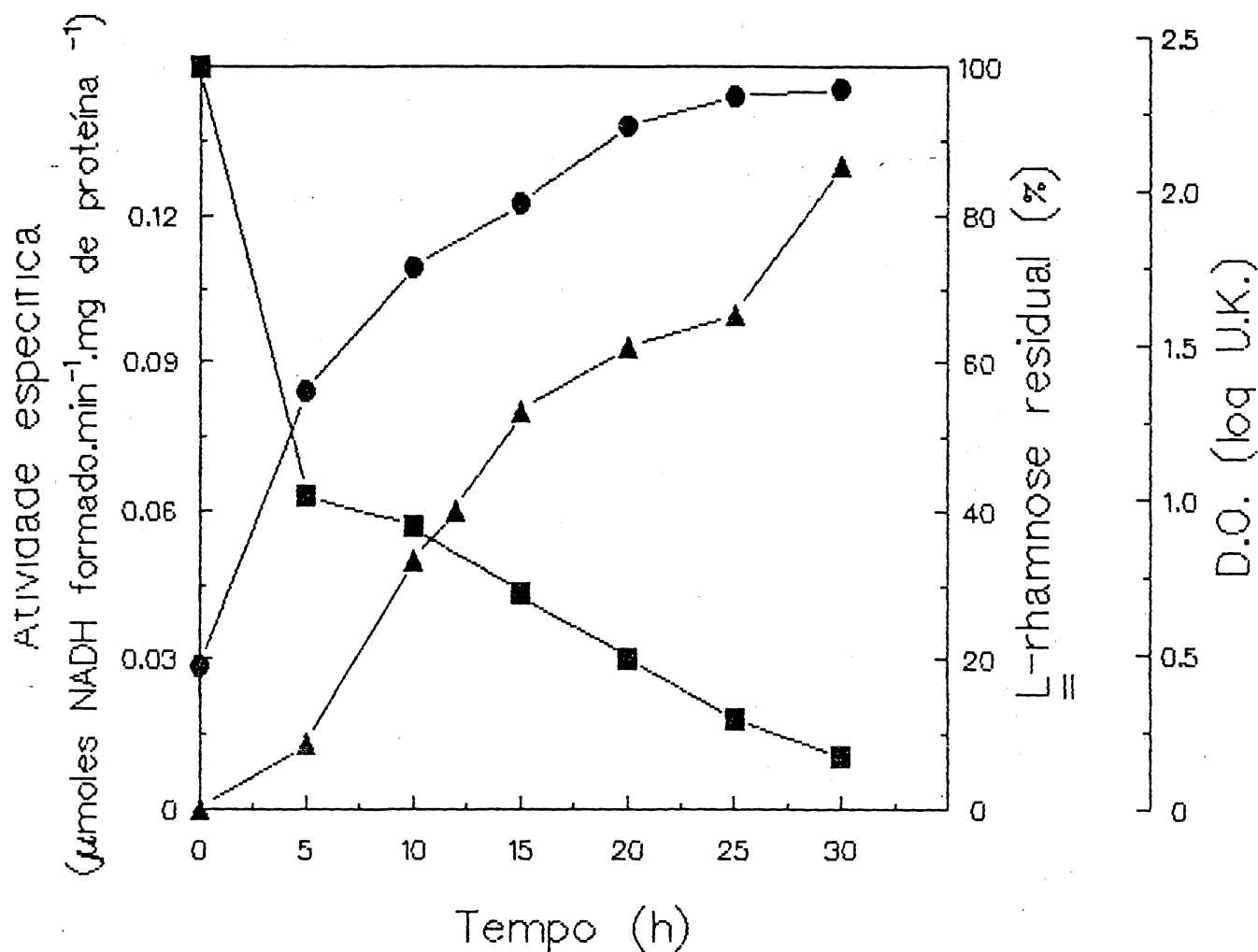


FIGURA 21 - Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da L-rhamnose desidrogenase em células de *Pichia stipitis* NRC 5568 em crescimento.

Células de *Pichia stipitis* NRC 5568 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (●) em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro verde nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) nos meios de cultivo e a atividade da L-rhamnose desidrogenase (▲) nos extratos livre de células.

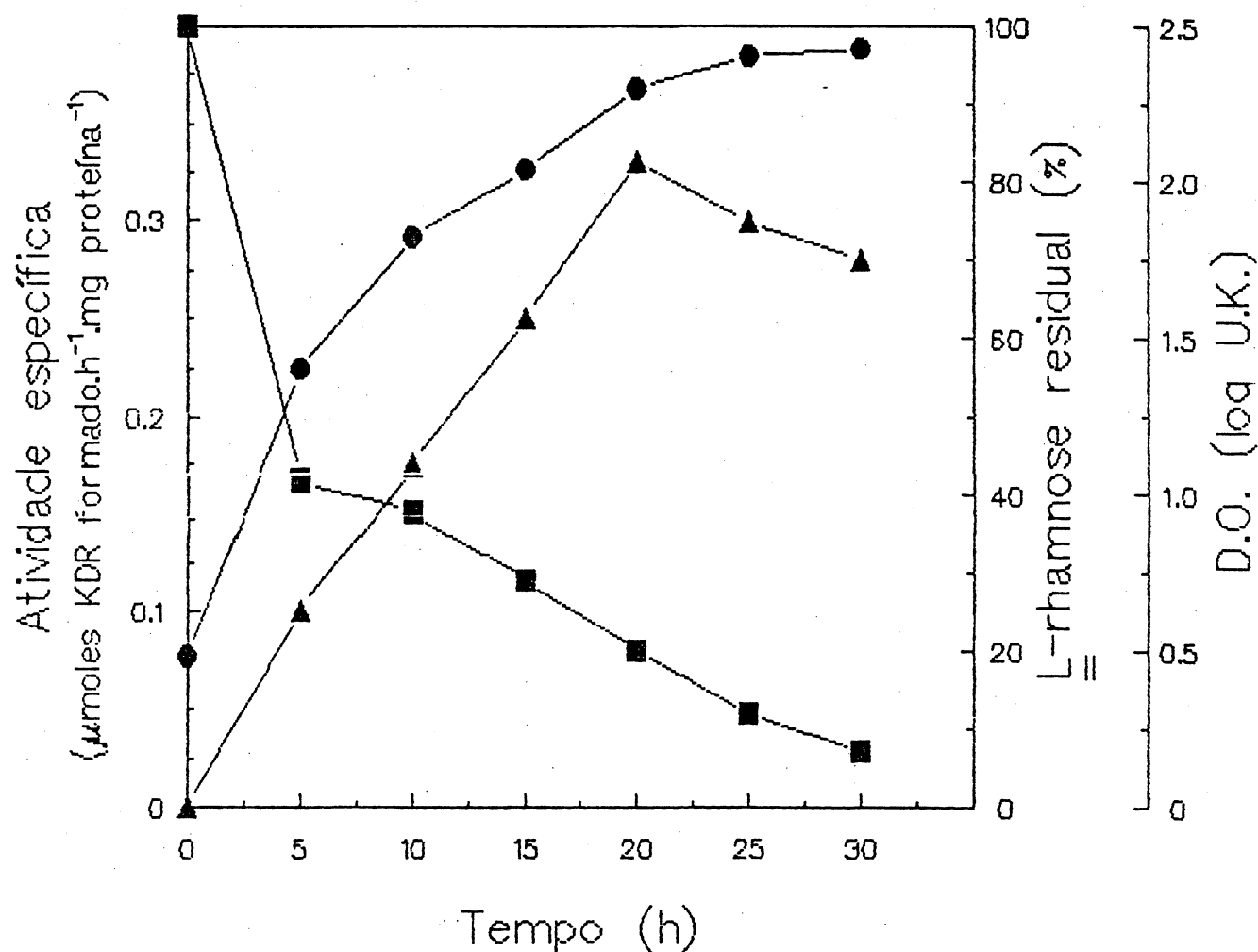


FIGURA 22 - Efeito da L-rhamnose sobre síntese da L-rhamnonato desidratase em células de *Pichia stipitis* NRC 5568 em crescimento.

Células de *Pichia stipitis* NRC 5568 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose conforme descrito em Materiais e Métodos item (2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (●) em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) nos meios de cultivo e a atividade da L-rhamnonato desidratase (▲) nos extratos livres de células.

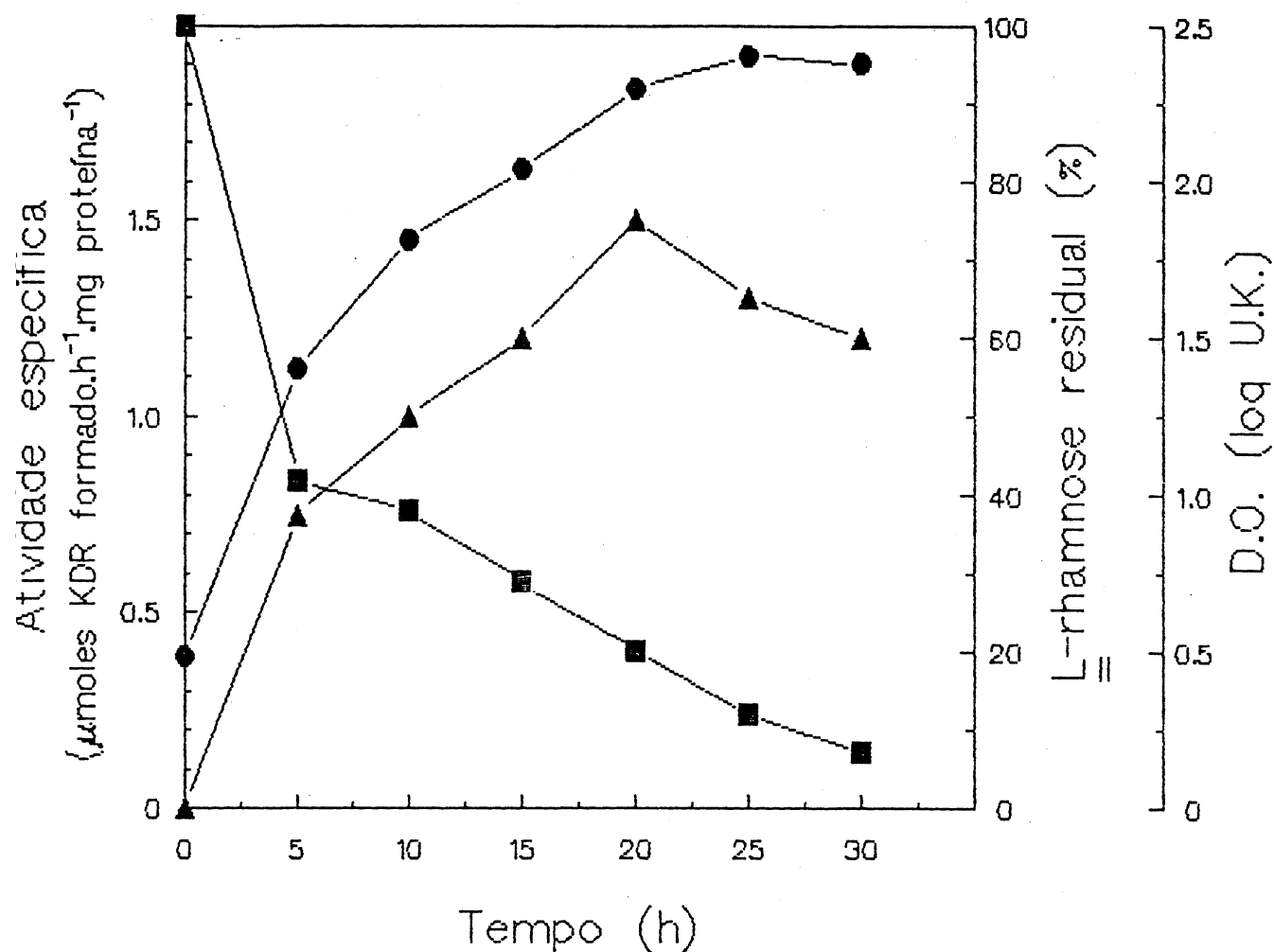


FIGURA 23 - Efeito da L-rhamnose sobre síntese da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase em células de *Pichia stipitis* NRC 5568 em crescimento.

Células de *Pichia stipitis* NRC 5568 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (●) em fotocolorímetro equipado de filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) nos meios de cultivo e atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase (▲) nos extratos livre de células.

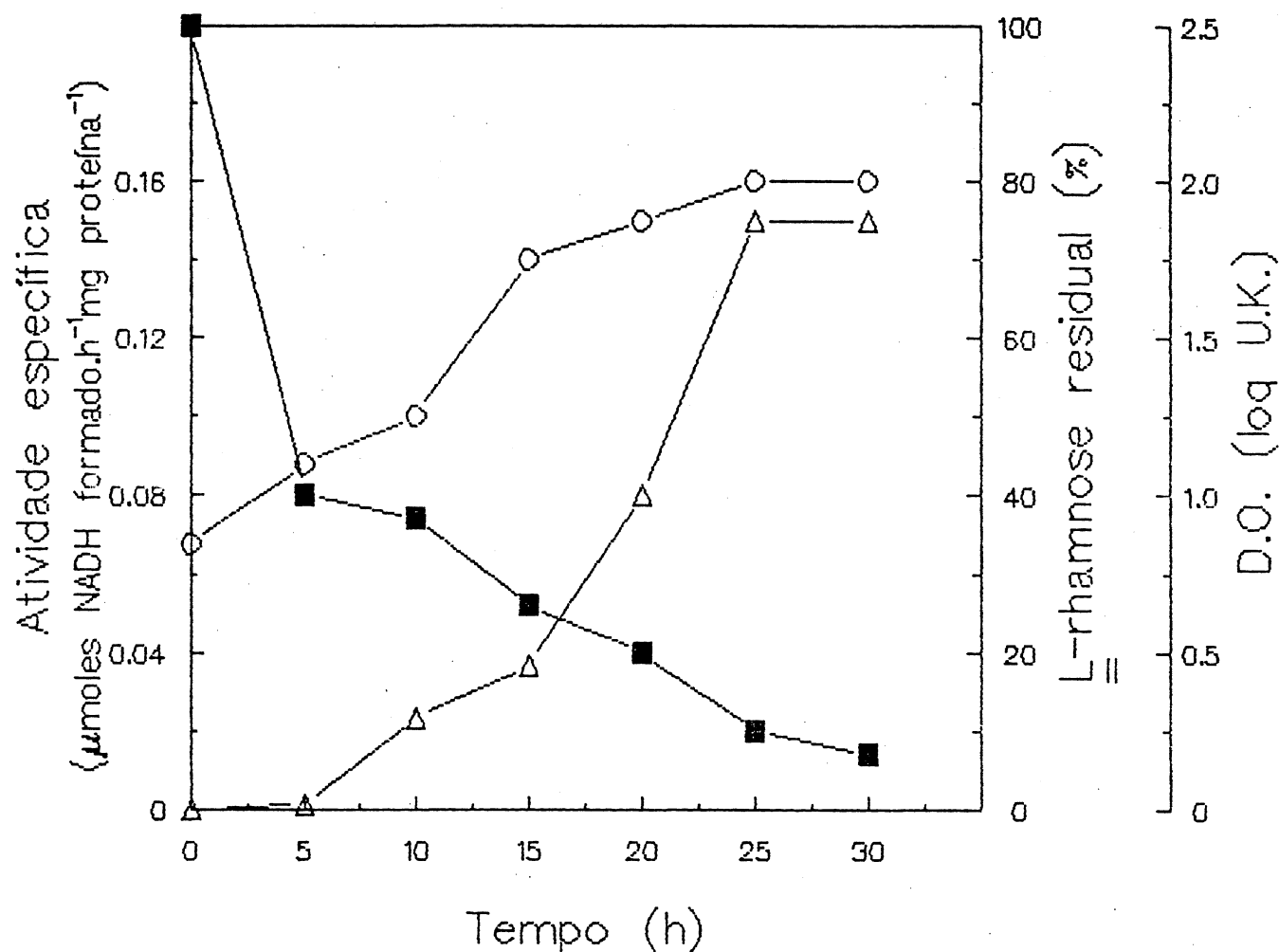


FIGURA 24 - Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da L-rhamnose desidrogenase em células de *Pichia stipitis* (PR1) em crescimento.

Células de *Pichia stipitis* PR1 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (○) em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) nos meios de cultivo e a atividade da L-rhamnose desidrogenase (Δ) nos extratos livre de células.

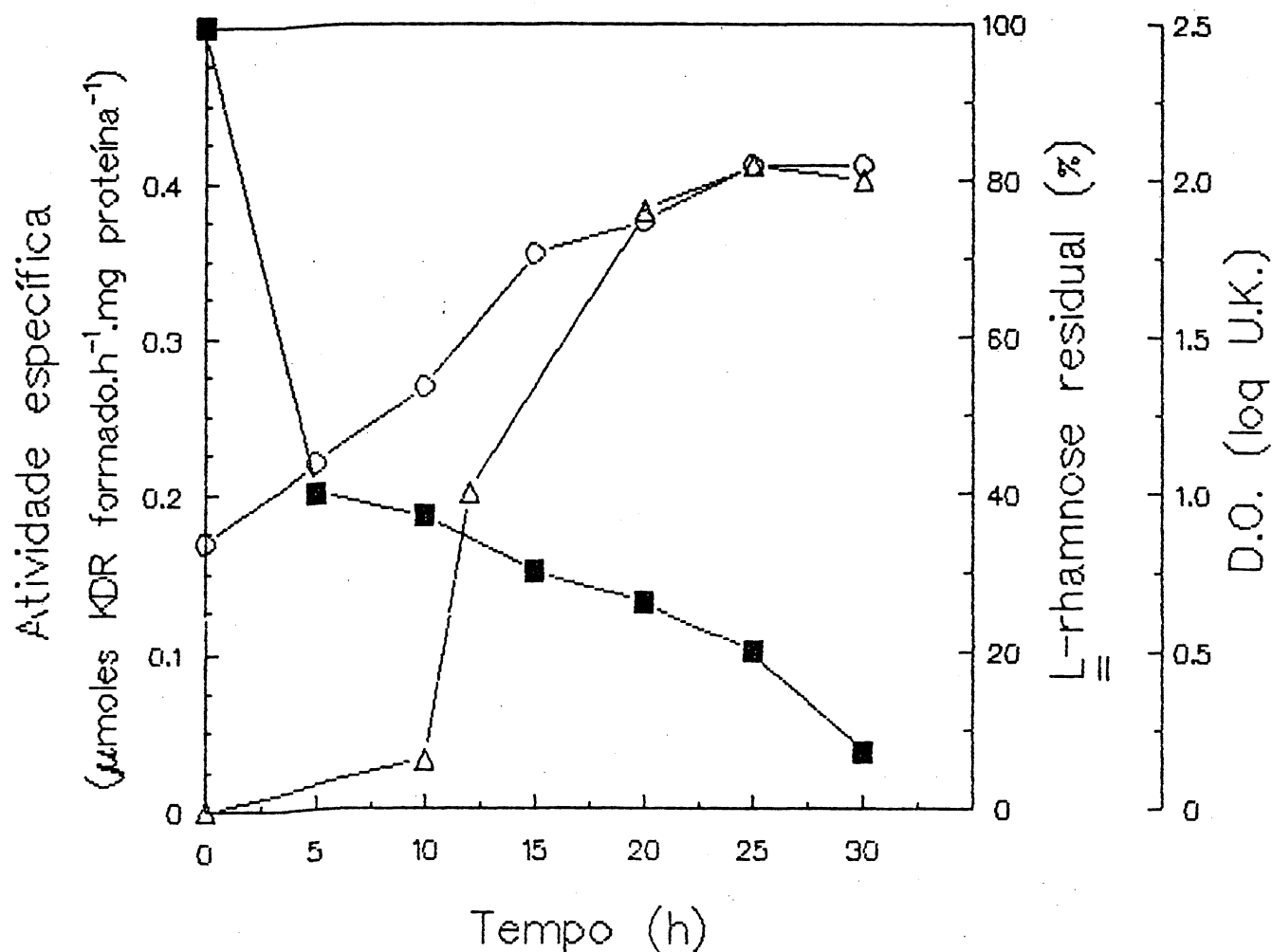


FIGURA 25 - Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da desidratase em células de *Pichia stipitis* (PR1) em crescimento.

Células de *Pichia stipitis* PR1 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (O) em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) nos meios de cultivo e a atividade da L-rhamnonato desidratase (Δ) nos extratos livres de células.

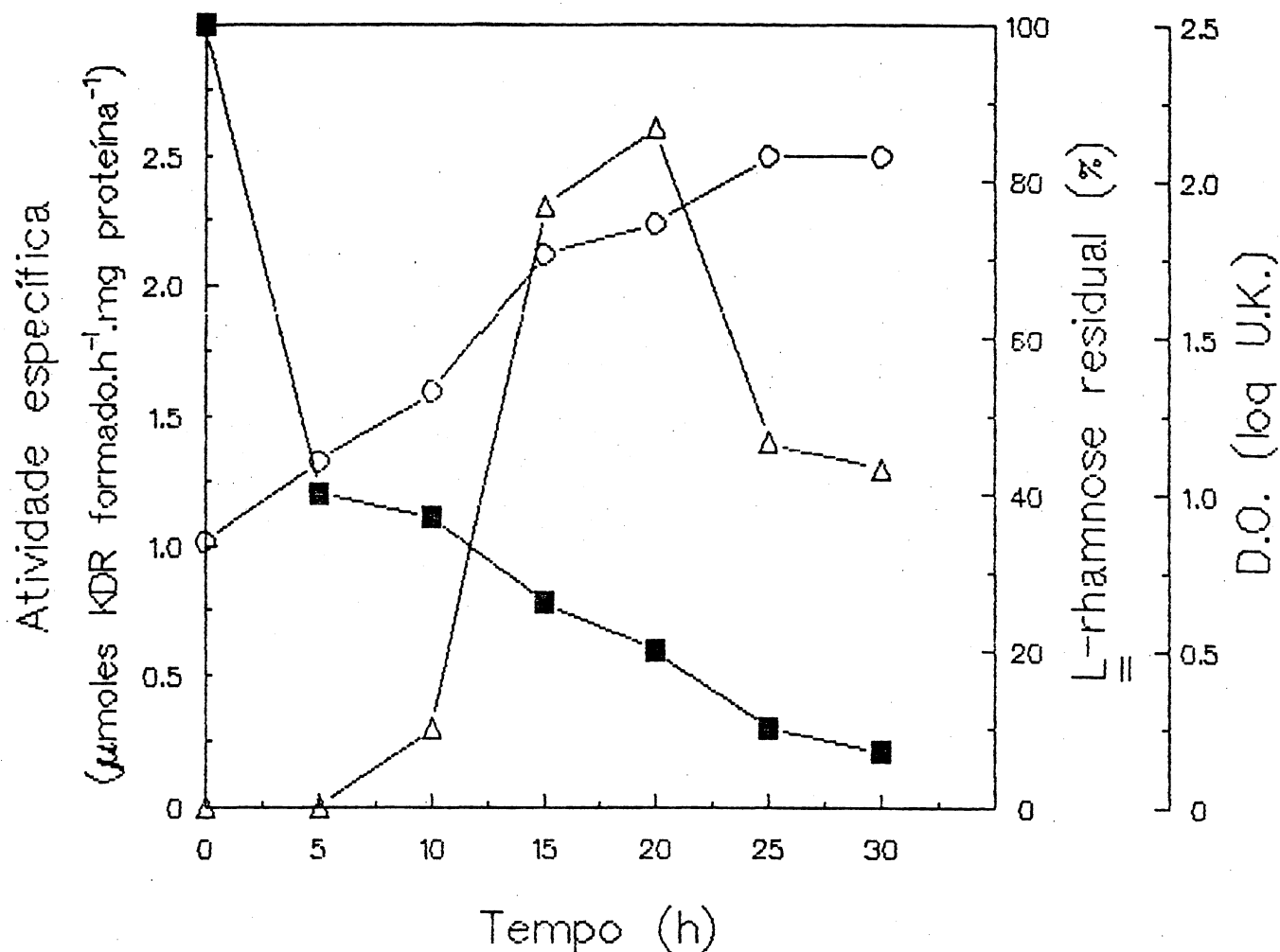


FIGURA 26 - Efeito da L-rhamnose sobre a síntese da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase em células de *Pichia stipitis* (PR1) em crescimento.

Células de *Pichia stipitis* PR1 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez ($\circ$) em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose ($\blacksquare$) nos meios de cultivo e a atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase (Δ) nos extratos livres de células.

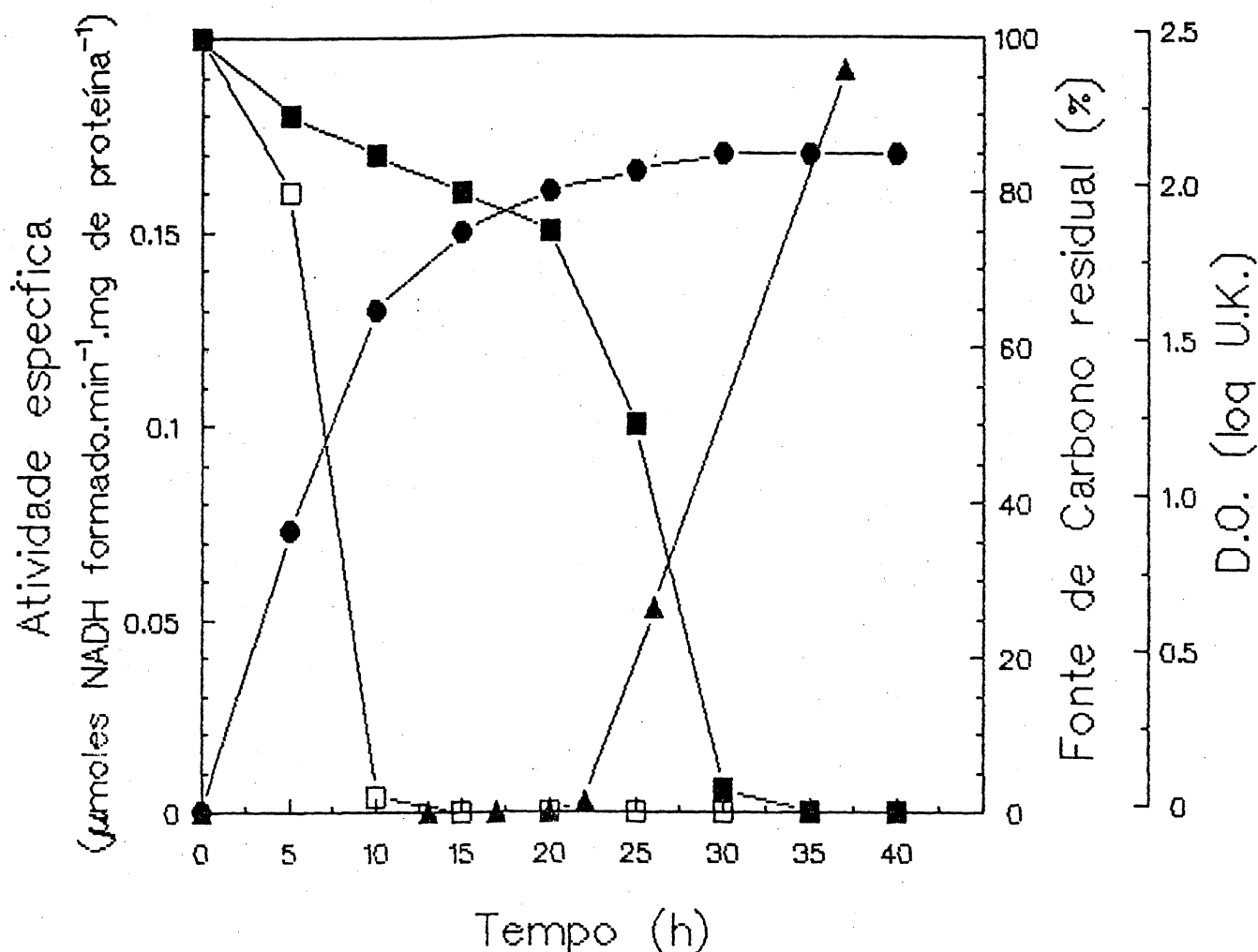


Figura 27 - Repressão da síntese da L-rhamnose desidrogenase por D-glucose em células de *Pichia stipitis* NRC 5568.

Células de *Pichia stipitis* NRC 5568 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose mais 0,2 % de D-glucose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (●) em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) e D-glucose (□) nos meios de cultivo e a atividade da L-rhamnose desidrogenase (▲) nos extratos livre de células.

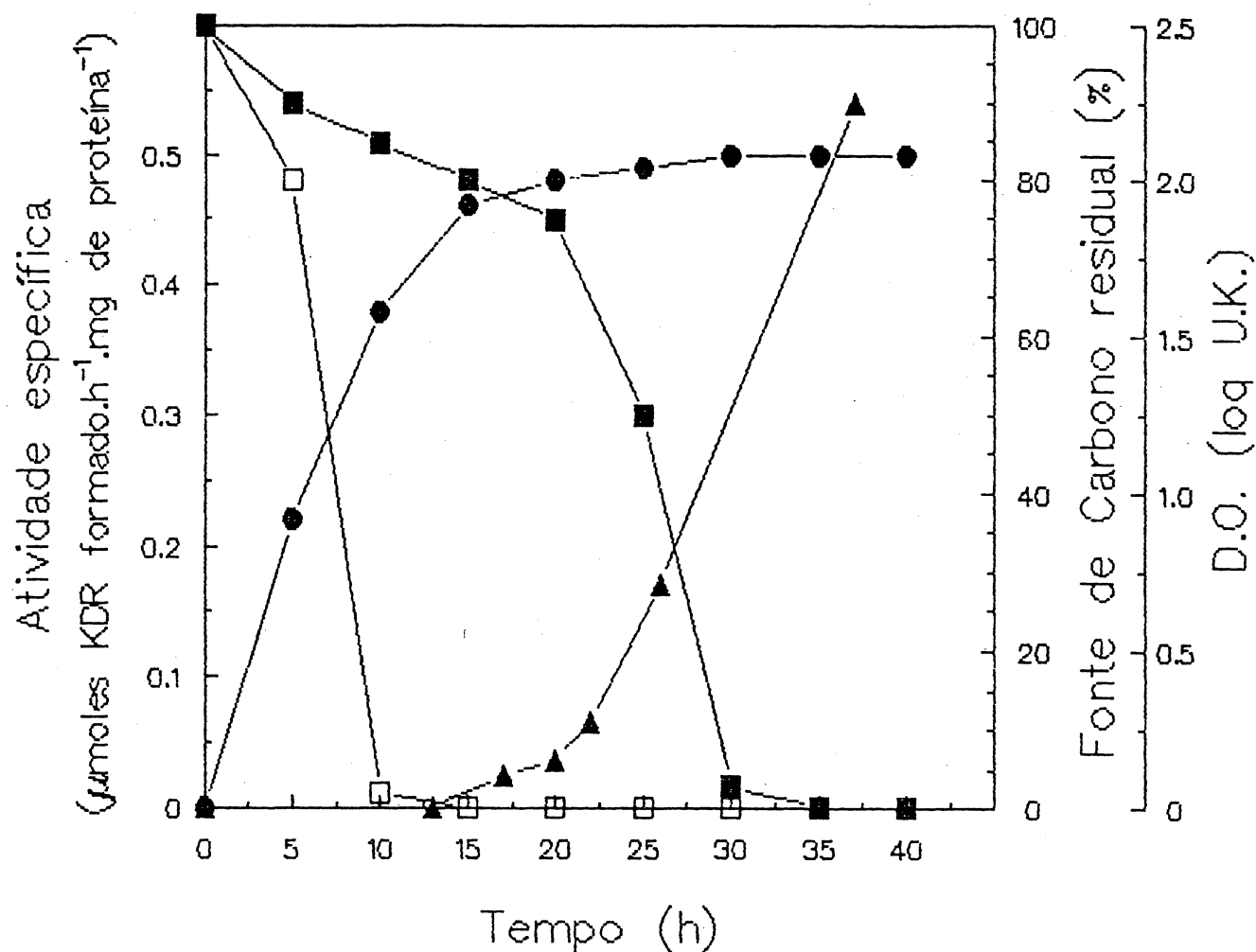


Figura 28 - Repressão da síntese da L-rhamnonato desidratase por D-glucose em células de *Pichia stipitis* NRC 5568.

Células de *Pichia stipitis* NRC 5568 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose mais 0,2 % de D-glucose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (●) em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) e de D-glucose (□) nos meios de cultivo e a atividade da L-rhamnonato desidratase (▲) nos extratos livre de células.

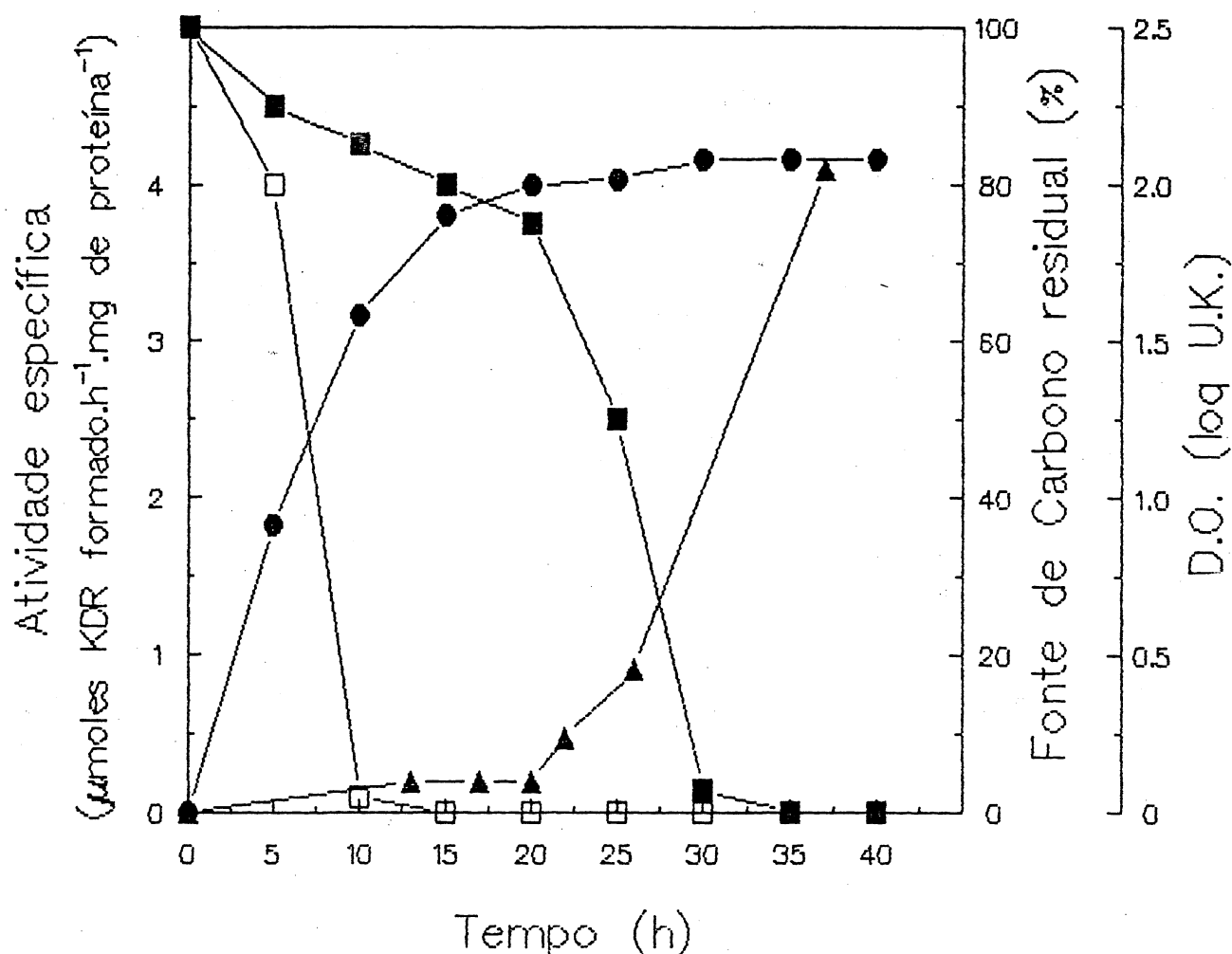


Figura 29 - Repressão da síntese da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase por D-glucose em células de *Pichia stipitis* NRC 5568.

Células de *Pichia stipitis* NRC 5568 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose mais 0,2 % de D-glucose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (●) em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) e D-glucose (□) nos meios de cultivo e a atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase (▲) nos extratos livre de células.

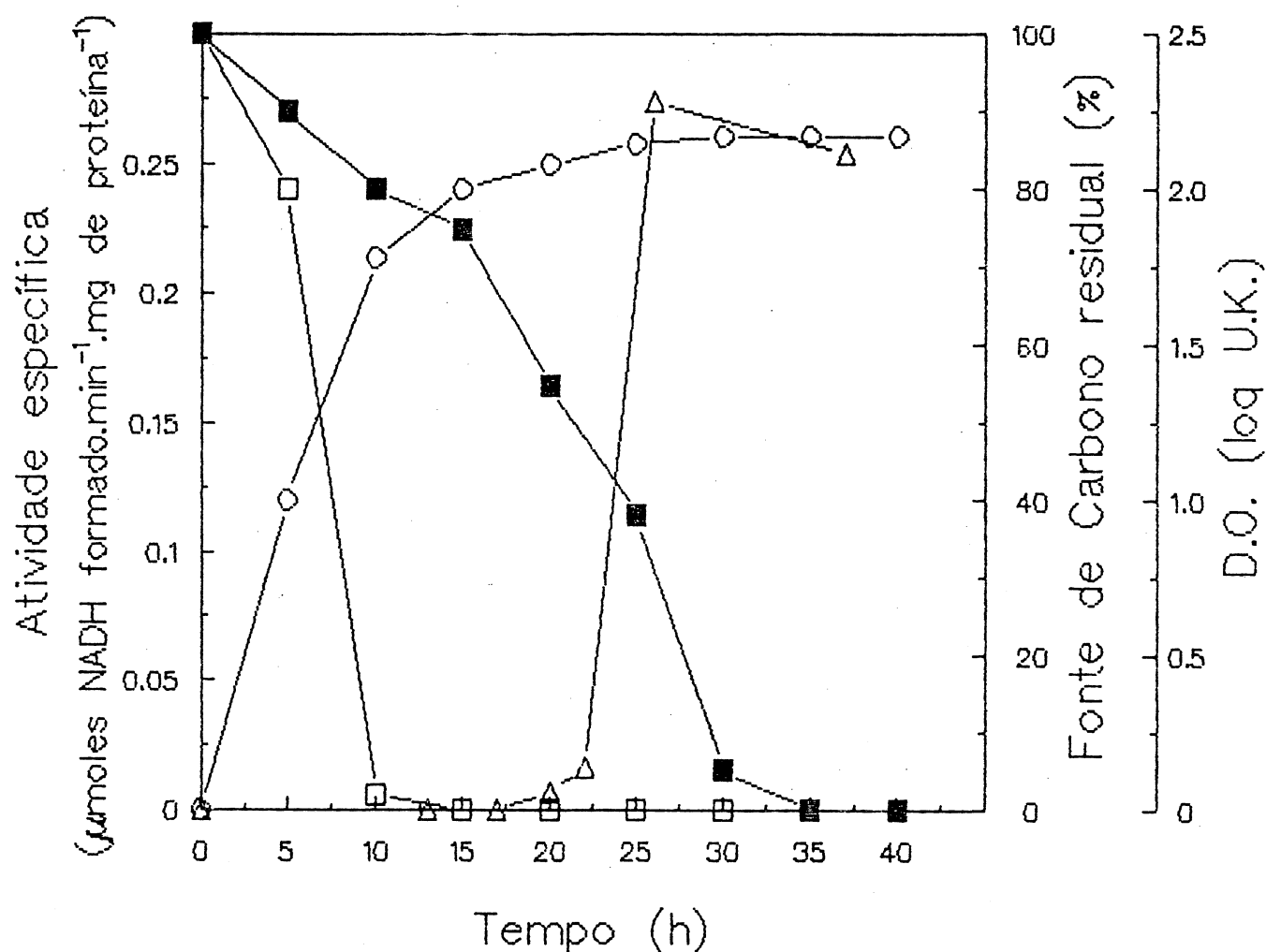


Figura 30 - Repressão da síntese da L-rhamnose desidrogenase por D-glucose em células de *Pichia stipitis* PR1.

Células de *Pichia stipitis* PR1 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose mais 0,2 % de D-glucose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (O) em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) e D-glucose (□) nos meios de cultivo e a atividade da L-rhamnose desidrogenase (Δ) nos extratos livre de células.

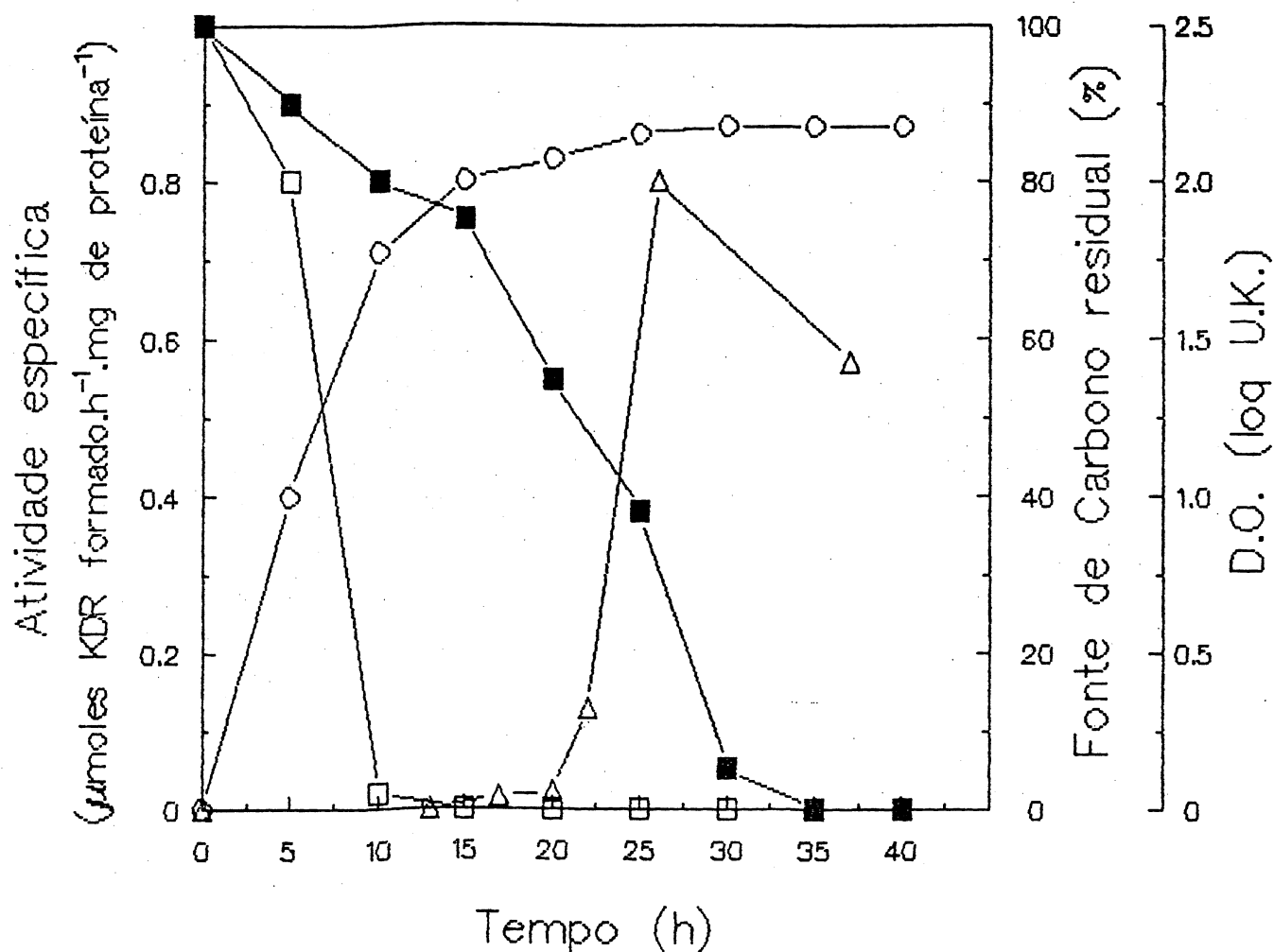


Figura 31 - Repressão da síntese da L-rhamnonato desidratase por D-glucose em células de *Pichia stipitis* PR1.

Células de *Pichia stipitis* PR1 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose mais 0,2 % de D-glucose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (○) em fotocolorímetro Klett-Summerson com filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) e D-glucose (□) nos meios de cultivo e a atividade da L-rhamnonato desidratase (△) nos extratos livre de células.

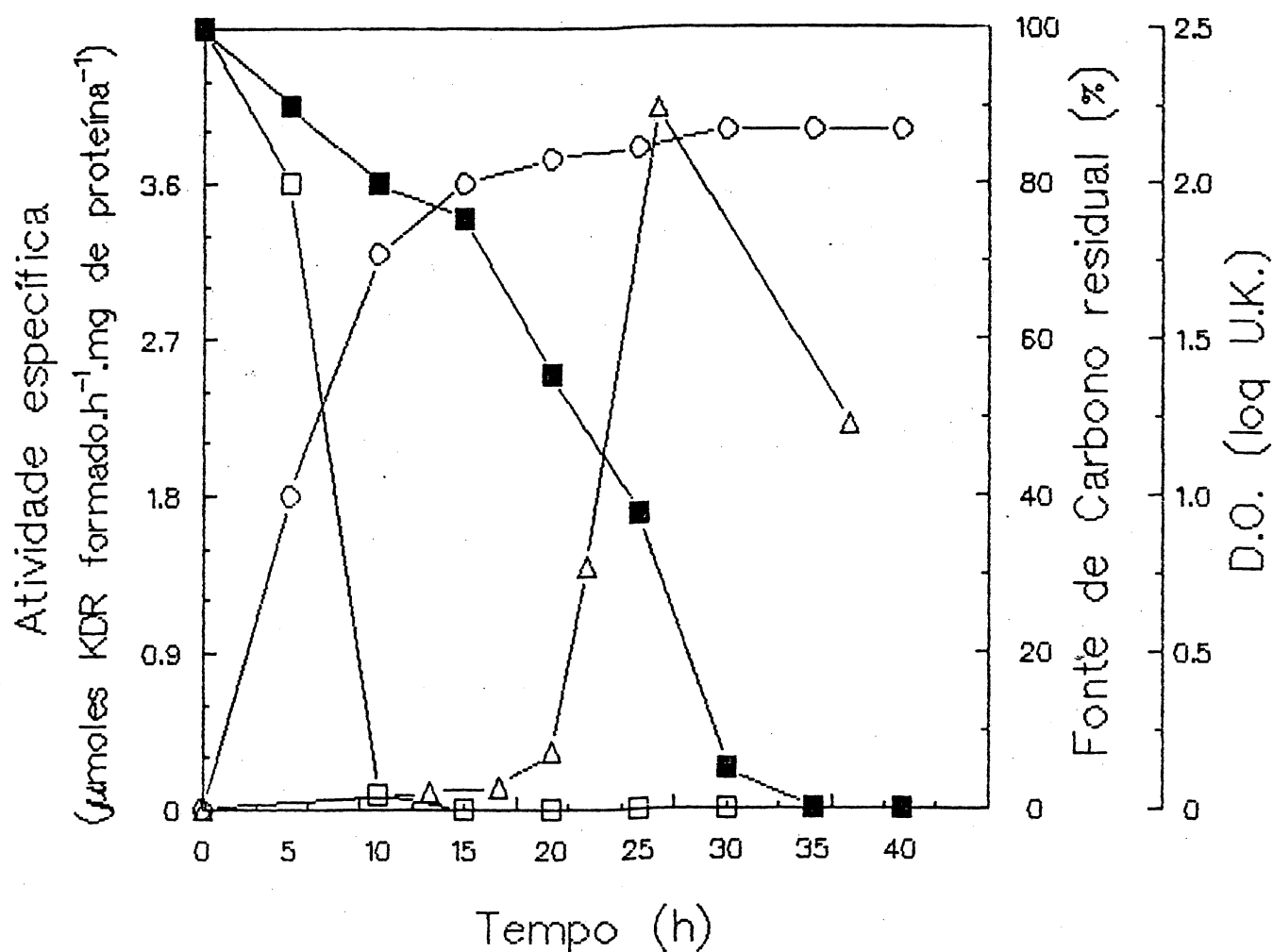


Figura 32 -Repressão da síntese da L-KDR aldolase por D-glucose em células de *Pichia stipitis* PR1.

Células de *Pichia stipitis* PR1 foram cultivadas em meio líquido contendo 0,2 % de L-rhamnose mais 0,2 % de D-glucose conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). Nos tempos indicados o crescimento foi acompanhado pelas leituras de turbidez (O) em fotocolorímetro Klett-Summerson com filtro nº 54. Foram determinadas as concentrações de L-rhamnose (■) e D-glucose (□) nos meios de cultivo e a atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase (Δ) nos extratos livre de células.

Tabela I: Atividade específica das enzimas da via metabólica da L-rhamnose em *Pichia stipitis* NRC 5568

Enzimas	Atividade específica	
	Extrato bruto	Fração sulfato de protamina
<u>L</u> -rhamnose desidrogenase *	0,064	0,1
<u>L</u> -rhamnono- γ -lactonase *	zero	zero
<u>L</u> -rhamnonato desidratase **	0,5	0,83
2-ceto-3-desoxi <u>L</u> -rhamnonato aldolase **	2	3,3
Lactaldeído desidrogenase *	0,02	0,03

* = atividade específica expressa em μmoles de produto formado (ou substrato consumido). $\text{minuto}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$

** = atividade específica expressa em μmoles de produto formado (ou substrato consumido). $\text{hora}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$

Tabela II: Efeito de diferentes nucleotídeos pirídínicos oxidados e reduzidos na atividade da L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568

Nucleotídeo	Atividade específica ($\mu\text{moles produto formado. min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$)
NAD ⁺	0,1
NADH	zero
NADP ⁺	zero
NADPH	zero

A mistura de reação com volume final de 1,0 ml, continha: 35 μmoles de tampão carbonato bicarbonato pH 9,5, 2 μmoles de L-rhamnose, 1 μmol de nucleotídeo e 0,06 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi feita a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrita em Materiais e Métodos.

Tabela III: Efeito de diferentes substratos na atividade da L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568

Substrato	Atividade relativa %
<u>L</u> -rhamnose	100
<u>L</u> -manose	6
<u>L</u> -arabinose	4
<u>L</u> -fucose	zero
<u>D</u> -glucose	4
<u>D</u> -galactose	zero
<u>D</u> -manose	zero
<u>D</u> -frutose	zero

A mistura de reação com volume final de 1.0 ml, continha 35 μ moles de tampão carbonato bicarbonato pH 9.5, 2 μ moles de monossacarídeo, 1 μ mol de NAD^+ e volume adequado de proteína da fração sulfato de protamina (Atividade Específica = 0,1 U. mg^{-1}). A incubação foi feita a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrito em Materiais e Métodos.

Tabela IV: Efeito de diferentes reagentes na atividade da L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568

Reagentes	Atividade relativa %
Sem	100
NH ₄ NO ₃	123
(NH ₄) ₂ SO ₄	143
H ₃ C-COONa	145
EDTA	126
MgSO ₄	100
MgCl ₂	100
NaCl	80
CuSO ₄	zero
CaCl ₂	zero
MnCl ₂	zero

A mistura de reação com volume final de 1,0 ml, continha 35 μ moles de tampão carbonato bicarbonato pH 9,5, 2 μ moles de L-rhamnose, 1 μ mol de NAD⁺, 5 μ moles de cada reagente e volume adequado de proteína da fração sulfato de protamina (Atividade Específica = 0,1 U. mg⁻¹). A incubação foi feita a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrito em Materiais e Métodos.

Tabela V: Efeito de diferentes aldeídos na atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase de *Pichia stipitis* NRC 5568

Aldeído	Atividade relativa %
L-lactaldeído	100
D-lactaldeído	75
Piruvaldeído	308
Formaldeído	zero

O sistema de incubação de 0,5 ml; continha 12 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 4 μ moles de aldeído, 5 μ moles de piruvato e volume adequado de proteína da fração sulfato de protamina (Atividade Específica = 3,3 U. mg⁻¹). A mistura foi incubada por 1 hora a 30°C, a reação foi interrompida por aquecimento a 100°C por 1 minuto. Alíquotas (0,2 ml) foram utilizadas para a dosagem de L-KDR pelo método de Weissbach & Hurwitz (84).

Tabela VI: Efeito de diferentes nucleotídeos pirídínicos oxidados e reduzidos na atividade da lactaldeído desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568

Nucleotídeo	Atividade específica ($\mu\text{mol de produto} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$)
NAD^+	0.04
NADP^+	zero
NADH	zero
NADPH	zero

A mistura de reação com volume final de 1,0 ml, continha 100 μmoles de tampão glicina pH 9,0, 2,5 μmoles de NAD^+ , 1 μmol de L-lactaldeído e 0,15 mg de proteína (fração sulfato de protamina). A incubação foi feita a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrita em Materiais e Métodos.

Tabela VII : Efeito de diferentes aldeídos na atividade da lactaldeído desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568

Aldeído	Atividade relativa %
L-lactaldeído	100
D-lactaldeído	75
Glicolaldeído	175
Acetaldeído	175
Piruvaldeído	30
Formaldeído	1,25

O sistema de incubação de 1,0 ml, continha 100 μ moles de tampão glicina pH 9,0, 2,5 μ moles de NAD^+ , 1 μ mol de aldeído e volume adequado de proteína da fração sulfato de protamina (Atividade Específica = 0,03 U. mg^{-1}). A incubação foi feita a 25°C e a formação de NADH foi acompanhada como descrito em Materiais e Métodos.

Tabela VIII: Valores de Rf do produto da L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568

Composto	Rf	
	Solvente a	Solvente b
<u>L</u> -rhamnose	0,66	0,38
Ácido- <u>L</u> -rhamnônico *	0,33	0,42
<u>L</u> -rhamnono- γ -lactona *	0,83	0,52
Produto da desidrogenase	0,33	0,42

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

* Padrões sintetizados quimicamente.

Tabela IX: Determinação do produto da L-rhamnonato desidratase de *Pichia stipitis* NRC 5568 por diferentes métodos

Reação	μ moles de L-KDR formados / ml
Periodato-tiobarbiturato	3,5
Semicarbazida	3,15

O produto da L-rhamnonato desidratase foi isolado conforme descrito em Materiais e Métodos. 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato foi determinado pelo método de periodato-tiobarbiturato de Weissbach & Hurwitz (84). Os α -ceto-ácidos foram determinados pelo método da semicarbazona de McGee & Doudoroff (51).

Tabela X: Valores de Rf dos produtos da L-rhamnonato desidratase e da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase de *Pichia stipitis* NRC 5568

Composto	Rf	
	Solvente b	Solvente c
L-KDA *	0,86	0,35
L-KDR **	0,86	0,4
Produto da reação da desidratase	0,86	0,4
Produto da reação da aldolase (síntese)	0,85	0,4

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

* Padrão sintetizado quimicamente.

** Padrão sintetizado biologicamente (64).

Tabela XI: Valores de Rf do produto enzimático da lactaldeído desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568

Composto		Rf	
		Solvente a	Solvente b
L-lactato	*	0,48	0,79
Piruvato	*	0,35	0,76
L-lactaldeído	*	0,52	0,82
Produto da reação da lactaldeído desidrogenase		0,49	0,78

O produto da reação enzimática foi isolado, cromatografado e revelado conforme Materiais e Métodos.

* Padrões sintetizados quimicamente.

Tabela XII: Atividades das enzimas envolvidas no metabolismo da L-rhamnose em extrato livre de células do mutante PR1 de *Pichia stipitis* e de *Pichia pseudopolymorpha* 1747.

Enzimas	<i>P. stipitis</i>	<i>P. pseudopolymorpha</i>
	PR1	1747
L-rhamnose desidrogenase *	0,1	0,04
L-rhamnono γ -lactonase *	zero	0,43
L-rhamnonato desidratase **	0,5	0,51
2-ceto-3-desoxi L-rhamnoato aldolase **	2	1,25
Lactaldeído desidrogenase *	0,02	0,03

* = atividade específica expressa em μmoles de produto formado (ou substrato consumido) . min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$

** = atividade específica expressa em μmoles de produto formado (ou substrato consumido) . hora^{-1} . mg de proteína $^{-1}$

Tabela XIII: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a expressão da atividade da L-rhamnose desidrogenase em *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747

Fonte de carbono	Atividade relativa		
	%		
	<i>P. stipitis</i> NRC 5568	<i>P. stipitis</i> PR1	<i>P. pseudopolymorpha</i> 1747
<u>L</u> -rhamnose	100	100	100
<u>D</u> -glucose	zero	zero	zero
<u>D</u> -galactose	zero	zero	zero
Glicerol	zero	zero	zero
Lactato	zero	zero	zero

Células de *Pichia stipitis* (NRC 5568 e PR1) e *Pichia pseudopolymorpha* 1747, foram cultivadas em meio líquido contendo as fontes de carbono indicadas durante 22 h nas condições de agitação e temperatura conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). As atividades específicas da L-rhamnose desidrogenase induzidas por L-rhamnose determinadas nos extratos livre de células de *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747 foram de 0,07, 0,1 e 0,034 U.mg⁻¹ respectivamente, e consideradas como 100 %.

Tabela XIV: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a expressão da atividade da L-rhamnonato desidratase em *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747

Fonte de carbono	Atividade relativa		
	%		
	<i>P. stipitis</i> NRC 5568	<i>P. stipitis</i> PR1	<i>P. pseudopolymorpha</i> 1747
<u>L</u> -rhamnose	100	100	100
<u>D</u> -glucose	6,5	7,8	3
<u>D</u> -galactose	4	6	3
Glicerol	6,5	6	2
Lactato	4	4	zero

Células de *Pichia stipitis* (NRC 5568 e PR1) e *Pichia pseudopolymorpha* 1747 foram cultivadas em meio líquido contendo as fontes de carbono indicadas durante 22 h nas condições de agitação e temperatura conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). As atividades específicas da L-rhamnonato desidratase induzidas por L-rhamnose determinadas nos extratos livre de células de *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747 foram de 0,31, 0,42 e 0,5 U.mg⁻¹, respectivamente e consideradas como 100 %.

Tabela XV: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a expressão da atividade $\underline{\text{L}}$ -KDR aldolase em *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747

Fonte de carbono	Atividade relativa %		
	<i>P. stipitis</i> NRC 5568	<i>P. stipitis</i> PR1	<i>P. pseudopolymorpha</i> 1747
$\underline{\text{L}}$ -rhamnose	100	100	100
$\underline{\text{D}}$ -glucose	6,5	9	28
$\underline{\text{D}}$ -galactose	4	8	25
Glicerol	4	4	24
Lactato	4	4	8

Células de *Pichia stipitis* (NRC 5568 e PR1) e *Pichia pseudopolymorpha* 1747, foram cultivadas em meio líquido contendo as fontes de carbono indicadas durante 22 h nas condições de agitação e temperatura conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). As atividades específicas da 2-ceto-3-desoxi- $\underline{\text{L}}$ -rhamnonato aldolase induzida por $\underline{\text{L}}$ -rhamnose determinadas nos extratos livre de células de *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747 foram de 1,26, 1,4 e 1,25 U.mg⁻¹ respectivamente, e consideradas como 100 %.

Tabela XVI: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a expressão da atividade da lactaldeído desidrogenase em *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747

Fonte de carbono	Atividade relativa %		
	<i>P. stipitis</i> NRC 5568	<i>P. stipitis</i> PR1	<i>P. pseudopolymorpha</i> 1747
<u>L</u> -rhamnose	100	100	100
<u>D</u> -glucose	zero	zero	zero
<u>D</u> -galactose	zero	zero	zero
Glicerol	zero	zero	zero
Lactato	zero	zero	zero

Células de *Pichia stipitis* (NRC 5568 e PR1) e *Pichia pseudopolymorpha* 1747 foram cultivadas em meio líquido contendo as fontes de carbono indicadas durante 22 h nas condições de agitação e temperatura conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.8). As atividades específicas da lactaldeído desidrogenase induzidas por L-rhamnose determinadas nos extratos livre de células de *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747 foram de 0,02, 0,03 e 0,03 U. mg⁻¹ respectivamente, e consideradas como 100 %.

4 DISCUSSÃO

Estudos sobre o metabolismo da L-rhamnose em microorganismo demonstraram duas vias possíveis, uma via fosforilativa descrita em bactérias (11, 12, 22, 24, 25, 46, 68, 74, 75) e uma via oxidativa descrita em fungo (65).

Não existem relatos na literatura a respeito de uma via oxidativa de utilização de L-rhamnose em leveduras. Entretanto, Suzuki & Onishi (73), em 1968, estudando produtos de meios de culturas de leveduras que fermentam L-rhamnose, encontraram duas cepas *Candida polymorpha* e *Pichia robertsii* que transformam L-rhamnose em ácido L-rhamnônico e/ou L-1,2-propanodiol, na presença de carbonato de cálcio. Este foi o primeiro indício de uma degradação oxidativa de L-rhamnose em leveduras.

No presente trabalho foi caracterizada uma via oxidativa de degradação de L-rhamnose na levedura *Pichia stipitis* NRC 5568.

Os perfis de crescimento de *Pichia stipitis* NRC 5568, mutante PR1 e *Pichia pseudopolymorpha* 1747 demonstraram que estas leveduras utilizaram eficientemente L-rhamnose como fonte de carbono e energia (Figura 1). *Pichia stipitis* NRC 5568 e o mutante PR1 apresentaram taxas de crescimento semelhantes como refletidos pelos tempos de geração bastante próximos. Entretanto *Pichia pseudopolymorpha* 1747 apresentou uma acentuada fase "lag" (0 h - 15 h) que corresponde provavelmente a fase de adaptação da levedura ao meio contendo L-rhamnose.

Em extratos livre de células de *Pichia stipitis* NRC 5568 crescidas na presença de L-rhamnose como fonte única de carbono não foram observadas atividades das enzimas envolvidas na via fosforilativa de degradação, L-rhamnose isomerase ou L-rhamnulose quinase. Entretanto foram detectadas atividades da L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnonato desidratase, 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase e lactaldeído desidrogenase (Tabela I). A presença destas enzimas indica claramente a existência de uma via oxidativa de degradação da L-rhamnose neste microrganismo.

A enzima L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis*, primeira enzima envolvida no metabolismo de L-rhamnose, mostrou-se altamente específica ao NAD^+ como coenzima, uma vez que todos os demais coenzimas testados se mostraram ineficazes (Tabela II). Dentre os monossacarídeos testados como substratos, a enzima mostrou alta especificidade para L-rhamnose (Tabela III); a enzima não exibiu nem mesmo atividade de L-manose desidrogenase, embora a L-rhamnose seja uma 6-desoxi-L-manose. Devido a esta especificidade da L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis*, foi utilizada e adaptada para um método espectrofotométrico simples com o objetivo de determinar a L-rhamnose, mesmo em presença de outros açúcares. Esta mesma metodologia foi utilizada por Bruel et al para a L-rhamnose desidrogenase de *Pullularia pullulans* (6). Em contraposição, a enzima L-fucose desidrogenase de *Pullularia pullulans* embora seja altamente específica para o seu substrato, a L-fucose (6-desoxi-L-galactose), apresenta também atividade para a

L-galactose (31).

O pH ótimo de atividade da L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* se encontra numa faixa alcalina, similarmente aos pHs ótimos de atividade da L-rhamnose desidrogenase e L-fucose desidrogenase de *Pullularia pullulans* (31, 66)

A L-rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* não é dependente de cátions divalentes, embora alguns ions metálicos inibam a sua atividade (Tabela IV). O anion acetato e o EDTA afetaram a sua atividade, imprimindo um aumento, pois de alguma maneira devem quelar os ions metálicos que inibem a atividade da enzima .

Com o intuito de comprovar que o produto da reação catalisada pela L-rhamnose desidrogenase em pH 9,5 era o ácido L-rhamnônico, foi realizada uma cromatografia do produto na presença de um padrão autêntico de ácido L-rhamnônico (Tabela VIII). O fato deles apresentarem os mesmos valores de Rf, permitiu a caracterização do produto como ácido L-rhamnônico. O ácido L-rhamnônico produzido biologicamente pode também ser quantificado e caracterizado pelo método de Hestrin (38) após acidificação.

Não foi comprovada a atividade da L-rhamnono- γ -lactonase, enzima da etapa subsequente do metabolismo da L-rhamnose. Na reação da lactonase efetuada em pH 7.0, a L-rhamnono- γ -lactona usada como substrato, sofreria uma hidrólise resultando em ácido L-rhamnônico. Esta etapa aparentemente difere da via descrita por Rigo et al (65) para a degradação de L-rhamnose em *Pullularia*

pullulans. Neste fungo o produto da $\underline{\underline{L}}$ -rhamnose desidrogenase é a $\underline{\underline{L}}$ -rhamnono- γ -lactona ao passo que o produto da oxidação da $\underline{\underline{L}}$ -rhamnose pela $\underline{\underline{L}}$ -rhamnose desidrogenase de *Pichia stipitis* NRC 5568 e do mutante PR1, é a $\underline{\underline{L}}$ -rhamnono- δ -lactona que por ser instável se hidrolisa espontaneamente ao ácido $\underline{\underline{L}}$ -rhamnônico. Entretanto em *Pichia pseudopolymorpha* 1747, foi detectada a presença de uma $\underline{\underline{L}}$ -rhamnono- γ -lactonase (Tabela XII). Estes resultados sugerem que a ausência de uma $\underline{\underline{L}}$ -rhamnono- γ -lactonase, não seja uma característica do gênero *Pichia*. A presença de uma δ -lactona instável, como produto da $\underline{\underline{D}}$ -fucose desidrogenase, também foi verificada por Dahms & Anderson (14), durante a caracterização do metabolismo de $\underline{\underline{D}}$ -fucose por *pseudomonas* de solo. Neste trabalho ficou demonstrada a presença de uma $\underline{\underline{D}}$ -fucono- δ -lactona, que sofria uma hidrólise espontânea ao ácido $\underline{\underline{D}}$ -fucônico, não sendo também necessária a presença de uma $\underline{\underline{D}}$ -fucono- γ -lactonase, que seria responsável por esta conversão.

A enzima seguinte envolvida na via oxidativa de $\underline{\underline{L}}$ -rhamnose, $\underline{\underline{L}}$ -rhamnonato desidratase, foi determinada em células de *Pichia stipitis*.

A $\underline{\underline{L}}$ -rhamnonato desidratase de *Pichia stipitis* é ativada pelo ion magnésio cerca de 3 vezes mais, em relação a atividade inicial, quando a concentração é da ordem de 10 mM (Figura 10). Provavelmente este ion estabelece uma ponte entre a enzima e o substrato facilitando a sua ação catalítica. O pH em que a enzima exibiu sua melhor atividade se encontra em uma faixa neutra (Figura 7).

Analogamente, estas duas características, a dependência do íon magnésio e a melhor atividade em pH neutro também foram determinadas para a L-rhamnonato desidratase de *Pullularia pullulans* (65).

O produto da desidratação do ácido L-rhamnônico pela desidratase, foi isolado e caracterizado como sendo 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato (L-KDR) por cromatografia (Tabela X) e pelo método de Weissbach & Hurwitz (84). Por esta reação, que é específica para ácidos 2-ceto-3-desoxi aldônicos (84), o L-KDR é oxidado com periodato produzindo β -formilpiruvato que reage com 2-tiobarbitúrico formando um cromógeno que apresenta espectro de absorção característico (540-550 nm). O espectro de absorção do derivado obtido a partir do L-KDR de origem biológica demonstrado na Figura 18, possui um pico de absorção máxima semelhante ao obtido por Rigo (64), confirmando a autenticidade do L-KDR obtido biologicamente. Este produto pôde também ser caracterizado pelo método da semicarbazida (51) que é específico para a determinação de α -ceto ácidos (Tabela IX).

O próximo passo da via metabólica é a clivagem do L-KDR pela 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase, tendo como produtos o L-lactaldeído e piruvato. Pela impossibilidade da síntese química do L-KDR, o L-lactaldeído e o piruvato foram utilizados como substratos para a síntese biológica do L-KDR, uma vez que são os prováveis produtos da clivagem pela aldolase. A análise cromatográfica do produto da aldolase no sentido da síntese, apresentou o mesmo Rf (Tabela X) do produto obtido pela ação da desidratase, bem

como o mesmo pico de absorção máxima em 548 nm, após ter sido submetido a reação de Weissbach & Hurwitz (84), confirmando como sendo o composto 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato (L-KDR).

A 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase além de exibir maior estereoespecificidade pelo L-lactaldeído do que o D-lactaldeído, possui uma atividade três vezes maior com piruvaldeído do que com L-lactaldeído, o substrato natural da via (Tabela V). Esta atividade pode ser explicada pela maior densidade elétrica do carbono da carbonila do piruvaldeído que a do carbono da carbonila do D ou L-lactaldeído. Numa reação não catalisável a diferença de densidade elétrica, favorece o ataque nucleofílico do íon carbanium do piruvato à carbonila do L-lactaldeído, esse favorecimento seria aumentado quando catalisada pela enzima. Outra hipótese que permitiria a explicação dessas atividades seria a presença de outra enzima, que desempenhe uma função semelhante a da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase. Ambas as hipóteses não devem ser descartadas sem um estudo mais profundo que permitirá esclarecer esta questão.

A relação estequiométrica da reação pode ser observada na Figura 14. O consumo do piruvato foi proporcional ao tempo e embora a velocidade tenha diminuído, prosseguiu até 10 % em relação à concentração inicial. Simultaneamente ao consumo de piruvato ocorreu a formação estequiométrica de L-KDR como revelado pela reação de Weissbach & Hurwitz (84).

O piruvato e o L-lactaldeído reultantes de uma clivagem da 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase são produtos

facilmente utilizáveis através de outras vias metabólicas. Em *Escherichia coli*, o L-lactaldeído é oxidado a L-lactato pela enzima lactaldeído desidrogenase em condições aeróbicas de crescimento; anaerobicamente o L-lactaldeído é convertido em L-1,2-propanodiol pela L-1,2-propanodiol oxidorreductase (2).

A atividade de lactaldeído desidrogenase foi detectada em extrato livre de células de *Pichia stipitis* (Tabela I), reforçando a via de utilização do L-lactaldeído.

Esta enzima é estritamente NAD^+ dependente (Tabela VI), embora a lactaldeído desidrogenase de leveduras de panificação utiliza o NAD^+ e o NADP^+ , como coenzimas (71).

Existe uma grande diversidade em relação ao pH ótimo de atividade, nos diferentes organismos em que a lactaldeído desidrogenase já foi detectada. Em algumas leveduras o pH ótimo ocorre em 7,5, em *Escherichia coli* se encontra por volta de 11,0 (71). Em *Pichia stipitis* a enzima exibiu sua melhor atividade em pH 9,0, valor próximo ao obtido para lactaldeído desidrogenase de leveduras de panificação (71).

Esta enzima apresenta uma baixa especificidade, além do L-lactaldeído, outros aldeídos também são utilizados como substratos (Tabela VII), analogamente como foi demonstrado por Sridhara & Wu (71) para a lactaldeído desidrogenase de *Pseudomonas fluorescens* e de leveduras de panificação. Nossos dados sugerem que a lactaldeído desidrogenase de *Pichia stipitis*, oxida substratos com a estrutura geral R-COH , onde R pode ser $\text{CH}_2\text{-OH}$, $\text{-CH}_2\text{OH}$, -CHOHCH_3 , -COCH_3 . A

enzima é praticamente inativa quando o R for igual ao hidrogênio. A outra possibilidade é a existência de várias desidrogenases neste extrato. Entretanto, esta atividade não foi detectada quando a L-rhamnose foi adicionada no sistema de incubação eliminando a hipótese de ser a atividade inespecífica da L-rhamnose desidrogenase (dados não demonstrados).

Em *Escherichia coli*, acreditava-se na existência de uma glicolaldeído desidrogenase e de uma lactaldeído desidrogenase, pelo fato de se obter uma melhor atividade para o glicolaldeído como substrato do que o L-lactaldeído (7). Caballero et al (7), demonstraram por análise eletroforética das duas enzimas purificadas, que se tratava de uma mesma proteína com as duas funções catalíticas, isto é, a de lactaldeído desidrogenase e de glicolaldeído desidrogenase. Da mesma forma, uma melhor atividade tendo o glicolaldeído como substrato também ocorreu na reação da lactaldeído desidrogenase de *Pichia stipitis* (Tabela VII), sugerindo uma identidade catalítica apesar de se tratarem de organismos diferentes. Tanto o L-lactaldeído como o glicolaldeído em concentrações acima de 1 mM, no sistema de incubação, causam uma inibição enzimática por excesso de substrato (Figura 16 A e B).

O produto da reação catalisada pela lactaldeído desidrogenase de *Pichia stipitis* foi identificado como sendo o L-lactato, bem como o produto desta desidrogenase de *Escherichia coli* utilizando o L-lactaldeído como substrato (71). Em contraposição outros ácidos orgânicos foram

caracterizados como produtos da lactaldeído desidrogenase de *Pseudomonas fluorescens*, leveduras de panificação e células de fígado de boi. Por outro lado, o piruvaldeído foi o produto da reação da lactaldeído desidrogenase em células de fígado de rato (71).

A presença das enzimas L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnonato desidratase, 2-ceto-3-desoxi L-rhamnonato aldolase e lactaldeído desidrogenase foram constatadas no mutante PR1 de *Pichia stipitis* e em *Pichia pseudopolymorpha* 1747 (Tabela XII), sendo que nesta última foi determinada a atividade de L-rhamnono- γ -lactonase. Estes dados demonstram a via oxidativa em que a L-rhamnose é degradado nestas leveduras.

Entre as fontes de carbono testadas, apenas a L-rhamnose, quando presente como única fonte de carbono no meio de cultura de *Pichia stipitis* NRC 5568 ou do mutante PR1 ou de *Pichia pseudopolymorpha* 1747 induz a síntese das enzimas da via (Tabelas XIII, XIV, XV, XVI). Os níveis de atividades enzimáticas aumentaram de 10 a 100 vezes quando comparadas com os níveis apresentados nas células crescidas em fontes de carbono como D-glucose, D-galactose, glicerol ou lactato. Entretanto, uma atividade de 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase foi encontrada em extratos livres de células de *Pichia pseudopolymorpha* 1747, quando crescidas em outras fontes de carbono que não a L-rhamnose. Esta atividade foi aumentada 4 vezes, quando L-rhamnose esta presente no meio de cultura. Os níveis de atividade desta enzima em meio contendo outras fontes de carbono, parecem

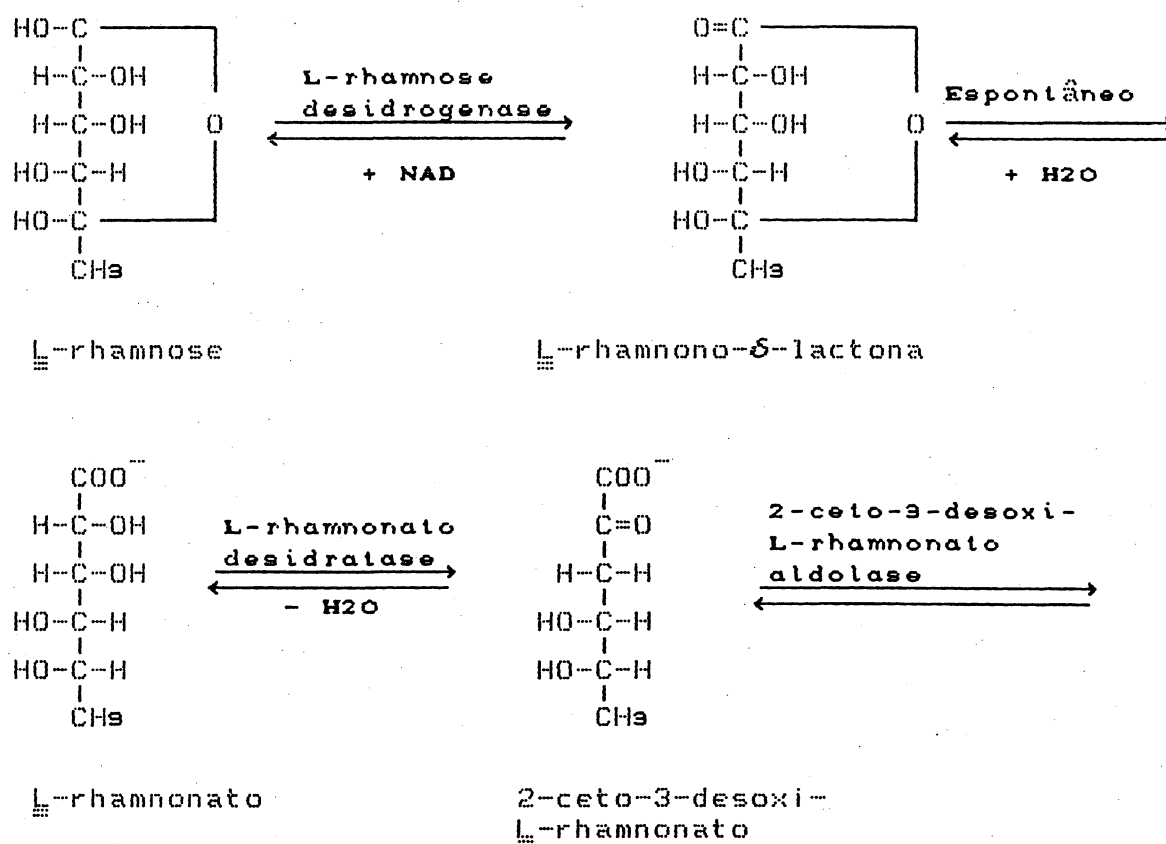
sugerir a presença constitutiva de uma aldolase.

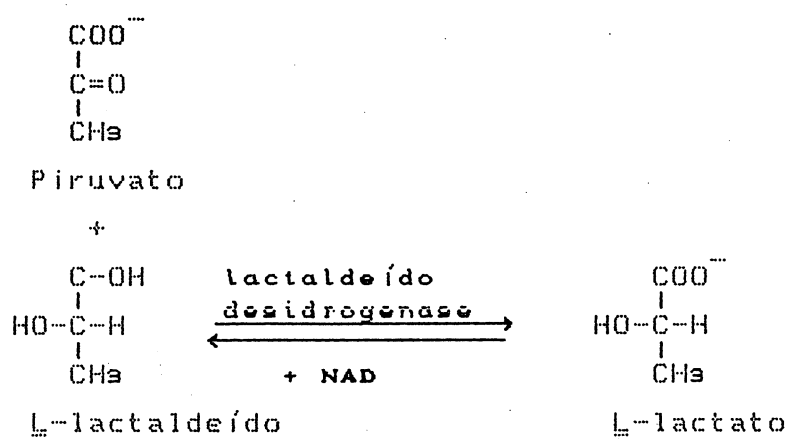
A relação entre crescimento, consumo de L-rhamnose e o aumento das atividades específicas das enzimas da via pode ser observado tanto em *Pichia stipitis* NRC 5568 como no mutante PR1 (Figuras 21, 22, 23; 24, 25, 26). Estes resultados mostram que provavelmente a síntese destas enzimas ocorre de forma simultânea.

A repressão da síntese das enzimas do metabolismo da L-rhamnose por D-glucose apresenta níveis diferentes na cepa selvagem comparando-se com a cepa mutante PR1 (Figuras 27, 28, 29, 30, 31, 32).

A presença de D-glucose no meio de cultura da cepa selvagem contendo L-rhamnose reprime a indução da síntese das enzimas catabólicas L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnonato desidratase e a 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase (Figuras 27, 28, 29). Nas células da cepa mutante PR1, o efeito repressivo da D-glucose é menor (Figuras 30, 31, 32), pois este mutante já foi caracterizado como sendo menos sensível a repressão catabólica, em estudos realizados por Pardo sobre a regulação da L-rhamnose desidrogenase nestes mesmos organismos (56). Os níveis das enzimas passaram a ser detectados em *Pichia stipitis* NRC 5568, após ocorrer todo consumo de D-glucose e quando cerca de 20 % da L-rhamnose tenha sido metabolizada. Os resultados demonstraram que os mecanismos regulatórios para a L-rhamnonato desidratase e 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase do mutante PR1 também foram modificados em relação a cepa selvagem de *Pichia stipitis*.

A via de degradação de L-rhamnose em *Pichia stipitis* NRC 5568, foi caracterizada como sendo oxidativa não envolvendo intermediários fosforilados, L-rhamnono- δ -lactona, L-rhamnonato, 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato, piruvato e L-lactaldeído. Esta via é bastante semelhante a descrita para o fungo *Pullularia pullulans* (65) e diferente da via caracterizada para bactérias (11, 12, 22, 24, 25, 46, 68, 74, 75, 76). A via oxidativa comprovada em *Pichia stipitis* segue as seguintes reações:





Os estudos genéticos com mutante PR1 de *Pichia stipitis* deverão esclarecer os mecanismos de indução e repressão das enzimas dessa via, enriquecendo as evidências apresentadas neste trabalho.

5 CONCLUSÕES

1. A levedura *Pichia stipitis* NRC 5568, ao ser crescida em meio mineral líquido na presença de L-rhamnose, desenvolve um sistema enzimático para a sua utilização como fonte de carbono e energia.

2. Foram determinadas a partir do extrato livre de células as enzimas responsáveis pela degradação da L-rhamnose: L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnonato desidratase, 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase e lactaldeído desidrogenase.

3. A L-rhamnose é metabolizada oxidativamente através da formação de L-rhamnono- δ -lactona, L-rhamnonato, 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato (L-KDR), piruvato e L-lactaldeído.

4. Das fontes de carbono testadas apenas a L-rhamnose induziu a síntese das enzimas da via.

5. Os níveis das enzimas induzidas por L-rhamnose em células em crescimento sofreram repressão pela adição de D-glucose ao meio.

6. O mutante PR1 de *Pichia stipitis* NRC 5568 apresenta as mesmas atividades das enzimas do metabolismo oxidativo da L-rhamnose analisadas na cepa selvagem, L-rhamnose desidrogenase, L-rhamnonato desidratase, 2-ceto-3-desoxi-L-rhamnonato aldolase e lactaldeído desidrogenase. Enquanto *Pichia pseudopolymorpha* 1747 apresenta além destas atividades, ainda uma atividade da L-rhamnono- γ -lactonase.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABDEL-AKHER, M. & SMITH, F. The detection of carbohydrate esters and lactones after separation by paper chromatography. *J. Am. Chem. Soc.*, 73: 5859-5860, 1951.
- 2 BALDOMA, L. & AGUILAR, J. Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: aerobic-anaerobic regulation of L-lactaldehyde dissimilation. *J. Bacteriol.*, 170: 416-421, 1988.
- 3 BARKER, S. B. & SUMMERSON, W. H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.*, 138: 535-554, 1941.
- 4 BLACK, S. Yeast aldehyde dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 34: 86-97, 1951.
- 5 BOX, H. C.; BUDZINSKI, E. E.; FREUND, H. G. Studies of electrons trapped in X-irradiated rhamnose crystal. *Rad. Res.*, 121(3): 2177-2182, 1990.
- 6 BRUEL, S. L.; MARECHAL, L. R.; RIGO, L. U.; VEIGA, L.A. Specific determination of L-rhamnose by L-rhamnose dehydrogenase. *Arq. Biol. Tecnol.*, 22: 149-153, 1979.
- 7 CABALLERO, E.; BALDOMA, L.; ROS, J.; BORONAT, A.; AGUILAR, J. Identification of lactaldehyde dehydrogenase and gliccoaldehyde dehydrogenase as function of the same protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 258: 7788-7792, 1983.
- 8 CHABY, R.; CHARON, D.; SARFATI, R. S.; SZABÓ, L.; TRIGALO, F. Estimation of 3-deoxy-2-ketoaldonic acids. In: WOOD, W. A. ed. *Carbohydrate metabolism*. part. B. New York, Academic, 1975. p. 32-34.

- 9 CHAM, B. E. & DAUNTER, B. Solasodine glycosides selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition of cytotoxicity by rhamnose in mice with sarcoma-180. *Canc. Lett.*, **55** : 221-226, 1990.
- 10 CHEN, Y.; ZHU, Y.; LIN, E. C. C. NAD⁺ linked aldehyde dehydrogenase for aerobic utilization of L-fucose and L-rhamnose by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **169**: 3289-3294, 1987.
- 11 CHIU, T. H. & FEINGOLD, D. S. The purification and properties of L-rhamnulokinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **92**: 489-497, 1964.
- 12 CHIU, T. H. & FEINGOLD, D. S. L-Rhamnulose 1-phosphate aldolase from *Escherichia coli*. Crystallization and properties. *Biochemistry*, **8**: 98-108, 1969.
- 13 DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose oxidase reagent. *Biochem. J.*, **80**: 547-551, 1961.
- 14 DAHMS, A. S. & ANDERSON, R. L. D-Fucose metabolism in a *Pseudomonad*. I. Oxidation of D-fucose to D-fucono- δ -lactone by a D-aldohexose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **247**: 2222-2227, 1972 a.
- 15 DAHMS, A. S. & ANDERSON, R. L. D-Fucose metabolism in a *Pseudomonad*. II. Oxidation of D-fucose to D-fucono- γ -lactone by an L-arabino-aldoase dehydrogenase and hydrolysis of the lactone by a lactonase. *J. Biol. Chem.*, **247**: 2228-2232, 1972 b.
- 16 DAHMS, A. S. & ANDERSON, R. L. D-Fucose metabolism in a *Pseudomonad*. III. Conversion of D-fuconate to 2-keto-3-deoxy-D-fuconate by a dehydratase. *J. Biol. Chem.*, **247**: 2233-2237, 1972 c.

- 17 DAHMS, A. S. & ANDERSON, R. L. D-Fucose metabolism in a *Pseudomonad*. IV. Cleavage of 2-keto-3-deoxy-D-fuconate to pyruvate and D-lactaldehyde by 2-keto-3-deoxy-L-arabonate aldolase. *J. Biol. Chem.*, 247: 2238-2241, 1972 d.
- 18 DAVIES, A. The especific polyssacharides of some gram-negatives bacteria. *Biochem. J.*, 59: 696-704, 1955.
- 19 DAWSON, R. M.; ELLIOT, D. C.; ELLIOT, W. H.; JONES, K. M. Detection of biochemical compounds. IN: _____ *Data for biochemical research*. 2. ed. Oxford, 1969. p. 515.
- 20 DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Acid hydrolysis of wheat straw and process considerations for ethanol fermentation by *Pichia stipitis* Y7124. *Proc. Biochem. Intern.*, 25: 132-135, 1990.
- 21 DISCHE, Z. & SHETTLES, L. B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.*, 175: 595-603, 1948.
- 22 DOMAGK, G. F. & HEINRICH, R. Über den abbau der desoxyzucker durch bakterien enzyme. *Biochem. Z.*, 341: 420-429, 1965.
- 23 EAGON, R. G. Bacterial dissimilation of L-fucose and L-rhamnose. *J. Bacteriol.*, 82: 548-550, 1961.
- 24 ENGLESBERG, E. Physiological basis for rhamnose utilization by a mutant of *Pasteurella pestis*. I. Experiments with resting cells: The isolation of lactic aldehyde. *J. Bacteriol.*, 74: 8-11, 1957 a.
- 25 ENGLESBERG, E. Physiological basis for rhamnose

utilization by a mutant of *Pasteurella pestis*. II. A single mutational event leading to the production of two enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 71: 179-193, 1957 b.

- 26 GANCEDO, C.; SALAS, M. L.; GINER, A.; SOLS, A. Reciprocal effects of carbon source on the levels of an AMP sensitive fructose-1,6-diphosphatase and phosphofructokinase in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20: 15-20, 1965.
- 27 GHALAMBOR, M. A. & HEATH, E. C. The metabolism of L-fucose. II. The enzymatic cleavage of L-fuculose-1-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 237: 2427-2433, 1962.
- 28 GREEN, M. & COHEN, S. S. The enzymatic conversion of L-fucose for L-fuculose. *J. Biol. Chem.*, 219: 557-567, 1956.
- 29 GROOTJEN, D. R. J.; MEIJLINK, L. H. H. M.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. Ch. A. M. Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. Microb. Tech.* 12: 860-864, 1990.
- 30 GUIMARÃES, M. F. & VEIGA, L. A. L-fucose dehydrogenase from *Pullularia pullulans*. I. R. C. S. Med. Sci., 1: 73-77, 1973.
- 31 GUIMARÃES, M. F. & VEIGA, L. A. Purification and general properties of L-fucose dehydrogenase from *Pullularia pullulans*. *Arq. Biol. Tecnol.*, 32: 575-587, 1989.
- 32 GUIMARÃES, M. F. & VEIGA, L. A. An oxidative pathway for L-fucose dissimilation in fungi. *Arq. Biol. Tecnol.* 33 (3): 645 - 655, 1990.

- 33 GUPTHAR, A. S. & GARNETT, H. M. Hibridization of *Pichia stipitis* with its presumptive imperfect partner *Candida shehatae*. *Current Genetics*, 12: 199-204, 1987.
- 34 GUTMAN, I. & WAHLFELD, A. W. L-lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD⁺. In: BERGMAYER, H. U., ed. *Methods of Enzymatic analysis*. 2. ed. New York A. P., 1974. v. 3. p. 1464-1468.
- 35 HAGGEDORN, J. & CIRIACY, M. Isolation and characterization of xyl mutants in a xylose utilizing yeast *Pichia stipitis*. *Current Genetics*, 16: 27-34, 1989.
- 36 HAUSER, G. & KARNOVSKY, M.L. Rhamnose and rhamnolipid biosynthesis by *Pseudomona aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 224: 91-105, 1957.
- 37 HEATH, E. C. & GHALAMBOR, M.A. The metabolism of L-fucose. I. The purification and properties of L-fuculose kinase. *J. Biol. Chem.*, 237: 2423-2426, 1962.
- 38 HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hidrolxylamine and its analytical application. *J. Biol. Chem.*, 180: 249-261, 1949.
- 39 HORECKER, B. L. & KORNEBERG, A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 175: 385-390, 1948.
- 40 HUANG, P. C. & MILLER, O. N. The metabolism of lactaldehyde. V. Metabolism of L-fucose. *J. Biol. Chem.*, 231 : 201-205, 1958.

- 41 HUFF, E. & RUDNEY, H. The enzymatic oxidation of 1,2-propanediol phosphate to acetol phosphate. *J. Biol. Chem.*, 234 : 1060-1064, 1959.
- 42 JONES, J. K. N. & SMITH, F. Plant gums and mucilages. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 4: 243-285, 1949.
- 43 KREGER-VAN RIJ, N. W. K. Discussion of the genera belonging to the ascomycetous yeast. In: LODDER, J. *The yeast, a taxonomic study*. 2. ed. Amsterdam. North Holland Publishing Company, 1970. p. 533-535.
- 44 KURTZMAN, C. P. Nuclear DNA relatedness among strain of the xylose fermentation yeasts *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* in *Proc. 88th Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*, 1988.
- 45 LANNING, M. C. & COHEN, S. S. The detection and estimation of 2-ketohexonic acids. *J. Biol. Chem.*, 189: 109-114, 1951.
- 46 LEVINSON, S. L. & KRULWICH, T. A. Metabolism of L-rhamnose in *Arthrobacter pyridinolis*. *J. Gen. Microbiol.*, 95: 277-286, 1976.
- 47 LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658-666, 1934.
- 48 LODDER, J. General classification of the yeasts. In: LODDER, J. *The yeasts, a taxonomic study*. 2. ed. Amsterdam. North Holland Publishing Company, 1970. p. 1-30.
- 49 LODDER, J.; SLOOF, W. C. RIJ, N. J. K. The classification of yeasts. In: COOK, A. H. *The chemistry and biology of yeasts*. 3.ed. New York.

Academic Press Inc. Publishers, 1968. p. 1-57.

- 50 LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 51 MACGEE, J. & DOUDOROFF, M. A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. *J. Biol. Chem.*, 210: 617-626, 1954.
- 52 MILLER, J. H. Determination of variable cell counts bacterial growth curves. In: *Experiments in molecular genetics*. 2. ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. p.31-36.
- 53 MOORE, S. & LINK, K. P. Carbohydrate characterization. *J. Biol. Chem.*, 133: 293-311, 1940.
- 54 NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153: 375-380, 1944.
- 55 OLSON, B. H. & JOHNSON, M. J. Factors producing high yeast yields in synthetic media. *J. Bacteriol.*, 57: 235-246, 1949.
- 56 PARDO, E. H. Regulação da L-rhamnose desidrogenase no mutante PR1 de *Pichia stipitis* capaz de utilizar 2-desoxi-D-glucose. Curitiba, 1991. 98 p. Tese (Mestrado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 57 PIGMAN, W. W. & GOEPP, Jr. R. M. *Chemistry of the carbohydrates*, New York, Academic, 1948. p. 108.
- 58 PREEZ, J. C.; DRIESSEL, B.; PRIOR, B. A. The relation between redox potential and D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Biotech. Let.*

10: 901-906, 1988.

- 59 PREEZ, J. C.; DRIESSEL, B.; PRIOR, B. A. Effect of aerobiosis on fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* and *Candida tenuis* on D-xylose. *Arch. Microbiol.* 152: 143-147, 1989.
- 60 PREEZ, J. C.; DRIESSEL, B.; PRIOR, B. A. D-Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotech. Let.*, 11: 131-136, 1989.
- 61 PRIOR, B. A.; KILLIAN, S. G.; PREEZ, J. C. Fermentation of the D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Proc. Bioc.* 24: 21-32, 1989.
- 62 PYKE, M. Baker's yeasts. In: ROMAN, W. *Yeasts*. 1. ed. New York. Academic Press Inc. Publishers, 1957. p. 13-16.
- 63 REITMANN, S. & FRANKEL, S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 28: 56-63, 1957.
- 64 RIGO, L. U. Metabolismo de L-rhamnose em *Pullularia pullulans*. Curitiba, 1983. 75 p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 65 RIGO, L. U.; MARECHAL, L. R.; VIEIRA, M. M.; VEIGA, L. A. Oxidative pathway for L-rhamnose in *Pullularia pullulans*. *Can. J. Microbiol.* 31: 817-822, 1985.
- 66 RIGO, L. U.; NAKANO, M.; VEIGA, L. A. & FEINGOLD, D. S. L-Rhamnose dehydrogenase of *Pullularia pullulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 445: 286-293, 1976.

- 67 RIZZI, M.; KLEIN, C.; SCHULZE, C.; BUIZHAN, N. A.; DELLVEG, H. Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP balances for modeling oxygen-limited growth and fermentation of yeast *Pichia stipitis* with xylose as carbon source. *Biotech. Bioeng.* 34: 509-514, 1989.
- 68 SAWADA, H. & TAKAGI, Y. The metabolism of L-rhamnose in *Escherichia coli*. III. L-rhamnulose 1-phosphate aldolase. *Biochem. Biophys. Acta*, 92: 26-32, 1964.
- 69 SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160: 61-68, 1945.
- 70 SPENCER, J. F. T. & SPENCER, D. Yeasts genetics. In: CAMPBELL, I. & DUFFUS, J. H. ed. *Yeast a practical approach*. Oxford and Washington D.C., 1986. p. 65-106.
- 71 SRIDHARA, S. & WU, T. T. Purification and properties of lactaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 244: 5233-5238, 1969.
- 72 STOLZENBACH, F. Lactic dehydrogenase (crystalline). *Methods Enzymol.*, New York, 9: 278-288, 1966.
- 73 SUZUKI, T. & ONISHI, H. Aerobic dissimilation of L-rhamnose and the production of L-rhamnonic acid and 1,2-propanediol by yeasts. *Agricol. Biol. Chem.*, 32: 888-893, 1968.
- 74 TAKAGI, Y. & SAWADA, H. The metabolism of L-rhamnose in *Escherichia coli*. I. L-rhamnose isomerase. *Biochim. Biophys. Acta*, 92: 10-17, 1964 a.
- 75 TAKAGI, Y. & SAWADA, H. The metabolism of L-rhamnose in *Escherichia coli*. II. L-rhamnulose kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 92: 18-25, 1964 b.

- 76 TEECE, G.; LAZZARI, G.; GIROLAMO, M. Adattamento al L-rhamnosio e utilizzazione del D-arabinosio in un ceppo di *Escherichia coli*. *Giorn. Microbiol.*, 3: 154-165, 1957.
- 77 TREVELYAN, W. E.; PROCTOR, D. P.; HARRINSON, J. S. Detection of sugar on paper chromatograms by the use of dipping reagents. *Nature* (Lond), 166: 444-445, 1950.
- 78 TWERDOCHLIB, A. L.; FUNAYAMA, S.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U. Use of L-rhamnose by *Pichia stipitis*. *Arq. Biol. Tecnol.*, 32: 258, 1989.
- 79 VALYASEVI, R.; SANDINE, W. E.; GELLER, B. L. The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. *App. Environ. Microbiol.*, 56: 1882-1889, 1990.
- 80 VANZIL, S.; PRIOR, B. A.; PREEZ, J. C. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Enz. Microbiol. Tech.*, 13: 82-86, 1991.
- 81 VEIGA, L. A.; RIGO, L. U.; FEINGOLD, D. S.; NAKANO, M. L-rhamnose dehydrogenase isolation of a new enzyme from *Pullularia pullulans*. *I. R. C. S. Med. Sci.* 2: 1397. 1974.
- 82 VIEIRA, M. M.; RIGO, L. U.; MARECHAL, L. R.; VEIGA, L. A. Induction and catabolite repression of L-rhamnose dehydrogenase in *Pullularia pullulans*. *J. Bacteriol.*, 38: 55-59, 1979.
- 83 WEISS, E. I.; SHENITZKI, B.; SMORODINSKI, N. Identification of the rhamnose sensitive adhesin of *Campytophaga ochracea* ATCC 33596. *Arch. Or. Biol.*,

35: 127-130, 1990.

- 84 WEISSBACH, A. & HURWITZ, J. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. I. Identification. *J. Biol. Chem.*, 234: 705-709, 1959.
- 85 WILSON, D. M. & AJL, S. Metabolism of L-rhamnose by *Escherichia coli*. I. L-rhamnulose isomerase. *J. Bacteriol.*, 73: 410-414, 1957 a.
- 86 WILSON, D. M. & AJL, S. Metabolism of L-rhamnose by *Escherichia coli*. II. L-rhamnulose kinase. *J. Bacteriol.* 73: 415-420, 1957 b.
- 87 WILSON, J. J.; DESCHATELETS, L.; NISHIKAWA, N. K. Comparative fermentation and acid hydrolyses of stem prepared aspen wood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *App. Microbiol. Biotech.*, 31: 592-596, 1989.
- 88 WOLFROM, M. L. & THOMPSON, A. 6-Deoxy- α -L-mannose (α -L-rhamnose) monohydrate. In: WHISTLER, R. L. & WOLFROM, M. L. eds. *Anal. Prep. Sugars*, New York, Academic, 1962. p. 202-205.