

ALICE ETSUKO KITAMURA

CARACTERIZAÇÃO DA GALACTOSE OXIDASE
INTRACELULAR DO MUTANTE Gal⁻ Ara⁻ DE
Dactylium dendroides (DD09)

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

CURITIBA
1992

ALICE ETSUKO KITAMURA

CARACTERIZAÇÃO DA GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR DO MUTANTE
GAL⁻ Ara⁻ DE *Dactylium dendroides* (DD09)

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora: Prof^a. Déa Amaral Ferreira do Amaral
Departamento de Bioquímica, UFPR.

Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa
Departamento de Bioquímica, UFPR.

Prof. Emanuel Maltempi de Souza
Departamento de Bioquímica, UFPR.

Curitiba, 06 de março de 1992

ORIENTADORES:

DRA. DÉA AMARAL

DRA. GLACI T. ZANGAN

AGRADECIMENTOS

À Dra. Glaci T. Zancan, pelo apoio, orientação e correção da tese.

A colega e amiga Iara M. Pereira, pelo apoio e amizade durante a realização do trabalho.

À Prof^a. Kazuko H. do Nascimento pela amizade e sugestões.

Ao Prof. Sigehiro Funayama pelo apoio e sugestões.

À amiga Enelda H. Pardo pelo carinho e conforto nas horas difíceis.

Ao mano Luiz pela confecção dos desenhos.

Ao Prof. Emanuel M. Souza pelos trabalhos fotográficos.

Aos Pós-Graduandos Hidevaldo B. Machado, Marcos Machado e Ilma Higuti pelo auxílio e amizade.

Ao CNPQ pelo suporte financeiro durante a realização do trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
SUMÁRIO	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo do Trabalho	8
2 MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1 Reagentes	9
2.2 Microorganismo	9
2.3 Meios de Cultura	10
2.3.1 Meio Sólido	10
2.3.2 Meio Líquido	10
2.4 Condições de Manutenção e cultivo	11
2.4.1 Preparo do pré-inóculo	11
2.4.2 Cultivo em grande escala	12
2.5 Preparo do extrato livre de células	13
2.6 Determinação da atividade enzimática	13
2.7 Unidade de enzima e atividade específica	14
2.8 Determinação de proteínas	15
2.9 Curva de crescimento e atividade enzimática ...	15
2.10 Estabilidade térmica da galactose oxidase no extrato bruto	16

	Páginas
2.11	Estabilidade da galactose oxidase a 55°C a diversos tempos 16
2.12	Purificação da galactose oxidase 17
2.12.1	Inativação térmica 17
2.12.2	Fracionamento pelo Sulfato de Amônio 18
2.12.3	Cromatografia em Sepharose 6B 18
2.13	Eletroforese em gel de poliacrilamida 19
2.14	Determinação de peso molecular 20
2.15	Efeito da concentração de enzima na velocidade de reação 21
2.16	Efeito do tempo de incubação na atividade da galactose oxidase intracelular 21
2.17	Efeito da temperatura na atividade enzimática . 22
2.18	Efeito do pH do sistema na atividade enzimática 22
2.19	Efeito da concentração de substrato 23
2.20	Determinação do conteúdo de carboidratos 24
2.21	Tratamento alcalino 24
3	RESULTADOS 26
3.1	Níveis de galactose oxidase intracelular em função do crescimento 26
3.2	Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas 27
3.3	Estabilidade da enzima a 55°C 27
3.4	Purificação da galactose oxidase intracelular . 27
3.5	Homogeneidade das enzimas purificadas 28
3.6	Determinação do peso molecular 28
3.7	Efeito da concentração de enzima 29
3.8	Efeito do tempo de incubação 29

		Páginas
3.9	Efeito do pH	29
3.10	Efeito da temperatura	29
3.11	Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de reação	30
3.12	Teor de açúcares neutros totais	31
3.13	Tratamento alcalino	31
4	DISCUSSÃO	58
5	CONCLUSÃO	64
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE TABELAS

	Páginas
1. Níveis de galactose oxidase extracelular em 48 horas de crescimento	32
2. Tabela de purificação da galactose oxidase de 36 horas	33
3. Tabela de purificação da galactose oxidase de 72 horas	34
4. Parâmetros cinéticos das enzimas de 36 horas e de 72 horas para a <u>D</u> -galactose	35
5. Parâmetros cinéticos das enzimas de 36 horas e de 72 horas para a Dihidroxiacetona	36
6. Conteúdo de carboidratos em açúcares neutros totais	37

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
1. Níveis de galactose oxidase em função do crescimento	38
2. Estabilidade da galactose oxidase no extrato bruto a diferentes temperaturas	39
3. Estabilidade da galactose oxidase no extrato bruto a 55°C	40
4. Perfil de eluição da galactose oxidase intracelular 36 horas em coluna de Sepharose 6 B	41
5. Perfil de eluição da galactose oxidase intracelular 72 horas em coluna de Sepharose 6 B	42
6. Homogeneidade das enzimas purificadas	43
7. Perfil eletroforético das enzimas 36 e 72 horas	44
8. Determinação de peso molecular	45
9. Efeito da concentração de enzima sobre a velocidade de reação	46
10. Efeito do tempo de incubação sobre a velocidade de reação	47
11. Efeito do pH sobre a atividade enzimática das formas de galactose oxidase	48
12. Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade enzimática	49
13. Efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática da galactose oxidase 36 horas	50
14. Efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática da galactose oxidase 72 horas	51

15.	Gráfico de HILL para o efeito da concentração de <u>D</u> -galactose sobre a atividade enzimática da galactose oxidase de 36 e 72 de horas	52
16.	Efeito da concentração de dihidroxiacetona sobre a atividade enzimática da galactose oxidase 36 horas .	53
17.	Efeito da concentração de dihidroxiacetona sobre a atividade enzimática da galactose oxidase 72 horas .	54
18.	Gráfico de HILL para o efeito da concentração de dihidroxiacetona sobre a atividade enzimática da galactose oxidase de 36 e de 72 horas	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ABF = azul de bromo fenol
°C = grau Celsius
Da = daltons
EDTA = ácido etilenodiaminatetraacético
Fig. = figura
g = grama
kDa = kilodaltons
M = concentração molar
m = massa
mg = miligrama
min = minuto
ml = mililitro
mM = milimolar
µg = micrograma
µM = micromol
N = concentração Normal
nm = nanômetro
nH = coeficiente de HILL
"overnight" = 12 horas
PM = peso molecular
SDS = dodecil sulfato de sódio
Tab. = tabela
TCA = ácido tri-cloro-acético
TEMED = N,N,N',N' tetrametilenodiamina
UE = Unidade de enzima
v = volume

RESUMO

A galactose oxidase intracelular do mutante Gal⁻Ara⁻ de *Dactylium dendroides* (DD09), foi purificada de micélios de 36 horas e de 72 horas. O peso molecular das enzimas homogêneas foi de 70.000 e 68.000 daltons respectivamente. O pH ótimo de catálise está entre 6,8 e 7,0 e a temperatura ótima foi de 30°C.

A galactose oxidase intracelular do mutante catalisa a oxidação da D-galactose e da dihidroxiacetona e apresentou uma cinética não michaeliana para ambos substratos. O valor do $K_{m_{app}}$ para a D-galactose foi de 77,0 mM e 100 mM para a enzima de 36 horas e de 72 horas de crescimento, respectivamente. O valor do $K_{m_{app}}$ para a dihidroxiacetona encontrado foi de 18 mM e 27 mM para a enzima de 36 horas e de 72 horas respectivamente.

As duas formas enzimáticas apresentam cooperatividade positiva, como sugerido pelos valores de coeficiente de Hill (n_H) de 1,2 para a D-galactose e de 1,6 para a dihidroxiacetona.

A análise da composição de carboidratos revelou um teor de glicosilação de 4,54 mg% para a enzima de 36 horas e 4,27 mg% para a enzima de 72 horas de crescimento, dos quais 3,30 mg e 3,16 mg respectivamente, foram resistentes à β eliminação.

1 INTRODUÇÃO

A galactose oxidase (D-galactose: oxigênio oxido redutase E.C. 1.1.3.9.) catalisa a oxidação da D-galactose a D-galactohexodialdose com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (7,8,9,10,11).

A enzima galactose oxidase foi descrita pela primeira vez em 1959 por COOPER et al (17) como sendo secretada ao meio de cultura, pelo fungo *Polyporus circinatus*. Este microrganismo foi posteriormente reclassificado como *Dactylium dendroides* (60). A enzima encontra-se distribuída na natureza em um número limitado de microorganismos (5,29). As propriedades da enzima extracelular de *Dactylium dendroides* (7,8,11,17) e de *Gibberella fujikuroi* (2,3,4), foram bem estudadas, por apresentarem nestes fungos, níveis elevados da enzima no meio de cultura.

O cultivo do microrganismo e a metodologia de purificação da enzima extracelular foram desenvolvidos por vários investigadores (7,8,10,11,34,35,40,70,71). Vários fatores como a composição do meio, concentração de inóculo interferem no aparecimento da galactose oxidase extracelular. A composição do meio e as condições que fornecem o maior rendimento em galactose oxidase extracelular no fungo *Dactylium dendroides*, foram determinadas por MARKUS et al (52).

Posteriormente, SHATZMAN & KOSMAN (66) demonstraram o efeito do pH e a densidade da cultura na síntese e secreção da enzima. Mais recentemente, PEDROSA & ZANCAN (63) estudaram o efeito do oxigênio sobre a síntese e secreção da galactose oxidase. Estes autores demonstraram que os níveis intra e extracelulares da enzima aumentam com a tensão de oxigênio. Eles sugerem que galactose oxidase seria um fator de proteção contra a toxicidade do oxigênio no fungo *Dactylium dendroides*. A toxicidade do oxigênio nos organismos é devida principalmente aos intermediários da redução do oxigênio molecular, isto é, O_2^- , H_2O_2 e OH^- (28).

A galactose oxidase extracelular é uma metaloenzima, e depende de cobre para a formação da sua forma ativa. O cobre está presente na proporção de um átomo-grama por mol de enzima e se encontra firmemente ligada a enzima. A remoção do cobre é conseguida por tratamento com dietilcarbamato ou em diálise contra H_2S , o que leva a uma modificação na conformação da enzima (7).

O papel do cobre na catálise tem sido exaustivamente investigado na enzima extracelular de *Dactylium dendroides* (14,15,16,19,24,42,44,46,47,75,76). Estes estudos sugerem que 1 ou mais resíduos de triptofano participam, juntamente com o átomo de cobre no processo de catálise (43,75). KWIATKOWSKI, L. et al (47) sugerem também o envolvimento de um resíduo de histidina no sítio catalítico.

O fungo crescido na ausência de cobre forma uma apoenzima inativa, cuja atividade pode ser resgatada através

da incubação da enzima inativa em presença de sais de cobre (7).

A galactose oxidase é totalmente inibida pelo dietilcarbamato e cianeto na concentração de $10^{-4}M$, hidroxilamina e azida na concentração de $10^{-3}M$, porém a atividade da enzima pode ser quase completamente restaurada após a diálise e incubação em presença de íons cobre na concentração de $10^{-3}M$ (7).

Enquanto a presença de superóxido dismutase inibe a reação catalisada pela galactose oxidase, o íon superóxido e o ferricianeto aumentam a velocidade da reação (31). A presença de peroxidase ativa a galactose oxidase pela remoção de H_2O_2 (10,38).

A galactose oxidase extracelular de *Dactylium dendroides* é uma proteína monomérica, de caráter básico com ponto isoelétrico próximo a 12 (44,53).

A incubação da enzima extracelular com autolisados micellais ou extratos sonicados a inibem (12). Este fator inativante é um peptídeo de peso molecular da ordem de 2.000 Da. Após tratamento ácido e térmico, este fator foi dialisável. Estudos sugerem que este fator atua como quelante de cobre, formando um complexo com o cobre da enzima. A presença de íons cobre na concentração de 1 mM evitou a inativação da enzima, bem como as amostras inativadas de enzima podem ser reativadas pela incubação "overnight" em presença de 1 mM de $CuSO_4$ a $30^\circ C$ (12).

A forma intra e extracelulares da galactose oxidase apresentam ampla especificidade quanto aos

substratos (32,53). Ambas catalisam a oxidação da D-galactose e seus derivados galactosídeos como a melibiose, rafinose e estaquiose, em que a hidroxila do C₆ não se encontra substituída. Os polímeros com resíduos terminais de D-galactose também são substratos para a galactose oxidase (8,10,52,67). Estudos recentes indicam que a galactose oxidase não somente converte o grupo alcoólico primário da posição C₆ da galactose para grupo aldeído, mas também catalisa a oxidação deste para grupo carboxílico (39). Como a afinidade da enzima extracelular é maior para galactosídeos e polímeros com resíduos terminais de D-galactose (8,10,67) e para dihidroxiacetona do que para a D-galactose, admite-se que a galactose não seja o substrato natural da enzima (78).

A galactose oxidase extracelular do fungo *Gibberella fujikuroi* apresenta características cinéticas semelhantes às descritas para a enzima de *Dactylium dendroides*. Entretanto além de cobre, possui ferro na sua molécula, peso molecular de 90.000 Da e ponto isoelétrico de 3,7 (2,3).

A atividade catalítica da enzima pode ser avaliada quantitativamente pela medida do consumo de oxigênio através do eletrodo de oxigênio (8) ou pela quantificação de $\overset{\sim}{\text{H}_2\text{O}_2}$ formado, utilizando o método enzimático acoplado com peroxidase e um reagente cromogênico tais como o-dianisidina (8), o-toluidina (67), 4-aminoantipirina (5) ou ainda por um sistema acoplado com NADH-peroxidase (9).

Estudos anteriores referiam-se a galactose oxidase

extracelular, purificada dos meios de cultura de *Dactylium dendroides* e *Gibberella fujikuroi*. Recentemente, MENDONÇA & ZANGAN (53) purificaram e caracterizaram a galactose oxidase intracelular do fungo *Dactylium dendroides*. A enzima intracelular possui especificidade semelhante a extracelular quanto aos substratos. Seu peso molecular é de 72.000 Da, ligeiramente superior à extracelular da ordem de 68.000 Da (44), quando determinados em gel de poli-acrilamida com SDS.

A galactose oxidase intracelular possui 7,7 mg% de açúcares neutros enquanto a forma extracelular possui apenas 1,7 mg%, portanto ambas as formas da enzima são glicoproteínas (53). As formas com teores maiores de carboidratos mostraram-se mais estáveis a variação de pH, inativação térmica e proteólise (54,55,56).

As glicoproteínas estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas livres no citosol ou associadas a membranas (33). A secreção de enzimas em eucariontes aparentemente está associada a glicosilação e tem sido estudada principalmente em *Saccharomyces cerevisiae* (28), utilizando como modelo as enzimas com alto teor de glicosilação tais como a fosfatase ácida e a invertase, ambas com teor de 50% de carboidrato (13,58).

A investigação do papel de carboidratos no transporte e secreção de proteínas tem sido realizado principalmente com o uso de inibidores de glicosilação tais como a tunicamicina, deoxinojirimicina, castonospermina e outros (21,22,50,59,69).

Estudos com diversas glicoenzimas demonstraram que

a presença de açúcar não é essencial para a atividade enzimática de muitas enzimas tais como a invertase, fosfatase ácida, DNase, RNase, carboxipeptidase, porém as formas deglicosiladas parecem mais susceptíveis a proteases e condições desnaturantes (62).

O teor de glicosilação parece ser importante para a secreção de enzimas com alto teor de carboidrato como a fosfatase ácida e invertase (62), bem como na secreção de glicoproteínas do fungo *Achlya* (65). Enzimas com menores teores de glicosilação como a β 1-3 glucanase, fosfatase alcalina e celulase são secretadas em níveis normais mesmo na presença de inibidores da glicosilação (21), assim nenhuma generalização pode ser feita a respeito do papel dos açúcares na secreção de proteínas.

A fosfatase ácida e a invertase de levedura apresentam teores de glicosilação maiores na sua forma extracelular (13,50). Teores inversos apresentam a α -glucosidase de *Aspergillus niger* que possui a sua forma intracelular mais glicosilada que a extracelular (64).

Os estudos com inibidores da glicosilação em galactose oxidase de *Dactylium dendroides* demonstraram que os açúcares estão ligados a enzima através da N-glicosilação e O-glicosilação. Os dados obtidos sugerem que a glicosilação não parece ser essencial à secreção da enzima (54,55,56).

O mecanismo de secreção de enzimas tem sido estudado empregando mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* não secretores das enzimas fosfatase ácida e invertase

(23,26,27,61). Estes mutantes eram deficientes na síntese das enzimas envolvidas em diferentes etapas do mecanismo de secreção. Pela incubação em temperaturas não permissíveis ocorre um acúmulo de precursores das proteínas secretadas em estágios de glicosilação específicos.

Na tentativa de obter formas esporuladas do fungo *Dactylium dendroides*, o mesmo foi submetido ao tratamento com N-Metil-N-Nitrosoguanidina (NTG). Apesar do insucesso na obtenção de formas esporuladas, vários mutantes morfológicos e bioquímicos foram isolados (18). DIAPP et al (18) caracterizaram o mutante DDD1 como duplo mutante com fenótipo $\underline{\underline{D}}$ -frutose⁻ e $\underline{\underline{L}}$ -arabinose⁻. A mutação provocou um comprometimento parcial na secreção da galactose oxidase. A sua capacidade de secretar a enzima ao meio de cultura foi afetada em 50% (18).

Outro mutante, DDD9 com características morfológicas diferentes da linhagem selvagem, apresentou crescimento restrito e distinto. O mutante foi caracterizado por KUBICKI et al (45) como $\underline{\underline{D}}$ -galactose⁻ e $\underline{\underline{L}}$ -arabinose⁻. A cinética de transporte para a $\underline{\underline{D}}$ -galactose mostrou um perfil diferenciado no mutante.

As enzimas da via de Leloir para o metabolismo de $\underline{\underline{D}}$ -galactose estão presentes no fungo *Dactylium dendroides* (77). No mutante DDD9, embora a $\underline{\underline{D}}$ -galactoquinase e a UDP-galactose-4-epimerase estejam presentes, a galactose-1-fosfato-uridilil-transferase não foi detectada (45).

A função da enzima galactose oxidase no

metabolismo do fungo não está clara. A presença da enzima no mutante deficiente em 22% na incorporação de D-galactose, exclue a sua participação no catabolismo de galactose (45).

1.1 OBJETIVO DO TRABALHO

O mutante Gal⁻Ara⁻ de *Dactylium dendroides* DD09, isolada por DIAPP et al (18), embora não seja capaz de metabolizar a D-galactose, apresenta níveis intracelulares de galactose oxidase compatíveis com os da linhagem selvagem (45). Os níveis extracelulares da enzima na linhagem selvagem são 10 vezes superiores aos intracelular (83). No mutante DD09 os níveis extracelulares correspondem apenas a 11% dos níveis apresentados pela linhagem selvagem em condições experimentais equivalentes (45).

O presente trabalho trata da purificação e caracterização da galactose oxidase intracelular do mutante DD09, e visa obter informações que permitam esclarecer o mecanismo de secreção da enzima.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Acrilamida, ágar, 4-aminoantipirina, azul de dextrana, azul de bromo fenol (ABF), azul de Coomassie brilhante R-250, dihidroxiacetona, D-fucose, β -mercaptoetanol, padrões para a determinação de peso molecular (anidrase carbônica, α lactalbumina, ovoalbumina, soroalbumina bovina), peroxidase, soroalbumina bovina fração V, SDS (dodecil sulfato de sódio), TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina), Tris (hidroximetil)amino-metano foram obtidos da Sigma Chemical Company. Bisacrilamida foi obtida da Aldrich Chemical Co. Inc.. D-galactose foi proveniente da Galbiochem.. Sepharose 6 B foi obtida da Pharmacia Fine Chemicals. Ácido acético, ácido tri-cloro-acético, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, extrato de levedura, glicina, D-glucose, fenol e metanol eram produtos da Merck.

2.2 Microorganismo

A linhagem selvagem e a mutante DD09 do fungo *Dactylium dendroides* pertencem a micoteca do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. A linhagem mutante foi obtida por tratamento da linhagem selvagem de *Dactylium dendroides* com N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina

(18).

2.3 Meios de cultura

2.3.1 Meio sólido

O meio sólido empregado para a sua manutenção foi ágar extrato malte que possui a seguinte composição:

Extrato malte	2,0 g
Peptona	0,1 g
D-Glucose	2,0 g
Ágar	2,0 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

A esterilização dos meios foi realizada em autoclave a 1 atmosfera de pressão durante 20 minutos.

2.3.2 Meio líquido

O meio líquido para a obtenção de micélios foi o meio proposto por MARKUS et al (52) com a seguinte composição:

KH_2PO_4 anidro	9,0 g
Na_2HPO_4 anidro	8,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1,0 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	2,5 mg

Extrato de levedura 1,0 g
 Água destilada q.s.p. 1000 ml

O pH final do meio foi corrigido para 5,8 com solução de ácido clorídrico diluído 1:1 (v/v). A determinação do pH foi realizado em pHmetro digital Micronal B-374. O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão durante 20 minutos.

Como fonte de carbono foi empregada uma solução de D-glucose a 20% m/v, esterilizada separadamente a 1 atmosfera de pressão durante 20 minutos. Esta solução foi adicionada assepticamente ao meio de cultura na concentração final de D-glucose a 1,0 g%.

2.4 Condições de manutenção e cultivo

A linhagem selvagem e mutante DD09 de *Dactylium dendroides* foi cultivada em ágar malte com 2,0 g% de D-glucose a 28°C por cerca de 5 dias e estocadas a 4°C, sendo a cultura renovada mensalmente.

2.4.1 Preparo do pré-inóculo

Fragmentos do micélio cultivados em meio sólido foram transferidos para um frasco erlenmeyer de 250 ml de capacidade, contendo 50 ml de meio de MARKUS (52) acrescido de 1,0 g% de D-glucose. A seguir, a cultura foi submetida a

crescimento a 28°C por 48 horas a 100 rpm em um agitador rotatório. Uma alíquota dos micélios foi então transferida com o auxílio de alça de platina, para um segundo erlenmeyer de 250 ml de capacidade contendo 50 ml do mesmo meio e 1,0 g% de D-glucose e o crescimento foi efetuado nas mesmas condições por 48 horas. A cultura assim obtida constituiu-se o pré-inóculo.

2.4.2 Cultivo em grande escala

O cultivo em grande escala foi efetuado em frascos erlenmeyer de 2 litros de capacidade, contendo 400 ml de meio de MARKUS (52) com 1,0 g% de D-glucose como única fonte de carbono.

O pré-inóculo foi homogeneizado em um liquidificador (Waring blendor) estéril durante 30 segundos. Foram transferidos 2,0 ml do homogeneizado para cada frasco contendo o meio de cultura.

O crescimento foi efetuado a 28°C sob agitação contínua a 110 rpm. Os micélios com 36 horas e 72 horas de crescimento foram recolhidos por filtração à vácuo, lavados com água destilada e utilizados para o preparo de extrato bruto ou extrato livre de células.

2.5 Preparo do extrato livre de células

O extrato bruto ou extrato livre de células foi preparado rompendo-se as células congeladas em nitrogênio líquido, por trituração em um gral de porcelana previamente resfriado. A extração foi realizada em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 contendo 0,5 mM de EDTA na proporção 1:2 (p/v). Os extratos foram centrifugados a 15.000 g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada Sorval RC-5, para a remoção de fragmentos celulares e células intactas. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima.

Para a purificação da enzima galactose oxidase intracelular, os micélios foram suspensos no mesmo tampão e as células foram rompidas em prensa (French Pressure Cell Press - Aminco Instruments) com o pistão previamente resfriado, sob a pressão de 20.000 PSI (Pound per square Inch). Cada fração da suspensão micelial foi submetida ao mesmo tratamento por duas vezes. Após centrifugação, o sobrenadante de 15.000 g foi usado como fonte de enzima.

2.6 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da galactose oxidase foi determinada pela dosagem da água oxigenada formada empregando o método enzimático acoplado de AISAKA & TERADA (5).

A decomposição da água oxigenada formada, em presença de peroxidase, neste método acopla oxidativamente a 4-aminoantipirina ao fenol, resultando num produto corado, a quinoneimina, que apresenta absorção máxima a 500 nm (5).

O sistema de incubação em um volume de 3,0 ml continha 150 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 250 μ moles de D-galactose, 21 μ moles de fenol, 1,2 μ moles de 4-aminoantipirina, 20 unidades de peroxidase e uma quantidade variável de enzima. O sistema foi incubado a 30°C por 10 minutos. A coloração desenvolvida era estimada pela absorbância a 500 nm em um espectrofotômetro Beckman DU-2.

A conversão das unidades de absorbância em μ moles de peróxido de hidrogênio foi realizada pelo emprego da curva padrão de 10 a 280 nmoles de H_2O_2 . A água oxigenada utilizada para a calibração foi previamente titulada pelo método de VOGEL (72).

Para cada determinação enzimática foram realizados os controles sem enzima e os controles sem substratos.

2.7 Unidade de enzima e atividade específica

Uma unidade de galactose oxidase (UE) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de H_2O_2 por minuto. A atividade específica foi expressa pela razão entre as unidades de enzima por miligrama de proteína.

2.8 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas nas diferentes frações foram previamente dialisadas em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 durante 16 horas, e realizada pelo método de LOWRY et al (51), utilizando a soroalbumina bovina como padrão.

A dosagem de proteínas nas frações eluída da coluna de Sepharose 6B foi realizada segundo o método espectrofotométrico de WARBURG & CRISTIAN (73).

2.9 Curva de crescimento e atividade enzimática

O crescimento do fungo em função do tempo foi determinado utilizando-se erlenmeyer de 2 litros contendo 400 ml de meio de MARKUS (52) e D-glucose a 1 g% como fonte de carbono. Cada um dos frascos foi inoculado com 2,0 ml de pré-inóculo homogeneizado e incubado a 28°C sob agitação rotatória a 100 rpm.

Em intervalos pré-estabelecidos entre 18 e 85 horas, 50 ml da cultura foi coletada, filtrada em disco de papel (Wheaton) de peso conhecido adaptados a um sistema de filtração Millipore. Os filtros contendo os micélios foram então levados à estufa de secagem a 60°C até peso constante, obtendo-se assim o peso seco dos micélios em diversos tempos.

Nos mesmos intervalos de tempo, outros 50 ml da cultura foi coletada para a determinação da atividade

enzimática no micélio e no meio de cultura, conforme descrito no ítem 2.6.

2.10 Estabilidade térmica da galactose oxidase no extrato livre de células

Frações de 5 ml de extrato bruto preparado de micélio coletados com 36 horas e 72 horas de crescimento foram submetidas a diferentes temperaturas (45° a 60°C) durante 5 minutos. Estas frações foram então resfriadas rapidamente em banho de gelo e centrifugadas a 15.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi usado para a medida da atividade enzimática.

2.11 Estabilidade da galactose oxidase a 55°C a diversos tempos

Frações de 5 ml de extrato bruto preparado com o micélio coletado com 36 horas e 72 horas de crescimento foram incubadas a 55°C. A intervalos de tempo de 3,0 a 15 minutos, o material foi resfriado e processado conforme descrito no ítem anterior.

2.12 Purificação da galactose oxidase

O processo de purificação da galactose oxidase intracelular do mutante DDO9 seguiu a metodologia estabelecida por MENDONÇA & ZANGAN (53) para a enzima da linhagem selvagem.

A purificação foi realizada a partir de 146 g e 205 g de micélio úmido coletados com 36 horas e 72 horas de crescimento em meio de MARKUS respectivamente (52). Os micélios foram suspensos em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 contendo 0,5 mM de EDTA na proporção de 1:2 (p/v) e rompidos na French Pressure Cell. Após centrifugação a 15.000 g por 15 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada Sorval RC-5, foram obtidos 365 ml de extrato livre de células do micélio coletado com 36 horas e 515 ml de extrato livre de células do micélio coletado com 72 horas de crescimento. Estes extratos foram submetidos às etapas posteriores de purificação.

Uma alíquota dos extratos brutos foi reservada para a determinação da atividade enzimática e a dosagem de proteínas. Essas alíquotas dos extratos de 72 horas foram previamente dialisadas durante 12 horas em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 contendo 0,5 mM de sulfato de cobre.

2.12.1 Inativação térmica

O extrato livre de células foi incubado a 55°C

durante 5 minutos, utilizando frações de aproximadamente de 50 ml. Após a inativação, as frações foram rapidamente resfriadas em banho de gelo, centrifugados a 15.000 g durante 15 minutos a 4°C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi submetido a etapa seguinte de purificação.

2.12.2 Fracionamento pelo sulfato de amônio

Ao sobrenadante da etapa anterior foi adicionado lentamente cristais de sulfato de amônio sob agitação constante e suave até a saturação de 45%. A solução foi mantida em repouso por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi removido por centrifugação a 15.000 g por 15 minutos. Ao sobrenadante foi então adicionado da mesma forma, sulfato de amônio em cristais até a saturação de 65%. A solução foi mantida em repouso por 15 minutos a 4°C e centrifugada. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo a enzima foi suspenso em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 em um volume aproximado de 1/40 do volume inicial, e então dialisado contra tampão acetato de amônio 0,1 M pH 7,2 contendo 0,5 mM de CuSO_4 durante 12 horas.

2.12.3 Cromatografia em Sepharose 6 B

As frações dialisadas da etapa anterior contendo

180 mg e 144 mg de proteína total obtidas a partir dos micélios coletados com 36 horas e 72 horas de crescimento respectivamente, foram cromatografados em coluna de Sepharose 6B (1,7 cm x 24,5 cm), com volume total da coluna de 55,58 ml. A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de amônio 0,1 M pH 7,2 e o fluxo era de 1,0 ml/min.

As proteínas contaminantes foram eluídas com 4 a 5 volume total da coluna, com o mesmo tampão de equilíbrio, coletadas em frações de 5 ml com o auxílio de um coletor de frações LKB 7.000, e monitoradas pela leitura no espectrofotômetro de acordo com o método de WARBURG & CRISTIAN (73).

A enzima galactose oxidase foi eluída da coluna com uma solução de D-fucose 0,1 M em tampão acetato de amônio 0,1 M pH 7,2, coletadas em frações de 2,0 ml. As frações contendo as enzimas foram reunidas, e distribuídas em frações de 0,5 ml e mantidas congeladas a -20°C.

2.13 Eletroforese em gel de poliácridamida

As amostras de galactose oxidase intracelular purificada dos micélios 36 horas e 72 horas de crescimento foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida a 14% contendo 0,1% de SDS, segundo LAEMMLY (48). A eletroforese foi realizada em placa (14 cm x 11 cm), onde foram aplicadas 50 µg de cada amostra, previamente tratadas com 2% de SDS, 5% de β-mercaptoetanol e incubadas em

banho-fervente durante 5 minutos.

O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina 25 mM pH 8.3 com 0,1% de SDS e a eletroforese foi desenvolvida a 4°C durante 9 horas. A corrente aplicada foi de cerca de 30 mA/placa por uma hora e 21 mA/placa no restante da corrida.

As proteínas foram fixadas com solução de TCA a 10% durante 30 minutos, em seguida corada com azul de Coomassie brilhante R-250 (0,25 g%) durante uma hora a 50°C, e descoradas com solução de ácido acético a 5% a 50°C (57).

2.14 Determinação de peso molecular

O peso molecular foi determinado por eletroforese em gel de poli(acrilamida) utilizando um gel separador a 10% e um gel empilhador a 5% contendo 0,1% de SDS em condições desnaturantes, segundo LAEMMLY (48) modificado. As amostras de enzima e os marcadores de peso molecular (α lactalbumina 14.200; anidrase carbônica 29.000; ovoalbumina 45.000; Soroalbumina bovina 66.000 e 132.000 daltons) foram tratadas com SDS a 2% e β -mercaptoetanol a 5% e incubados em banho-fervente durante 5 minutos.

A eletroforese foi realizada em placa (14 cm x 11cm), onde foram aplicados 5 μ g de cada amostra e 5 μ g de cada padrão de peso molecular. A eletroforese foi desenvolvida utilizando tampão Tris-glicina 25 mM pH 8,3 contendo 0,1% de SDS e azul de bromo fenol (ABF) como

marcador de corrida durante 9 horas a 4°C. A corrente aplicada foi de 8 mA/gel por uma hora e 15 mA/gel no restante da corrida.

As proteínas foram fixadas com solução de TCA a 10% durante 30 minutos, coradas com azul de Coomassie brilhante R-250 (0,25 g%) por 1 hora a 50°C e descoradas com solução de ácido acético a 5% a 50°C (57).

A determinação do peso molecular das enzimas foi feita considerando a mobilidade relativa (M_r) das proteínas em relação ao corante.

2.15 Efeito da concentração de enzima na velocidade de reação

O efeito da concentração de enzima sobre a velocidade de reação foi avaliada pelo método enzimático acoplado em sistema de 3,0 ml contendo 150 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 1,2 μ moles de aminoantipirina, 21 μ moles de fenol, 20 unidades de peroxidase, 250 μ moles de D-galactose e quantidades variáveis de enzima (0,075 μ g a 0,75 μ g). O sistema foi incubado a 30°C por 10 minutos.

2.16 Efeito do tempo de incubação na atividade da galactose oxidase intracelular

A atividade enzimática da galactose oxidase

Intracelular foi avaliada pela produção de água oxigenada pelo método enzimático acoplado em um sistema de 3,0 ml contendo 150 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 1,2 μ moles de aminoantipirina, 21 μ moles de fenol, 20 unidades de peroxidase, 250 μ moles de D-galactose e 0,075 μ g de enzima de 36 horas ou 0,076 μ g de enzima de 72 horas. O sistema foi incubado a 30°C num período de tempo variável entre 3,0 e 30 minutos.

2.17 Efeito da temperatura na atividade enzimática

Para avaliação do efeito da temperatura e incubação sobre a atividade da galactose oxidase, foram submetidas sistema de 3,0 ml contendo 150 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 1,2 μ moles de aminoantipirina, 21 μ moles de fenol, 20 unidades de peroxidase e 250 μ moles de D-galactose e 0,380 μ g de enzima de 36 horas ou 0,375 μ g de enzima de 72 horas. O sistema foi submetido a diferentes temperatura entre 10° a 80°C durante 10 minutos.

2.18 Efeito do pH do sistema na atividade enzimática

Para a avaliação do efeito do pH do sistema na atividade da enzima foram submetidas sistemas de 3,0 ml contendo 0,75 μ g de enzima de 36 horas ou 0,76 μ g de enzima de 72 horas, 1,2 μ moles de aminoantipirina, 21 μ moles de

fenol, 250 μ moles de D-galactose, 20 unidades de peroxidase e 150 μ moles de tampão fosfato em diferentes valores de pH entre 5,3 a 8,0. O pH da mistura foi determinado em pHmetro digital Micronal B-374. O sistema foi incubado a 30°C durante 10 minutos e avaliada a atividade enzimática pelo método enzimático acoplado.

2.19 Efeito da concentração de substrato

A galactose oxidase intracelular de 36 horas e de 72 horas de crescimento foram analisadas frente a D-galactose e dihidroxiacetona como substratos e determinadas as constantes cinéticas.

Todos os reagentes foram previamente saturados com oxigênio através de borbulhamento de O₂ durante 15 minutos, e os teores de oxigênio foram avaliados na fase gasosa das soluções por cromatografia em fase gasosa (63).

A velocidade de reação foi determinada em sistema de 3,0 ml contendo 150 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 1,2 μ moles de aminoantipirina, 21 μ moles de fenol, 20 unidades de peroxidase e concentração variável de substrato. O sistema foi previamente termostatizado a 30° C. A reação foi iniciada pela adição de 0,75 μ g de enzima 36 de horas ou 0,76 μ g de enzima de 72 horas, e acompanhadas durante os 3 minutos iniciais a 500 nm em espectrofotômetro Gilford equipado de banho-maria com água circulante mantida a 30°C e registrador para a leitura das velocidades iniciais. As

constantes cinéticas $K_{m_{app}}$ e $V_{máx}$ da galactose oxidase intracelular para a D-galactose e dihidroxiacetona foram determinadas pelos gráficos de duplos recíprocos de LINEWEAVER-BURK (49), e as constantes $S_{0,5}$ e n_H (constante de HILL) foram determinadas no gráfico de HILL (36). Os dados são quaduplicatas de uma mesma experiência.

2.20 Determinação do conteúdo de carboidratos das enzimas

As amostras de preparações homogêneas da galactose oxidase intracelular de 36 horas e de 72 horas foram concentradas e dialisadas contra água destilada durante 72 horas, com troca de água a cada 3 horas. A concentração dos açúcares totais nessas amostras foi determinada pelo método fenol-sulfúrico (20) utilizando 200 μ g de proteína em cada ensaio e tendo D-glucose como padrão.

2.21 Tratamento alcalino

Amostras (300 μ g) de galactose oxidase intracelular de 36 horas e de 72 horas previamente dialisadas por 72 horas contra água destilada foram submetidas a um processo de β eliminação, segundo as condições propostas por HOLT & HART (37): NaOH 0,1 N por 18 horas a 37°C. Após o tratamento alcalino, as preparações foram neutralizadas com ácido acético 0,1 N e dialisadas

novamente por 72 horas contra água destilada para a remoção de açúcares livres e demais reagentes. As amostras foram então desidratadas em liofilizador New Brunswick Scientific e o conteúdo de açúcares totais remanescentes foi determinado pelo método fenol-sulfúrico (20).

3 RESULTADOS

3.1 Níveis de galactose oxidase intracelular em função do crescimento

O fungo *Dactylium dendroides* DD09 crescido em meio de MARKUS (52) apresenta um perfil com dois picos de atividade intracelular (Fig. 1 B). Um pico de atividade na fase exponencial de crescimento e outro na fase estacionária. O mesmo perfil foi observado quando o fungo foi crescido em meio contendo tiamina como fator de crescimento, em substituição ao extrato de levedura.

As atividades extracelulares atingem o máximo em 66 horas de crescimento (Fig. 1 A). Para comparar os níveis de enzima extracelulares entre a linhagem selvagem e a mutante, foi realizado um experimento em 48 horas de crescimento de ambos, que corresponde ao tempo ideal para a secreção da enzima pela linhagem selvagem (45). Os resultados estão apresentados na tabela 1. A diálise do meio em tampão fosfato 10 mM contendo 0,5 mM de sulfato de cobre não aumentou a atividade de ambas preparações. Portanto, para uma mesma massa micelial, o mutante secretou 6,8 vezes menos enzima que o tipo selvagem. No mesmo tempo o mutante secretou 50% a mais de proteínas que o tipo selvagem, considerando a mesma massa micelial.

3.2 Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas

A atividade da galactose oxidase dos extratos brutos de micélios de 36 horas e de 72 horas de crescimento mostrou-se relativamente estável a temperaturas entre 45°C e 55°C. Quando submetidos a temperatura de 55°C, a perda foi de 7% e 15% de atividade respectivamente para as enzimas de 36 horas e de 72 horas (fig. 2).

3.3 Estabilidade da enzima a 55°C

A enzima do extratos brutos dos micélios de 36 horas e de 72 horas de crescimento foi estável até 5 minutos de incubação à temperatura de 55°C. Após este tempo há uma perda progressiva na atividade enzimática (fig.3). A meia-vida da enzima à 55°C foi de 9,5 minutos e 12 minutos para a enzima de 36 horas e de 72 horas respectivamente.

3.4 Purificação da galactose oxidase intracelular

A galactose oxidase intracelular dos micélios de 36 e de 72 horas de crescimento foi submetida a um processo de purificação, descrito por MENDONÇA & ZANGAN (53) para a enzima intracelular do fungo *Dactylium dendroides*.

O processo de purificação constou de uma etapa de inativação térmica a 55°C por 5 minutos, fracionamento com

sulfato de amônio 45-65% e cromatografia de afinidade em Sepharose 6 B.

Os perfis cromatográficos das duas enzimas em coluna de Sepharose 6 B estão mostrados na figuras 4 e 5. Em ambos os casos, a galactose oxidase foi eluída da coluna de Sepharose 6 B com solução de D-fucose 0,1 M em tampão acetato de amônio 0,1 M pH 7,2.

A enzima do micélio de 36 horas de crescimento, após a eluição da coluna, apresentou um grau de purificação de 3.680 vezes e um rendimento de 144%, e a enzima do micélio de 72 horas de crescimento foi obtida com um grau de purificação de 4.446 vezes e um rendimento de 193% (tabela 2. e 3.).

3.5 Homogeneidade das enzimas purificadas

As preparações enzimáticas de 36 horas e de 72 horas após o processo de purificação, apresentaram-se homogêneas, em bandas únicas observadas em eletroforese em gel de poliácridamida (fig. 6).

3.6 Determinação de peso molecular

A determinação do peso molecular, realizado em gel de poliácridamida a 10% com SDS em condições desnaturantes, forneceu um peso molecular da ordem de 70.000 Da para a

enzima de 36 horas e 68.000 Da para a enzima de 72 horas (fig. 7 e 8).

3.7 Efeito da concentração de enzima

O efeito da concentração de galactose oxidase sobre a velocidade de reação está apresentada na figura 9. Para ambas enzimas, a velocidade de oxidação de D-galactose foi linear entre 0,075 μ g a 0,75 μ g de proteína.

3.8 Efeito do tempo de incubação

As velocidades de reação para as enzimas de 36 horas e de 72 horas de crescimento, apresentaram-se lineares até 30 minutos de incubação (fig. 10).

3.9 Efeito do pH

A faixa de pH ótimo de catálise da galactose oxidase está entre 6,8 e 7,0 tanto para a enzima de 36 horas quanto para a enzima de 72 horas (fig. 11).

3.10 Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade da galactose oxidase

As enzimas de 36 horas e de 72 horas foram ensaiadas em diversas temperaturas na faixa de 10°e 80°C. A temperatura ótima de catálise foi de 30°C para ambas enzimas (fig. 12).

3.11 Efeito da concentração dos substratos sobre a velocidade de reação

O efeito da concentração de D-galactose (fig. 13 e 14) e dihidroxiacetona (fig. 16 e 17) sobre a velocidade de reação das enzimas de 36 horas e 72 horas são apresentados.

Os valores de $K_{m_{app}}$ determinados pelo método de LINEWEAVER-BURK (49) para a D-galactose foi de 77 mM para a enzima de 36 horas e 100 mM para a enzima de 72 horas (Tabela 4.). Enquanto que para a dihidroxiacetona, o valor de $K_{m_{app}}$ encontrado foi de 17,87 mM para a enzima de 36 horas e 26,89 mM para a enzima de 72 horas (Tabela 5.).

Estes dados foram também analisados através do gráfico de HILL (36) (fig.15 e 18), obtendo-se os valores de $S_{0.5}$ e coeficiente de Hill (n_H) apresentados na Tabela 4. e 5.

Para a D-galactose, os valores de $S_{0.5}$ foram de 79,43 mM para a enzima de 36 horas e 100 mM para a enzima de 72 horas, e para a dihidroxiacetona foram de 26,30 mM para a enzima de 36 horas e 29,51 mM para a enzima de 72 horas.

Os valores de coeficiente de Hill foram maiores que 1,0 para a D-galactose e dihidroxiacetona. Os gráficos

de LINEWEAVER-BURK (49) confirmam a cooperatividade cinética de ambas as enzimas para a D-galactose e dihidroxiacetona, porém a cooperatividade foi mais acentuada para dihidroxiacetona.

3.12 Teor de açúcares neutros totais

A análise do conteúdo de açúcares neutros totais da galactose oxidase foi realizada pelo método fenol-sulfúrico (20). As enzimas de 36 horas e de 72 horas apresentaram valores de 4,54 mg% e 4,27 mg% respectivamente (Tabela 6.).

3.13 Tratamento alcalino

Após o tratamento alcalino suave, o conteúdo de açúcares totais foi reduzido em 27% e 26% (Tabela 6.). Os resultados indicam a presença de 73% e 74% de ligações glicosídicas resistentes ao tratamento alcalino suave na estrutura das enzimas.

TABELA 1. NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR EM 48 HORAS DE CRESCIMENTO

LINHAGEM	PESO SECO DE MICÉLIO (mg)	ATIVIDADE UE TOTAL	PROTEÍNA TOTAL (mg)	PROTEÍNA/mg MICÉLIO
SELVAGEM	264	104,0	10,27	0,040
DD09	96	4,8	5,77	0,060

As culturas foram realizadas em meio de MARKUS (52) contendo D-glucose a 1,0 g%, conforme Materiais e Métodos ítem 2.4.2. Após 48 horas de crescimento, os micélios foram recolhidos para a determinação do peso seco, e o meio de cultura foi dialisado em tampão fosfato 10 mM e liofilizado para a determinação da atividade enzimática e a dosagem de proteínas.

TABELA 2. TABELA DE PURIFICAÇÃO DA GALACTOSE OXIDASE DOS MICÉLIOS COM 36 HORAS DE CRESCIMENTO

ETAPAS	VOLUME (ml)	UE ml^{-1}	PROT. $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	ATIV. ESPEC. $\text{UE} \cdot \text{mg}^{-1}$	PURIF.	REND. %
EXTRATO BR.	365	0,590	11,7	0,050	-	100
INAT. TÉRM.	295	0,773	6,67	0,116	2,32	106
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9	33,75	20,00	1,687	33,7	141
SEPHAROSE 6B	14	22,12	0,12	184	3.680	144

TABELA 3. TABELA DE PURIFICAÇÃO DE GALACTOSE OXIDASE DOS MICÉLIOS COM 72 HORAS DE CRESCIMENTO

ETAPAS	VOLUME (ml)	UE ml^{-1}	PROT. $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	ATIV. ESPEC. $\text{UE} \cdot \text{mg}^{-1}$	PURIF.	REND. %
EXTRATO Br.	515	0,094	6,21	0,015	-	100
INAT.TÉRM.	425	0,138	3,21	0,043	2,8	121
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12	8,844	12,0	0,570	38,0	170
SEPHAROSE 6B	20	4,670	0,07	66,70	4.446	193

Atividade específica do extrato bruto antes da diálise foi de 0,002 UE/mg.

TABELA 4. PARÂMETROS CINÉTICOS DA GALACTOSE OXIDASE DE 36 E DE 72 HORAS PARA A D-GALACTOSE

ENZIMA	$Km_{app.}$ (mM)	$S_{0,5}$ (mM)	n_H
36 horas	$77,0 \pm 3,89$	$79,4 \pm 4,13$	$1,19 \pm 0,05$
72 horas	$100,0 \pm 6,74$	$100,0 \pm 5,02$	$1,20 \pm 0,06$

Condições experimentais conforme descrito em Materiais e Métodos ítem 2.19. Os dados foram obtidos das figuras 13, 14 e 15. Os valores $\pm$ representam os desvios padrões.

TABELA 5. PARÂMETROS CINÉTICOS DA GALACTOSE OXIDASE DE 36 E DE 72 HORAS PARA A DIHIDROXIACETONA

ENZIMA	$K_{m_{app.}}$ (mM)	$S_{0.5}$ (mM)	n_H
36 horas	$17,87 \pm 1,38$	$26,3 \pm 1,25$	$1,66 \pm 0,09$
72 horas	$28,89 \pm 3,70$	$29,5 \pm 2,92$	$1,50 \pm 0,06$

Condições experimentais conforme descrito em Materiais e Métodos ítem 2.19. Os dados foram obtidos dos gráficos das figuras 16, 17 e 18. Os valores $\pm$ representam os desvios padrões.

TABELA 6. CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS EM AÇÚCARES TOTAIS

ENZIMA	AÇÚCARES TOTAIS (mg%)	
	sem tratamento	NaOH 0.1 N
36 horas	4,54	3,30
72 horas	4,27	3,16

A determinação dos açúcares foi realizada pelo método fenol-sulfúrico, conforme descrito em Materiais e Métodos ítem 2.20 e 2.21.

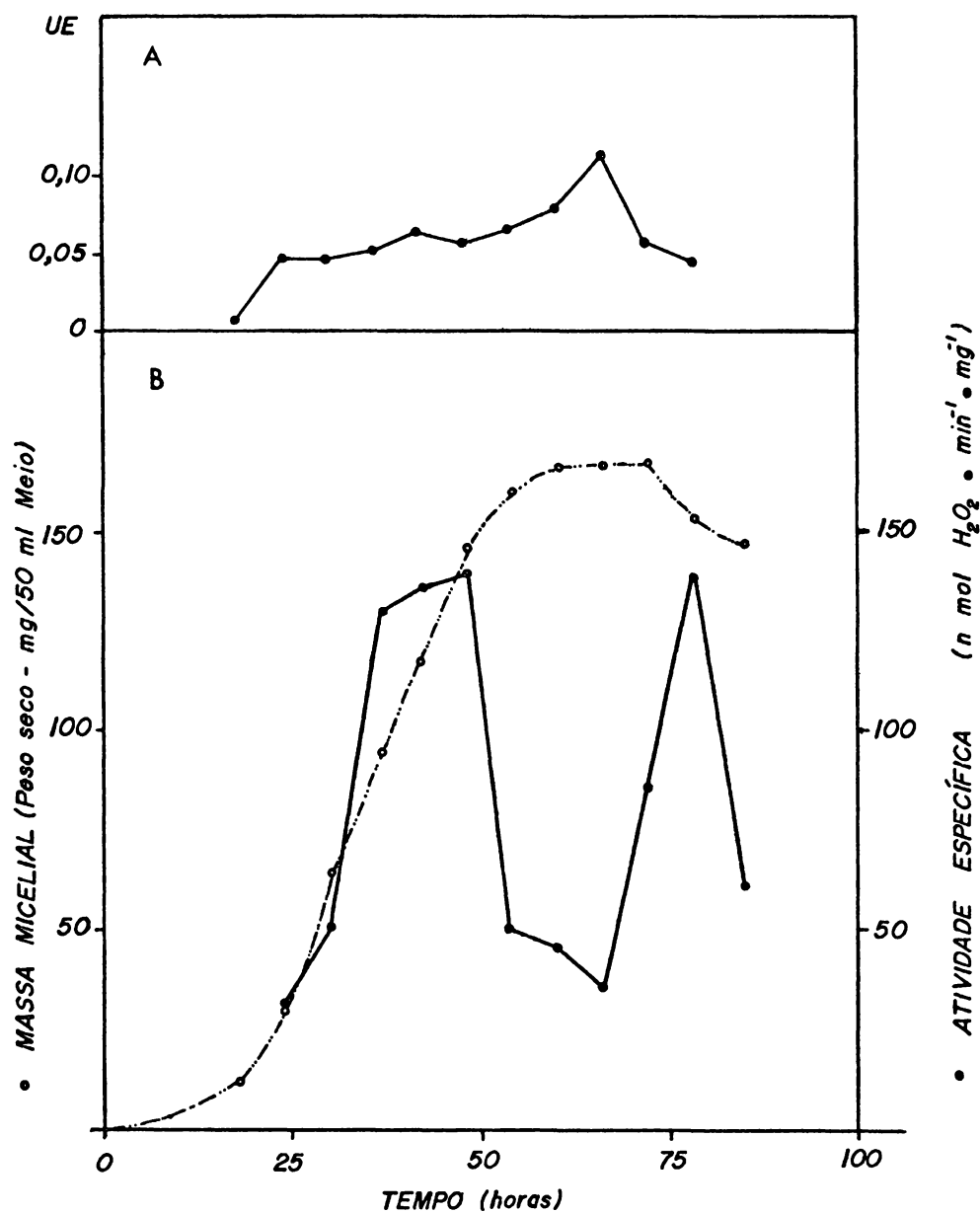


Fig. 1. Níveis de galactose oxidase em função do crescimento.

Condições experimentais conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.9).

A - Galactose oxidase extracelular

B - Galactose oxidase intracelular

● - Atividade enzimática

○ - Crescimento micelial

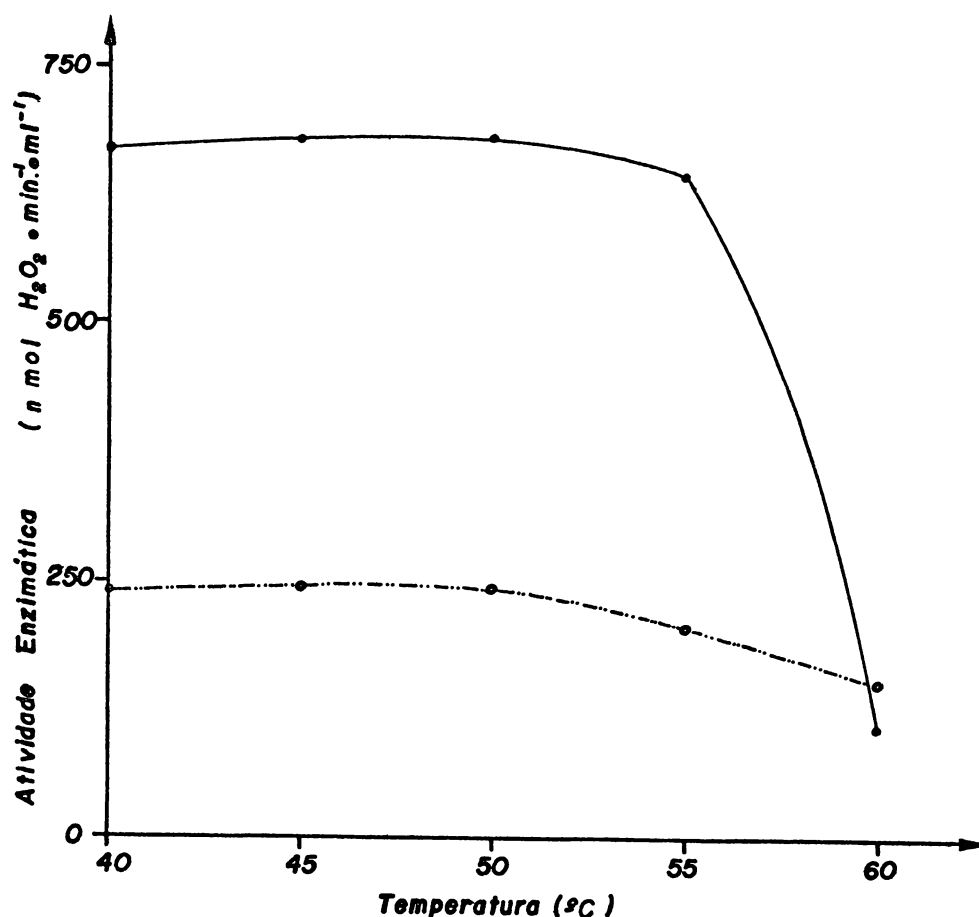


Fig. 2. Estabilidade da galactose oxidase no extrato bruto a diferentes temperaturas

Condições experimentais conforme descrito em Materiais e Métodos ítem 2.10.

● - Extrato bruto preparado de micélio coletado com 36 horas de crescimento. Atividade do extrato bruto sem tratamento térmico: 693 nmoles H₂O₂ . min⁻¹ . ml⁻¹.

○ - Extrato bruto preparado de micélio coletado com 72 horas de crescimento. Atividade do extrato bruto sem tratamento térmico: 240 nmoles H₂O₂ . min⁻¹ . ml⁻¹, medida após diálise em tampão fosfato 10 mM + CuSO₄ 0,5 mM durante 15 horas.

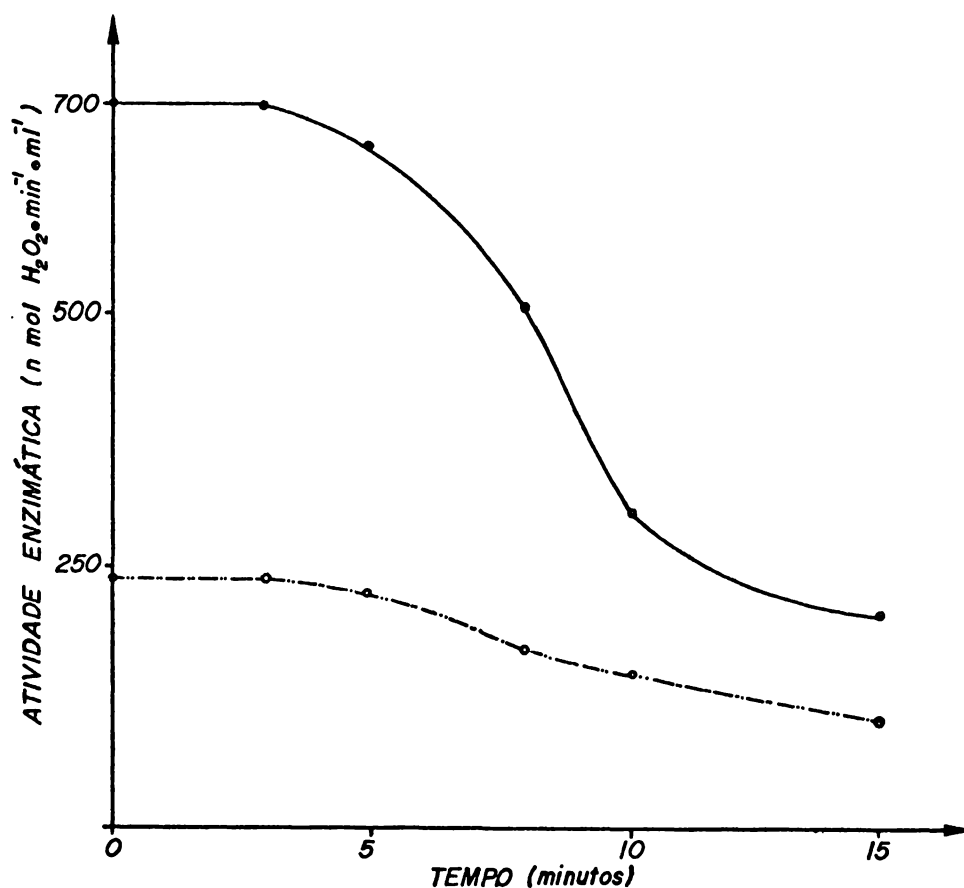


Fig. 3. Estabilidade da galactose oxidase no extrato bruto a 55° C.

Condições experimentais conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.11).

● - Extrato bruto preparado de micélio de 36 horas. Atividade enzimática do extrato sem tratamento térmico: 700 nmoles H_2O_2 .min⁻¹.ml⁻¹.

○ - Extrato bruto preparado de micélio de 72 horas. Atividade enzimática do extrato sem tratamento térmico: 240 nmoles H_2O_2 .min⁻¹.ml⁻¹, determinados após diálise em tampão fosfato 10 mM pH 7.0 + $CuSO_4$ 0,5 mM.

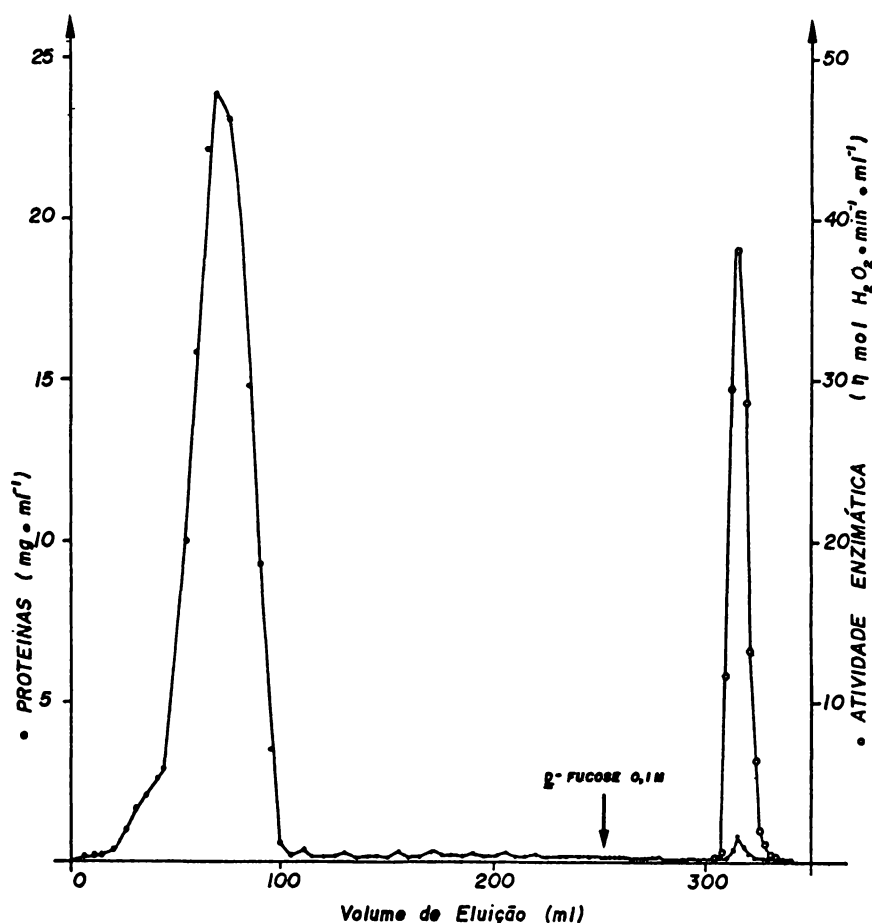


Fig. 4. Perfil de eluição da galactose oxidase intracelular de 36 horas em coluna de Sepharose 6 B.

A coluna (1,7 cm x 24,5 cm) foi equilibrada com tampão acetato de amônio 0,1 M pH 7,2.

Proteína total aplicada na coluna: 180 mg.

A eluição da galactose oxidase foi realizada com D-fucose 0,1 M em tampão acetato de amônio 0,1 M pH 7,2.

● - Proteínas

○ - Atividade enzimática

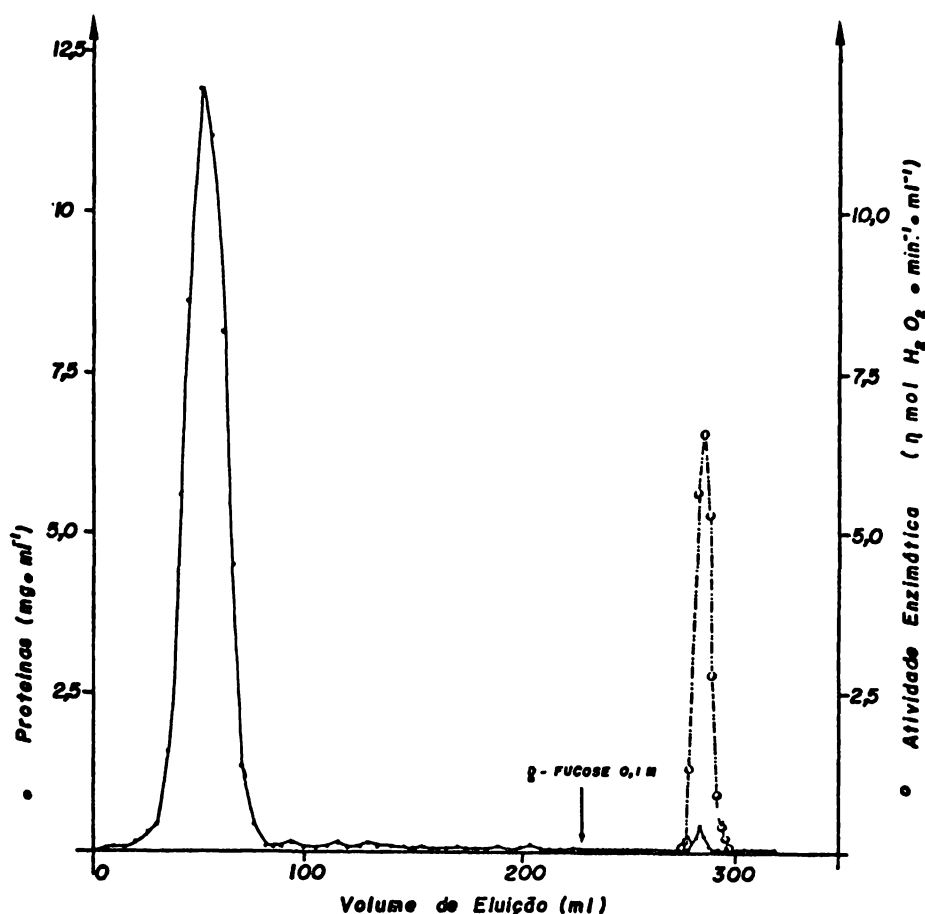


Fig. 5. Perfil de eluição da galactose oxidase intracelular de 72 horas em coluna de Sepharose 6 B.

A coluna (1,7 cm x 24,5 cm) foi equilibrada com tampão acetato de amônio 0,1 M pH 7,2.

Proteína total aplicada na coluna: 144 mg.

A eluição da galactose oxidase foi realizada com solução de D-fucose 0,1 M em tampão acetato de amônio pH 7,2.

● - Proteínas

○ - Atividade enzimática

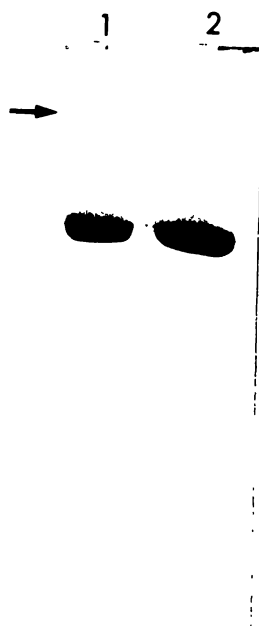


Fig. 6. Homogeneidade das enzimas purificadas

Homogeneidade determinada em eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes. A eletroforese foi realizada em placa onde foram aplicadas 50 μ g de cada enzima, e desenvolvida segundo descrito em Materiais e Métodos ítem 2.13. A seta indica a origem da migração.

1 - enzima de 36 horas

2 - enzima de 72 horas

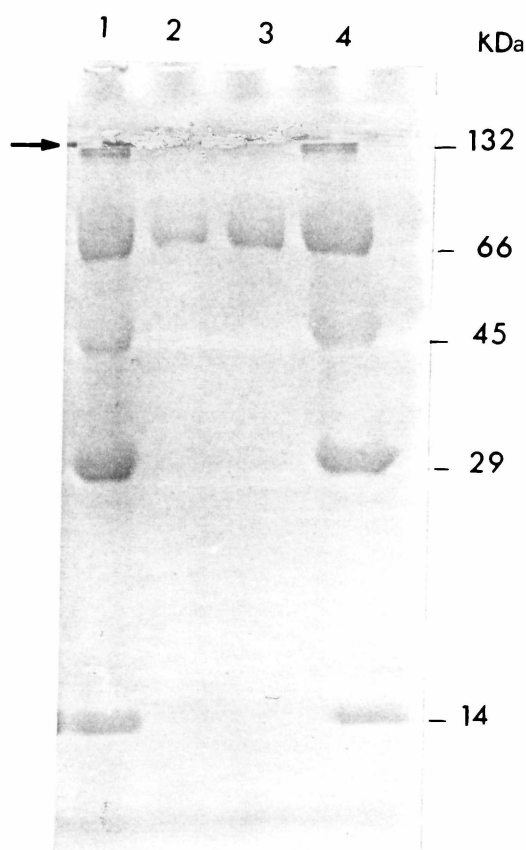


Fig. 7. Perfil eletroforético da galactose oxidase (36 e 72 horas) em gel de poliacrilamida.

Amostras (5,0 μ g) da enzima de 36 e de 72 horas foram previamente desnaturadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo 0,1% de SDS, e desenvolvida conforme descrito em Materiais e Métodos ítem 2.14. A seta indica a origem da migração.

- 1 - mistura de padrões de peso molecular
- 2 - enzima de 36 horas
- 3 - enzima de 72 horas
- 4 - mistura de padrões de peso molecular

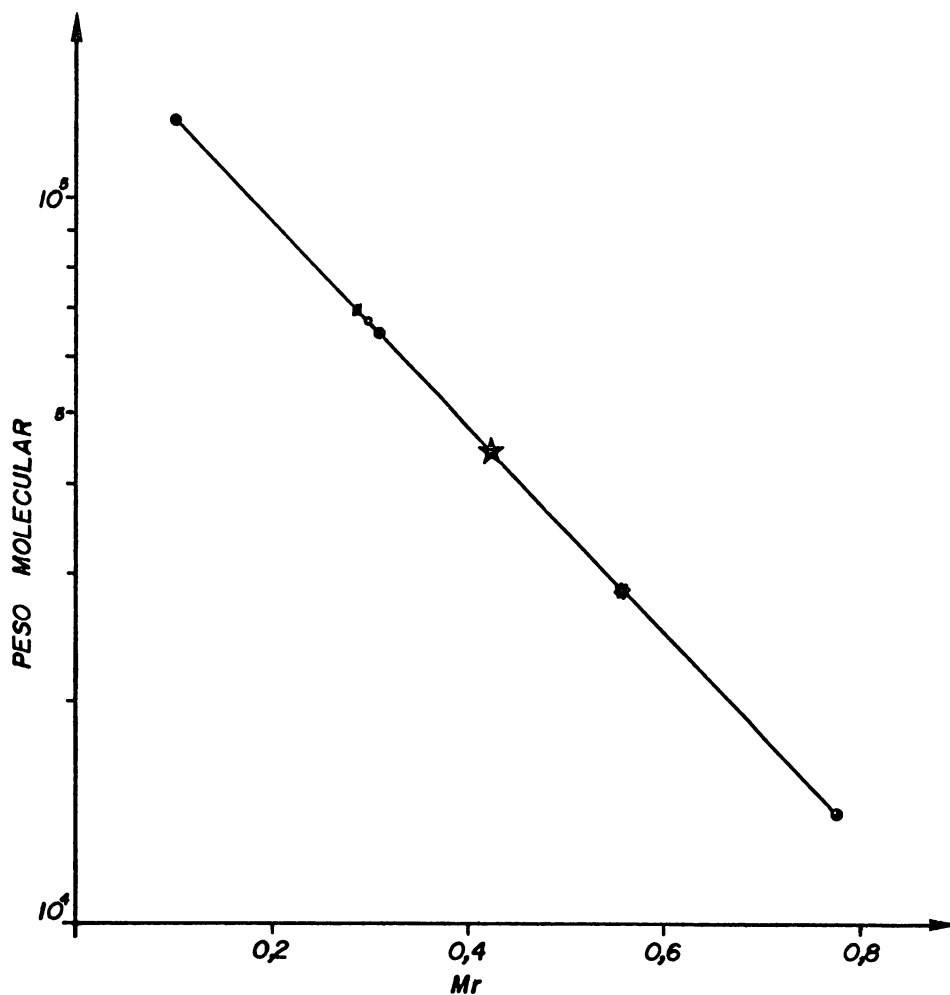


Fig. 8. Determinação do peso molecular das formas de galactose oxidase intracelular por eletroforese em gel de poli(acrilamida) em condições desnaturantes.

A eletroforese foi realizada conforme descrito em Materiais e Métodos ítem 2.14. Foram aplicadas 5,0 μ g de enzima e 5,0 μ g de cada padrão de peso molecular.

Padrões de peso molecular expresso em kDa:

- - Soroalbumina bovina, 66 e 132 ; ★ - Ovoalbumina, 45 ;
- * - Anidrase Carbônica, 29 ; • - α Lactalbumina, 14,2.
- ◆ - Enzima de 36 horas
- - Enzima de 72 horas

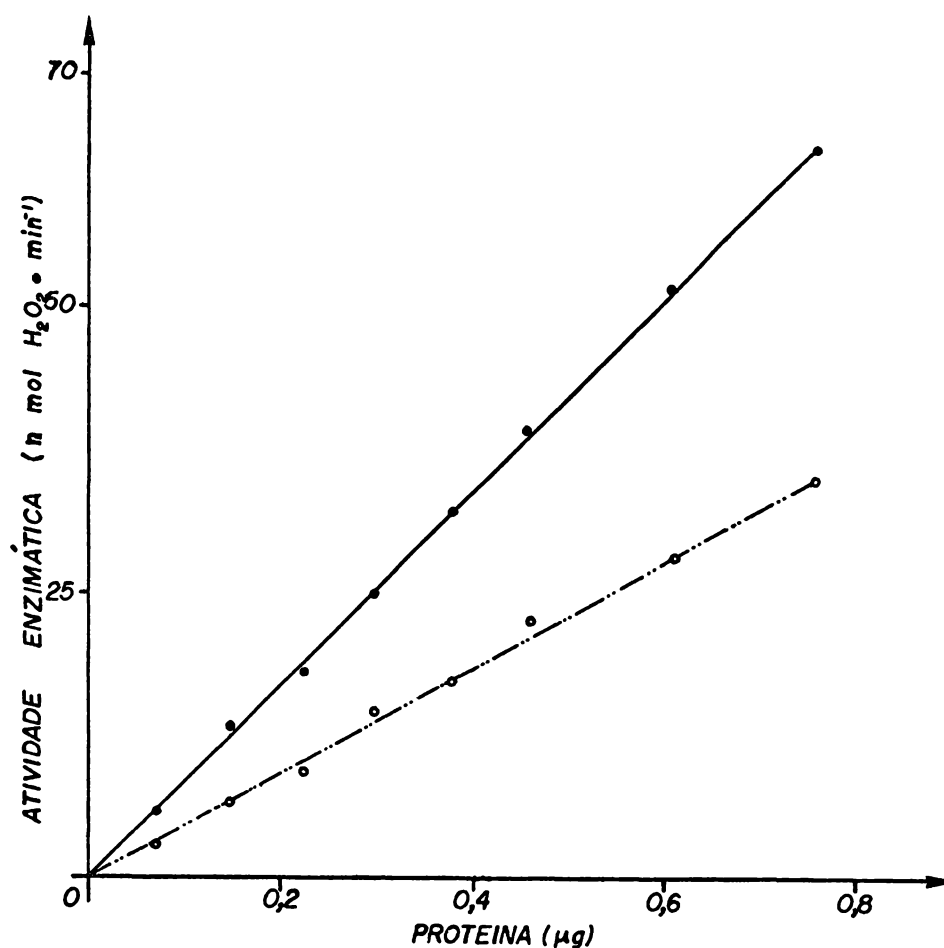


Fig. 9. Efeito de concentração de galactose oxidase sobre a velocidade de reação.

Sistema de incubação contendo 150 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 1,2 μ mol de aminoantipirina, 21 μ moles de fenol, 20 unidades de peroxidase, 250 μ moles de D-galactose e concentrações de enzima entre 0,075 μ g ou 0,75 μ g num volume final de 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição de enzima e incubados a 30°C durante 10 minutos.

● - Enzima de 36 horas

○ - Enzima de 72 horas

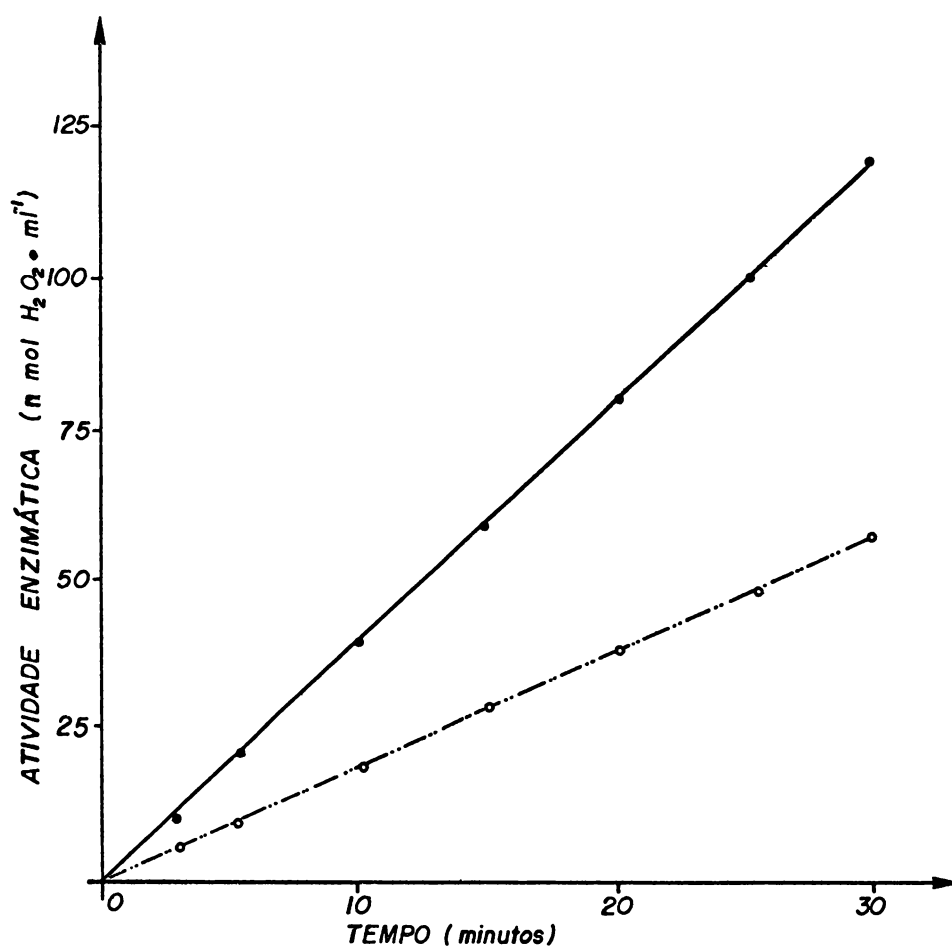


Fig. 10. Efeito do tempo de incubação sobre a atividade enzimática.

Sistema contendo 150 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 1,2 μ mol de aminoantipirina, 21 μ moles de fenol, 20 unidades de peroxidase, 250 μ moles de D-galactose, e concentrações de 0,075 μ g ou 0,076 μ g de enzima, respectivamente de 36 e de 72 horas, num volume final de 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição de enzima e incubados a 30°C num período de tempo até 30 minutos.

- - Enzima de 36 horas
- - Enzima de 72 horas

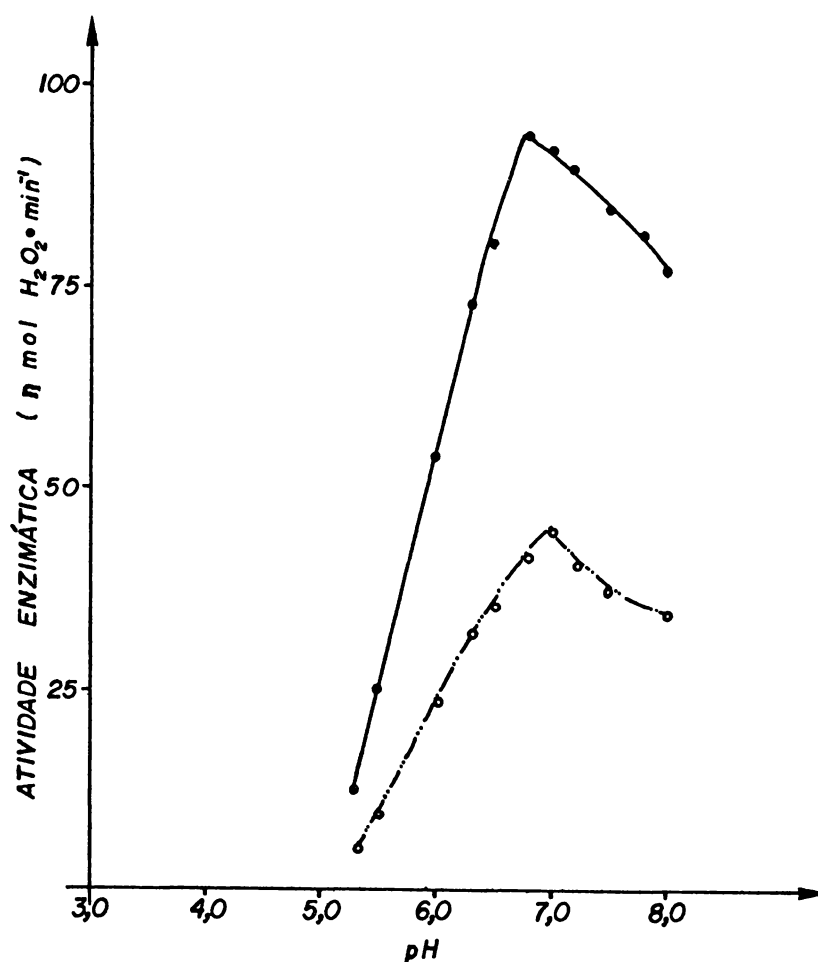


Fig. 11. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da galactose oxidase.

Sistema de incubação contendo 1,2 μmol de aminoantipirina, 21 μmoles de fenol, 20 unidades de peroxidase, 250 μmoles de D-galactose, 150 μmoles de tampão fosfato pH 5,3 a 8,0, e concentrações de 0,75 μg ou 0,76 μg de enzima, respectivamente de 36 e de 72 horas, num volume final de 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição de enzima e incubados a 30°C durante 10 minutos.

● - Enzima de 36 horas

○ - Enzima de 72 horas

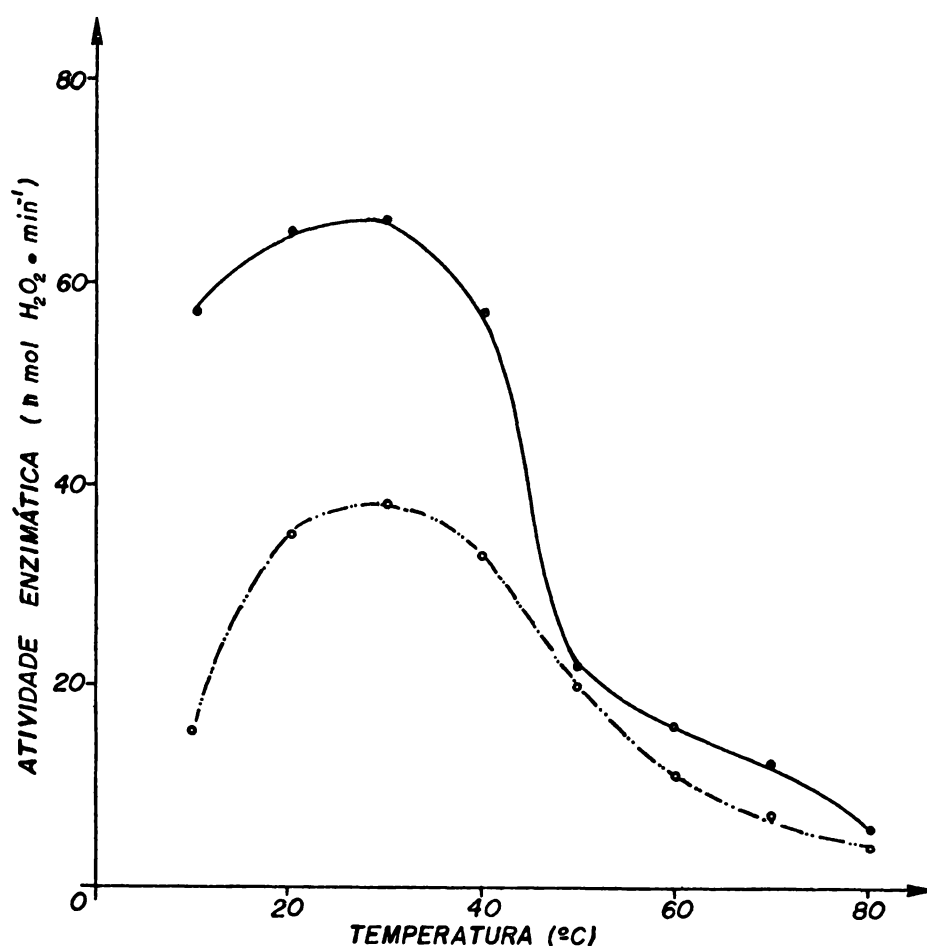


Fig. 12. Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade enzimática.

Sistema de incubação contendo 150 μmoles de tampão fosfato pH 7,0, 1,2 μmol de aminoantipirina, 21 μmoles de fenol, 20 unidades de peroxidase, 250 μmoles de D-galactose e concentrações de 0,380 μg ou 0,375 μg de enzima purificada, respectivamente de 36 e de 72 horas, num volume final de 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição de enzima e incubados a temperatura entre 10° e 80°C durante 10 minutos.

● - Enzima de 36 horas

○ - Enzima de 72 horas

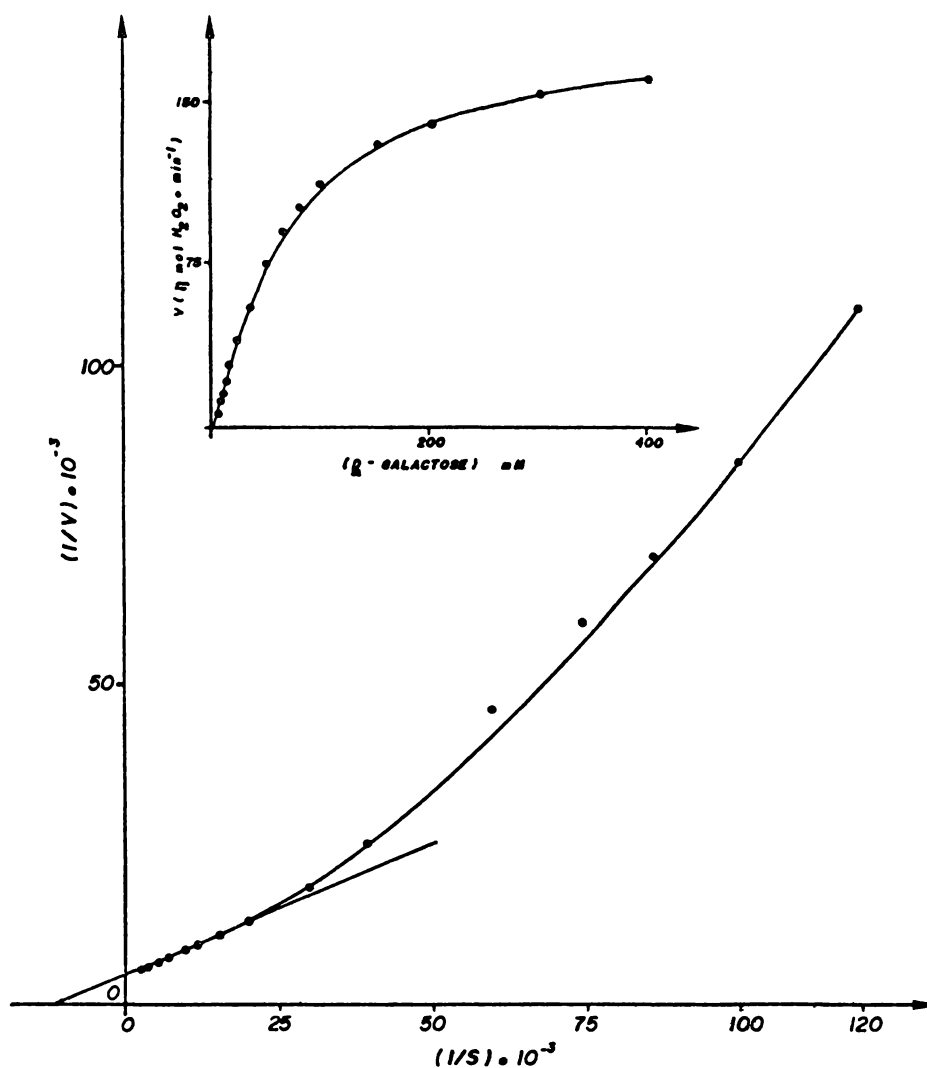


Fig. 13. Efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática da galactose oxidase de 36 horas.

Sistema de incubação com composição definida em Materials e Métodos ítem 2.19. Todos os reagentes foram previamente saturados pelo borbulhamento de O_2 .

Concentração de enzima no sistema: 0,76 μg de proteína.

A reação foi iniciada pela adição de enzima e a velocidade inicial acompanhada em espectrofotômetro.

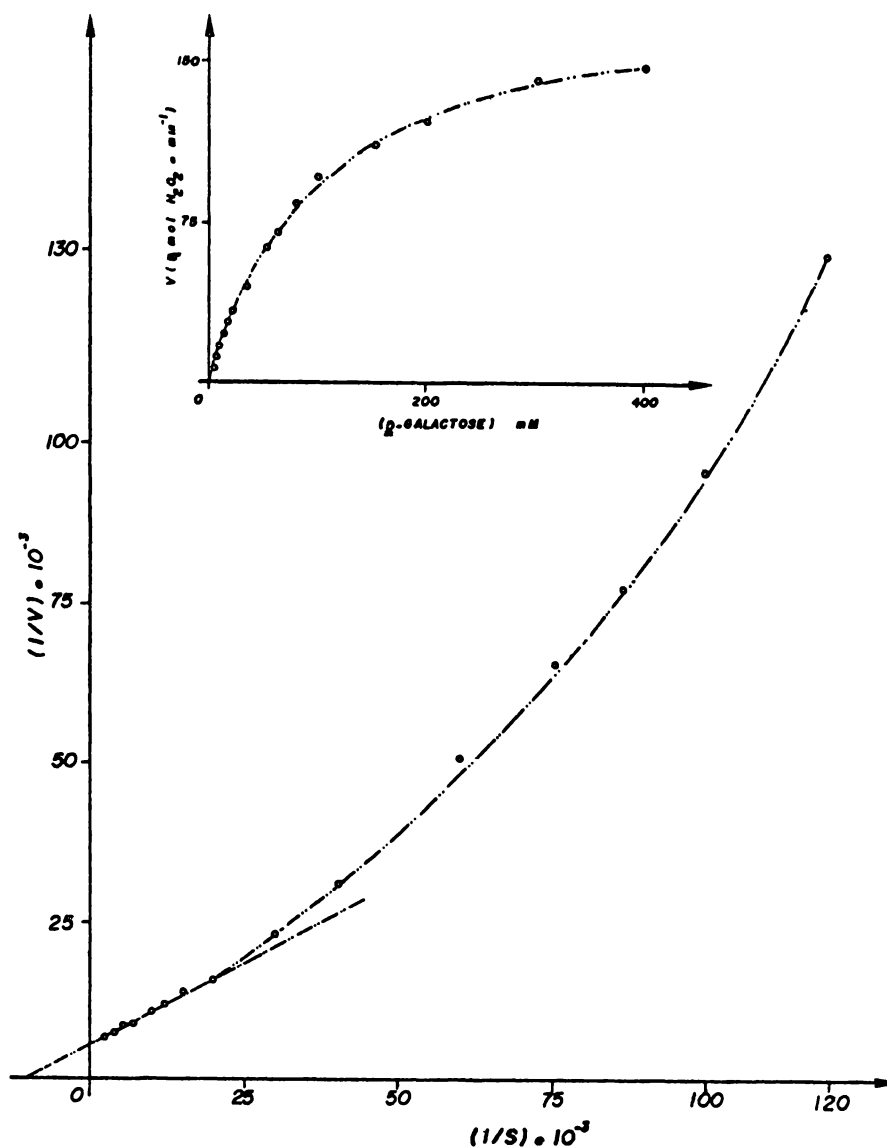


Fig. 14. Efeito da concentração de D-galactose sobre a atividade enzimática da galactose oxidase de 72 horas.

Sistema de incubação com composição definida em Materiais e Métodos (item 2.19. Todos os reagentes foram previamente saturados com oxigênio.

Concentração de enzima no sistema: 0,75 μ g de proteína.

A reação foi iniciada pela adição de enzima e a velocidade inicial acompanhada em espectrofotômetro.

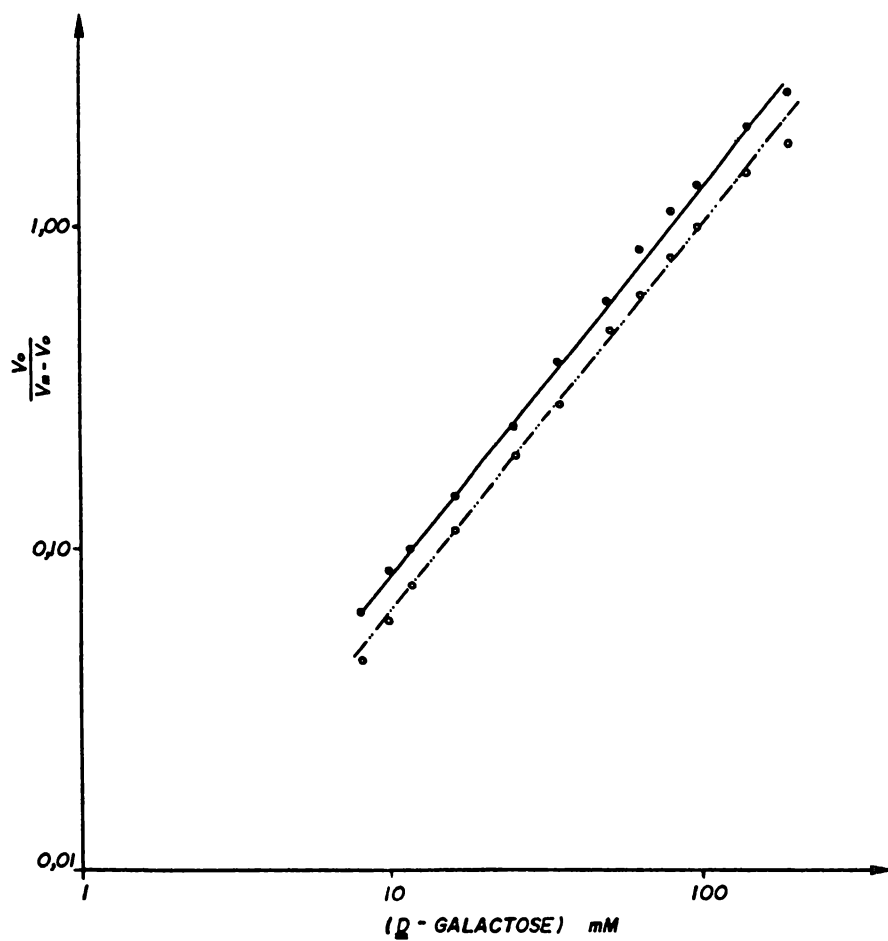


Fig. 15. Gráfico de HILL para o efeito da concentração de D-galactose sobre a velocidade de reação das enzimas de 36 e de 72 horas.

Dados referentes aos experimentos da fig. 13 e 14.

- - Enzima de 36 horas
- - Enzima de 72 horas

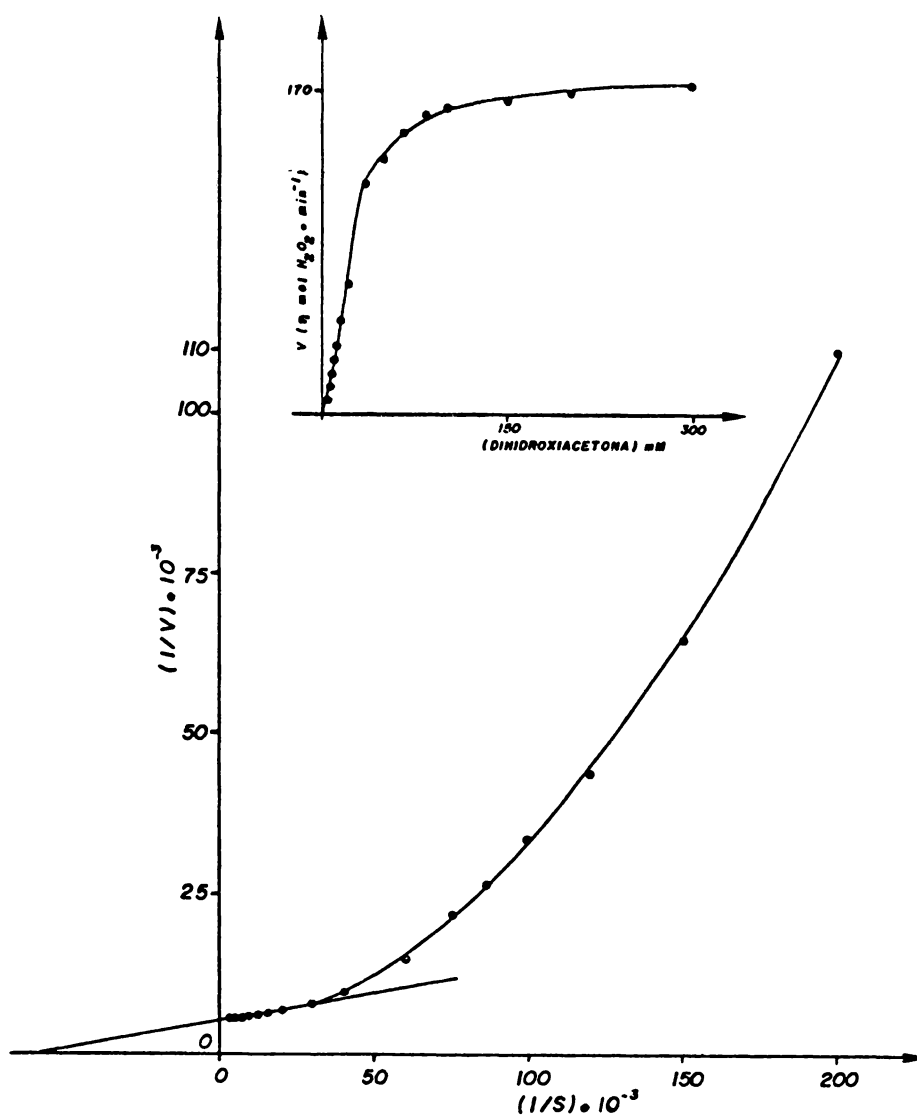


Fig. 16. Efeito da concentração de dihidroxiacetona sobre a atividade enzimática da galactose oxidase de 36 horas.

Sistema de incubação com composição definida em Materiais e Métodos ítem 2.19. Todos os reagentes foram previamente saturados com oxigênio.

Concentração de enzima no sistema: 0,76 μg de proteína.

A reação foi iniciada pela adição de enzima e a velocidade inicial acompanhada em espectrofotômetro.

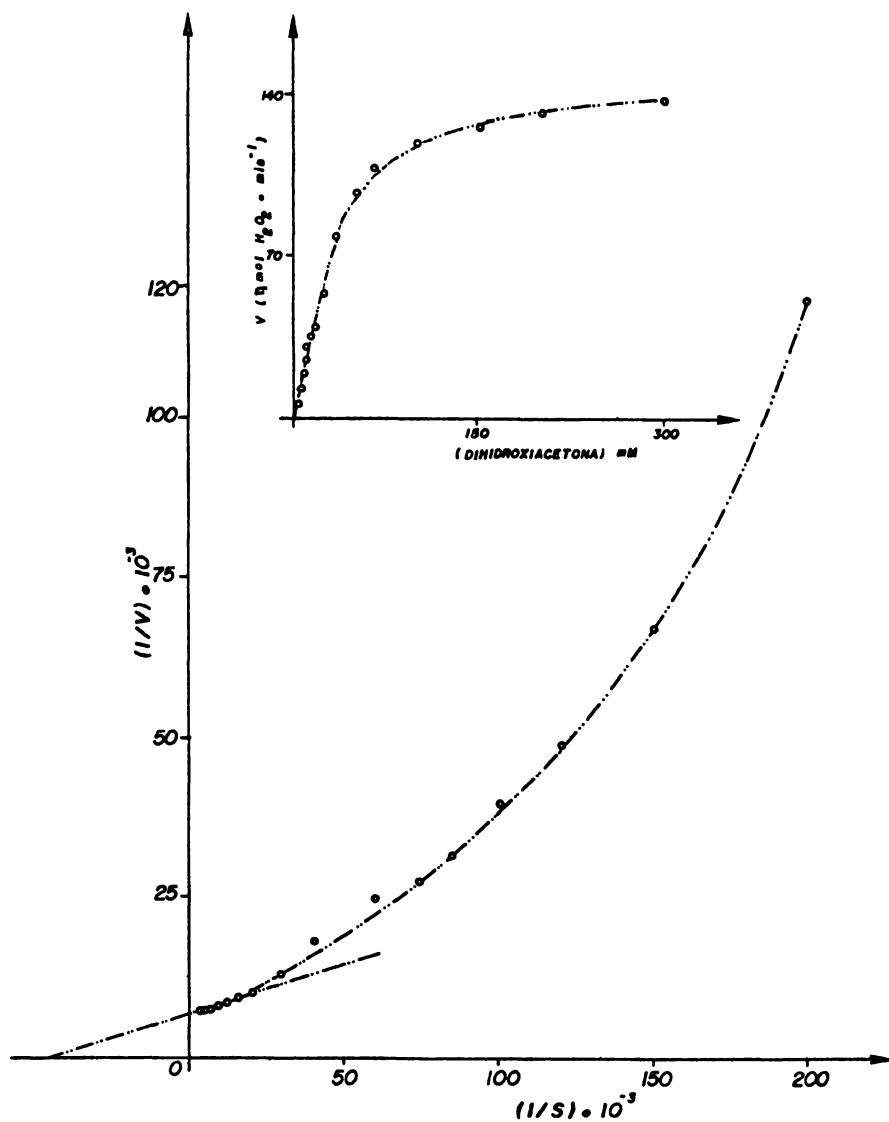


Fig. 17. Efeito da concentração de dihidroxiacetona sobre a atividade enzimática da galactose oxidase de 72 horas.

Sistema de incubação com composição definida em Materiais e Métodos (item 2.19). Todos os reagentes foram previamente saturados com oxigênio.

Concentração de enzima no sistema: 0,75 μg de proteína.

A reação foi iniciada pela adição de enzima e a velocidade inicial acompanhada em espectrofotômetro.

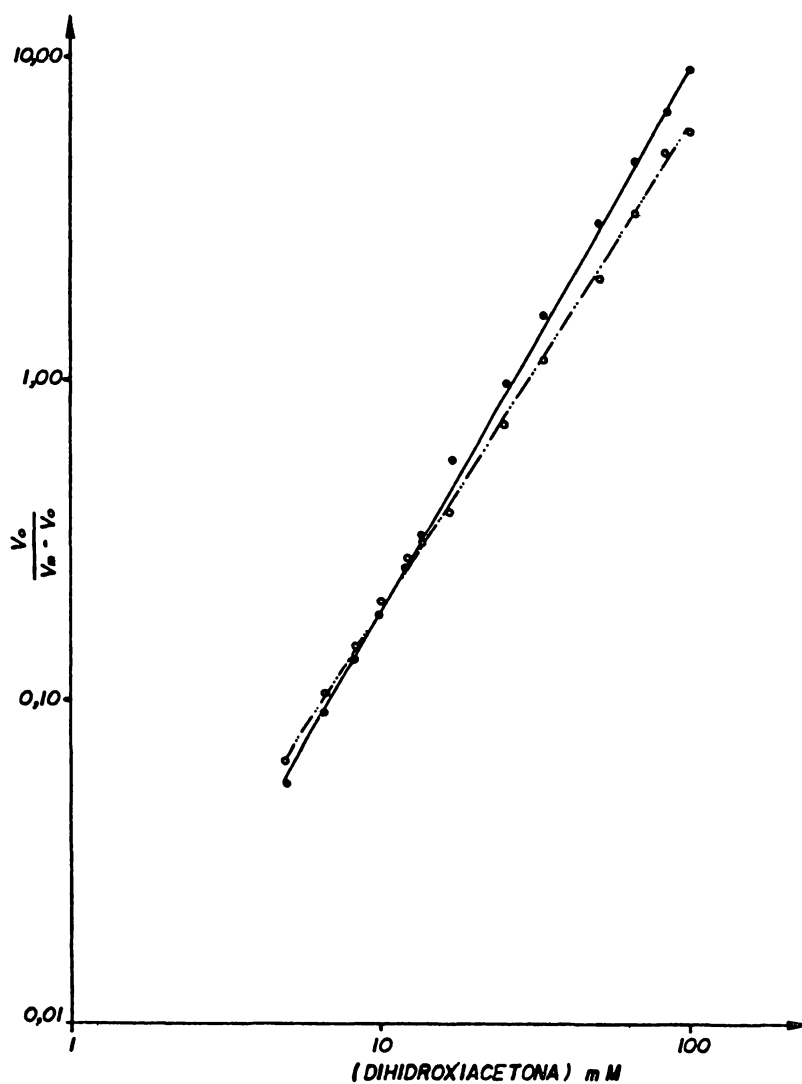


Fig. 18. Gráfico de HILL para o efeito da concentração de dihidroxiacetona sobre a velocidade de reação das enzimas de 36 e de 72 horas.

Dados referentes aos experimentos da figura 16 e 17.

- - Enzima de 36 horas
- - Enzima de 72 horas

4 DISCUSSÃO

O mutante DD09 de *Dactylium dendroides*, fungo produtor de galactose oxidase, possui características morfológicas e bioquímicas diversas da linhagem selvagem (18,45).

O fungo *Dactylium dendroides* produz a enzima galactose oxidase durante a fase logarítmica de crescimento, sendo que a secreção da enzima ocorre no período de 36 a 60 horas de crescimento (66).

A linhagem mutante DD09 é um duplo mutante, deficiente na utilização de D -galactose e L-arabinose como única fonte de carbono (45). Os níveis intracelulares de galactose oxidase são similares ao da linhagem selvagem (45). Embora os níveis de galactose oxidase extracelular são 7 vezes menores que os da linhagem selvagem, considerando a massa micelial (Tabela 1.). Em 36 horas de crescimento, a atividade enzimática atinge o seu máximo, decresce entre 55 a 70 horas, voltando a aumentar até 78 horas.

A queda nos níveis de enzima neste período entre 50 e 70 horas, pode ser decorrente da síntese de um inibidor natural da galactose oxidase descrito anteriormente por AVIGAD, G. et al (12). Este inibidor parece encontrar-se em maior quantidade no mutante. Nas células rompidas por compressão e descompressão obteve-se um extrato bruto contendo a enzima parcialmente ativa. A atividade da enzima

foi recuperada após diálise em tampão fosfato 10 mM contendo 0,5 mM de sulfato de cobre. A diálise do extrato bruto obtido dos micélios de 72 horas, provocou um aumento de 30 vezes na atividade específica da enzima.

A enzima do mutante apresentou-se relativamente estável a 55°C por 5 minutos (fig. 2 e 3), sendo portanto a temperatura escolhida para à inativação térmica. A enzima demonstrou ser mais sensível à temperatura que a enzima da linhagem selvagem. A maior termossensibilidade pode ser devido ao menor teor de açúcares ligado da enzima, corroborando os resultados apresentados por MENDONÇA & ZANGAN (54), de que as formas com maiores teores de açúcares apresentavam maior estabilidade à temperatura e ao pH.

A última etapa de purificação da galactose oxidase foi realizada por cromatografia de afinidade em Sepharose 6 B. Esta resina é uma agarose modificada constituída de uma sequência alternada de resíduos de β -galactose e 3,6 anidro-galactose com ligações tipo β (1 $\rightarrow$ 4) e α (1 $\rightarrow$ 3) e pode ser reconhecida pela galactose oxidase, dada a sua estrutura. Desta forma a galactose oxidase pode ser eluída separadamente das proteínas contaminantes (35).

A galactose oxidase extracelular possui baixa afinidade pela matriz da Sepharose 6 B, podendo ser eluída da coluna com o próprio tampão de equilíbrio. A afinidade da galactose oxidase extracelular é influenciada pela natureza do tampão de equilíbrio, sendo eluída em 5 a 6 vezes o volume morto da coluna com tampão acetato de amônio 0,1 M pH 7,2 (35).

A galactose oxidase intracelular, por outro lado, possui afinidade maior pela matriz da Sepharose 6 B, não sendo portanto eluída da coluna com o tampão de equilíbrio (53). O teor de glicosilação também pode modificar a afinidade da enzima pela matriz da Sepharose 6B. MENDONÇA & ZANGAN (55) demonstraram que a enzima intracelular obtida de micélio exposto ao etanol e ao etanol + tunicamicina apresentaram uma alteração na afinidade pela matriz de Sepharose sendo que esta última é eluída com o próprio tampão de equilíbrio, sem a adição de D-fucose.

As enzimas extraídas do mutante DD09 apresentaram um perfil de eluição semelhante ao obtido para a linhagem selvagem do micélio tratada com etanol (55). As proteínas contaminantes foram eluídas com tampão acetato de amônio 0,1 M pH 7,2 e a enzima somente foi eluída da coluna pela troca do tampão de equilíbrio para uma solução de D-fucose 0,1 M em acetato de amônio 0,1 M pH 7,2.

Obteve-se preparações homogêneas das duas enzimas (fig. 6), com 144% e 193% de rendimento, respectivamente para a enzima de 36 horas e de 72 horas de crescimento (Tabela 2 e 3.). Este rendimento superior a 100% deve-se provavelmente a presença do inibidor no extrato livre de células, que foi removido durante as etapas de purificação.

A enzima intracelular do mutante DD09 de 36 horas de crescimento apresentou um peso molecular de 70.000 Da e a enzima de 72 horas de crescimento apresentou um peso molecular da ordem de 68.000 Da quando determinados em gel

de poli(acrilamida em condições desnaturantes (fig. 7 e 8).

As diferenças de peso molecular da forma enzimática de 36 horas de crescimento quando comparada à da linhagem selvagem (53), pode ser justificada em parte pelo menor conteúdo de carboidratos da enzima. Com relação a forma de 72 horas de crescimento, o menor peso molecular pode ser devido à proteólise, já que o teor de açúcar praticamente se manteve constante. O peso molecular da forma de 72 horas de crescimento equivale ao peso molecular do polipeptídeo obtido por tratamento proteolítico da enzima da linhagem selvagem (54).

As enzimas purificadas de 36 horas e de 72 horas apresentaram valores de $K_{m_{app}}$ de 77 mM e 100 mM respectivamente para a D-galactose, utilizando o método enzimático acoplado (fig. 13 e 14). Os valores demonstraram que as enzimas intracelulares do mutante apresentam menor afinidade para a D-galactose que a enzima intracelular da linhagem selvagem que possui um $K_{m_{app}}$ da ordem de 40 mM (53).

Em decorrência do fato da galactose oxidase apresentar maior afinidade à dihidroxiacetona (78), foi analisado o comportamento das enzimas frente a este substrato. Os valores de $K_{m_{app}}$ obtido para as duas preparações de enzimas frente a dihidroxiacetona foi da ordem de 18 mM para a enzima de 36 horas e de 27 mM para a enzima de 72 horas (fig. 16 e 17), enquanto os valores obtidos para a enzima da linhagem selvagem é de 35 mM para o mesmo substrato (53).

Embora as enzimas do mutante apresentem menor afinidade a D-galactose, elas apresentaram maior afinidade para a dihidroxiacetona que a galactose oxidase intracelular da linhagem selvagem.

As formas enzimáticas do mutante apresentaram uma cinética não michaeliana para a D-galactose e dihidroxiacetona. Nos gráficos dos duplos recíprocos apresentaram-se não linear em ambos os casos (fig. 13,14,16,17). Por outro lado, a enzima da linhagem selvagem apresenta uma cinética não michaeliana para a D-galactose, porém para a dihidroxiacetona o efeito cooperativo é menos acentuado, aproximando-se de uma cinética michaeliana. O mesmo comportamento foi verificado para a galactose oxidase extracelular do fungo *Gibberella fujikuroi* para a D-galactose (2).

A cooperatividade cinética observada poderia ser explicada pela existência de um centro ativo com dois sítios de encaixe para o substrato. A atividade enzimática só se realizaria quando os dois sítios estivessem ocupados pelo substrato. Estes sítios seriam quantitativamente idênticos, porém a ligação de uma molécula de substrato em um dos sítios facilitaria a ligação da segunda molécula de substrato. Esta hipótese foi aventada para explicar o comportamento cinético da galactose oxidase extracelular do fungo *Gibberella fujikuroi* (2), que apresenta um coeficiente de Hill (n_H) igual a 1,3 para a D-galactose.

Outra hipótese mais consistente para explicar a cooperatividade positiva seria a existência da enzima numa

forma ativa e outra inativa, ocorrendo uma transição lenta entre as duas formas decorrentes do estado de oxido-redução do cobre (38). WHITTAKER & WHITTAKER (76) demonstraram a existência de espécies cataliticamente ativas e inativas da enzima apresentando diferentes estados de óxido-redução do cobre.

O teor de glicosilação tem sido muitas vezes relacionados a secreção de enzimas (13). A galactose oxidase intracelular apresenta teores de glicosilação de 7,7 mg% de açúcares neutros totais e de 1,5 mg% de açúcares aminos enquanto que a enzima extracelular apresenta teores de glicosilação de 1,7 mg% de açúcares neutros totais e de 0,4 mg% de açúcares aminos (54). A análise da composição de açúcares das formas intra e extracelulares revelou a presença de glucose, arabinose, manose, galactose, galactosamina e glucosamina, sendo que a glucose e a arabinose são os principais componentes glicídicos da enzima (53).

As duas formas da enzima do mutante apresentaram teores de glicosilação 42 a 45% menores que o encontrado na enzima da linhagem selvagem (55). O teor de açúcares totais após a β -eliminação é semelhante ao da linhagem selvagem (55), o que indica que a redução no teor de açúcares na enzima do mutante se fez as custas das ligações glicosídicas O-serina ligadas.

Valores inferiores encontrados para as formas da enzima do mutante pode ser decorrentes da deficiência de Gal-1-P-uridil-transferase (45), uma vez que a galactose é

um dos componentes da porção açúcar da galactose oxidase intracelular (53).

Formas enzimáticas modificadas pela presença de inibidores de glicosilação sugerem que a glicosilação da galactose oxidase não seja necessária para a secreção da enzima, já que formas menos glicosilada são igualmente secretadas (55,56). No mutante, os níveis de glicosilação também parecem não ser o fator limitante para a secreção da enzima, já que a enzima intracelular possui ainda um teor 1,67 vezes maior do que a enzima extracelular do selvagem (55), a não ser que a porção açúcar que permanece na enzima seja um sinal para a sua manutenção no interior da célula.

Os baixos níveis de atividade enzimática observado no meio de cultura do mutante poderiam ser explicados pela inativação da enzima secretada. Como não foi feita a purificação da enzima extracelular do mutante, não se conhece o teor de glicosilação, portanto essa alternativa não pode ser excluída. Como as formas enzimáticas menos glicosilada são mais facilmente proteolizadas (55), as enzimas secretadas deveriam ter um teor de açúcar menor que 1,7 mg% que é observado na enzima extracelular da linhagem selvagem (53).

Outra hipótese para explicar o defeito na secreção da galactose oxidase pelo mutante seria que houvesse uma alteração na sequência sinal. Esta hipótese é pouco provável, pois aparentemente existe uma tolerância à variações mutacionais nesta sequência (30).

Estudos anteriores demonstraram que a parede

celular do fungo *D. dendroides* é composta por uma galactoglucomanana (41). Como o metabolismo de galactose encontra-se afetado no mutante, é provável que a estrutura da parede celular esteja modificada, alterando a sua permeabilidade a proteínas, neste caso seria de se esperar que a deficiência afetasse a secreção de todas as proteínas, o que não parece ser o caso, já que em 48 horas de crescimento o tipo selvagem secretou 0,040 mg de proteínas/mg de peso seco e o mutante 0,060 mg de proteínas/mg de peso seco (Tabela 1.).

As formas enzimáticas do mutante apresentaram-se idênticas entre si. A forma de 36 horas tem um teor menor de açúcares neutros e apresenta uma cinética para dihidroxiacetona distinta da enzima do tipo selvagem. Do exposto é evidente que maiores estudos serão necessários para esclarecer a razão pela qual a enzima do mutante não é secretada com a mesma eficiência que a do tipo selvagem.

5 CONCLUSÃO

1. As formas de galactose oxidase intracelular isolada de micélio de 36 horas e de 72 horas de crescimento apresentaram o mesmo perfil de purificação.
2. As formas enzimáticas do mutante apresentaram pH ótimo entre 6,8 e 7,0 e temperatura ótima de catálise 30°C.
3. A cinética de substrato para a D-galactose e dihidroxiacetona apresentou um comportamento não michaeliano em concentrações baixas de substratos, indicando cooperatividade cinética positiva.
4. Os teores de glicosilação das formas enzimáticas do mutante foram semelhantes entre si e estas estão predominantemente ligados por ligações glicosídicas resistentes à β eliminação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AINSLE, G.R. ; SHILL, J.P. & NEET, K.E. Transient and cooperativity. *J. Biol. Chemistry.*, 247: 7088-7096, 1972.
- 2 AISAKA, K.; UWAJIMA, T. & TERADA, O. Kinetic properties of galactose oxidase from *Gibberella fujikuroi*. *Agric. Biol. Chem.*, 48: 1425-1431, 1984.
- 3 AISAKA, K. & TERADA, O. Purification and properties of galactose oxidase from *Gibberella fujikuroi*., *Agric. Biol. Chem.*, 46: 1191-1197, 1982.
- 4 AISAKA, K.; UWAJIMA, T. & TERADA, O. Catalytic properties of galactose oxidase. *Agric. Biol. Chem.*, 49: 1201-1202, 1985.
- 5 AISAKA, K. & TERADA, O. Production of galactose oxidase by *Gibberella fujikuroi*. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 2311-2316, 1981.
- 6 AMARAL, D. & BACILA, M. Determinação da galactose oxidase pelo eletródio de oxigênio. *Arq. Biol. Tecnol.*, 12: 179-183, 1966.
- 7 AMARAL, D. ; BERENSTEIN, L ; MORSE, D. & HORECKER, B.L. Galactose oxidase from *Polyporus circinatus* : a copper enzyme. *J. Biol. Chem.*, 238: 2281-2284, 1963.
- 8 AMARAL, D. ; KELLY-FALCOZ, F. & HORECKER, B.L. Galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. *Meth. enzymol.*, 9: 87-92, 1966.
- 9 AVIGAD, G. An NADH coupled assay system of galactose oxidase. *Anal. Biochem.*, 86: 470-476, 1978.

- 10 AVIGAD, G.; ASENSIO, C. ; AMARAL, D. & HORECKER, B. M.
Galactodialdose production with an enzyme from the
mold *Polyporus circinatus*. *Biochem. Biophy. Res.*
Comm., 4: 474-477, 1961.
- 11 AVIGAD, G. ; AMARAL, D. ; ASENSIO, C. & HORECKER, B.M.
The D-galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. *J.*
Biol. Chem., 237: 2736-2743, 1962.
- 12 AVIGAD, G. & MARKUS, Z. Inibition of galactose oxidase
by extracts from the mycelia which produce the enzyme.
Isr. J. Chem., 3: 193-196, 1965.
- 13 BARBARIC, S ; MRSA, V. ; RIES, B. & MILDNER, P. Role of
carbohydrate part of yeast acid phosphatase. *Arch.*
Biochem. Biophys., 234: 567-575, 1984.
- 14 BEREMAN, R.D.; ETTINGER, M.J. ; KOSMAN, D.J. & KURLAND,
R.J. Characterization of the copper (II) site in
galactose oxidase. *Bioinorg. Chem. II*, 263-280, 1979.
- 15 BLUMBERG, W.E. ; HORECKER, B.L. ; KELLY-FALCOZ, F &
PEISACH, J. The role of copper in galactose oxidase.
Biochem. Biophy. Acta., 96: 336-338, 1965.
- 16 CLEVELAND, L. ; COFFMAN, R.E. ; COON, P. & DAVIS, L. An
investigation of the role of the copper in the
galactose oxidase. *Biochem.*, 14: 1108-1114, 1975.
- 17 COOPER, J.A. ; SMITH, W. ; BACILA, M. & MEDINA, H.
Galactose oxidase from *Polyporus circinatus*, *Fr. J.*
Biol. Chem., 234: 445-448, 1959.
- 18 DIAPP, C.J. ; KUBICKI, D. & AMARAL, D. Characterization
of morphological mutant of the galactose oxidase
producing mold, *Dactylium dendroides*. *Bras. J. Med.*
Biol. Res., 16: 297-303, 1983.

- 19 DYRKACZ, G.R. ; LIBBY, R.D. & HAMILTON, G.A. Trivalent copper as a probable intermediate in the reaction catalyzed by galactose oxidase. *J. Am. Soc.*, 98: 626-628, 1979.
- 20 DUBOIS, M ; GILLES, K.A. ; HAMILTON, G.A. ; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356, 1956.
- 21 ELBEIN, A.D. ; MITCHELL, M. & MOLYNEUX, R.J. Effect of castanospermine on the structure and secretion of glycoprotein enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *J. Bacteriol.*, 160: 67-75, 1984.
- 22 ELBEIN, A.D. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-Linked oligosaccharides chain. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 497-534, 1987.
- 23 ESMON, P.C. ; ESMON, B.E. ; SCHAUER, J.E. ; TAYLOR, A. & SCHEKMAN, R. Structure assembly, and secretion of octameric invertase. *J. Biol. Chem.*, 262: 4387-4394, 1987.
- 24 ETTINGER, M.J. Spectral properties of "non-blue cupric copper in proteins. Circular dichroism and optical spectra of galactose oxidase. *Biochem.*, 13: 1242-1251, 1974.
- 25 ETTINGER, M.J. & KOSMAN, D.J. Chemical and catalytic properties of galactose oxidase. *Metal ions biol.*, 3: 219-261, 1981.
- 26 FERRO-NOVICK, S. ; NOVICK, P. ; FIELD, C. & SCHEKMAN, R. Yeast secretory mutants that blocks the formation of active cell surface enzymes. *J. Cell. Biol.*, 98: 35-43, 1984.

- 27 FIELD, C & SCHEKMAN, R. Localized secretion of acid phosphatase reflects the pattern of cell surface growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.*, 86: 123-128, 1980.
- 28 FRIDOVICH, I. Superoxide radical an endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23: 239-257, 1983.
- 29 GANCEDO, J.M. ; GANCEDO, C. & ASENSIO, C. Widespread occurrence of galactose oxidase and glucose oxidase in fungi. *Arch. Biochem. Biophys.*, 119: 588-589, 1967.
- 30 GIERASCH, L.M. Signal sequences. *Biochem.*, 28: 923-930, 1989.
- 31 HAMILTON, G.A. & LIBBY, D. The valence of copper and the role of superoxide in the D-galactose oxidase catalyzed reaction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 55: 333-340, 1973.
- 32 HAMILTON, G.A. ; DE JERSEY, J. ; ADOLF, P.K. Galactose oxidase: The complexities of a simple enzyme. In: *Oxidases and related redox systems*. KING, T.E. ; MASON, H.S. ; MORRISON, M. ED. University Park Press, Baltimore, 103-124, 1973.
- 33 HANOVER, J.A. & LENNARZ, W.J. Transmembrane assembly of membrane and secretory glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 211: 1-19, 1981.
- 34 HATTON, M.W.C. & REGOECZI, E. The proteolytic nature of commercial samples of galactose oxidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 438: 336-346, 1976.
- 35 HATTON, M.W.C. & REGOECZI, E. Galactose oxidase from commercial samples. *Meth. enzymol.*, 89: 172-176, 1982.

- 36 HILL, A.V. The combination of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. *Biochem. J.*, 7: 471-480. 1913.
- 37 HOLT, G.D. & HART, G.W. The subcellular distribution in terminal N-acetylglucosamine moieties. *J. Biol. Chem.*, 261: 8049-8057, 1986.
- 38 JOHNSON, J.M. ; HALSALL, H.B. ; HEINEMAN, W.R. Redox activation of galactose oxidase: Thin-Layer electrochemical study. *Biochem.*, 24: 1579-1585, 1985.
- 39 KELLEHER, F.M. & BHAVANANDAN, V.P. Re-examination of the products of the action of Galactose oxidase. Evidence for the conversion of Raffinose to 6"carboxy Raffinose. *J. Biolog. Chem.*, 261: 11045-11048, 1986.
- 40 KELLEHER, F.M. ; DUBBS, S.B. & BHAVANANDAN, V.P. Purification of galactose oxidase from *Dactylium dendroides* by affinity chromatography on Melibiose-Polyacrilamide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 263: 349-354, 1988.
- 41 KEMMELMEYER, C. & ZANCAN, G.T. Chemical and immunological properties of galactoglucomannans form *Dactylium dendroides*. *Exp. Mycol.*, 5: 339-348, 1981.
- 42 KOSMAN, D.J. ; BEREMAN, R.D. ; ETTINGER, M.J. & GIORDANO, R.S. On the role of a cuprous ion intermediate in the galactose oxidase reation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 54: 856-861, 1973.
- 43 KOSMAN, D.J. ; ETTINGER, M.J.; BEREMAN, R.D. & GIODANO, R.S. Role of tryptophan in the spectral and catalytic properties of the copper enzyme, galactose oxidase. *Biochem.*, 16: 1597-1601, 1977.

- 44 KOSMAN, D.J. ; ETTINGER, M.J. ; WEINER, R.E. & MASSARO, E.J. The molecular properties of the copper enzyme galactose oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 165: 456-467, 1974.
- 45 KUBICKI, D. ; ZANCAN, G.T. & AMARAL, D. A *Dactylium dendroides* morphological mutant defective in D-galactose metabolism. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 21: 895-895-1988.
- 46 KWIATKOSWSKI, L. & KOSMAN, D.J. On the role of superoxido radical in the mechanism of action of galactose oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 53: 715-721, 1973.
- 47 KWIATKOSWSKI, L.D. ; SICONOLFI, L. ; WEINER, R.E. ; GIORDANO, R.S. ; BEREMAN, R.D. ; ETTINGER, M.J. & KOSMAN, D.J. Histidine as an essencial residue in the active site of the copper enzyme galactose oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 182: 712-722, 1977.
- 48 LAEMMLY, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 277: 680-685, 1970.
- 49 LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 58: 658, 1934.
- 50 LIRAS, P. & GASCON, S. Biosynthesis and secretion of yeast invertase. Effect of cycloheximide and 2-deoxy-D-glucose. *Europ. J. Biochem.*, 23: 160-165, 1971.
- 51 LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J. ; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.

- 52 MARKUS, Z. ; MILLER, G. ; AVIGAD, G. Effect of culture condition on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. *Appl. Microbiol.*, 13: 686-693, 1965.
- 53 MENDONÇA, M. H. & ZANCAN, G.T. Purification and characterization of intracellular galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 252: 507-514, 1987.
- 54 MENDONÇA, M.H. & ZANCAN, G.T. Role of carbohydrate content on the properties of galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 266: 427-434, 1988.
- 55 MENDONÇA, M.H. & ZANCAN, G.T. Intra and extracellular forms of ethanol-modified O-underglycosylated galactose oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 275: 001-010, 1989.
- 56 MENDONÇA, M.H. & ZANCAN, G.T. Effects of N-glycosylation inhibitors on galactose oxidase synthesis and secretion. *An. asoc. Quím. Argent.*, 77: 101-106, 1989.
- 57 MEYER, T.S. & LAMBERTS, B.L. Use of Coomassie brilliant blue R-250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochem. Biophys. Acta.*, 107: 144-145, 1965.
- 58 MORENO, F. ; OCHOA, A.G. ; GASCON, S. & VILLANUEVA, J.R. Molecular forms of yeast invertase. *Europ. J. Biochem.*, 50: 471-579, 1981.
- 59 MOROSOLI, R. ; LECHER, P. & DURAND, S. Effects of tunicamycin on xylanase secretion in the yeast *Cryptococcus albidus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 265: 183-189, 1988.

- 60 NOBLES, M.K. & MADHOSING, C. *Dactylium* (Bull) Fr. misnamed as *Polyporus circinatus* Fr. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 12: 146-147, 1963.
- 61 NOVICK, P. & SCHECKMAN, R. Export of major cell surface proteins is blocked in yeast secretory mutants. *J. Cell. Biol.*, 96: 541-547, 1983.
- 62 OLDEN, K. ; BERNARD, B.A. ; HUMPHRIES, M.J. ; YEO, J.K. ; YEO, K.T. ; WHITE, S.L. ; NEWTON, S.A. ; BAUER, H.C. & BRIAN PARENT, J.B. Function of glycoprotein glycans. *Trends Biochem. Sci.*, 10: 78-82, 1985.
- 63 PEDROSA, F.O & ZANCAN, G.T. Effect of oxygen on galactose oxidase synthesis and secretion in *Dactylium dendroides*. *Exp. Mycol.*, 10: 126-130, 1986.
- 64 RUDICK, M.J. ; FTZGERALD, Z.E. & RUDICK, V.L. Intra and extracellular forms of α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 193: 509-520, 1979.
- 65 SENGUPTA, C. ; BRANDHORST, B.P. & VERMA, D.P.S. Synthesis, glycosylation and rapid secretion of glycoprotein by *Achlya* a primitive eucaryote. *Biochem. Biophys. Acta.*, 674: 105-117, 1981.
- 66 SHATZMAN, A.R. & KOSMAN, D.J. Regulation of galactose oxidase synthesis in *Dactylium dendroides* : Effect of pH and culture density. *J. Bacteriol.*, 130: 455-463, 1977.
- 67 SCHLEGEL, R.A. ; GERBERCK, C.M. & MONTGOMERY, R. Substrate specificity of D-galactose oxidase. *Carbohydrate Reserch*, 7: 193-199, 1968.
- 68 SCHECKMAN, R. The secretory pathway in yeast. *Trends Biochem. Sci.*, 7: 243-246, 1982.

- 69 SPEAKE, B.K. ; MALLEY, D.J. & HEMMING, F.W. The effect of tunicamycin on secreted glycosidase of *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 210: 110-117, 1981.
- 70 TRESSEL, P.S. & KOSMAN, D.J. Galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. *Meth. enzymol.*, 89: 163-176, 1982.
- 71 TRESSEL, P.S. & KOSMAN, D.J. A simplified purification procedure for galactose oxidase. *Anal. Biochem.*, 105: 150-153, 1980.
- 72 VOGEL, A.I. Analysis of hydrogen peroxide. In : *Textbook of quantitative inorganic analysis*. London.2.ed. Richard Clay and Company Ltd, p. 283, 1951.
- 73 WARBURG, O & CHRISTIAN, W. Isolierung und kristallisation des garungs ferments enolase. *Biochem. Z.*, 310: 384-421,1941.
- 74 WEINER, R.E. ; ETTINGER, M.J. & KOSMAN, D.J. Flurescence properties of the copper enzyme galactose oxidase and its tryptophan-modified derivaties. *Biochem.*, 16: 1602-1606, 1977.
- 75 WINKLER, M.E. ; BEREMAN, R.D. & KURLAND, R.J. Kinetic and magnetic resonance studies of substrate binding to galactose oxidase copper (II). *J. inorg. Biochem.*, 14: 223-235, 1981.
- 76 WHITTAKER, M.M. & WHITTAKER, T.W. The active site of Galactose oxidase. *J. Biol. Chem.*, 263: 6074-6080, 1988.
- 77 ZANCAN, G.T. Leiloir's Pathway in *Polyporus circinatus*. *Can. J. Microbiol.*, 17: 563-565, 1971.

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