

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**“Trealases de *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*:
purificação, propriedades e efetores”.**

Marita Gimenez Pereira

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da USP, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**"Trealases de *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*:
purificação, propriedades e efetores".**

Marita Gimenez Pereira

Orientador: Prof. Dr. João Atílio Jorge

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Marita Gimenez

Purificação e caracterização bioquímica das enzimas trealases do fungo *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*.

Ribeirão Preto, 2007

133 p. il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Jorge, João Atílio.

1. Trealose – 2. Trealase – 3. *Malbranchea pulchella* –
4. Purificação de enzimas.

Onisciência Divina

Senhor, vós me perscrutais e me conheceis, sabeis tudo de mim, quando me sento ou me levanto.

De longes penetrais meus pensamentos.

Quando ando e quando repouso, vós me vedes, observais todos os meus passos.

A palavra ainda me não chegou à língua, e já, Senhor, a conheceis toda.

Vós me cercais por trás e pela frente, e estendeis sobre mim a vossa mão.

Conhecimento assim maravilhoso me ultrapassa, ele é tão sublime que não posso atingi-lo.

Para onde irei, longe de vosso Espírito?

Para onde fugir, apartado de vosso olhar?

Se subir até os céus, ali estareis; se descer à região dos mortos, lá vos encontrareis também.

Se tomar as asas da aurora, se me fixar nos confins do mar, é ainda vossa mão que lá me levaria, e vossa destra que me sustentaria.

Se eu dissesse: Pelo menos as trevas me ocultarão, e a noite, como se fora luz me há de envolver.

As próprias trevas não são escuras para vós, a noite vos é transparente como o dia e a escuridão, clara como a luz.

Fostes vós que plasmastes as entranhas de meu corpo, vós me tecestes no seio de minha mãe.

Sede bendito por me haverdes feito de modo tão maravilhoso.

Pelas vossas obras tão extraordinárias, conheceis até o fundo a minha alma.

Nada de minha substância vos é oculto, quando fui formado ocultamente, quando fui tecido nas entranhas subterrâneas.

Cada uma de minhas ações vossos olhos viram, e todas elas foram escritas em vosso livro; cada dia de minha vida foi prefixado, desde antes que um só deles existisse.

Ó Deus, como são insondáveis para mim vossos desígnios!

E quão imenso é o número deles!

Como contá-los? São mais numerosos que a areia do mar; se pudesse chegar ao fim, seria ainda com vossa ajuda.

Perscrutai-me, Senhor, para conhecer meu coração; provai-me e conheci meus pensamentos.

Vede se ando na senda do mal, e conduzi-me pelo caminho da eternidade.

*À Deus, por esta realização e por todas as
bênçãos derramadas em minha vida.*

*À minha mãe Maria Odila (in memoriam),
pelo exemplo de vida.*

*Ao Renato, pelo seu carinho, apoio e
incentivo ao longo desses anos.*

Agradecimentos

À toda minha família, em especial tia Odete, tia Ermínia (in memoriam), tia Gi e tia Bete pelo apoio e infinita paciência.

Ao meu pai José e ao meu irmão Saulo, por sempre acreditar em mim.

À minha segunda mãe, Regina, ao Hélvio, a minha afilhada Yasmim, e a vó Júlia, obrigada por terem me acolhido na família. Amo vocês!!!

Ao Prof. João Atílio Jorge, por acreditar em mim, pela orientação, dedicação, confiança e oportunidade de realização deste trabalho. Muito obrigada!!!

À Prof^{ta} Maria de Lourdes T. M. Polizeli por todo o apoio e amizade.

Aos Profs. Luis Henrique Guimarães e Héctor Francisco Terenzi pela colaboração e boa vontade.

À Prof^{ta}. Rosa P. Melo Furriel por suas valiosas sugestões ao longo deste trabalho.

À Giovana, pela acolhida, por toda ajuda e ensinamentos, mas, sobretudo pela amizade.

À Vanessa que sempre esteve disponível a ajudar e pelos laços de amizades que cultivamos a cada dia.

À Michele que sempre esteve disposta a ajudar em tudo e pela amizade dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos de laboratório Tati, Simone, Cynthia, Alexandre, Jean, Berabita, Maller, Aninha, André, Simone, Mariele, Ricardo e Allan pela excelente convivência e por me agüentarem todos os dias independentes do meu humor.

Aos colegas de laboratório Bruna, Fabrício, Flávio, César, Sandra, Ana Cláudia, Vivian, Juliana, Alana e Priscila pela convivência durante a realização deste trabalho.

À Renata, secretária da Pós-graduação, por toda a sua atenção e disponibilidade em sempre ajudar.

Aos funcionários da secretária da Biologia Isabel, Miriam, Carlos e Sandra, que sempre me ajudaram.

Ao Mauricio pelo apoio técnico e por todas as caronas.

Aos amigos Wagner, Márcio, Cris, Dani, Thaís, Janaína, Ercília, Helaine, Nivaldo (Pretinho), Elenice, Sílvia, Angelina, Daniel, Padre Fernandinho e todos do Grupo de Oração Vida Nova. A vocês, amigos de verdade, obrigada pela amizade e por todas as vezes que estiveram dispostos a ajudar e torceram por mim.

À Faculdade de Filosofia Ciência e Letras de Ribeirão Preto, local onde foi desenvolvida essa pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que direta e indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

ÍNDICE

Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiv
1. Introdução	1
1.1. Trealose	2
1.2. Estrutura, ocorrência e biossíntese de trealose	2
1.3. Funções da trealose.....	7
a) Carboidrato de reserva.....	7
b) Função protetora	8
c) Estabilizadora e protetora de proteínas e lipídios e tolerância à desidratação.....	9
d) Proteção contra o calor	13
e) Proteção contra o frio	13
f) Proteção contra radicais de oxigênio (radicais livres).....	13
g) Regulador do crescimento e desenvolvimento de plantas	14
h) Componente estrutural da parede celular bacteriana.....	14
i) Osmotolerância	15
1.4. Propriedades físico-químicas da trealose e sua aplicação in vitro	15
1.5. Trealases	18
1.6. Ocorrência da trealase em fungos termófilos	20
1.7. Organismo de estudo	21
2. Objetivo.....	22
3. Material e Métodos.....	24
3.1. Organismos	25
3.2. Manutenção	25
3.3. Obtenção de conídios	25

3.4. Crescimento em meio líquido	26
3.5. Obtenção do micélio e extrato bruto micelial.....	26
3.6. Determinação da atividade trealásica	27
3.6.1. Determinação da atividade enzimática pelo método de DNS.....	27
3.6.2. Determinação da atividade trealásica por acoplamento com Glicose Oxidase	27
3.7. Dosagem de proteína.....	28
3.8. Determinação da melhor fonte de carbono para produção da atividade trealásica.....	28
3.9. Determinação do melhor tempo de crescimento para a produção da atividade trealásica.....	29
3.10. Purificação da atividade trealásica	29
3.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE).....	30
3.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	31
3.13. Detecção de proteínas através do método de coloração por prata	31
3.14. Detecção de proteínas através do método de coloração por Coomassie Blue	32
3.15. Determinação da massa molecular por cromatografia de filtração em gel	32
3.16. Determinação dos carboidratos neutros das trealases intra e extracelular purificadas	33
3.17. Determinação do ponto isoelétrico para as trealases de <i>M. pulchella</i>	33
4. Resultados.....	35
4.1. Determinação das condições ótimas de crescimento para produção da trealase de <i>Malbranchea pulchella</i>	36
4.2. Determinação do tempo de cultivo do meio	41
4.3. Determinação da temperatura e pH ótimo para a atividade trealásica.....	41
4.4. Efeito da concentração de extrato de levedura na produção de trealase em <i>M. pulchella</i>	47
4.5. Efeito do cálcio na atividade trealásica de <i>M. pulchella</i>	47
4.6 Determinação da concentração de açúcar redutor no meio de cultura.....	51

4.7. Estabilidade térmica da trealase de <i>M. pulchella</i> em extrato bruto	56
4.8. Purificação das trealases de <i>M. pulchella</i>	56
4.8.1. Purificação da trealase extracelular.....	56
4.8.2. Critério de pureza.....	64
4.8.3. Determinação da Massa Molecular da enzima purificada	64
4.8.3.1. Determinação da Massa Molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	64
4.8.3.2. Determinação da Massa Molecular por filtração	67
4.8.4. Purificação da trealase intracelular	69
4.8.5. Critério de pureza.....	73
4.8.6. Determinação da Massa Molecular da enzima purificada	73
4.8.6.1. Determinação da Massa Molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	73
4.8.6.2. Determinação da Massa Molecular por filtração	76
4.9. Caracterização das trealases purificadas.....	78
4.9.1. Determinação do ponto isoelétrico das trealases intra e extracelular purificadas de <i>M. pulchella</i>	78
4.9.2. Efeito do pH sobre a atividade trealásica de <i>M. pulchella</i>	78
4.9.3. Determinação da temperatura ótima de atividade das trealases purificadas ..	78
4.9.4. Efeitos de íons metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade das trealases purificadas	85
4.9.5. Efeito de nucleosídeos fosfato sobre a atividade trealásica	91
4.9.6. Estabilidade térmica da trealase extracelular	93
4.9.7. Análise cinética das trealases purificadas.....	98
4.9.8. Determinação do conteúdo de carboidratos neutros das trealases intra e extracelular purificadas	98
4.9.9. Especificidade das trealases purificadas de <i>M. pulchella</i>	101
5. Discussão	102
5.1. Otimização da síntese de trealase intra e extracelular no meio de cultivo para <i>Malbranchea pulchella</i>	103
5.2. Purificação das trealases de <i>M. pulchella</i>	106
5.3. Caracterização das trealases purificadas de <i>M. pulchella</i>	108

6. Conclusões.....	116
7. Referências Bibliográficas	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da trealose.....	3
Figura 2 - Via de biossíntese de trealose na maioria dos organismos.....	6
Figura 3 - Esquema mostrando o mecanismo de estabilização da membrana de lipossomas no estado dessecado na presença de açúcar.....	11
Figura 4 - Altas temperaturas causam a desnaturação protéica.....	12
Figura 5 - Dobramento de proteínas pelas chaperoninas (HSP).....	17
Figura 6 – Determinação do melhor tempo de cultivo para produção da trealase extracelular de <i>M. pulchella</i>	42
Figura 7 – Determinação do melhor tempo de cultivo para produção da trealase intracelular de <i>M. pulchella</i>	43
Figura 8 – Determinação da melhor temperatura para atividade das trealases de <i>M. pulchella</i>	44
Figura 9 – Determinação do pH ótimo para atividade da trealase intracelular de <i>M. pulchella</i>	45
Figura 10 – Determinação do pH ótimo para a reação da atividade de trealase extracelular de <i>M. pulchella</i>	46
Figura 11 – Determinação da melhor concentração de extrato de levedura para produção de trealases em <i>M. pulchella</i>	48
Figura 12 – Determinação do efeito de cálcio na atividade da trealase extracelular de <i>M. pulchella</i>	49
Figura 13 – Determinação do efeito do cálcio na atividade da trealase intracelular bruta de <i>M. pulchella</i>	50
Figura 14 – Determinação do teor de açúcar redutor no meio de cultura, utilizando amido como fonte de carbono no meio de cultura (crescimento sob agitação).....	52
Figura 15 – Determinação da quantidade de açúcar redutor no meio de cultura, utilizando maltose como fonte de carbono (crescimento sob agitação).....	53
Figura 16 – Determinação da quantidade de açúcar redutor no meio de cultura, utilizando amido como fonte de carbono no meio de cultura (crescimento estacionário).....	54
Figura 17 – Determinação da quantidade de açúcar redutor no meio de cultura, utilizando maltose como fonte de carbono (crescimento estacionário).....	55

Figura 18 – Estabilidade térmica da trealase extracelular em extrato bruto de <i>M. pulchella</i>	58
Figura 19 – Estabilidade térmica da trealase intracelular em extrato bruto de <i>M. pulchella</i>	59
Figura 20 – Perfil cromatográfico da atividade trealásica extracelular do extrato bruto de <i>M. pulchella</i> em coluna de troca iônica de DEAE-Celulose em pH 7,0.....	61
Figura 21 – Perfil cromatográfico em coluna de Phenyl-Sepharose do “pool” DEAE-Celulose da atividade trealásica extracelular de <i>M. pulchella</i>	62
Figura 22 – Perfil cromatográfico em coluna de DEAE-Celulose, pH 5,0 do “pool” de Phenyl-Sepharose da atividade trealásica extracelular de <i>M. pulchella</i>	63
Figura 23 – PAGE da trealase extracelular purificada de <i>M. pulchella</i>	65
Figura 24 – SDS-PAGE da trealase extracelular purificada de <i>M. pulchella</i>	66
Figura 25 – Determinação da massa molecular da trealase extracelular de <i>M. pulchella</i> por filtração.....	68
Figura 26 – Perfil cromatográfico da atividade trealásica intracelular do extrato bruto de <i>M. pulchella</i> em coluna de troca iônica de DEAE-Celulose.....	71
Figura 27 – Perfil cromatográfico em coluna de Phenyl-Sepharose do “pool” DEAE-Celulose de <i>M. pulchella</i>	72
Figura 28 – PAGE da trealase intracelular purificada de <i>M. pulchella</i>	74
Figura 29 – SDS-PAGE da trealase intracelular de <i>M. pulchella</i>	75
Figura 30 – Determinação da massa molecular da trealase intracelular de <i>M. pulchella</i>	77
Figura 31 - Representação gráfica da focalização isoeletrica (pI) da trealase extracelular produzida por <i>M. pulchella</i>	79
Figura 32 - Representação gráfica da focalização isoeletrica (pI) da trealase intracelular produzida por <i>M. pulchella</i>	80
Figura 33 – Determinação do pH ótimo de atividade da trealase extracelular purificada de <i>M. pulchella</i>	81
Figura 34 – Determinação do pH ótimo de atividade da trealase intracelular purificada de <i>M. pulchella</i>	82
Figura 35 – Determinação da temperatura ótima da trealase extracelular de <i>M. pulchella</i>	83
Figura 36 – Determinação da temperatura ótima da trealase intracelular de <i>M. pulchella</i>	84

Figura 37 – Influência da concentração de cobalto e manganês na atividade trealásica extracelular de <i>M. pulchella</i>	89
Figura 38 – Influência da concentração de cálcio, cobalto e manganês na atividade de trealase intracelular de <i>M. pulchella</i>	90
Figura 39 – Termoestabilidade da trealase extracelular purificada de <i>M. pulchella</i> (diluída em água).....	94
Figura 40 – Termoestabilidade da trealase extracelular purificada de <i>M. pulchella</i> (diluída em trealose 1%).....	95
Figura 41 – Termoestabilidade da trealase intracelular purificada de <i>M. pulchella</i> (diluída em água).....	96
Figura 42 – Termoestabilidade da trealase intracelular purificada de <i>M. pulchella</i> (diluída em trealose 1%).....	97
Figura 43 – Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a trealase extracelular purificada de <i>M. pulchella</i>	99
Figura 44 – Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a trealase intracelular purificada de <i>M. pulchella</i>	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Determinação da melhor fonte de carbono para produção da trealase extracelular de <i>M. pulchella</i>	37
Tabela 2 – Determinação da melhor fonte de carbono para produção da trealase intracelular de <i>M. pulchella</i>	38
Tabela 3 – Determinação da melhor fonte de carbono para produção da trealase extracelular de <i>M. pulchella</i> em incubadora que movimenta os frascos por excursão.....	39
Tabela 4 – Determinação da melhor fonte de carbono para produção da trealase intracelular de <i>M. pulchella</i> em incubadora que movimenta os frascos por excursão.....	40
Tabela 5 – Purificação da trealase extracelular de <i>M. pulchella</i>	60
Tabela 6 – Purificação da trealase intracelular de <i>M. pulchella</i>	70
Tabela 7 – Influência de íons, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da trealase extracelular purificada de <i>M. pulchella</i>	87
Tabela 8 – Influência de íons, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da trealase intracelular purificada de <i>M. pulchella</i>	88
Tabela 9 – Efeito de nucleosídeos fosfato sobre as trealases de <i>M. pulchella</i>	92
Tabela 10 – Estudo da especificidade das trealases purificadas de <i>M. pulchella</i> ...	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius
ABS - Absorbância
ADP - Adenosina difosfato
AE - Atividade específica
AMP - Adenosina monofosfato
AMPc - Adenosina 3,5-monofosfato
ATP - Adenosina trifosfato
BSA – Soro albumina bovina
cm - Centímetro
DEAE - Dietilaminoetil
DNS - Ácido 3,5 dinitrosalicílico
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
GOD - Glicose oxidase
HEPES - Hidroxietyl piperazina ácido sulfônico etano
HPLC – Hight Performance Liquid Chromatography
HSP – Chaparoninas
Hs - horas
kDa – Kilo dalton
 K_m - Constante de Michaelis-Menten
M - Molar
mA - Miliampére
MES - Ácido 2-N-Morfolino Etasulfônico
Mg - Miligrama
Min - Minuto
ml - Mililitro
mm - milímetro
mM - Milimolar
n.d. - Não detectável
nm – Nanômetro
nmol - Nanomol
ots/A e ots/B – genes responsáveis pela síntese de trealose em *E. coli*
PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

pI – Ponto isoelétrico
PKA – Proteína quinase dependente de AMPc
prot. - Proteína
p/v - Peso por volume
® - Marca registrada
rpm - Rotações por minuto
SDS - Dodecil sulfato de sódio
Tris-HCl - Tris (hidroximetil) aminoetano hidróclorido
Tsl1p – Regulador da síntese de trealose
TPP – Enzima trealose-P-fosfatase
TPS – Enzima trealose-P-sintase
TPS1p – Enzima que catalisa a síntese de trealose-6-fosfatase
TPS2p – Enzima que remove o fosfato
TPS3p – Proteína homóloga de Tsl1p
U - Unidade enzimática
UDP - Uridina difosfato
UDPG – Uridina-difosfato-glicose
µg - Micrograma
µl – Microlitro
µmol - Micromol
V - Volts
Ve - Velocidade de eluição da coluna
V_{máx} – Velocidade máxima
Vo – Volume void
v/v - Volume por volume
X g - Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

RESUMO

Trealases são enzimas largamente distribuídas nos organismos e são altamente específicas, hidrolisando somente trealose. No passado foram divididas em dois grupos, ácidas e neutras, considerando o seu pH de atuação. Apesar da estrita especificidade, as trealases das diferentes fontes exibem uma grande diversidade de propriedades bioquímicas.

Atualmente é evidente que a simples divisão em ácidas e neutras não é mais satisfatória. Sabe-se que em fungos termófilos há fortes evidências da existência de um grupo intermediário de trealase, com características mistas, de ácidas e de neutras. Em fungos filamentosos, as trealases ácidas são glicoproteínas termo-resistentes e sua atividade são pouco influenciadas por íons ou outras moléculas. As trealases neutras não são glicoproteicas, são mais lábeis que as ácidas, de localização intracelular, atuam sobre o “pool” endógeno de trealose e são muito influenciadas por íons e fosforilação dependente de PKA.

O fungo *Malbranchea pulchella* é termofílico e vive normalmente na decompostagem entre os demais termófilos e é pouco estudado do ponto de vista fisiológico e bioquímico. O objetivo desse trabalho foi purificar e caracterizar as trealases intra e extracelular deste fungo, visando a comparação com as trealases de outros termófilos.

Esse fungo cresce melhor em meio contendo amido e/ou maltose como fonte de carbono. A enzima é produzida com mais eficácia em incubadora que movimentada os frascos por excursão. O processo de purificação consistiu em cromatografia da enzima extracelular em coluna de DEAE-Celulose pH 7,0, seguida da cromatografia em uma coluna hidrofóbica de Phenyl-Sepharose pH 7,0 e re-cromatografia em uma DEAE-Celulose pH 5,0. A enzima foi purificada 33,7 vezes, com uma atividade específica de 84,50 U/mg de proteína e um rendimento de 6%. A análise em PAGE e SDS-PAGE mostrou uma única banda de proteína de aproximadamente 52 kDa, e a massa molecular foi estimada por filtração em 104 kDa. A atividade máxima foi conseguida em pH 5,0, na temperatura de 55°C.

A trealase intracelular foi purificada com dois passos. O processo de purificação consistiu em aplicação da enzima intracelular em coluna de DEAE-Celulose pH 7,0, seguida da aplicação do “pool” de DEAE em uma coluna hidrofóbica de Phenyl-Sepharose pH 7,0. A enzima foi purificada 24 vezes, com uma

atividade específica de 50 U/mg de proteína e um rendimento de 21%. A análise em PAGE e SDS-PAGE mostrou uma única banda de proteína de aproximadamente 50 kDa, e a massa molecular foi estimada por filtração em 150 kDa. A atividade máxima foi conseguida em pH 5,5-6,0, e na temperatura de 50°C. As enzimas purificadas são específicas para trealose e não hidrolisaram avicel, amido, maltose, sacarose, lactose e rafinose.

As trealases purificadas exibiram um *pI* de 3,5 e 3,0 para trealase extracelular e intracelular, respectivamente. A trealase extracelular foi ativada por manganês (50%) e cobalto (14%) e inibida por cálcio (cerca de 42%), alumínio (43%), chumbo (34%), ferro (61%), mercúrio (66%) e prata (56%). Outros íons não tiveram efeito significativo sobre a atividade da enzima extracelular. A trealase intracelular foi ativada por manganês (41%), cobalto (40%), e prata (31%). A enzima foi inibida por alumínio (58%), cobre (38%), zinco (57%), chumbo (50%), ferro (71%), EDTA (40%) e mercúrio (100%). Outros íons não exerceram ativação e/ou inibição significativa na atividade da enzima intracelular. A trealase extracelular, na presença de 20 mM de manganês, tem sua ativação máxima; enquanto que na presença de cobalto, a enzima necessita de 10 mM. Para enzima intracelular é necessário 40 mM de manganês ou cobalto para sua ativação máxima.

A enzima extracelular sofreu uma pequena inibição em presença de ATP, sendo inibida cerca de 9 e 21% nas concentrações de 1 e 10 mM, respectivamente. Na presença de ADP e AMP, na concentração de 1 mM, a enzima extracelular sofreu cerca de 11% de inibição. A enzima intracelular se mostrou mais sensível aos nucleotídeos fosfatos. Em presença de ATP a enzima sofreu cerca de 23 e 44% de inibição na presença de 1 e 10 mM, respectivamente. ADP 1 mM inibiu a enzima aproximadamente 14%, AMP 1 mM, ADP 10 mM e AMP 10 mM, inibiu aproximadamente 21% da atividade.

Quanto à estabilidade das trealases purificadas frente à temperatura, a trealase extracelular possui uma meia vida quando incubada a 65°C de aproximadamente 9,8 minutos. Quando incubamos a trealase extracelular na presença de trealose 1% a 65°C, a enzima praticamente não perde a atividade em até 60 minutos de incubação. A trealase intracelular incubada a 60°C teve uma meia vida de aproximadamente 8 minutos. Quando a trealase intracelular é incubada com trealose 1%, a sua estabilidade térmica é aumentada para 46 minutos a 55°C.

O valor de k_m encontrado para trealase extracelular foi de 2,72 mM, e a $V_{m\acute{a}x}$ foi de 90 U/mg de proteína. O valor de k_m encontrado para trealase intracelular foi de 4,66 mM, e a $V_{m\acute{a}x}$ foi de 90, 90 U/mg de proteína. O conteúdo de carboidrato foi estimado em 19% para enzima extracelular e 66% para a enzima intracelular.

Assim, as propriedades exibidas pelas trealases de *M. pulchella* sugerem a existência de um grupo de trealases que apresentam propriedades mistas, no entanto, as trealases de *M. pulchella* possuem uma característica particular, elas não são ativadas por cálcio.

ABSTRACT

The enzyme trehalase exists in a wide variety of organisms and is highly specific for trehalose. In the past, trehalases were separated into two groups, acid and neutral, considering its pH optimum, positive response to ions (neutral), heat stability (acid), activation by cAMP (neutral) and inhibition by ATP and ADP (neutral). In spite of the specificity, trehalases of several sources exhibit different biochemical properties. At the present it is clear that the division in acid and neutral is not more satisfactory, since a large number of trehalases with peculiar biochemical properties have been described. It is known that thermophilic fungus exhibited a new class of trehalase, with mixed characteristics, of acid and of neutral.

The thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* usually lives in compost. In comparison with other thermophilic fungi little is known about its physiology and biochemistry. In this work, we have purified and characterized the intracellular and extracellular trehalases from *M. pulchella* in order to compare it with other thermophilic trehalases.

Malbranchea grows and produces good amount of trehalase activity in several carbon sources as glucose, starch, maltose, xylose, and mannose. Apparently the carbon source did not influence the enzyme production, but the amount of growth that was a prerequisite for trehalase production.

In comparison with growth in orbital shaker, the level of intra and extracellular trehalases, were increased 10 to 20 times when the organism was grown in shaker where the flasks were agitated by excursion. Under this condition, the mycelia could be under stress, since the mycelium was projected out of the medium and stuck on flask walls and became only humidified by the liquid medium. Thus, it seemed that for

M. pulchella trehalase production is more related with the stage of cultivation than the carbon source.

The extracellular trehalase was purified by chromatography on DEAE-cellulose (pH 7.0), Phenyl-Sepharose, and DEAE-cellulose (pH 5.0). After the last chromatography step the extracellular enzyme exhibited 84.50 U/mg protein and a purification of about 34-fold was achieved. Analysis in SDS-PAGE showed a unique polypeptide band of approximately 52 kDa, and the molecular mass of the native enzyme was estimated to be 104 kDa by gel-filtration chromatography, suggesting that the native extracellular enzyme was composed of two identical subunits. The activity of extracellular enzyme was maximal at pH 5.0 and the temperature optimum was 55 °C.

The intracellular trehalase was purified with two chromatographic steps on DEAE-celulose (pH 7.0) and Phenyl-Sepharose. After the hydrophobic chromatography the intracellular trehalase exhibited a specific activity of 50 U/mg protein and purification of about 24-fold was achieved. Non-denaturing PAGE of the intracellular purified enzyme showed a single band after staining with Coomassie Blue or silver. Filtration in Bio-Sil-Sec 400 (BIORAD) indicated that the native protein had a molecular mass of 150 kDa. However, on SDS-PAGE, the intracellular trehalase exhibited a single band of molecular mass of approximately 50 kDa, suggesting that the enzyme was formed of three identical subunits. The maximum of activity was achieved at pH 5.5-6.0, and temperature optimum was about 50°C.

The carbohydrate content of the extracellular and intracellular trehalases was estimated as 19% and 66%, respectively.

Both trehalases (intra and extracellular) were highly specific for trehalose and did not hydrolyze avicel, starch, maltose, sucrose, lactose or raffinose.

The isoelectric point was about 3.5 and 3.0, for the extracellular and intracellular enzymes, respectively. The purified extracellular trehalase was activated by manganese (50%) and cobalt (14%), and inhibited by calcium (about of 42%), aluminium (43%), lead (34%), iron (61%), mercury (66%) and silver (56%). The intracellular trehalase was activated by manganese (41%), cobalt (40%), silver (31%) and was inhibited by aluminium (58%), cooper (38%), zinc (57%), lead (50%), iron (71%), EDTA (40%) and mercury (100%).

The maximum activity of the purified extracellular trehalase was obtained in the presence of 20 mM manganese or 10 mM cobalt. The Intracellular trehalase exhibited maximum activity in the presence or 40 mM manganese or 40 mM cobalt. At 1mM and 10 mM concentration, ATP inhibited 9% and 21%, respectively, the extracellular trehalase. The intracellular enzyme was more sensitive to nucleoside phosphate, being inhibited about 23 and 43% by 1 and 10 mM ATP, respectively. 10 mM ADP or AMP inhibited about 21% the intracellular enzyme.

The extracellular enzyme showed good thermal stability at 60 °C, but exhibited a half-life of 9.8 min at 65 °C. Moreover, in the presence of trehalose the extracellular enzyme was stable up to 1 hour when incubated at 65 °C. The intracellular enzyme incubated at 60 °C had a half-life of approximately 8 minutes, but in the presence of trehalose its thermal stability was improved. Both enzymes exhibited biphasic curves of thermal denaturation when incubated in several temperatures, suggesting the presence of at least two pools of molecules with different thermal stability. These results are in good agreement with the data obtained in SDS-PAGE for both trehalases.

Apparent K_m values, for the extracellular and intracellular trehalases, were about 2.7 mM and 4.7 mM, respectively; the V_{max} for the extracellular and intracellular trehalases, were 90 U/mg of protein and 90 U/mg of protein, respectively.

The molecular structure of the intracellular and extracellular trehalases of *M. pulchella* was apparently different. More studies are necessary in order to confirm whether these enzymes are product of different genes, or result of posttranslational modifications, such as aggregation, glycosylation or proteolysis. However, the data obtained with the *M. pulchella* agree with the current idea that trehalases exhibit very large biochemical diversity. Moreover, the fact that *M. pulchella* trehalases are not activated by calcium suggest that differences exist also between the enzymes from thermophilic filamentous fungi.

1. Introdução

1.1. Trealose

A trealose [α -D-glicopiranosil-1- α -D-glicopiranosídeo] é um dissacarídeo não redutor, solúvel em água ou etanol aquoso, e insolúvel em éter, cuja hidrólise ácida produz duas moléculas de glicose. Não é facilmente dissociado em seus dois monossacarídeos redutores, a menos que exposto a condições hidrolíticas extremas ou à ação de trealases (Schiraldi et al., 2002).

É uma das mais importantes formas de carboidratos, a qual está presente em quase todas as formas de vida, exceto nos mamíferos (Benaroudj et al., 2001). Trealose serve como reserva de carbono endógena para várias funções biológicas (Thevelein, 1984b).

1.2. Estrutura, ocorrência e biossíntese de trealose

A trealose foi identificada pela primeira vez no fungo patogênico ergot (*Claviceps purpurea*). Este organismo atraiu a atenção do pesquisador H. A. L. Wiggers, que em 1832, identificou um açúcar até então desconhecido. Este mesmo açúcar, vinte e cinco anos mais tarde, foi descoberto em casulos do besouro *Larinus*, chamados *treala*, dando origem ao nome *trealose*. Posteriormente, a estrutura (figura 1) e a síntese química da trealose foram amplamente revisadas (Birch, 1963; Eibein, 1974; Singer & Lindquist, 1998).

A trealose tem sido encontrada em uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, algas, líquens, plantas, insetos e outros invertebrados (Eibein, 1974). Sendo mais predominantemente em alguns anidrobiontes. Estes organismos incomuns, no qual inclui a chamada “planta da ressurreição”

(*Selaginella lepidophylla*), alguns camarões de salmoura, nematóides e leveduras de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*), resistem à dessecação quase completa, suportando longos períodos em condições extremas, voltando da dormência à atividade plena apenas quando a água volta a ser disponível (Singer & Lindquist, 1998).

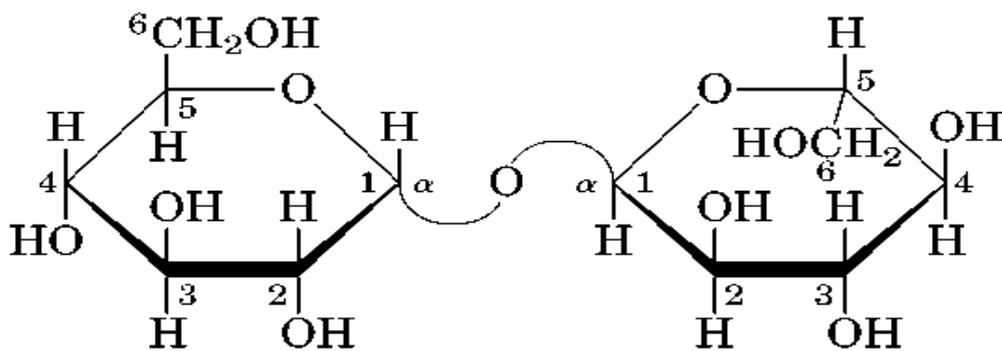


Figura 1 - Estrutura molecular da trealose.

Em insetos a trealose é o principal açúcar da hemolinfa, servindo como um substrato indispensável para a biossíntese de macromoléculas e produção de energia (Su et al., 1994). Análogos de trealose têm sido testados por seu efeito fungicida e inseticida, visando principalmente o controle de pragas agrícolas (Lange et al., 1993; Kono et al., 1993 e 1994).

A trealose, em fungos, é comum tanto em estágios reprodutivos quanto vegetativos e células dormentes, como esporos, conídios e esclerócitos (Thevelein, 1996; Elbein, 1974). Nas estruturas reprodutivas, a trealose está freqüentemente presente em concentrações muito maiores que as dos outros carboidratos. Em *Neurospora*, por exemplo, os ascósporos (Sussman, 1961) e conidiósporos (Hanks & Sussman, 1969) contêm 14 e 10%, respectivamente, do peso seco em trealose. Em ascósporos de *Saccharomyces cerevisiae*, a trealose é o único açúcar presente no seu citoplasma (Thevelein, 1984a).

Em fungos, a trealose acumula-se durante períodos de crescimento lento, como sob privação de nutrientes, (Thevelein, 1984b), durante condições adversas como estresse térmico e dessecação, e durante a esporulação, sugerindo que esse açúcar pode suprir a energia necessária para a germinação de esporos (Hey-Ferguson et al., 1973; Van Laere, 1989; Wiemken, 1990). A trealose acumula-se também no micélio durante a fase estacionária e em conídios é rapidamente utilizada após o crescimento ser retomado, ou mesmo quando a germinação é iniciada.

Segundo Nicolaus et al. (1988), em arqueobactérias tem sido encontrado trealose acumulada em resposta ao estresse. Já em leveduras e nematóides, a sacarose (dissacarídeo) desempenha um papel similar ao da trealose (Anandarajah e Mckersie, 1990).

O complexo enzimático catalisador da síntese de trealose em levedura está localizado no citoplasma, onde a produção do açúcar, através da via clássica, ocorre em dois passos (figura 2):

➤ A glicose proveniente da uridina-difosfato-glicose (UDPG) é acoplada a glicose-6-fosfato, através da trealose-6-fosfato-sintase, formando trealose-6-fosfato; a enzima trealose-6-fosfatase faz a remoção do grupo fosfato, liberando a trealose e reciclando fosfato inorgânico livre (Leloir & Cabib, 1953; Cabib & Leloir, 1958; Elbein et al., 2003; Bonini et al., 2004).

➤ Esse complexo enzimático é formado pelas enzimas TPS1p - catalisa a síntese de trealose-6-fosfato - TPS2p - remove o fosfato, formando trealose - e Tsl1p - regulador da síntese de trealose (Vandercammen et al., 1989; Londesboroug & Vuorio, 1991; Bell et al., 1992; De Virgilio et al., 1993; Vuorio et al., 1993). Uma quarta proteína, a TPS3p, homóloga de Tsl1p, foi encontrada também em associação com TPS1p e TPS2p, sendo que a Tsl1p tem seus níveis aumentados durante a fase estacionária, enquanto que a TPS3p tem níveis de expressão constantes durante as fases exponencial e estacionária. (Singer & Lindquist, 1998).

A proteína TPS1p catalisa o primeiro passo na síntese de trealose; as células que perdem esse gene não produzem trealose e trealose-6-fosfato (Bell et al., 1992). A proteína TPS2p é conhecida como trealose-6-fosfato fosfatase (TPP).

Os níveis de regulação de trealose em diferentes condições fisiológicas não são completamente entendidos. Sabe-se que TPS1p, TPS2p e TPS3p são constitutivas e a expressão de TPS1p e TPS2p é induzida por choque térmico (Bell et al., 1992; De Virgilio et al., 1993). O calor faz com que a atividade deste complexo enzimático aumente (Hottinger et al., 1987; Neves & François, 1992).

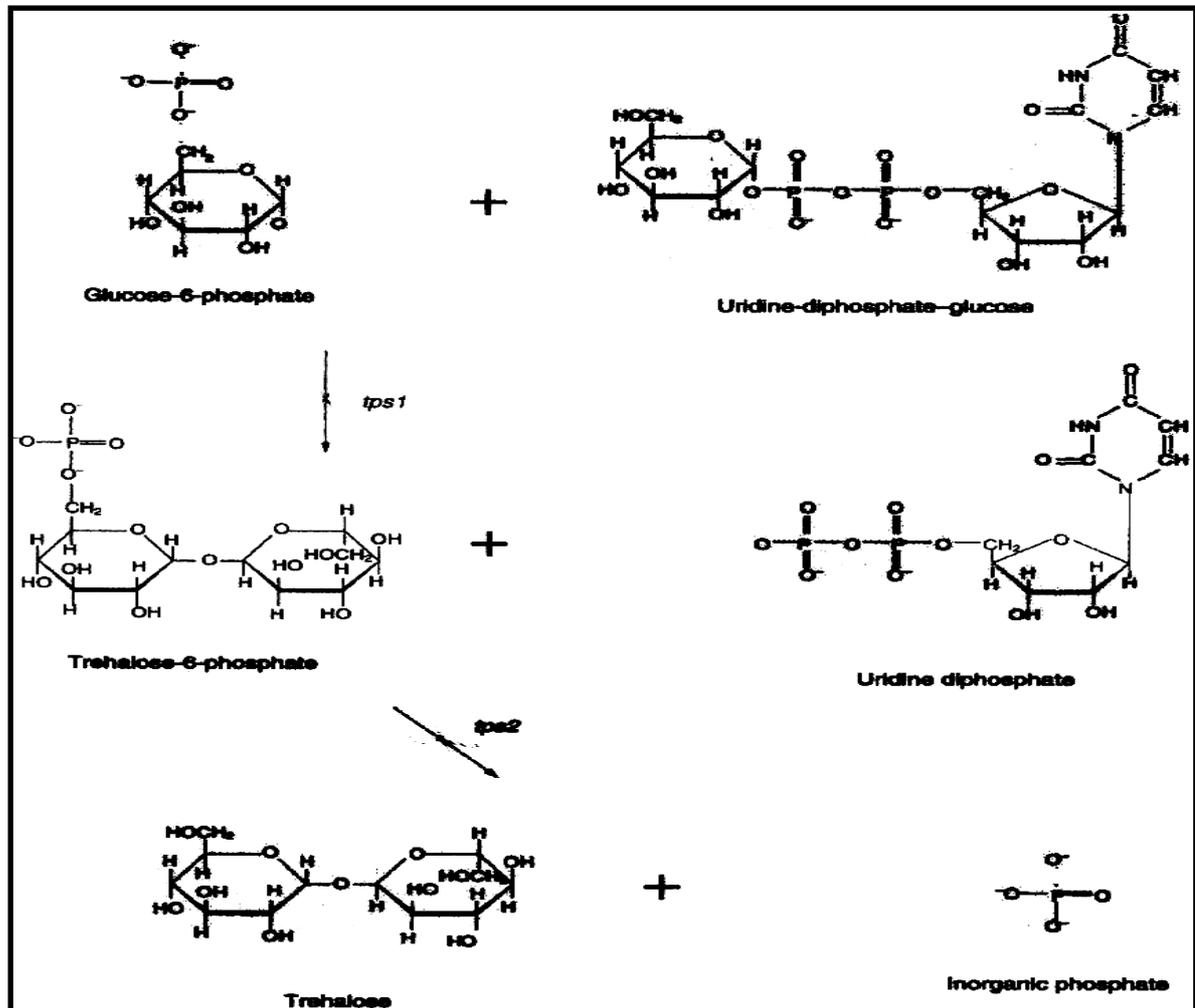


Figura 2 - Via de biossíntese de trealose na maioria dos organismos. Esta via envolve a transferência de glicose a partir de UDP-glicose ou outro nucleotídeo para a glicose-6-fosfato para formar trealose-6-fosfato por ação da enzima trealose-P-sintase (TPS1) e então desfosforilada pela enzima específica trealose-P-fosfatase (TPS2), formando trealose e liberando fosfato (Cabib & Leloir, 1958).

As informações sobre o metabolismo de trealose e sua regulação em células de levedura, principalmente em células de *S. cerevisiae*, mostram que o metabolismo de trealose está ligado a outros fenômenos biológicos importantes, sugerindo princípios que podem ter um significado universal entre fungos. Como exemplo, podemos citar: (1) o duplo papel da trealose, que age tanto como reserva de carbono quanto como protetor de estresse (Van Laere, 1989; Weimken, 1990; Panek, 1995; Thevelein, 1996); (2) a atividade do complexo trealose-6-fosfato sintase, que possivelmente contribui para modular a entrada de glicose na célula, e podendo participar da sinalização intracelular e (3) também a existência de duas classes de trealase, neutra e ácida (Jorge et al., 1997).

1.3. Funções da trealose

a) Carboidrato de reserva:

A trealose é utilizada pela maioria dos fungos como fonte de carbono extracelular. É acumulada em muitas células microbianas, insetos e algumas plantas, bem como, nos solos ricos em biomassa, onde a trealose está contida em quantidades significativas; esse dissacarídeo pode servir como fonte de carbono para microorganismos dotados de atividades trealásicas.

Inicialmente a trealose era conhecida apenas como carboidrato de reserva, como o glicogênio, para fornecer energia durante uma fase específica do ciclo de vida, como por exemplo, esporulação (Inoue & Shimoda, 1981), quebra de dormência de esporos, durante estocagem e dispersão de esporos de fungos (Van Assche et al., 1978; Thevelein & Jones, 1983). A trealose, durante o ciclo celular é acumulada durante a fase de maturação e mobilizada durante a fase de divisão

celular (Thevelein, 1984b), funcionando como carboidrato de reserva e sobrevivência em períodos de jejum prolongado, mantendo a viabilidade das células nesta condição (Lillie & Pringle, 1980).

Normalmente se esperaria que reservas energéticas fossem estocadas quando houvesse grandes quantidades de nutrientes, para a utilização quando houvesse escassez de nutrientes. Entretanto, foi verificado que a trealose não é produzida quando nutrientes são abundantes, como na fase de crescimento exponencial.

Em leveduras, o glicogênio é produzido durante a fase exponencial de crescimento, quando há glicose disponível. No entanto a trealose não é produzida até que os níveis de glicose sejam próximos à escassez e as células começam a entrar na fase estacionária. A trealose tem síntese contínua na fase estacionária em ausência de glicose extracelular e quando o glicogênio é metabolizado (Singer & Lindquist, 1998; Lúcio et al., 2000). Similarmente, na esporulação, o glicogênio é utilizado durante o final da maturação de ascósporos, enquanto isso, a trealose não é metabolizada, mas está presente na maturação dos esporos (Singer & Lindquist, 1998). Assim, a trealose só é degradada em último caso, como forma de nutrir a carência nutricional, após todos os estoques de glicogênio terem sido esgotados (Lúcio et al., 2000).

b) Função Protetora:

A trealose pode atuar também como substância protetora contra condições extremas, como o estresse térmico (Hottinger et al., 1987; de Virgilio et al., 1990), dessecação (Gadd et al., 1987; Hottinger et al., 1987), estresse osmótico (Giaever et al., 1988; Csonka, 1989), e outros. A função protetora da trealose foi descrita

inicialmente em esporos de *Dictyostelium discoideum* (Emyanitoff & Wright, 1979) e várias evidências apontam para esse papel.

A trealose em *S. cerevisiae* está localizada exclusivamente no compartimento nuclear-citosólico, em altas concentrações, bem maiores que as previstas (Singer & Lindquist, 1998). Os altos níveis desse açúcar sugeriram que poderia afetar os constituintes do citoplasma. No entanto, altos níveis de trealose, em altas temperaturas, fazem com que as proteínas mantenham sua forma nativa (Singer & Lindquist, 1998).

Quando células de *Mucor rouxii* eram incubadas em glicose e fosfato inorgânico, acumulavam cinco vezes mais trealose e eram mais resistentes ao aquecimento a 55°C do que as células controle. Adicionando trealose 40 mM no meio de cultura durante o estresse térmico, aumenta a sobrevivência dessas células de *M. rouxii* (Lúcio et al., 2000). Altos níveis de trealose aumentam a tolerância térmica de *Neurospora crassa* (Neves et al., 1991) e de *Saccharomyces cerevisiae* (Attfield et al., 1992).

c) Estabilizadora e protetora de proteínas e lipídios e tolerância à desidratação:

A dessecação de células de *S. cerevisiae* é conhecida por desencadear a mobilização de glicogênio e concomitante acúmulo de trealose (Bonini et al., 2004).

O conteúdo de trealose chega a ser maior que 2-3% do peso seco. Os números de ligações de hidrogênio com a água diminuem e a viabilidade das células dessecadas aumenta, sugerindo que níveis mínimos de trealose são necessários para proteger as células de leveduras, e que este valor corresponde à quantidade de açúcar requerida para substituir as ligações com a água e para a completa cobertura

das proteínas e estruturas intracelulares de leveduras por moléculas de trealose (Sano et al., 1999).

Recentemente, foi descrito que Hsp12 atua de modo análogo a trealose e protege a integridade da membrana lipossomal contra dessecação, sugerindo que Hsp12 interage eletrostaticamente com grupos carregados presentes na superfície da membrana. Grupos de serina e treonina em Hsp12 poderia imitar a ação da água minimizando a repulsão de cargas de grupos fosfato livres (Bonini et al., 2004).

Trabalhos com *S. cerevisiae* relatam que a trealose é crucial para a sobrevivência da célula sob estresse térmico. O calor danifica as células de vários modos, talvez mais criticamente, por romper a integridade estrutural da membrana e/ou por causar a desnaturação e agregação de proteínas (Singer & Lindquist, 1998). Assim, algumas evidências sugerem que a trealose atua na proteção estrutural de membranas (figura 3) e proteínas (figura 4) contra a dessecação, estabilizando-as no estado desidratado. Provavelmente esta estabilização ocorre pela formação de pontes de hidrogênio entre as hidroxilas deste carboidrato e grupos polares das proteínas e lipídios, utilizando na manutenção de sua estrutura um estado semelhante àquele encontrado quando estão em meio aquoso (Carpenter e Crowe, 1989). Portanto, a trealose diminuiria a fase de transição de temperatura no dessecação lipídico, o qual os mantém em uma fase líquida cristalina na ausência de água (Crowe & Crowe, 1988).

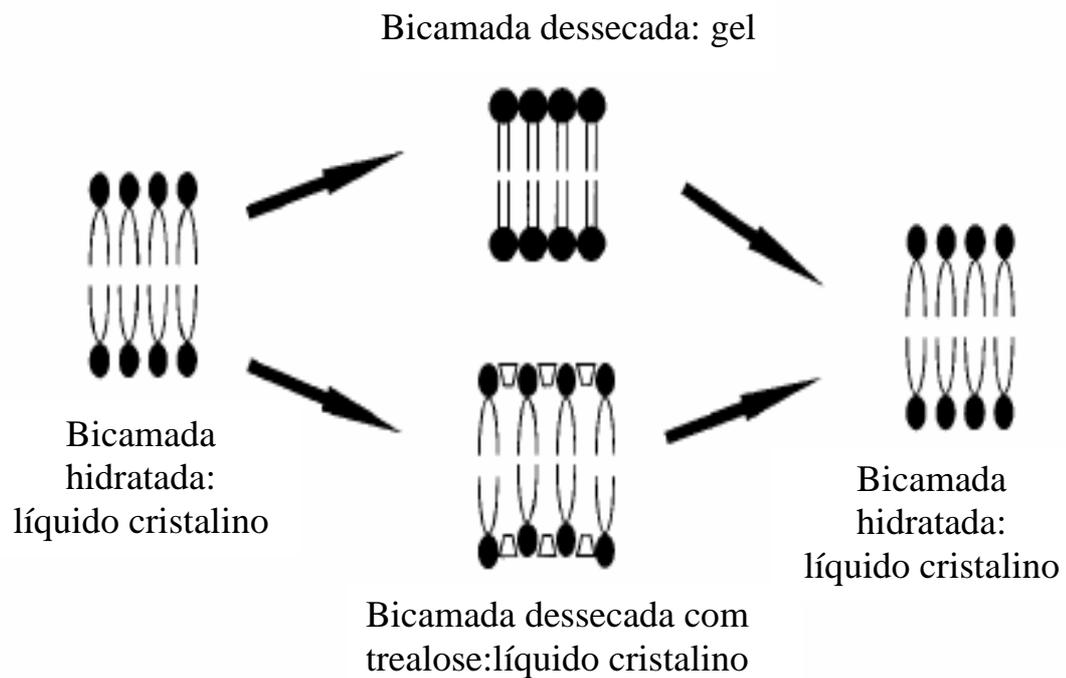


Figura 3 - Esquema mostrando o mecanismo de estabilização da membrana de lipossomas no estado dessecado na presença de açúcar. Resultados similares foram obtidos para células intactas. (Crowe et al., 1998).

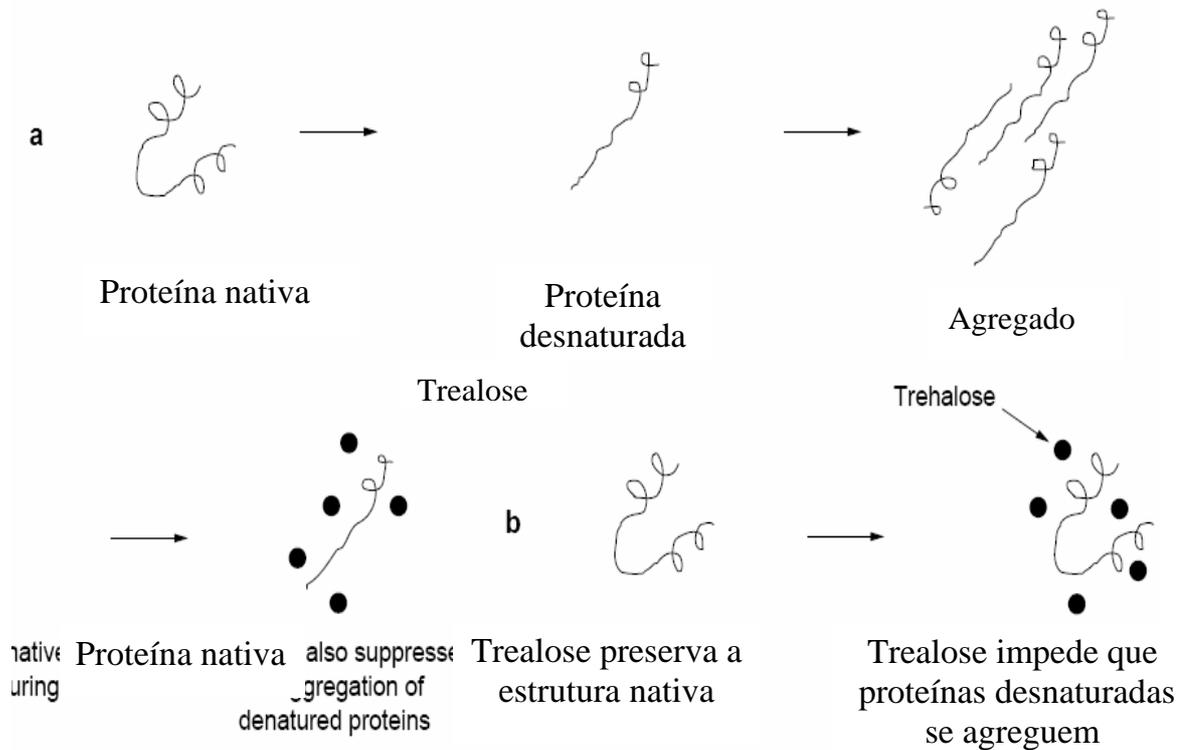


Figura 4 - Altas temperaturas causam a desnaturação protéica. Proteínas desnaturadas podem então se associar para formar agregados (**A**). *S. cerevisiae* sintetiza grandes quantidades de trealose durante estresse térmico. A trealose estabiliza proteínas no estado nativo sob essas condições, e também impede a agregação de proteínas que tenham desnaturado (**B**) (Singer & Lindquist, 1998).

d) Proteção contra o calor:

Nos fungos, em resposta ao choque térmico, também ocorre acúmulo de trealose, como por exemplo, em *S. cerevisiae* o complexo de trealose-6-P-sintase é ativado durante o choque térmico (Bell et. al., 1992). Segundo Singer e Lindquist (1998) as enzimas são mais capazes de conservar a atividade durante o choque térmico nas células que produzem trealose.

e) Proteção contra o frio:

A trealose é acumulada em microrganismos durante o choque térmico e estresse osmótico e ajuda a proteger a célula contra estresses e danos térmicos. Na bactéria *Escherichia coli*, esse açúcar é importante na adaptação ao frio; experimentos com uma cepa mutante de *E. coli* incapaz de produzir trealose mostraram morte mais rápida em resposta ao frio, em relação à cepa selvagem. Entretanto, a transformação deste mutante com genes ots/A e ots/B, responsáveis pela síntese de trealose, restauraram a habilidade de sintetizar trealose e também a viabilidade das células no frio à 4°C. A síntese de trealose é ativada durante o choque frio (tanto quanto no choque térmico) e tem um papel importante na resistência de *E. coli*, e de provavelmente outros organismos, em baixas temperaturas (Kandror et al., 2002).

f) Proteção contra radicais de oxigênio (radicais livres):

Em *S. cerevisiae* ocorre o acúmulo de trealose em resposta a choque suave de temperatura, ou à presença de inibidor de proteassoma. Em temperatura normal, tanto a trealose quanto a resistência ao estresse oxidativo voltam ao normal nas células de linhagem selvagem.

Uma linhagem de células mutantes, defeituosas na síntese de trealose, é mais sensível aos radicais livres. Com a adição de trealose ao meio, aumenta a resistência destas células ao peróxido de hidrogênio. Os radicais livres provocam danos nos aminoácidos das proteínas intracelulares, sendo que o aumento da concentração de trealose previne esse dano (Benaroudj et. al., 2001).

g) Regulador do crescimento e desenvolvimento de plantas:

A trealose em plantas não é acumulada em níveis detectáveis, mas regulando a expressão de genes de *E. coli* para síntese de trealose (otsA e otsB), tão bem como a fusão desse gene nas plantas, para a manipulação da tolerância contra estresse abiótico em arroz, funciona como um compatível estabilizador de estruturas biológicas sob estresse abiótico. Comparado com plantas de arroz não transgênica, a planta transgênica exibe um crescimento mais prolongado, menor dano foto-oxidativo, e melhor balanceamento de mineral (Garg et al., 2002).

h) Componente estrutural da parede celular bacteriana:

A trealose é um componente básico dos glicolipídios da parede celular bacteriana (Lederer, 1976). Segundo Brennan e Nikaido (1995), a parede celular de *M. tuberculosis* apresenta um lipídio trealósico que é considerado um dos principais componentes tóxicos desta estrutura, além de ser responsável pela baixa permeabilidade da parede celular micobacteriana, o que confere considerável resistência a drogas a este organismo.

i) Osmotolerância:

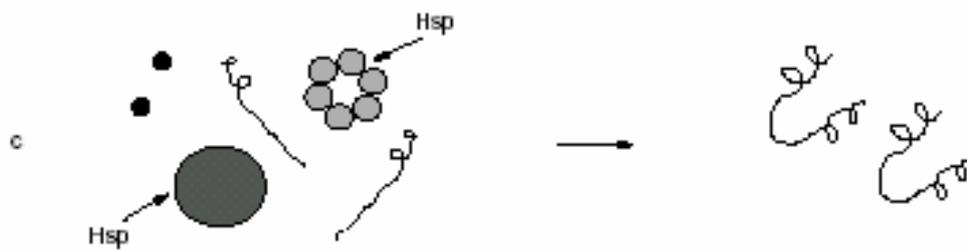
Mutantes de *S. cerevisiae* incapazes de produzir trealose (tps1 tps2 e tps1 hxk2) foram mais sensíveis ao estresse osmótico do que linhagens selvagens (Bonini et al., 2004). A presença de trealose aparentemente permitiu que células de leveduras produzissem mais glicerol em choque osmótico (Hazell et al., 1997).

1.4. Propriedades físico-químicas da trealose e sua aplicação in vitro

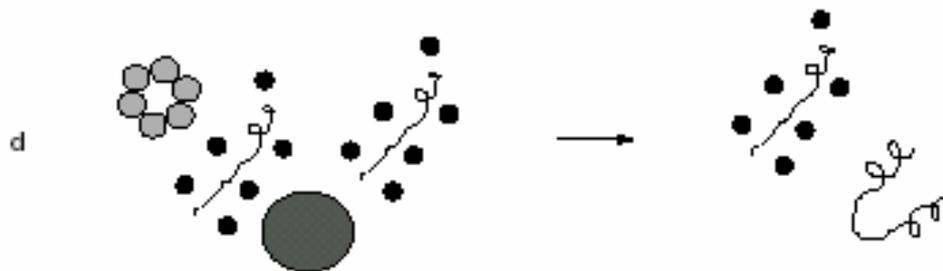
O papel protetor da trealose pode ser explicado por sua estrutura química. A diferença entre a trealose nesse aspecto e outros açúcares similares, pode ser atribuída a certas propriedades físico-químicas particulares, entre elas sua alta hidrofiliabilidade e estabilidade química, seu caráter não redutor e a ausência de pontes de hidrogênio intramoleculares (Roser, 1991).

A trealose desempenha papel protetor das biomoléculas devido a ocupar o lugar das moléculas de água presentes na superfície de macromoléculas, mantendo assim sua estrutura terciária. As pontes de hidrogênio formadas pelas hidroxilas da trealose promoveriam, desta forma, a estabilização de biomoléculas sob condições de estresse ambiental. Há ainda evidências que indicam que as hidroxilas da trealose interagem com fosfolípidos de membrana, mantendo sua configuração na ausência de água (McBride & Zusman, 1989).

De acordo com outros autores, as moléculas de trealose têm tendência a sofrer vitrificação ao invés de cristalização sob condições de dessecação. Assim, em presença de trealose as moléculas protéicas congelam na forma nativa, sem distorção de sua estrutura durante a desidratação (Franks et al., 1991; Colaço et al., 1992; Levine & Slade, 1992). A trealose contribui consideravelmente para a



HSP promovem o dobramento das proteínas desnaturadas



A trealose interfere no dobramento da proteína

Figura 5 - Em condições normais, as chaperoninas (HSP) fazem o dobramento das proteínas (C). A trealose, após o choque térmico, atrapalha as chaperoninas no dobramento das proteínas, é necessário que a trealose seja degradada pela trealase para ocorrer à ação das chaperoninas (D) (Singer & Lindquist, 1998).

1.5. Trealases

As trealases de origem fúngica podem ser agrupadas em dois grandes grupos: ácidas e neutras, considerando o pH ótimo das atividades e algumas propriedades regulatórias (Thevelein, 1984b).

As trealases neutras são enzimas citosólicas, afetadas por íons e ATP/ADP, não glicosiladas, reguladas através de fosforilação, mediada por proteínas quinases, envolvidas no catabolismo interno de trealose e podem ser chamadas de trealases reguladas (Thevelein, 1984b).

As trealases ácidas são glicoproteínas, de localização extracelular ou vacuolar, não reguladas por processos que envolvem a participação de AMPc, ATP, ADP, não afetadas por íons. Dessa forma, além de serem denominadas de ácidas, são tratadas na literatura como trealases não-reguladas, uma vez que não foi evidenciada a mudança de atividade durante períodos de mobilização de trealose (Thevelein, 1984b e 1988). As trealases ácidas são extremamente resistentes, quando comparadas com as neutras, considerando a termoestabilidade e labilidade ao pH. Outra diferença notável entre os dois tipos de trealases é quanto à afinidade pelo substrato, sendo que as ácidas geralmente exibem um K_m menor do que as neutras (Thevelein, 1984b).

As neutras são facilmente detectáveis em leveduras e de difícil detecção em fungos filamentosos, devido a sua labilidade nos extratos celulares (Bonini et. al., 1995). Dessa forma, durante muitos anos perdurou uma crença errônea de que em fungos filamentosos, a mobilização do “pool” endógeno de trealose estava relacionada com as ácidas, conseqüentemente a trealose interna deveria ser

lançada no espaço periplasmático para posterior hidrólise (Hecker & Sussman, 1973).

Estudos recentes com vários fungos demonstraram definitivamente que a trealase ácida tem como função a utilização de trealose externa como fonte de carbono enquanto que as trealases neutras são relacionadas com a mobilização de trealose endógena (Bonini et al., 1995; Stambuck et al., 1996; Nwaka et al., 1996; Jorge et al., 1997; d'Enfert et al., 1999).

Os fungos filamentosos termófilos apresentam ainda uma classe de trealase com características mistas de ácidas e neutras, sendo termorresistentes, ativadas por cálcio, manganês e cobalto, inibidas por ATP, ADP e não influenciadas por proteínas quinases (Zimmerman et al., 1990; Cardello et al., 1994; Kadowaki et al., 1996; Jorge et al., 1997; Almeida et al., 1999).

Os fungos filamentosos mesófilos produzem uma atividade ácida convencional. Recentemente foi descoberto que *Trichoderma reesei* QM9414 produz atividade trealásica, com pH ótimo presente em 4,0, inibido por ferro e alumínio e ativado por EDTA; enquanto que no pH 7,0 é ativada pelos metais e inibida por EDTA. Quando a proteína é analisada por cromatografia em DEAE-celulose, as duas atividades se sobrepõem, e durante o envelhecimento, resta somente a atividade em pH 4,0, sugerindo tratar-se de uma mesma enzima contendo dois sítios ou subsítios catalíticos (dados não publicados).

1.6. Ocorrência de trealase em fungos termófilos

Apesar do primeiro fungo verdadeiramente termófilo, *Mucor pusillus*, ter sido descrito em 1886 por Lindt (Cooney & Emerson, 1964), somente no fim da década de 80 é que a termofilia despertou interesse dos bioquímicos de microrganismos.

Entre os fungos, os termófilos representam uma pequeníssima parcela, exibindo a resistência ao calor como propriedade fisiológica distintiva (Cooney & Emerson, 1964). São considerados fungos termófilos os que crescem em temperatura acima de 45°C e morrem a 20°C ou menos. Entretanto, algumas vezes fica difícil diferenciar os fungos termófilos verdadeiros dos termotolerantes. Esses últimos são capazes de crescer em temperatura ligeiramente acima de 40°C, mas suportam a temperatura de 20°C.

Na enzimologia industrial a resistência ao calor é uma característica altamente desejável, preservando as enzimas contra a inativação térmica e facilitando o manuseio e transporte. Do ponto de vista acadêmico o estudo das propriedades bioquímicas das trealases de origem fúngica poderá ser útil para discernir os termófilos verdadeiros dos simples termotolerantes.

Entre os fungos termófilos, o gênero *Humicola* é relatado como boa fonte de trealase (Prasad & Maheswari, 1978). Em *Humicola grisea* var. *thermoidea* foram isoladas uma trealase ácida conidial (Zimmermann et. al., 1990) e uma citosólica, que embora exiba um pH ótimo de 5,5 e elevada resistência térmica, tem sua atividade estimulada por cálcio, manganês, cobalto e inibida por ATP ou ADP (Cardello et al., 1994). Em *Chaetomium thermophilum* e *Scytalidium thermophilum* foram isoladas duas atividades de trealase (intra e extracelular), de pH ótimo 6,0, alta termoestabilidade, também ativadas por cálcio e manganês e inibidas por ATP e

ADP, podendo ser agrupadas entre as trealases não regulatórias (Thevelein, 1984b); entretanto, como as trealases de *Humicola* (Zimmermann et al., 1990; Cardello et al., 1994), apresentam características de trealase neutra.

1.7. Organismo de estudo

O gênero *Malbranchea* é um fungo tão freqüente quanto qualquer um dos termófilos mais comuns e foi descrito por Saccardo por volta de 1882, que o denominou de *Malbranchea* em homenagem ao amigo Antony Malbranche, micologista de renome da época. O gênero pertence à classe Ascomycetae e as espécies mesofílicas podem ser patogênicas, mas as espécies termofílicas, como *M. pulchella* var. *sulfurea*, não exibem sinais de patogenicidade (Cooney & Emerson, 1964). Usualmente o fungo é encontrado em fragmento de vegetais em decomposição ou material que tenha celulose.

2. Objetivos

O objetivo primordial desse projeto é a caracterização bioquímica da (s) trealase (s) de *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*, visando a comparação com as demais já descritas para fungos termófilos e verificando ou não a sua classificação no grupo das trealases mistas. Os dados pretendidos podem favorecer decididamente a hipótese da existência de uma classe de trealase com propriedades mista e exclusiva dos fungos termófilos.

3. Material e Métodos

3.1. Organismos

O organismo usado no trabalho foi o: a) *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* cedido gentilmente pela “American Type Culture Collection”(ATCC), Rockville Maryland, USA.

3.2. Manutenção

O fungo *M. pulchella* foi mantido em meio denominado M6, o qual é composto de: extrato de levedura (0,4%); fosfato monoácido de potássio (0,1%); sulfato de magnésio (0,05%); amido (1,5%); ágar (2%); água de torneira (25%) e água destilada (75%). As culturas foram mantidas por 7 dias a 40°C e posteriormente armazenadas em geladeira e utilizadas dentro de um período de 30 dias.

3.3. Obtenção de conídios

Os conídios cultivados conforme descrito acima eram colhidos em suspensão aquosa acrescentando-se 10,0 ml de água destilada estéril as culturas estoque e raspando-se a superfície do ágar com um bastão de vidro estéril. Essa suspensão era então utilizada para inóculo em meio líquido, na proporção de 10^7 conídios para cada ml de meio.

3.4. Crescimento em meio líquido

O crescimento em meio líquido foi feito em meio denominado M6 (item 3.2.) em ausência de ágar, sob condição de agitação a 140 excursões por minutos a 40°C por um período de 96 horas.

3.5. Obtenção do micélio e extrato bruto micelial

Após cultivo por 96 horas nas condições descritas acima, a massa celular era separada do meio de cultivo por filtração a vácuo utilizando um funil de Buchner e papel de filtro Whatman nº 1. O meio de cultivo era guardado no gelo e a massa micelial era lavada com 2 volumes de água destilada. Em seguida essa massa era prensada entre folhas de papel de filtro para retirar o máximo possível de água embebida, e esse material era congelado por tempo indeterminado para posterior utilização.

Depois de congelada, a massa micelial era macerada com aproximadamente 2 volumes de areia (tratada com ácido nítrico concentrado), em almofariz de porcelana previamente gelado, até ruptura total das células. O macerado era ressuspenso em um volume de água até que se obtivesse uma solução não muito viscosa. A areia e restos celulares eram removidos por centrifugação em centrífuga refrigerada a 4°C (12.100g/10 min). O sobrenadante obtido era denominado extrato bruto micelial e utilizado para passos seguintes de purificação.

3.6. Determinação da atividade trealásica

3.6.1. Determinação da atividade enzimática pelo método de DNS

A atividade enzimática da trealase sobre a trealose era determinada quantitativamente através do método de DNS, conforme descrito por Miller (1959), no qual a reação era incubada à 55°C. A reação era constituída de 2,5 ml de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e/ou 5,5, 0,5 ml de trealose 10mg/ml e 2,0 ml de enzima. O volume final era de 5,0 ml. Nos tempos desejados, alíquotas de 1,0 ml foram retiradas e adicionadas a 1,0 ml de DNS [ácido 3,5 dinitrosalicílico (MILLER, 1959)] para interrupção da reação e detecção do açúcar redutor. Essa mistura foi aquecida em água fervente por 5 minutos, diluída em 10,0 ml de água destilada e a absorbância lida em espectrofotômetro a 540nm. A concentração de açúcar redutor liberado foi estimada através de uma curva padrão de glicose. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto, nas condições estabelecidas. A atividade específica é expressa em número de unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína total.

3.6.2. Determinação da atividade trealásica por acoplamento com Glicose Oxidase

Para quantificarmos a glicose residual resultante da degradação da trealose pela trealase, utilizamos o método de acoplamento por glicose oxidase descrito por Bergmeyer & Bernt (1974). A glicose foi obtida através de kits de análises clínicas (Labtest do Brasil®).

A mistura de reação foi constituída de tampão acetato 100 mM, pH 5,0 e/ou 5,5, trealose 1% como substrato, e enzima, incubada a 50 e/ou 55°C. Em tempos pré-determinados alíquotas da reação eram retiradas e aquecidas em água fervente por 5 minutos. As amostras coletadas, adicionadas de 0,5 ml do reagente glicose oxidase (Labtest do Brasil®) eram incubadas a 37°C por 30 minutos.

A leitura de absorbância foi realizada a 505 nm. Para esse método utilizou-se como unidade de atividade (U) a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de glicose por minuto, nas condições de ensaio.

3.7. Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Lowry et al., (1951), utilizando soroalbumina bovina como padrão.

3.8. Determinação da melhor fonte de carbono para produção da atividade trealásica

Eram preparados fracos de Erlenmeyer contendo 25,0 ml de meio M6 contendo 1% de diferentes fontes de carbono. Após o inóculo o cultivo era feito a 40°C por 96 horas sob agitação através de 110 rpm e/ou 140 excursões por minutos. Completando o período de cultivo, a massa celular era separada por filtração e o extrato bruto micelial obtido como descrito no item 3.5. A atividade trealásica foi verificada nos extratos intracelulares e também nos meios de cultivo, após diálise por 24 horas.

3.9. Determinação do melhor tempo de crescimento para a produção da atividade trealásica

Foram preparados frascos de Erlenmeyer contendo 25,0 ml de meio M6 para cultivo e obtenção do extrato bruto nos tempos 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Completando cada período de cultivo, o meio era filtrado, a massa micelial e o filtrado reservados sob congelamento para posterior determinação da atividade trealásica intra e extracelular.

3.10. Purificação da atividade trealásica

A atividade trealásica extracelular foi purificada a partir de 1 litro de meio de cultivo após crescimento por 96 horas sob agitação a 140 excursões por min. O extrato bruto foi aplicado em coluna de DEAE-Celulose (15 cm x 2,5 cm), equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, com um fluxo de aproximadamente 2 ml por minuto, à temperatura ambiente. Após aplicação da amostra na coluna, a mesma foi lavada com um volume de tampão igual a 7 vezes o valor da coluna, e em seguida eluída com 250 ml de um gradiente linear de 0-500 mM de NaCl em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. Alíquotas de 5,0 ml foram coletadas para leitura de absorbância em 280 nm e medida da atividade trealásica.

As frações de maior atividade trealásica foram reunidas, dialisadas e adicionadas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para uma concentração final de 1,5 M. Essa amostra, denominada “pool” DEAE-Celulose, foi então aplicada a uma coluna de Phenyl-Sepharose (5 cm x 2,5 cm), equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, contendo 1,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com um fluxo de aproximadamente 1 ml por minuto, à

temperatura ambiente. A seguir, a coluna foi lavada com um volume igual a 7 vezes o volume da coluna com o tampão de equilíbrio e em seguida foi aplicado um gradiente inverso (200 ml) de 0,5 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frações de 3,0 ml por tubo foram coletadas para leitura de absorvância em 280 nm e medida a atividade trealásica.

As frações de maior atividade trealásica foram reunidas, dialisada e equilibradas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Essa amostra, denominada “pool” de Phenyl-Sepharose, foi então aplicada a uma coluna de DEAE-Celulose (9 cm x 1,5 cm), equilibrada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, com um fluxo de aproximadamente 2 ml por minuto, a temperatura ambiente. A seguir, a coluna foi lavada com um volume de 7 vezes o volume da coluna com o tampão de equilíbrio, e em seguida eluída com 170 ml de um gradiente linear de 0-500 mM de NaCl em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Alíquotas de 5,0 ml foram coletadas para leitura em absorvância em 280 nm e medida a atividade trealásica.

3.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE)

A eletroforese em condições não desnaturante foi realizada em gel de poliacrilamida conforme a metodologia descrita por DAVIS (1964), para proteínas ácidas. Os géis a 6% tinham uma espessura de 0,75 mm e eram polimerizadas entre placas de vidro ou polimerizados em tubos de aproximadamente 0,6 cm X 7 cm. A amostra foi diluída na proporção de 1:1 em tampão Tris 0,025 mM, pH 6,8, contendo 0,002% de azul de bromofenol e 5% de glicerol. As corridas eletroforéticas eram realizadas em tampão constituído de Tris-HCl 50 mM e glicina 36 mM, pH 8,9,

durante 1-2 horas, a temperatura ambiente sob corrente de 30 mA e 120 V para gel em placa ou 4mA por tubo.

3.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A massa molecular da trealase foi estimada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As amostras a serem analisadas eram diluídas na proporção 1:1 em tampão de amostra (glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,002% e Tris 0,12 M, pH 6,75) na presença de 10% de β -mercaptoetanol e aquecidas durante 5 minutos em água fervente imediatamente antes da aplicação. As eletroforeses eram realizadas a temperatura ambiente na presença do tampão Tris 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1%, pH 8,3 sob corrente de 30 mA e 120 V para gel em placa ou corrente de 4 mA para gel em tubo.

3.13. Detecção de proteínas através do método de coloração por prata

A revelação dos géis em condição desnaturante e não desnaturante foi feita com nitrato de prata (Blum et al., 1987). O gel foi fixado por no mínimo 1 hora em solução contendo metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e 0,05% (v/v) de formoldeído a 37%. Posteriormente o gel foi lavado duas vezes com etanol 50% e uma vez com etanol 35% (v/v), por 20 minutos, cada banho. Após lavagem este foi submetido a um pré-tratamento com tiosulfato de sódio pentahidratado 0,02% (p/v) por um minuto e, imediatamente enxaguado 3 vezes com excesso de água destilada por 20 segundos cada. O gel foi então colocado por 20 minutos em solução

contendo nitrato de prata 0,2% (p/v) e 0,075% (v/v) de formoldeído a 37%. Posteriormente este gel foi lavado 2 vezes com excesso de água destilada por 20 segundos cada banho e revelado em solução de carbonato de sódio 6% (p/v), tiosulfato de sódio pentahidratado 0,0004% (p/v) e 0,05% (v/v) de formoldeído a 37%. A revelação foi interrompida por adição de metanol 50% (v/v) e ácido acético 12% (v/v). O gel foi mantido, no mínimo por 20 minutos em metanol 50% (v/v). A seguir, o gel foi imerso em solução dessecante, composto por metanol 65% (v/v) e glicerol 0,5% (v/v) por 20 minutos. Posteriormente colocado entre folhas de papel celofane e deixado a temperatura ambiente para sua secagem.

3.14. Detecção de proteínas através do método de coloração por Coomassie Blue

A revelação dos géis em condição des

individualmente. Para calibração da coluna foram utilizados os seguintes padrões de massa molecular: tioglobulina (670 kDa), imunoglobulina (158 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e mioglobulina (17 kDa). As amostras foram previamente dissolvidas em 0,02 ml do tampão de eluição e aplicadas separadamente na coluna por injeção manual.

3.16. Determinação dos carboidratos neutros das trealases intra e extracelular purificadas

O conteúdo de carboidratos das trealases purificadas intra e extracelular foi estimado através da metodologia do fenol-sulfúrico de Dubbois et al. (1956), utilizando-se manose como padrão. Foram utilizados aproximadamente 8 mg de proteína. Em seguida, 10 µl de fenol 80% foram adicionados e, logo após, 1,0 ml de ácido sulfúrico concentrado. Essa mistura foi deixada em repouso por 10 minutos em gelo. Após esse período, a reação foi colocada em banho Maria em temperatura de 30°C, por um período de 15 minutos, em seguida foi feita a leitura da absorbância em 490 nm. Procedimento idêntico foi conduzido com solução de padrão manose.

3.17. Determinação do ponto isoelétrico para as trealases de *M. pulchella*

Os pontos isoelétricos das trealases purificadas foram determinados em géis de poliacrilamida de disco (0,5cm X 12cm) de acordo com o método descrito por O'Farrel et al (1977) usando anfólito "Pharmalite"® com uma faixa de pH entre 2,5 a 5,0 e a concentração dos géis era de 5%. Foram preparados dois géis, sendo que em um deles era aplicada a amostra de enzima purificada e em outro tubo era aplicada água no lugar da enzima (controle). Após a corrida por 6 horas a 500V, o

gel controle era fatiado em porções de 0,5cm, e cada porção era imersa em 2,0 ml de solução de 25mM de KCl, por uma noite. Para determinação do gradiente de pH formado, era feita a leitura do pH do anfólito eluído de cada porção do gel controle em um potenciômetro.

Após a corrida eletroforética os géis contendo as enzimas purificadas foram fatiados em fragmentos de 0,5 cm. Posteriormente, os fragmentos foram incubados a 55°C com tampão acetato 100mM pH 5,0 para enzima extracelular e pH 5,5 para enzima intracelular juntamente com trealose 10 mg/ml. Após o período de incubação de 2 hs, a reação era determinada através de glicose oxidase e a absorbância era lida em 505 nm (item 3.6.2).

4. Resultados

4.1. Determinação das condições ótimas de crescimento para produção da trealase de Malbranchea pulchella

Os estudos iniciais foram conduzidos com o objetivo de estabelecer o melhor meio de cultivo para a produção da atividade trealásica. Foram testadas diversas fontes de carbono adicionadas ao meio de cultivo. A melhor composição para a produção da atividade trealásica foi obtida quando o meio de cultivo foi suplementado com glicose 1% como fonte de carbono para a enzima extracelular (tabela 1) e maltose 1% como fonte de carbono para a enzima intracelular (tabela 2).

Na tentativa de melhorarmos a atividade trealásica, decidimos testar o crescimento do fungo em incubadora que movimentava os frascos por excursão, no qual obtivemos a melhor atividade específica utilizando amido para produção de trealase extracelular (tabela 3). Para a produção da enzima trealase intracelular, a atividade específica mais alta foi obtida quando se utilizou maltose como fonte de carbono, seguida de amido (tabela 4).

Tabela 1 – Determinação da melhor fonte de carbono para produção da trealase extracelular de *M. pulchella*

Fonte Carbono	Unidades Totais	Proteínas Totais	Ativ. Específica
SFC	0,460	4,663	0,099
Glicose 1%	1,995	9,638	0,207
Trealose 1%	0,955	5,008	0,191
Maltose 1%	1,438	10,34	0,139
Amido 1%	1,348	7,730	0,174
Sacarose 1%	1,140	5,635	0,202
Rafinose 1%	0,253	4,398	0,057
Xilose 1%	1,558	12,86	0,121
Arabinose 1%	1,525	12,69	0,120
Glicerol 1%	1,490	12,84	0,116
Frutose 1%	1,688	19,35	0,087
Avicel 1%	0,450	4,895	0,092
Manose 1%	1,765	10,46	0,169
Manitol 1%	0,845	7,680	0,110

Condições: O fungo foi crescido em 25 ml de meio M6 e suplementado com as fontes de carbono acima, sob agitação constante de 110 rpm à 40°C. Após 96 horas, as culturas foram interrompidas e a atividade de trealase extracelular foi medida.

Tabela 2 – Determinação da melhor fonte de carbono para produção da trealase intracelular de *M. pulchella*

Fonte Carbono	Unidades Totais	Proteínas Totais	Ativ. Específica
SFC	ND	ND	ND
Glicose 1%	0,895	3,816	0,235
Trealose 1%	0,145	1,968	0,074
Maltose 1%	1,513	4,248	0,356
Amido 1%	1,145	4,766	0,240
Sacarose 1%	0,342	2,072	0,165
Rafinose 1%	ND	0,431	ND
Xilose 1%	1,105	3,816	0,290
Arabinose 1%	ND	0,518	ND
Glicerol 1%	1,105	4,024	0,275
Frutose 1%	0,276	1,571	0,176
Avicel 1%	ND	0,414	ND
Manose 1%	0,750	3,091	0,243
Manitol 1%	0,070	1,088	0,064

Condições

Tabela 3 – Determinação da melhor fonte de carbono para produção da trealase extracelular de *M. pulchella* em incubadora que movimentava os frascos por excursão.

Fonte Carbono	Unidades Totais	Proteínas Totais	Ativ. Específica
Glicose 1%	16,00	9,50	1,68
Trealose 1%	12,75	9,75	1,31
Maltose 1%	21,00	15,25	1,38
Amido 1%	18,25	6,50	2,81
Sacarose 1%	7,75	7,25	1,07
Xilose 1%	16,50	17,25	0,96
Arabinose 1%	15,75	12,25	1,29
Glicerol 1%	10,50	5,50	1,91
Frutose 1%	14,00	10,50	1,33
Manose 1%	14,75	10,25	1,44

Condições: O fungo foi crescido em 25 ml de meio M6 e suplementado com as fontes de carbono acima, sob agitação constante de 140 excursões por minutos à 40°C. Após 96 horas, as culturas foram interrompidas e a atividade de trealase extracelular foi medida.

Tabela 4 – Determinação da melhor fonte de carbono para produção da trealase intracelular de *M. pulchella* em incubadora que movimentava os frascos por excursão.

Fonte Carbono	Unidades Totais	Proteínas Totais	Ativ. Específica
Glicose 1%	4,60	6,84	0,67
Trealose 1%	6,04	7,04	0,86
Maltose 1%	10,80	3,00	3,60
Amido 1%	13,24	3,80	3,48
Sacarose 1%	1,04	0,52	2,00
Xilose 1%	3,20	3,92	0,82
Arabinose 1%	1,48	1,28	1,16
Glicerol 1%	4,36	3,00	1,45
Frutose 1%	2,04	2,24	0,91
Manose 1%	6,92	2,20	3,15

Condições: O fungo foi crescido em 25 ml de meio M6 e suplementado com as fontes de carbono acima, sob agitação constante de 140 excursões por minutos à 40°C. Após 96 horas, as culturas foram interrompidas e a atividade de trealase intracelular foi medida.

4.2. Determinação do tempo de cultivo do meio

O próximo passo foi determinar o melhor período de crescimento para a produção da atividade das trealases intra e extracelular. A figura 6 demonstra os níveis de atividade específica para trealase extracelular em culturas crescidas em meio M6 com amido 1%, sob agitação constante por um período de até 144 horas. E a figura 7 demonstra os níveis de atividade específica para a trealase intracelular. Para as trealases foi possível observar melhor nível e atividade específica quando as culturas apresentaram 96 horas de crescimento.

4.3. Determinação da temperatura e pH ótimo para a atividade trealásica

Para a determinação da temperatura ótima, as trealases de *M. pulchella* foram incubadas com seu substrato, variando a temperatura de 35 à 75°C (figura 8). Os resultados obtidos mostram que as duas enzimas funcionam bem entre 50 e 55°C, sendo que 55°C foi à temperatura escolhida para a dosagem das duas enzimas.

Foi estudado o efeito da variação de pH nos níveis da atividade trealásica utilizando-se os seguintes tampões: tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,0 – 5,0); MES 100 mM (pH 5,5 – 7,5) e Tris-HCl 100 mM (7,5 – 9,0). O pH ótimo aparente é 5,5 para enzima intracelular (figura 9), e 5,0-5,5 para enzima extracelular (figura 10).

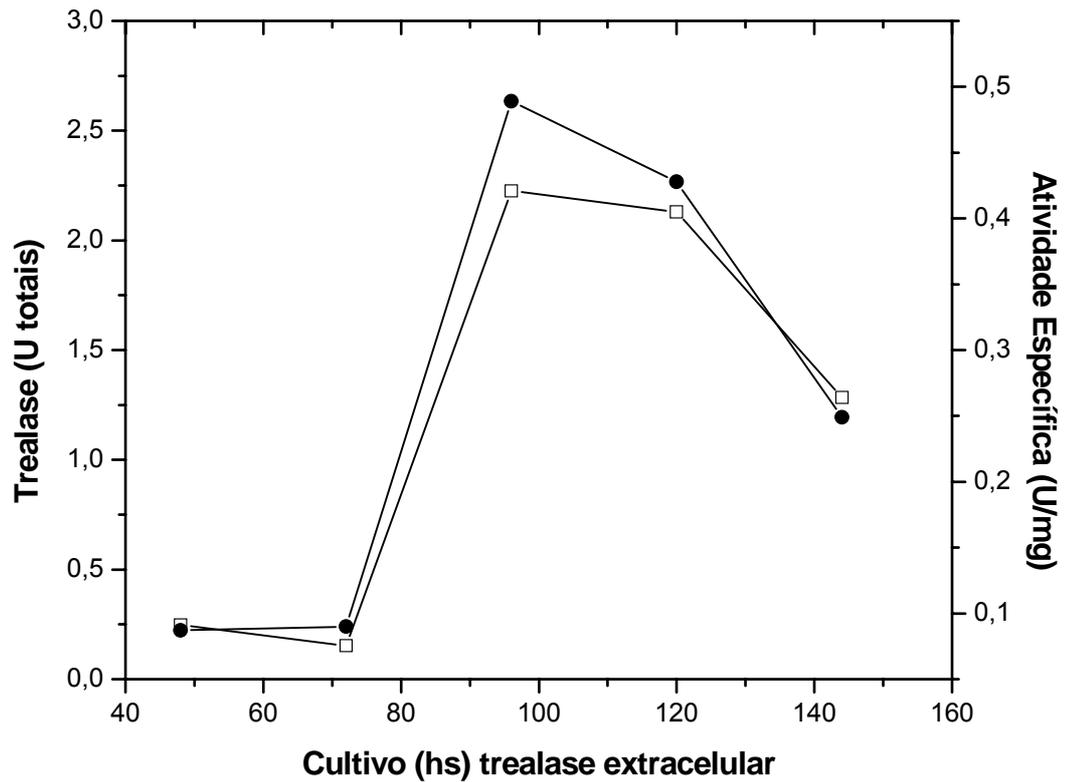


Figura 6 – Determinação do melhor tempo de cultivo para produção da trealase extracelular de *M. pulchella*. O fungo foi cultivado em meio M6, à temperatura de 40°C, sob agitação a 110 rpm. Símbolos: Unidades totais (□); Atividade Específica (●).

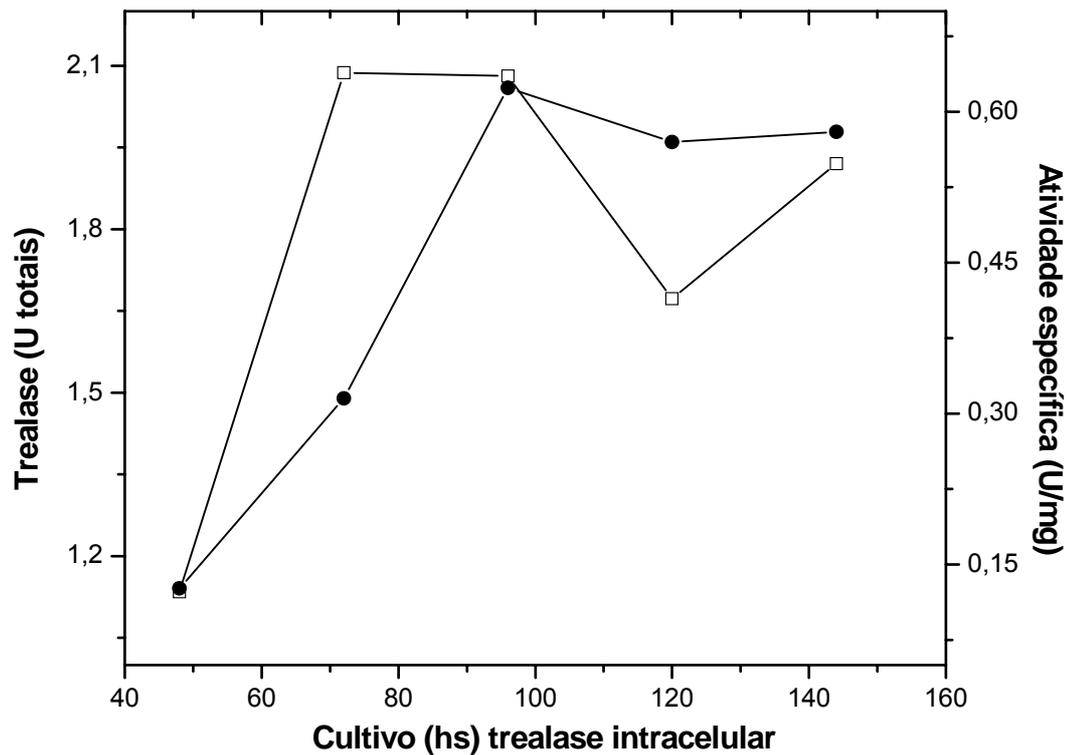


Figura 7 – Determinação do melhor tempo de cultivo para produção da trealase intracelular de *M. pulchella*. O fungo foi cultivado em meio M6, à temperatura de 40°C, sob agitação a 110 rpm. Símbolos: Unidades totais (□); Atividade Específica (●).

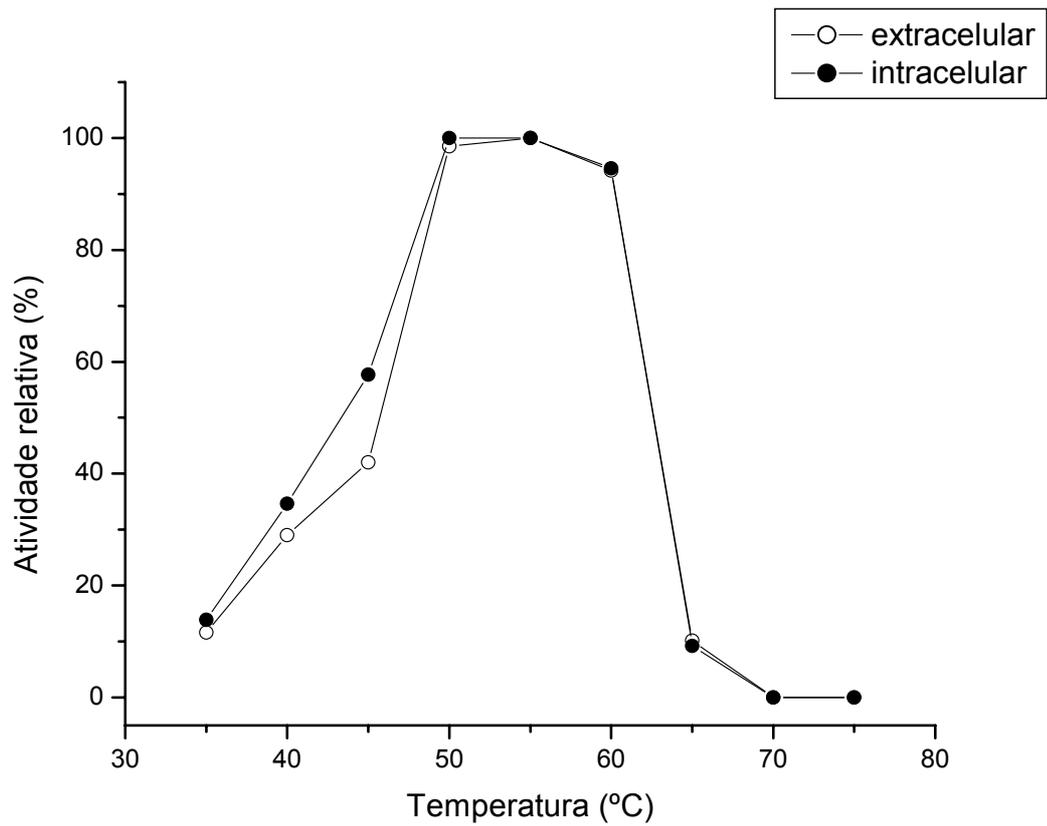


Figura 8 – Determinação da melhor temperatura para atividade das trealases de *M. pulchella*. O fungo foi cultivado em meio M6, por um período de 96 horas, à temperatura de 40°C, sob agitação a 110 rpm.

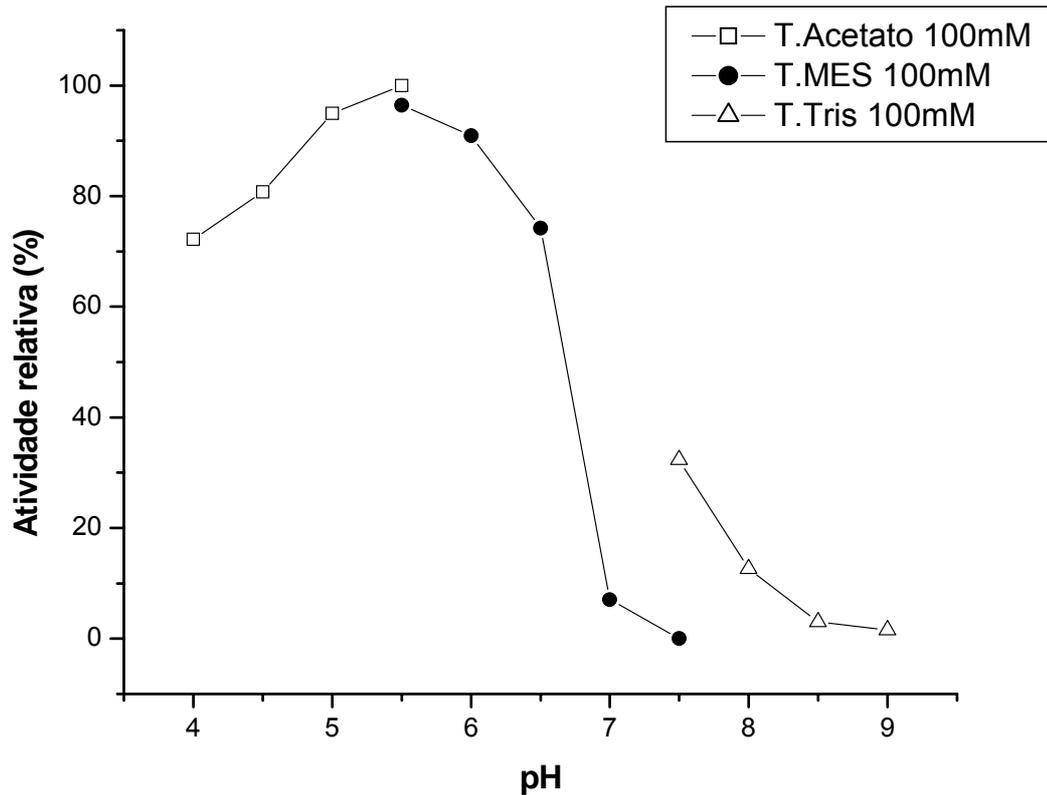


Figura 9 – Determinação do pH ótimo para atividade da trealase intracelular de *M. pulchella*. O fungo foi cultivado em meio M6, por um período de 96 horas, à temperatura de 40°C, sob agitação a 110 rpm. A reação enzimática foi realizada conforme descrita no item 3.6.1.

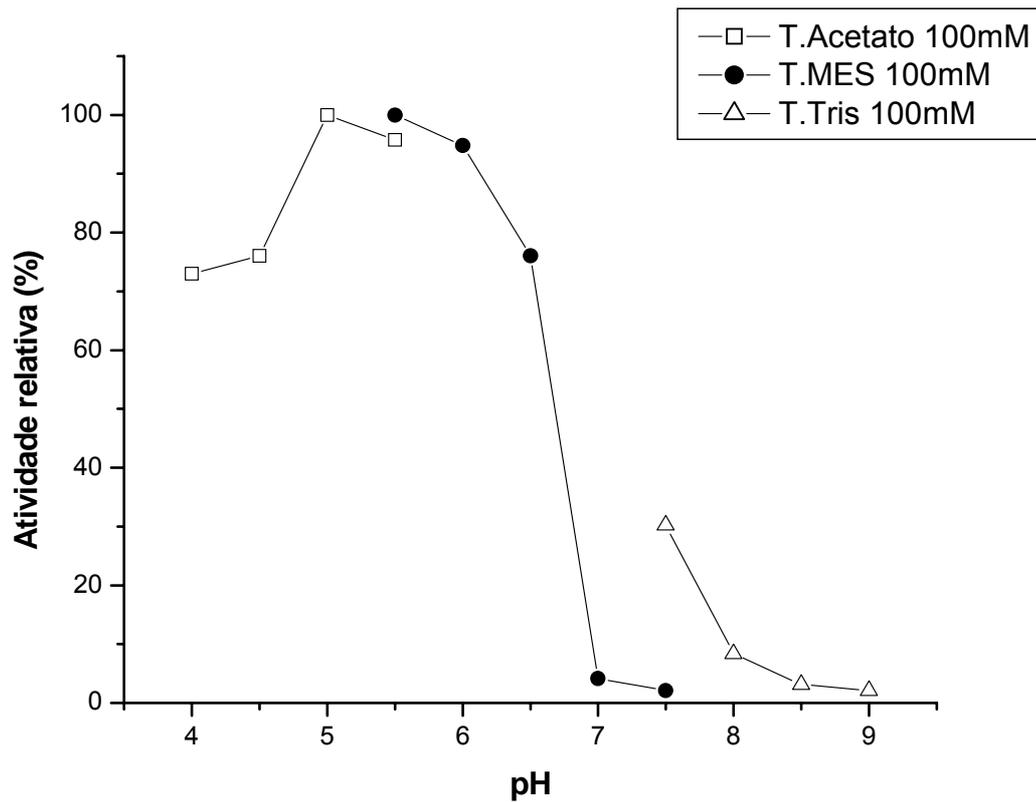


Figura 10 – Determinação do pH ótimo para a reação da atividade de trealase extracelular de *M. pulchella*. O fungo foi cultivado em meio M6, por um período de 96 horas, à temperatura de 40°C, sob agitação a 110 rpm. A reação enzimática foi realizada conforme descrita no item 3.6.1.

4.4. Efeito da concentração de extrato de levedura na produção de trealase em M. pulchella

Foi analisada a influência de extrato de levedura no meio de cultura M6, com diferentes concentrações de extrato de levedura. Para uma boa produção da enzima trealase pelo fungo termófilo *M. pulchella*, é necessário uma concentração de 0,2% e 0,4% de extrato de levedura para trealase extracelular e intracelular, respectivamente (figura 11).

4.5. Efeito do cálcio na atividade trealásica de M. pulchella

Foi estudado o efeito do cálcio sobre a atividade das trealases de *M. pulchella*, determinando-se as atividades relativas, em condições de pH e temperaturas ótimas. Na figura 12, os dados sugerem que a trealase extracelular de *M. pulchella* é influenciada pelo íon, quando em presença de 2 mM CaCl₂. Nesta concentração o íon pode ativar cerca de 1,5 vez a atividade da trealase extracelular de *M. pulchella*. Entretanto, podemos notar que a trealase intracelular de *M. pulchella* não é influenciada por cálcio, mesmo variando a sua concentração (figura 13).

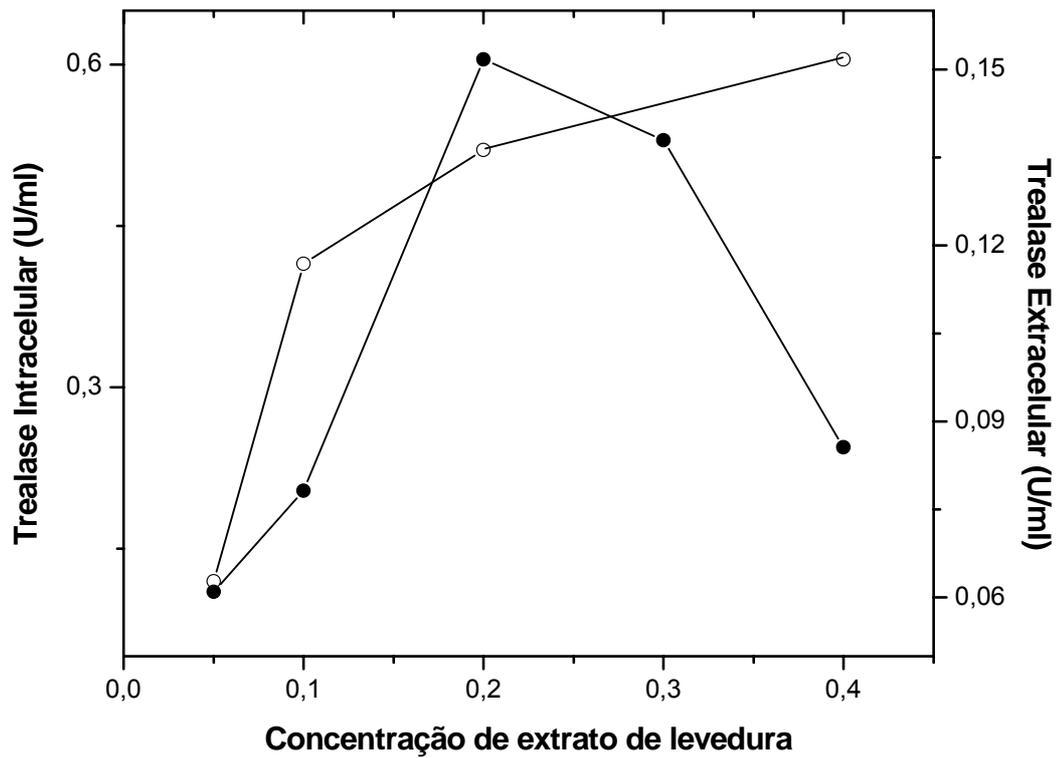


Figura 11 – Determinação da melhor concentração de extrato de levedura para produção de trealases em *M. pulchella*. O fungo foi cultivado em meio M6, por um período de 96 horas, à temperatura de 40°C, sob agitação a 110 rpm. Símbolos: Trealase intracelular (○); trealase extracelular (●).

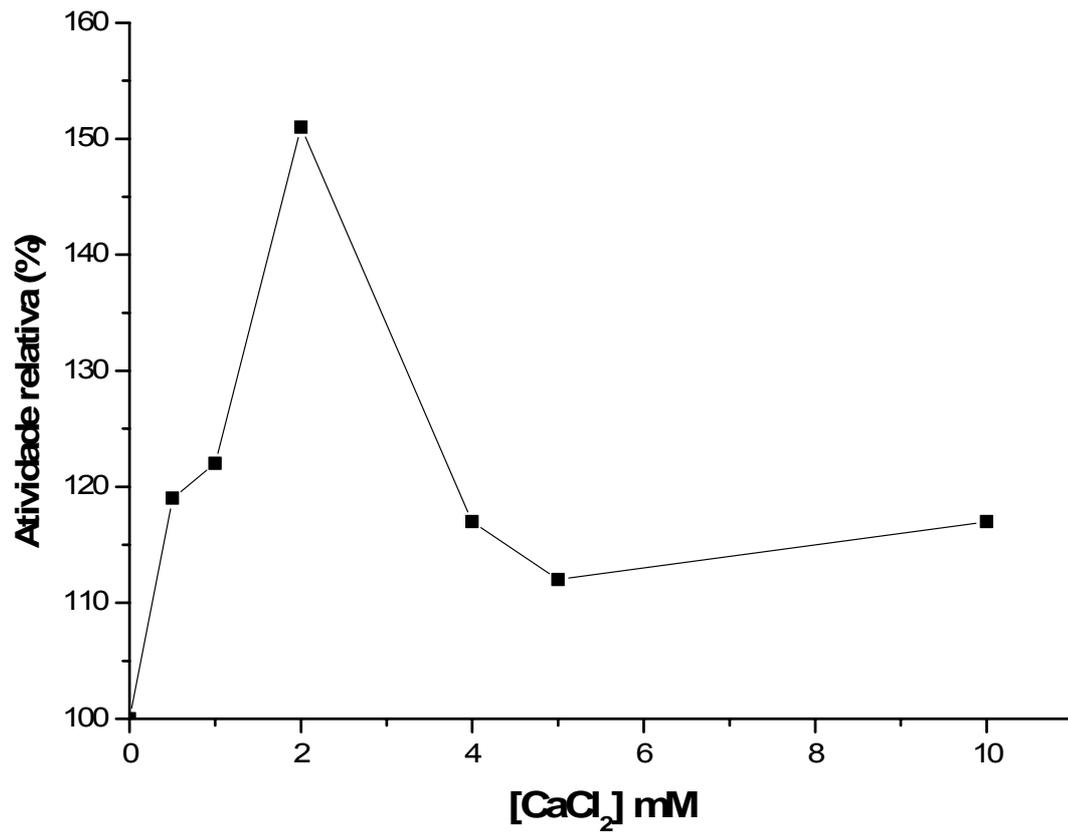


Figura 12 – Determinação do efeito de cálcio na atividade da trealase extracelular de *M. pulchella*.

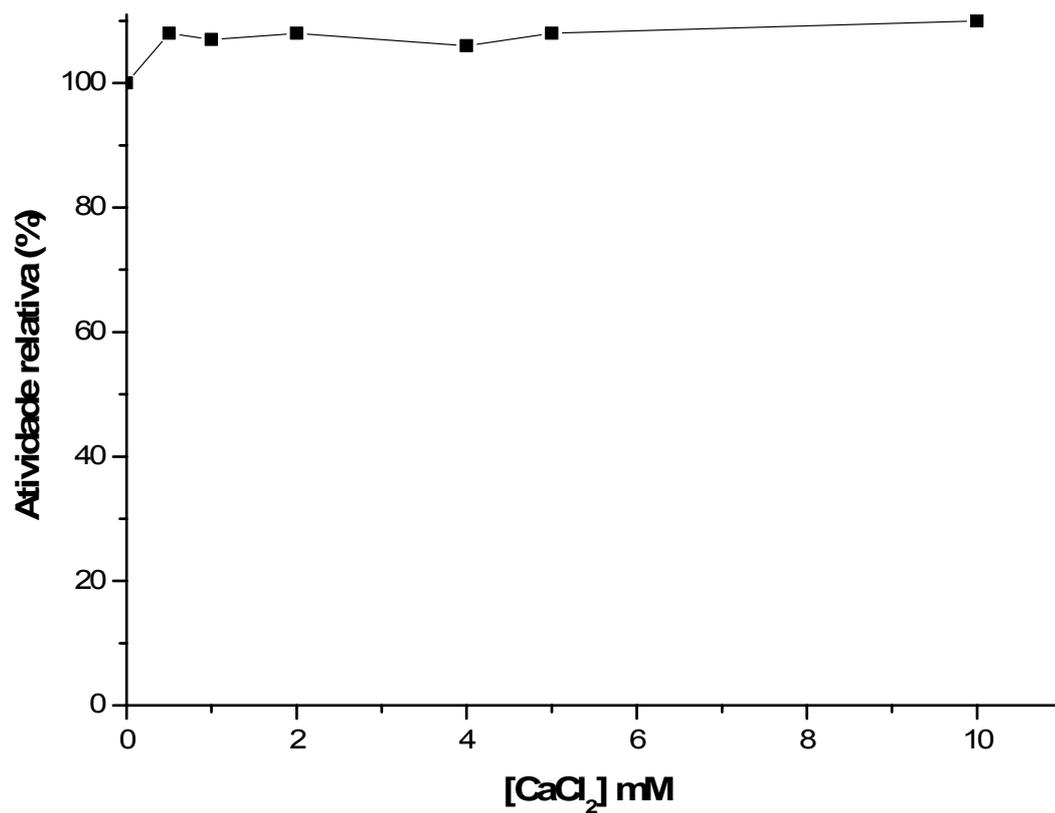


Figura 13 – Determinação do efeito do cálcio na atividade da trealase intracelular bruta de *M. pulchella*.

4.6 Determinação da concentração de açúcar redutor no meio de cultura

Para testar a mobilização do açúcar como fonte de carbono no meio de cultura, foi feito um experimento com 4 variantes, sendo amido com crescimento sob agitação (figura 14), maltose com crescimento sob agitação (figura 15), amido com crescimento estacionário (figura 16) e maltose com crescimento estacionário (figura 17), no qual o meio de cultura era suplementado com as fontes de carbono acima e incubados a 40°C com o fungo *M. pulchella*, pelo período de 0 a 264 horas para crescimento agitado e de 0 a 360 horas para crescimento estacionário. A partir do tempo 0, de 24 em 24 horas, alíquotas eram retiradas e a presença de açúcares redutores era determinada por DNS.

O objetivo deste experimento foi verificar o que acontece com a concentração de açúcar redutor no meio de cultivo e comparar com o momento que aumenta a atividade da trealase. Como podemos observar na figura 14, no momento em que a quantidade de açúcar redutor diminui, a produção da enzima aumenta. Em cultura sob a agitação constante adicionada com maltose, verificamos que os níveis de açúcar redutor a partir de 72 horas estão baixos (figura 15). Entretanto, sob crescimentos estacionário, podemos notar que os níveis de açúcar redutor começam cair a partir de 192 horas. Estes dados foram mostrados nas figuras 16 e 17.

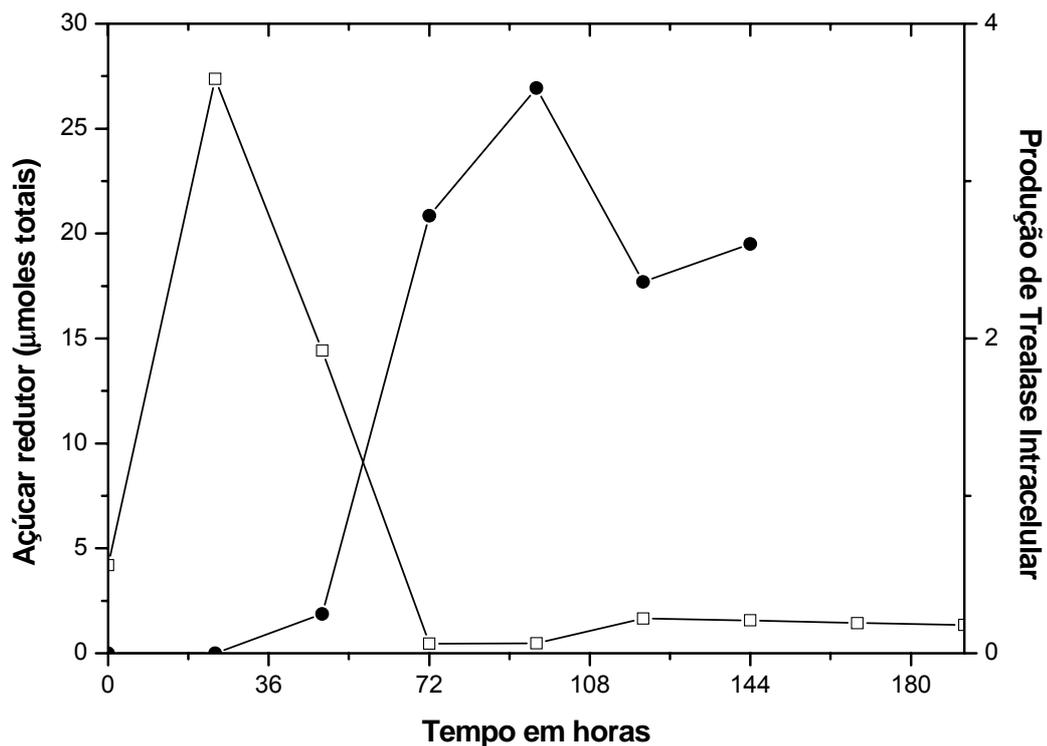


Figura 14 – Determinação do teor de açúcar redutor no meio de cultura, utilizando amido como fonte de carbono no meio de cultura. O fungo foi cultivado em meio M6, por um período de 0 a 264 horas, à temperatura de 40°C, sob agitação a 110 rpm. Símbolos: Teor de açúcar redutor (\square); Produção de trealase intracelular – U Totais (\bullet).

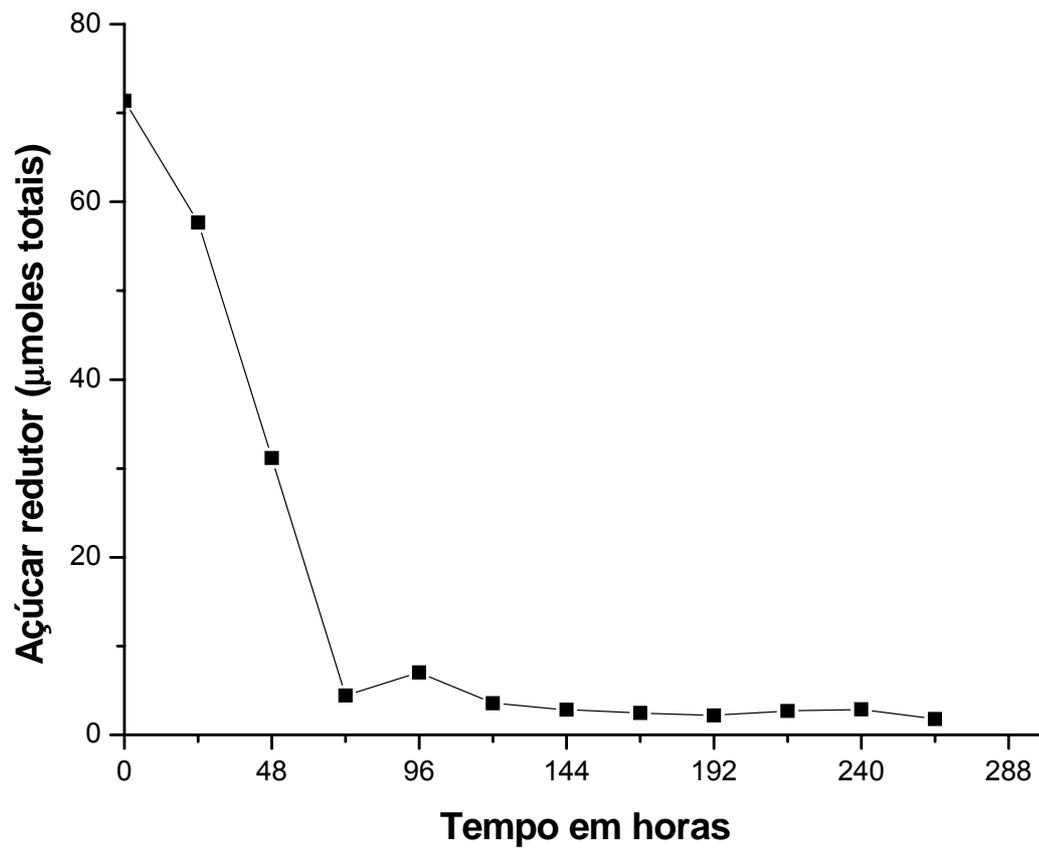


Figura 15 – Determinação da quantidade de açúcar redutor no meio de cultura, utilizando maltose como fonte de carbono. O fungo foi cultivado em meio M6, por um período de 0 a 264 horas, à temperatura de 40°C, sob agitação a 110 rpm.

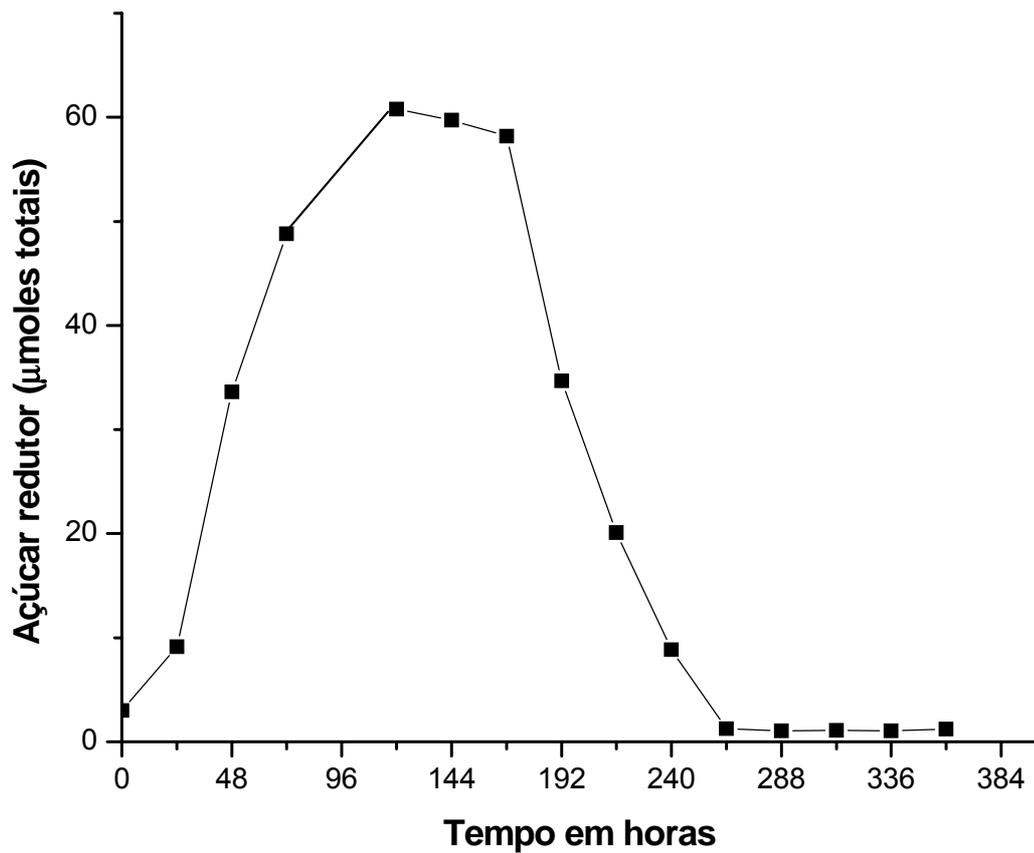


Figura 16 – Determinação da quantidade de açúcar redutor no meio de cultura, utilizando amido como fonte de carbono no meio de cultura. O fungo foi cultivado em meio M6, por um período de 0 a 360 horas, à temperatura de 40°C, sob condição estacionária. Dados referentes à média de dois experimentos.

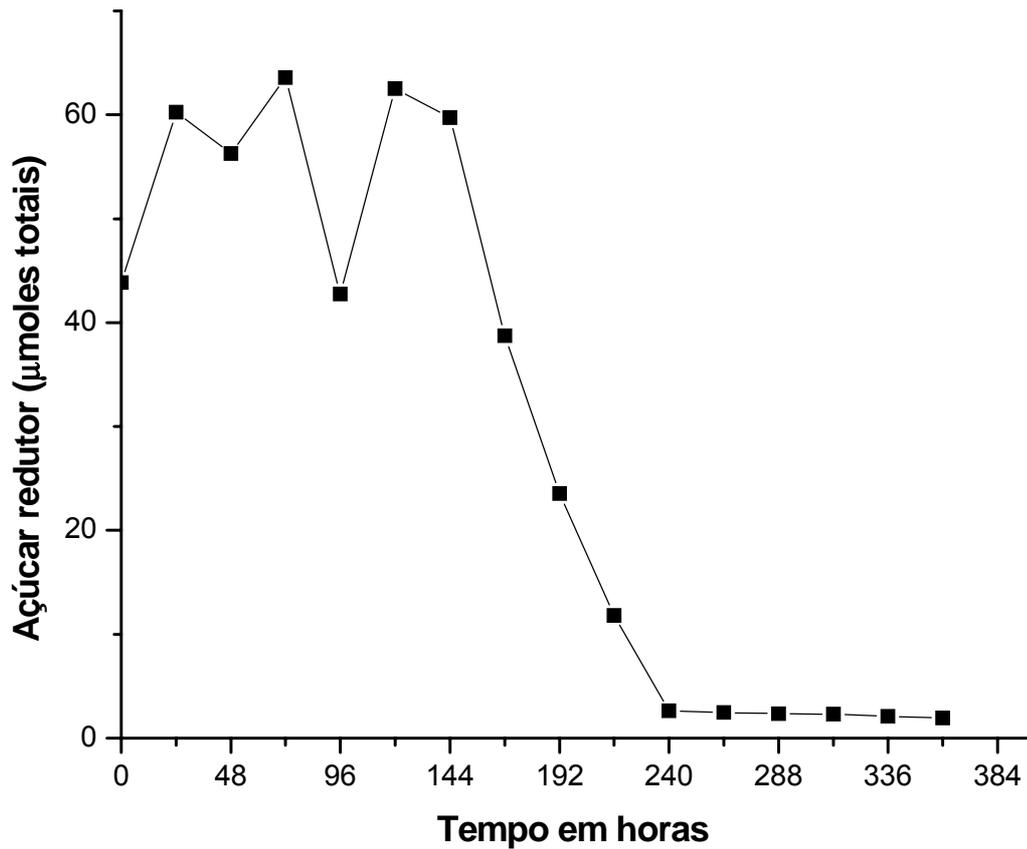


Figura 17 – Determinação da quantidade de açúcar redutor no meio de cultura, utilizando maltose como fonte de carbono. O fungo foi cultivado em meio M6, por um período de 0 a 360 horas, à temperatura de 40°C, sob condição estacionária. Dados referentes à média de dois experimentos.

4.7. Estabilidade térmica da trealase de M. pulchella em extrato bruto

Com objetivo de estudarmos a estabilidade térmica das enzimas em extrato bruto, foi realizada a incubação das enzimas nas temperaturas de 35 a 60°C. Podemos observar que a meia vida da trealase extracelular foi de 37 minutos a 60°C (figura 18). O tempo de meia vida da enzima intracelular foi de 10 minutos a 60°C (figura 19).

Esses resultados sugerem que a trealase extracelular é altamente estável. Em 65°C, as enzimas mostraram completa desnaturação nos primeiros 10 minutos de incubação (dados não mostrados).

4.8. Purificação das trealases de M. pulchella

4.8.1. Purificação da trealase extracelular

Transcorridos o período de padronização da produção das trealases de *M. pulchella*, foram iniciados os processos de purificação da atividade trealásica. A enzima foi purificada por um processo relativamente rápido que incluiu três passos de cromatografia em coluna (tabela 5).

Em pH 7,0 a enzima se liga a resina DEAE-Celulose, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, cujo o pH era 7,0. A enzima é eluída com o aumento da força iônica, para uma concentração de NaCl de aproximadamente 300 mM (figura 20). A amostra foi dialisada contra água por 24 horas à 4°C, para retirada de todo o sal proveniente do gradiente. A trealase após ter sido aplicada na coluna de DEAE-Celulose foi semi purificada com um fator de purificação de 3,3 vezes (tabela 5).

Após esse processo, o “pool” de DEAE-Celulose foi aplicado em uma coluna de interação hidrofóbica.

Assim, o passo seguinte da purificação, foi uma cromatografia em coluna de Phenyl-Sepharose, onde a coluna e a amostra foram equilibradas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, e sulfato de amônio na concentração de 1,5 M. A coluna foi lavada com gradiente reverso (0,5 à 0 M) e a enzima começou a ser eluída com cerca de 250 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A cromatografia eliminou cerca de 80% das proteínas contaminantes (figura 21). Após o procedimento de cromatografia, a amostra foi dialisada contra água por 48 horas a 4°C e a amostra foi purificada cerca de 4,7 vezes (tabela 5). Em seguida, a porção Phenyl-Sepharose foi aplicada em uma coluna de troca iônica, agora com pH 5,0.

A resina utilizada para troca iônica foi novamente a DEAE-Celulose, e a coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. A atividade trealásica foi eluída com o aumento da força iônica, para uma concentração de NaCl de aproximadamente de 110 mM (figura 22), e a amostra foi dialisada contra água por 24 horas à 4°C. A introdução de uma cromatografia em DEAE-Celulose a pH 5,0 eliminou uma grande parte dos contaminantes protéicos que co-purificaram na coluna anterior (Phenyl-Sepharose). No final a trealase foi purificada 34 vezes (tabela 5).

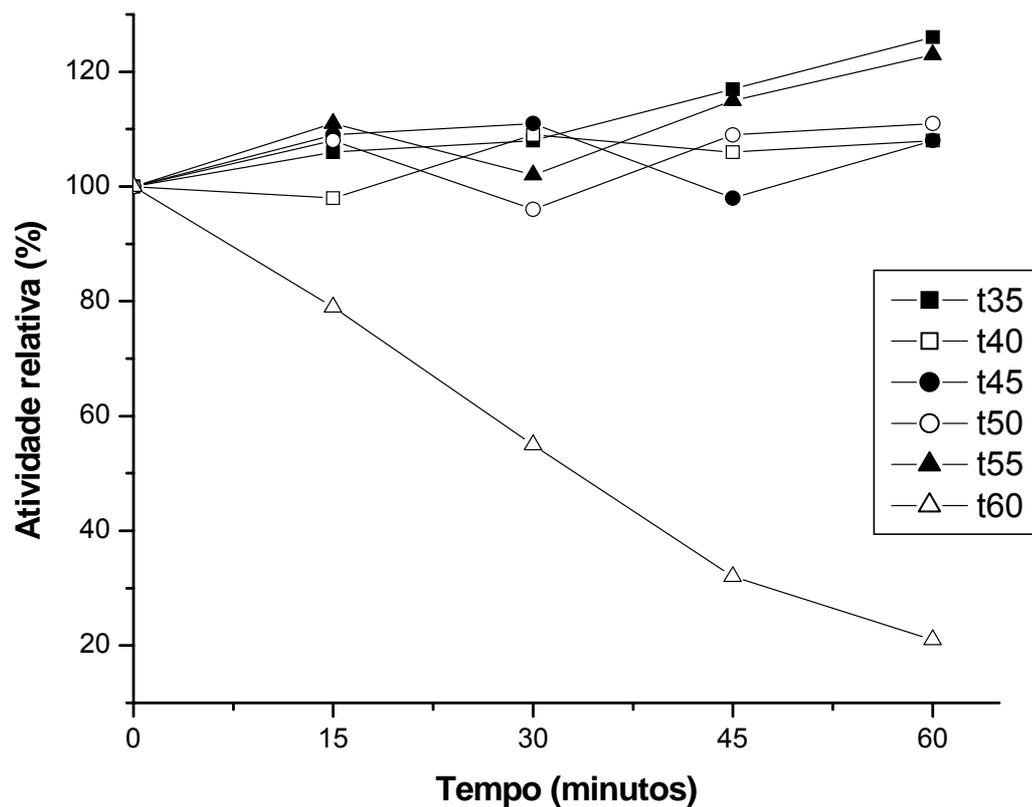


Figura 18 – Estabilidade térmica da trealase extracelular em extrato bruto de *M. pulchella*. A enzima era incubada a 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C, encontrando-se em extrato bruto e nos tempos indicados de 0 a 60 minutos, alíquotas foram retiradas para as dosagens de atividade residual. A reação foi determinada por DNS (item 3.6.1).

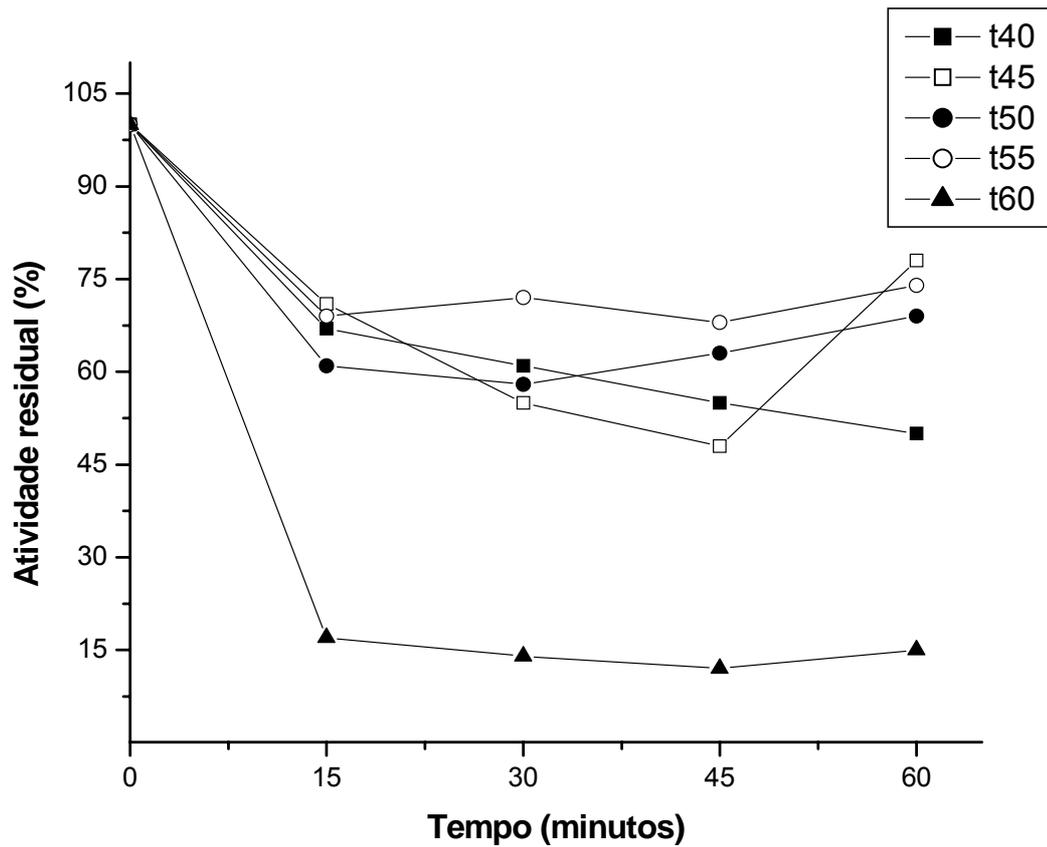


Figura 19 – Estabilidade térmica da trealase intracelular em extrato bruto de *M. pulchella*. A enzima foi incubada a 40, 45, 50, 55 e 60°C, encontrando-se em extrato bruto e nos tempos indicados de 0 a 60 minutos, alíquotas foram retiradas para as dosagens enzimáticas. A reação foi determinada pó DNS (item 3.6.1).

Tabela 5 – Purificação da trealase extracelular de *M. pulchella*

Etapa	Volume total (ml)	Proteínas totais (mg)	Unidades ^a totais (U totais)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação X
Extrato Bruto	765	313,65	787,95	2,51	100	1
DEAE – Celulose pH 7,0	58	14,50	118,90	8,2	15	3,3
Phenyl Sepharose pH 7,0	33	1,65	19,47	11,8	2	4,7
DEAE – Celulose pH 5,0	29	0,58	49,01	84,50	6	33,7

^aUma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de glicose por minuto nas condições de ensaio estabelecidas.

Condições: O fungo foi crescido em meio líquido M6, por um período de 96 horas à 40°C, sob agitação constante de 140 excursões por minutos.

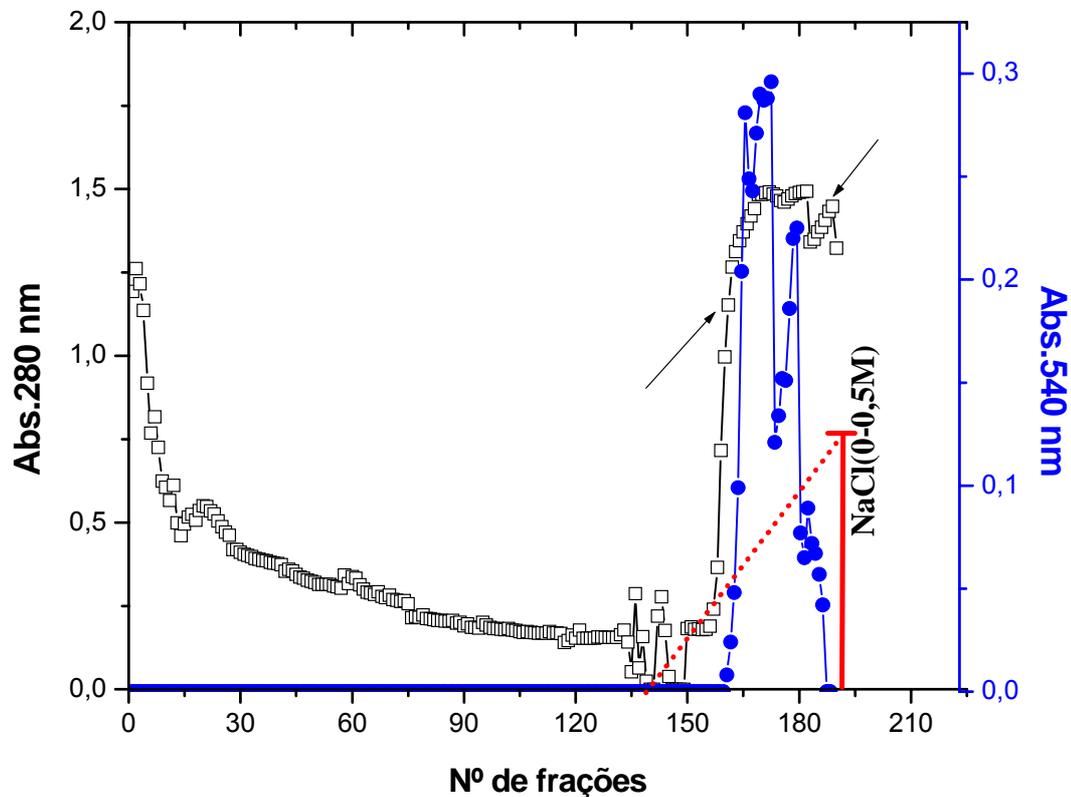


Figura 20 – Perfil cromatográfico da atividade trealásica extracelular do extrato bruto de *M. pulchella* em coluna de troca iônica de DEAE-Celulose em pH 7,0. A coluna (15 cm x 2,5 cm) foi equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio (usando aproximadamente 7 vezes do volume da coluna) e um gradiente linear de 0-500 mM de NaCl. Frações de 5,0 ml foram coletadas para leitura de absorvância em 280 nm e medida da atividade trealásica. As frações com atividade trealásica, indicadas entre as setas foram reunidas e denominadas “pool” DEAE-Celulose. Símbolos: Proteína 280nm (□); Atividade trealásica (●).

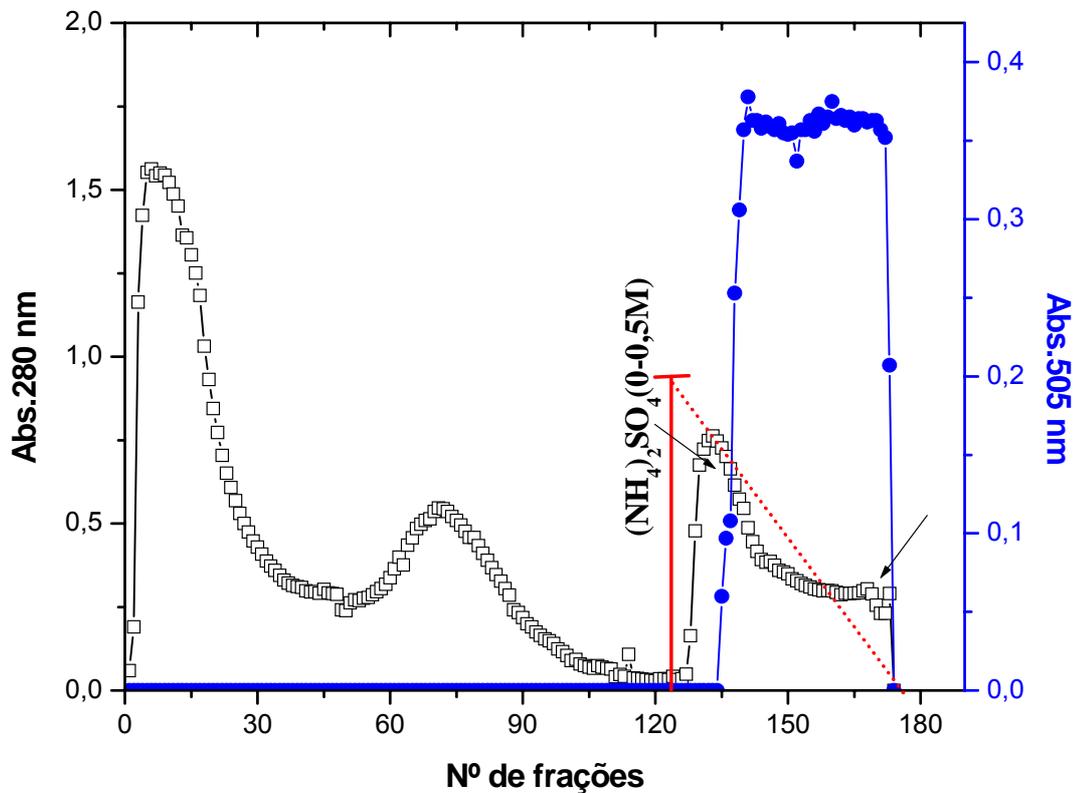


Figura 21 – Perfil cromatográfico em coluna de Phenyl-Sepharose do “pool” DEAE-Celulose da atividade trealásica extracelular de *M. pulchella*. A coluna (5 cm x 2,5 cm) foi equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0, contendo 1,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e a amostra adicionada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a concentração de 1,5 M. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio (aproximadamente 7 vezes do volume da coluna) e a seguir foi aplicado o gradiente linear inverso de 500-0 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frações de 3,0 ml foram coletadas para leitura de absorbância em 280 nm e medida a atividade trealásica. As frações com atividade trealásica, indicadas entre as setas, foram reunidas e denominadas “pool” Phenyl Sepharose. Símbolos: Proteína 280nm (\square); Atividade trealásica (\bullet).

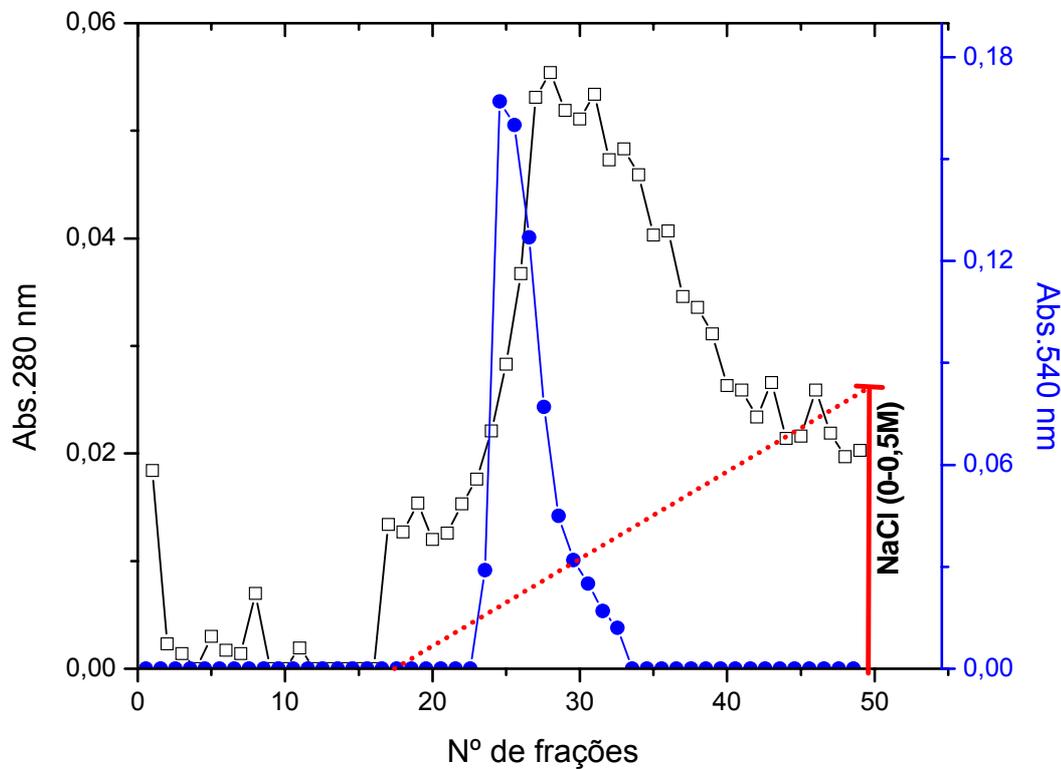


Figura 22 – Perfil cromatográfico em coluna de DEAE-Celulose, pH 5,0 do “pool” de Phenyl-Sepharose da atividade trealásica extracelular de *M. pulchella*. A coluna (9 cm x 1,5 cm) foi equilibrada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio (aproximadamente 7 vezes o volume da coluna) e um gradiente linear de 0-500 mM de NaCl. Frações de 5,0 ml foram coletadas para leitura de absorvância em 280 nm e medida da atividade trealásica. As frações com maior atividade trealásica, foram reunidas e denominadas “pool” DEAE-Celulose. Símbolos: Proteína 280nm (□); Atividade trealásica (●).

4.8.2. Critério de pureza

O critério de pureza empregado foi a análise eletroforética da enzima em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e não desnaturantes. Conforme podemos observar na figura 23 A e B, a eletroforese em condições não

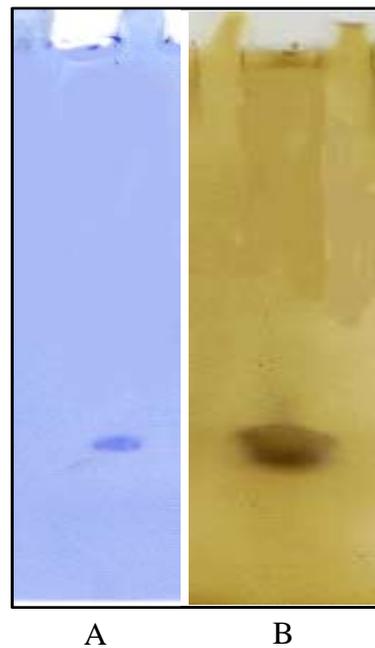


Figura 23 – PAGE da trealase extracelular purificada de *M. pulchella*. **A)** Corada com Coomassie Blue. **B)** Corada com nitrato de prata. A eletroforese foi realizada em condições não desnaturantes, em géis de poliacrilamida a 6%, conforme descrito em material e métodos.

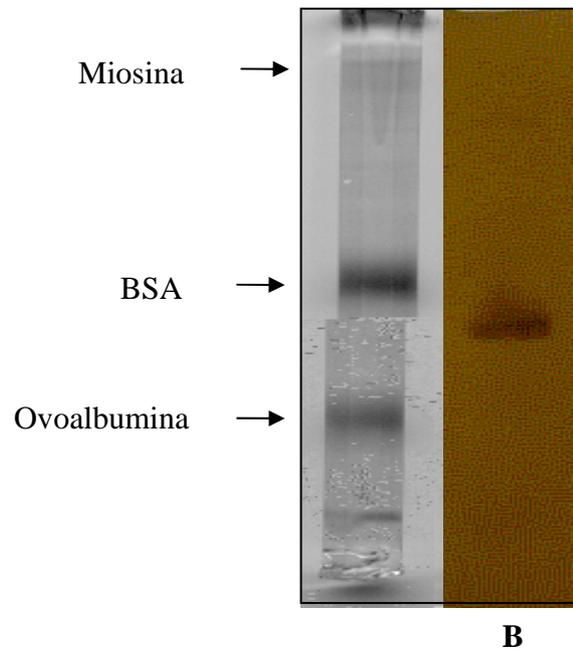


Figura 24 – SDS-PAGE da trealase extracelular purificada de *M. pulchella*. **A)** Padrão de massa molecular, corado com Coomassie Blue. Marcadores de massa molecular: 1 – Miosina (205 kDa), 2 - BSA (66 kDa) e 3 – Ovoalbumina (45 kDa). **B)** Trealase extracelular corada com nitrato de prata. A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida a 7% em condições desnaturantes; conforme descrito em material e métodos.

4.8.3.2. Determinação da Massa Molecular por filtração

Para demonstrarmos a massa molecular da enzima na forma nativa, foi realizado o procedimento de aplicação da enzima em uma coluna de filtração.

Utilizou-se para este procedimento, a coluna Bio-Sil Sec-400 da Bio Rad. A amostra apresenta um único pico de atividade trealásica. Através de uma curva padrão, estimou-se uma massa molecular nativa aparente de 104 kDa. Este dado foi mostrado na figura 25.

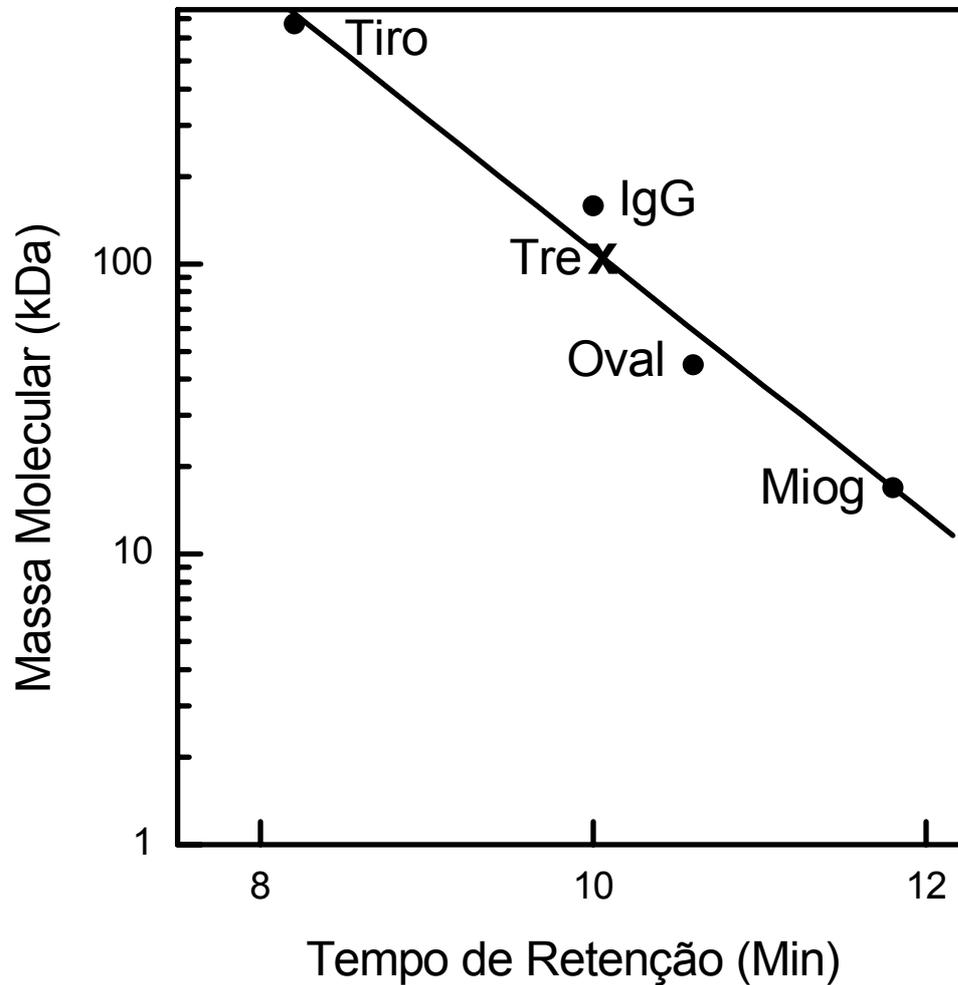


Figura 25 – Determinação da massa molecular da trealase extracelular de *M. pulchella* por filtração. A cromatografia foi realizada em HPLC equipado com uma coluna de Bio-Sil SEC-400 (30x0,78 cm) equilibrada e eluída em tampão HEPES 100 mM, pH 6,8, contendo NaCl 150 mM e azida sódica 10 mM sob o fluxo de 1,0 ml/min. Símbolos: Tiro (670 kDa); IgG (158 kDa); Oval (45 kDa); Miog (17 kDa).

4.8.4. Purificação da trealase intracelular

Transcorridos o período de padronização da produção das trealases de *M. pulchella*, foram iniciados os processos de purificação da atividade trealásica intracelular. A enzima foi purificada por um processo relativamente rápido que incluiu dois passos de cromatografia em coluna (tabela 6).

Em pH 7,0 a enzima se liga à resina DEAE-Celulose, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, cujo pH é 7,0. A enzima foi eluída com o aumento da força iônica, para uma concentração de NaCl de aproximadamente 170 mM (figura 26). Após a cromatografia, a amostra foi dialisada contra água por 24 horas à 4°C. Esse procedimento resultou na eliminação de grande parte de contaminantes presentes no extrato bruto e a trealase foi semi purificada, com fator de purificação de 9 vezes (tabela 6). A seguir, o “pool” de DEAE-Celulose foi aplicado em uma coluna de interação hidrofóbica.

O passo seguinte da purificação foi cromatografia em coluna de Phenyl-Sepharose, no qual a coluna e a amostra foram equilibradas em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,0, e sulfato de amônio na concentração de 1,5 M. A enzima foi retirada da resina e foi eluída com gradiente reverso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,5-0 M, com volume final de 150 ml (figura 27). Após esse procedimento a amostra foi dialisada contra água por 48 horas à 4°C, resultando numa purificação de cerca de 24 vezes (tabela 6).

Tabela 6 – Purificação da trealase intracelular de *M. pulchella*

Etapa	Volume total (ml)	Proteínas totais (mg)	Unidades ^a totais (U totais)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação X
Extrato Bruto	400	568	1184	2,09	100	1
DEAE – Celulose pH 7,0	130	16,9	304,2	18	26	9
Phenyl-Sepharose pH 7,0	120	4,92	246	50	21	24

^aUma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de glicose por minuto nas condições de ensaio estabelecidas.

Condições: O fungo foi crescido em meio líquido M6, por um período de 96 horas à 40°C, sob agitação constante de 140 excursões por minutos.

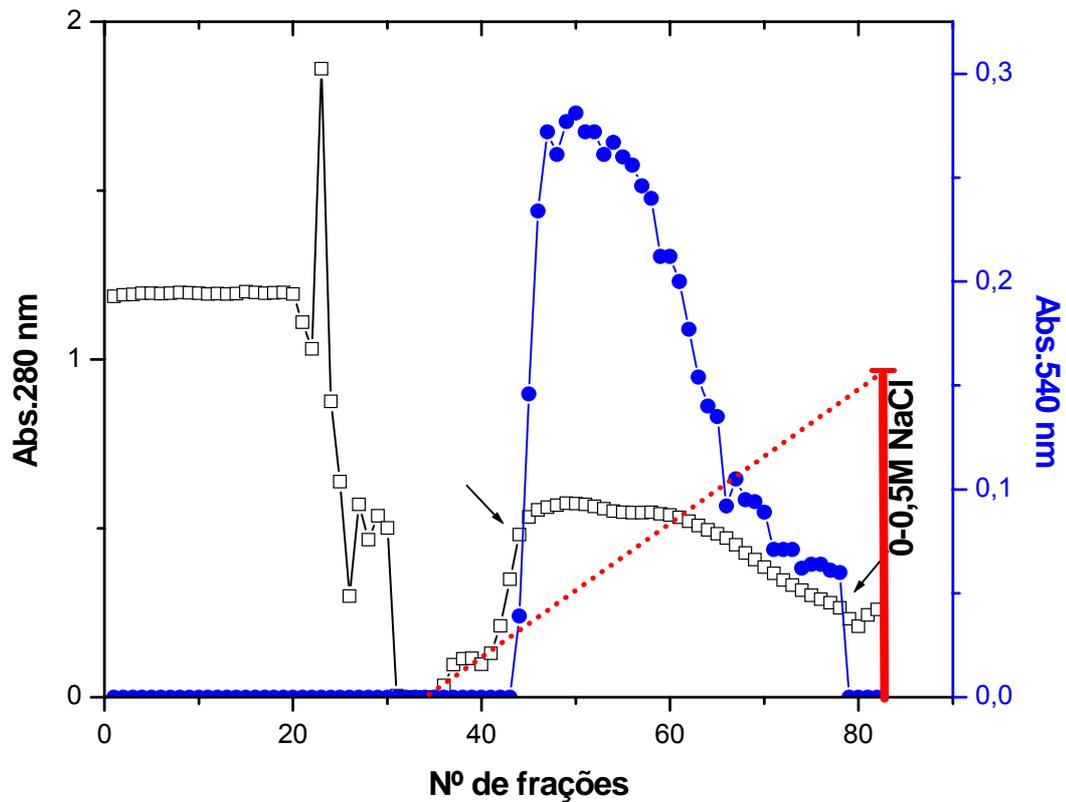
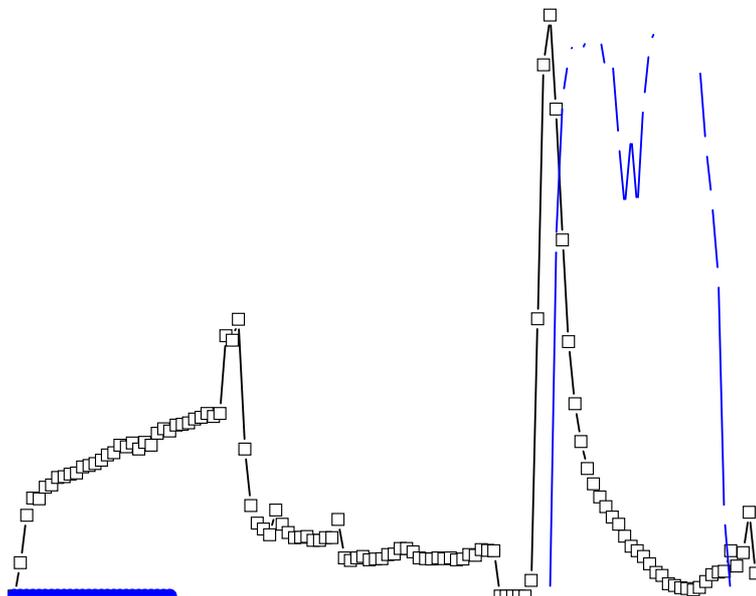


Figura 26 – Perfil cromatográfico da atividade trealásica intracelular do extrato bruto de *M. pulchella* em coluna de troca iônica de DEAE-Celulose. A coluna (15 cm x 2,5 cm) foi equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio (aproximadamente 7 vezes o volume da coluna) e um gradiente linear de 0-500 mM de NaCl. Frações de 4,0 ml foram coletadas para leitura de absorvância em 280 nm e medida da atividade trealásica. As frações com atividade trealásica indicadas entre as setas foram reunidas e denominadas “pool” DEAE-Celulose. Símbolos: Proteína 280 nm (□); Atividade trealásica (●).



4.8.5. Critério de pureza

O critério de pureza empregado foi a análise eletroforética da enzima em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e não desnaturantes. Conforme podemos observar na figura 28, a trealase intracelular de *M. pulchella*, exibe uma única banda protéica em eletroforese em condições não desnaturantes, após o gel ter sido corado com nitrato de prata.

4.8.6. Determinação da Massa Molecular da enzima purificada

A determinação da massa molecular da trealase extracelular foi determinada por dois métodos distintos: por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e por coluna de filtração.

4.8.6.1. Determinação da Massa Molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A trealase intracelular purificada apresentou uma única banda protéica em SDS-PAGE e com uma massa molecular relativa de aproximadamente 50 kDa. Dados foram mostrados na figura 29.

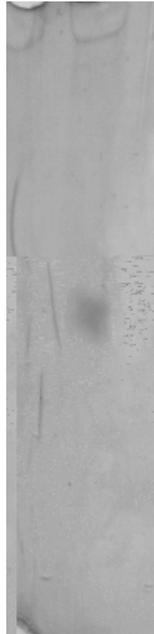


Figura 28 – PAGE da trealase intracelular purificada de *M. pulchella*. Amostra corada com nitrato de prata. A eletroforese foi realizada em condições não desnaturantes, em géis de poliacrilamida a 6%, conforme descrito em material e métodos.

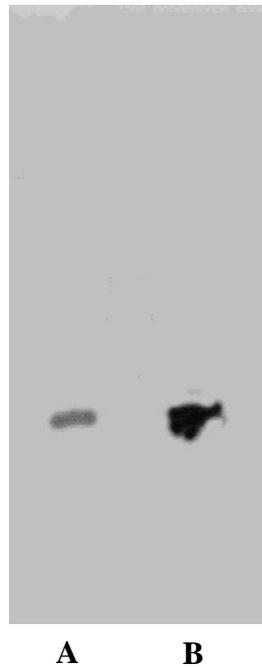


Figura 29 – SDS-PAGE da trealase intracelular de *M. pulchella*. **A)** Trealase intracelular corado com nitrato de prata. **B)** Marcador de massa molecular - ovoalbumina (45 kDa). A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida a 7% em condições desnaturantes, conforme descrito em material e métodos.

4.8.6.2. Determinação da Massa Molecular por filtração

Para demonstrarmos a massa molecular da enzima na forma nativa, foi realizado o procedimento de aplicação da enzima em uma coluna de filtração.

Utilizou-se para este procedimento, a coluna de filtração da Bio-Sec-400 da Bio-Rad. A amostra apresenta um único pico de atividade trealásica. Através de uma curva padrão, estimou-se que a massa molecular da trealase era de 150 kDa (figura 30).

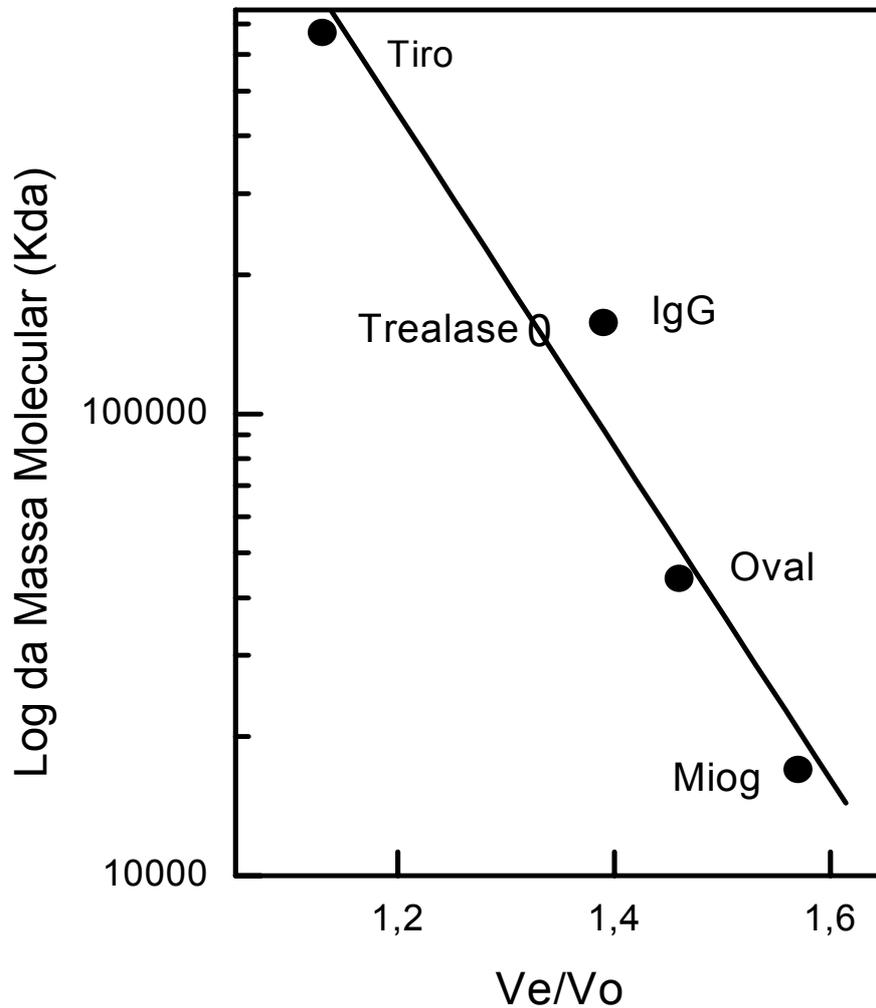


Figura 30 – Determinação da massa molecular da trealase intracelular de *M. pulchella*. A cromatografia foi realizada em HPLC equipado com uma coluna de Biosil SEC-400 (30 x 0,78 cm) equilibrada e eluída em tampão HEPES 100 mM, pH 6,8, contendo 150 mM de NaCl e azida sódica 10 mM sob o fluxo de 1,0 ml/min. Símbolos: Tiro (670 kDa); IgG (158 kDa); Oval (45 kDa); Miog (17 kDa).

4.9. Caracterização das trealases purificadas

4.9.1. Determinação do ponto isoelétrico das trealases intra e extracelular purificadas de M. pulchella

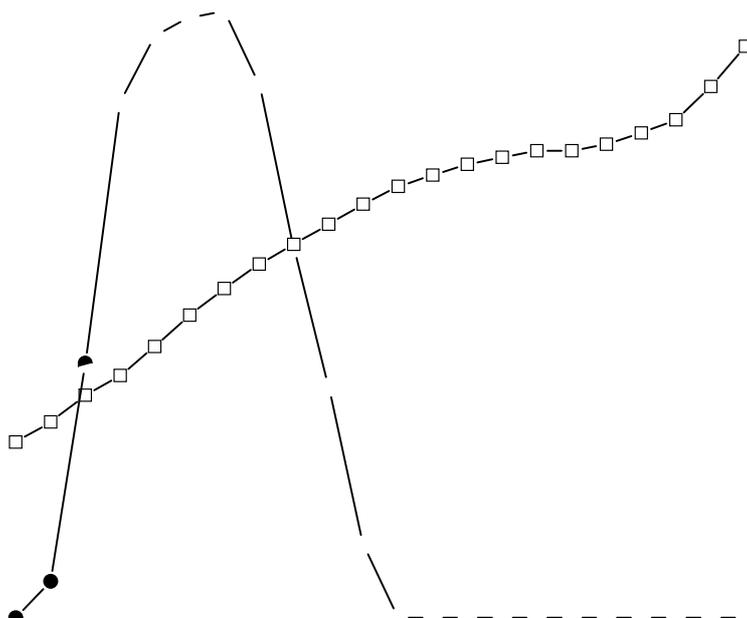
O pI das enzimas purificadas foi determinado por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida. O pI das trealases purificadas a partir do extrato bruto obtido em cultivo correspondem a 3,5 e 3,0 para trealase extracelular (figura 31) e intracelular (figura 32), respectivamente.

4.9.2. Efeito do pH sobre a atividade trealásica de M. pulchella

A atividade trealásica foi medida na escala de pH 4,0 até 9,0. Podemos verificar que o pH ótimo encontrado para a atividade enzimática extracelular foi de 5,0 (figura 33). Entretanto, para a atividade enzimática intracelular, o pH ótimo de reação foi de 5,5-6,0 (figura 34).

4.9.3. Determinação da temperatura ótima de atividade das trealases purificadas

A temperatura ótima de atividade das trealases foi determinada por meio de experimentos onde as dosagens enzimáticas foram realizadas em diferentes temperaturas na faixa de 35 a 70°C. A temperatura ótima da trealase extracelular foi de 55°C (figura 35), enquanto que para trealase intracelular foi de 50°C (figura 36).



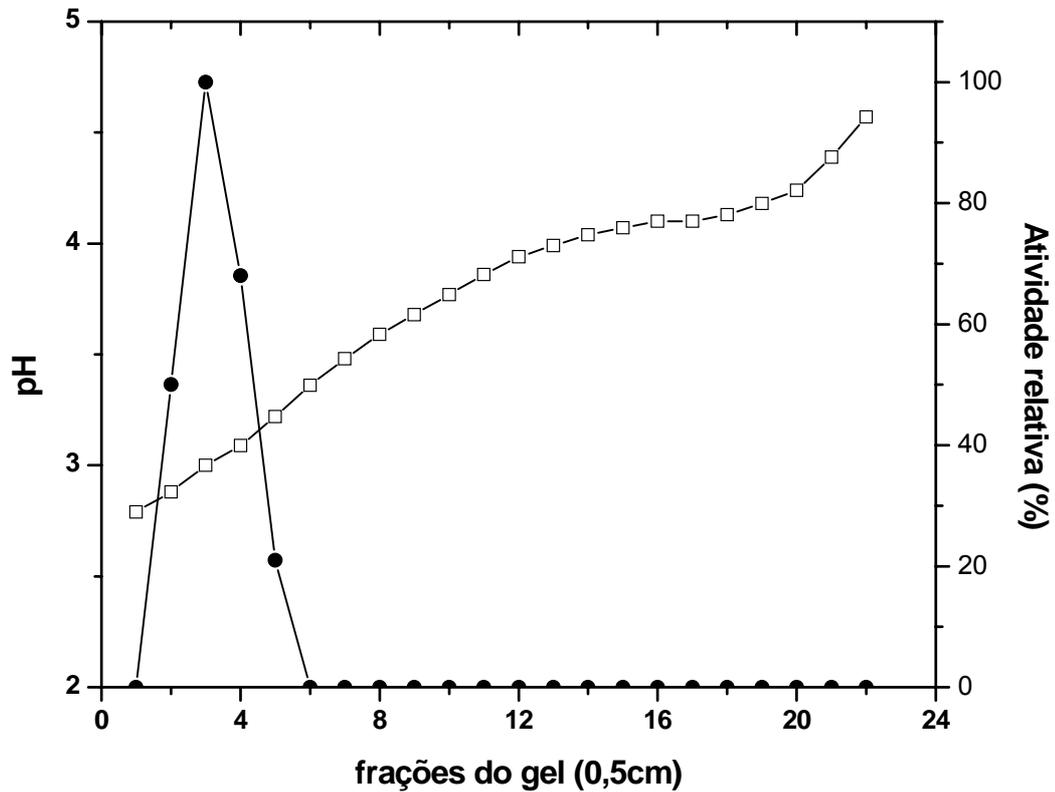


Figura 32 - Representação gráfica da focalização isoeétrica (pI) da trealase intracelular produzida por *M. pulchella*. Símbolos: (□) gradiente de pH ao longo do gel; (●) atividade enzimática ao longo do gel determinada com GOD.

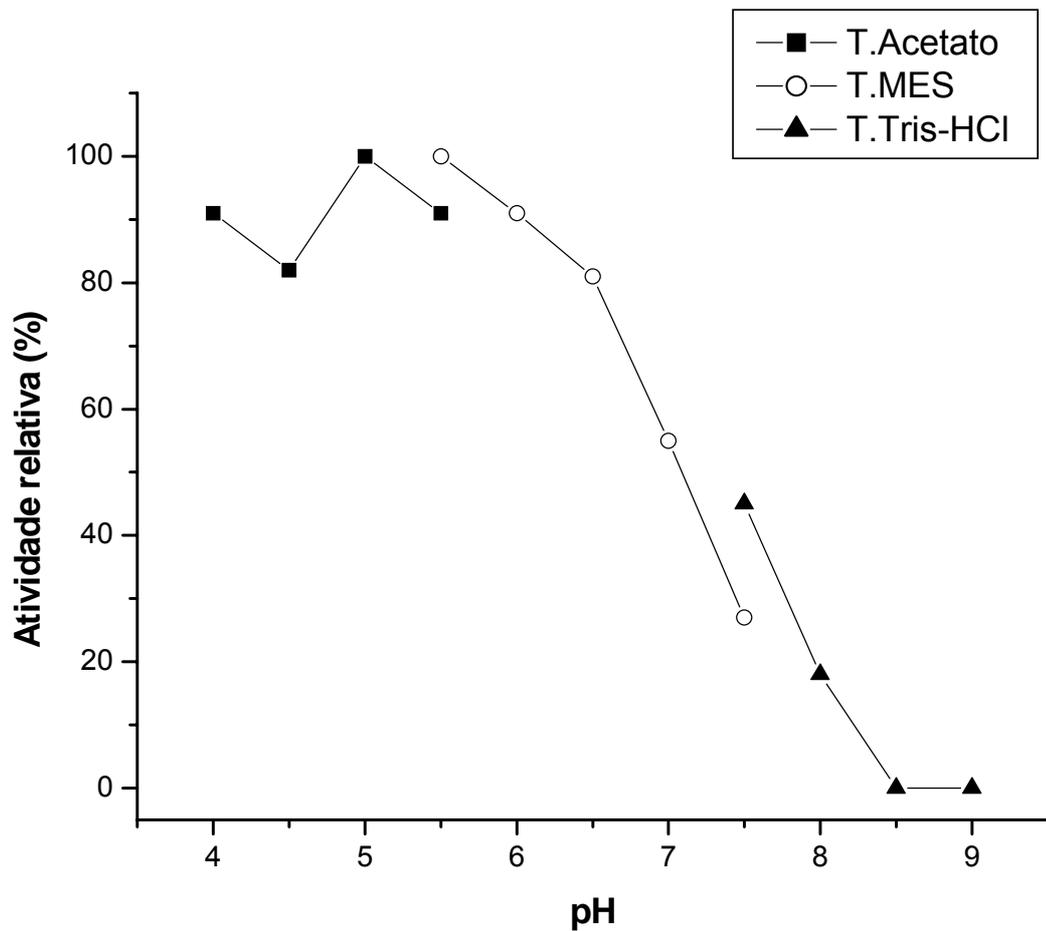


Figura 33 – Determinação do pH ótimo de atividade da trealase extracelular purificada de *M. pulchella*. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio, na faixa de pH de 4,0 à 5,0; MES, na faixa de pH de 5,5 à 7,5; Tris-HCl, na faixa de 7,5 à 9,0. A atividade trealásica foi determinada nas condições ótimas de atividade, conforme descrito em material e métodos (item 3.6.1).

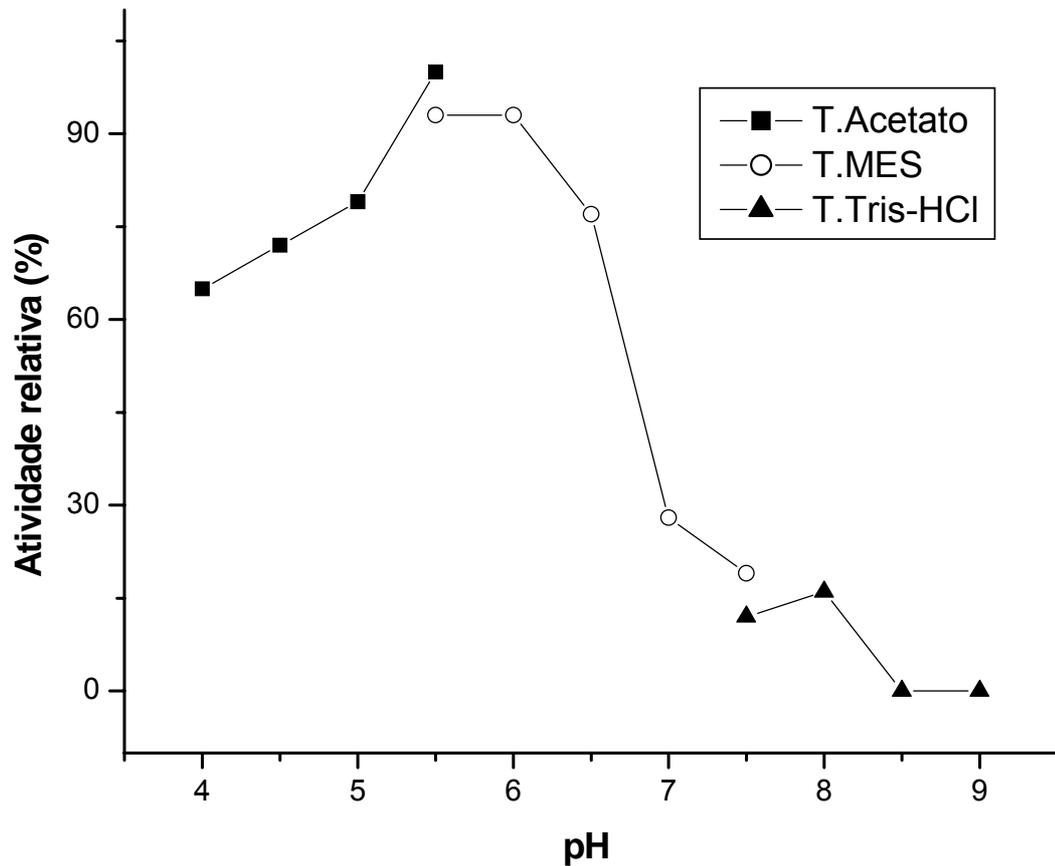


Figura 34 – Determinação do pH ótimo de atividade da trealase intracelular purificada de *M. pulchella*. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio, na faixa de pH de 4,0 à 5,0; MES, na faixa de pH de 5,5 à 7,5; Tris-HCl, na faixa de 7,5 à 9,0. A atividade trealásica foi determinada nas condições ótimas de atividade, conforme descrito em material e métodos (item 3.6.1).

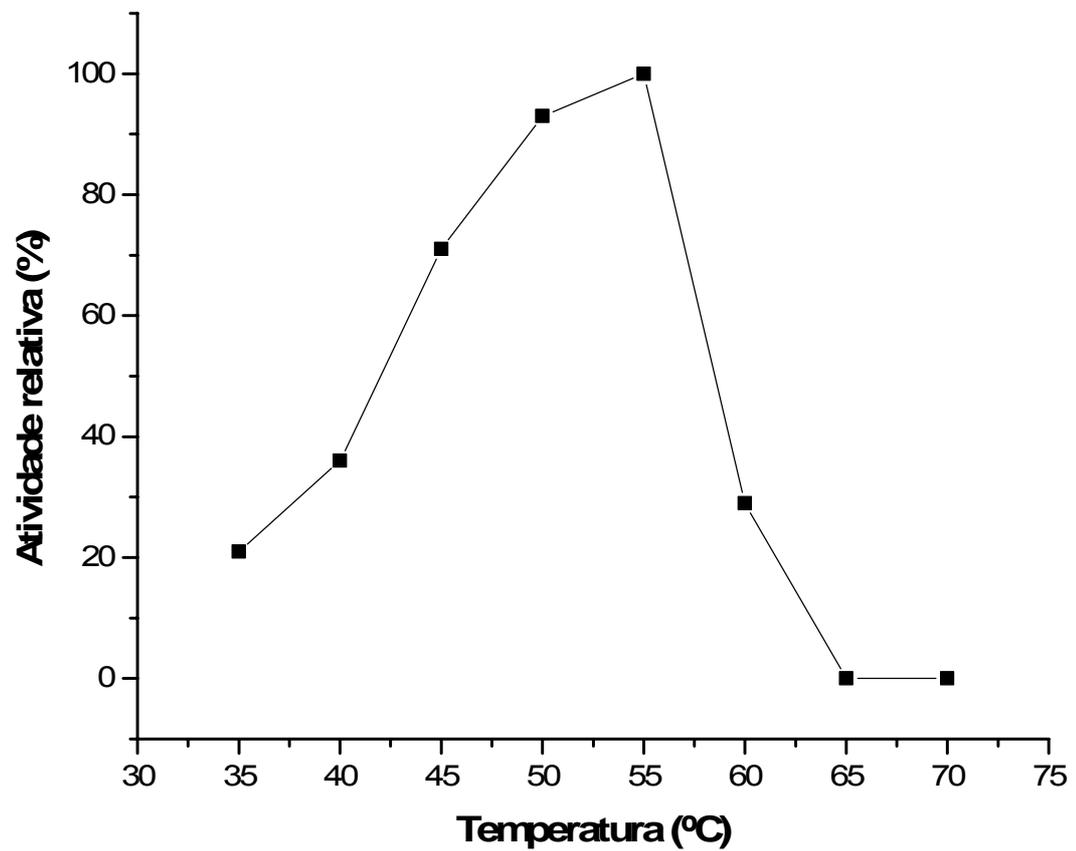


Figura 35 – Determinação da temperatura ótima da trealase extracelular de *M. pulchella*.

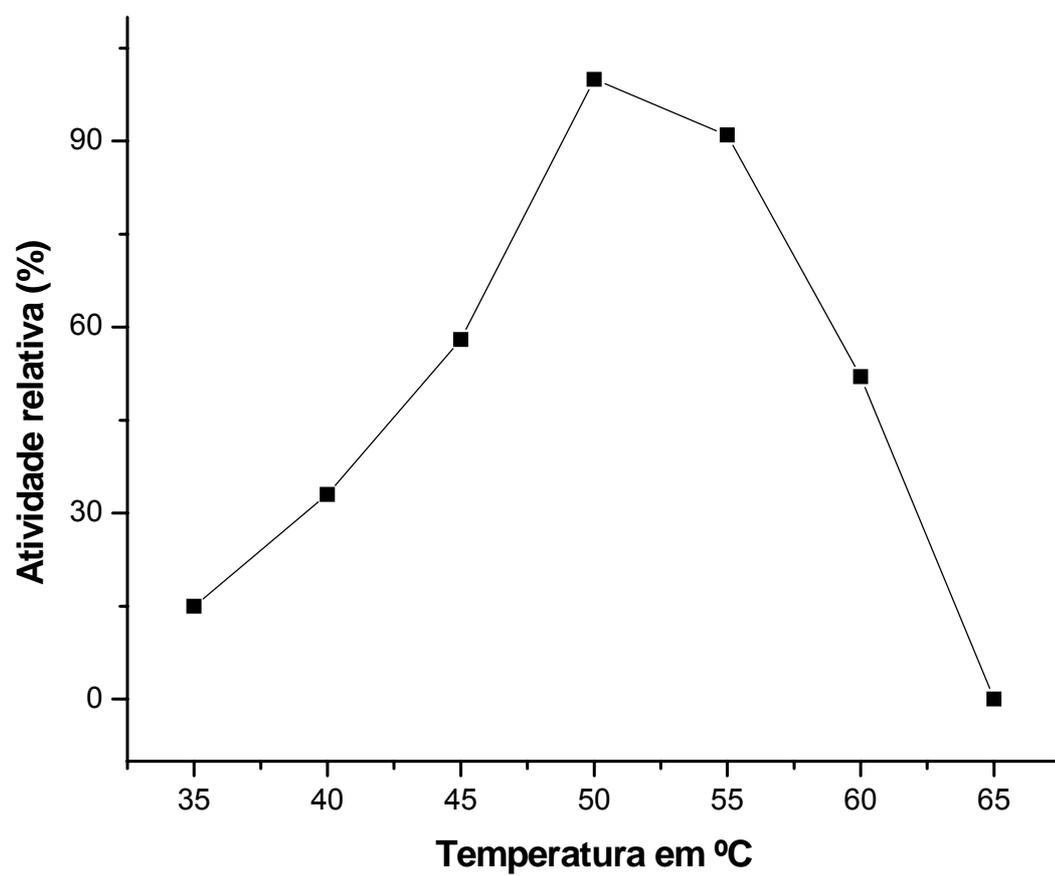


Figura 36 – Determinação da temperatura ótima da trealase intracelular de *M. pulchella*.

4.9.4. Efeitos de íons metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade das trealases purificadas

O efeito de alguns íons metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade das trealases de *M. pulchella* purificadas foram investigados, determinando-se a atividade trealásica, em condições de pH e temperatura ótimas.

A trealase extracelular foi ativada por manganês (50%) e cobalto (14%). Alguns íons inibiram a atividade da enzima, como cálcio (cerca de 42%), alumínio (43%), chumbo (34%), ferro (61%), mercúrio (66%) e prata (56%). Outros íons não tiveram efeito significativo sobre a atividade da enzima. Estes dados foram mostrados na tabela 7.

A trealase intracelular foi ativada por manganês (41%,) cobalto (40%), a enzima também teve a atividade aumentada na presença de prata (31%). Alguns íons inibiram a atividade da enzima, como alumínio (cerca de 58%), cobre (38%), zinco (57%), chumbo (50%), ferro (71%), EDTA (40%) e mercúrio (100%). Outros íons não exerceram ativação e/ou inibição significativa na atividade da enzima. Estes dados foram mostrados na tabela 8.

Para estudarmos melhor o efeito de manganês e cobalto, foi realizada incubação da enzima extracelular com o substrato em presença das seguintes concentrações de manganês e cobalto: 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM e 40 mM. Como controle foi realizado um ensaio na ausência dos íons (figura 37).

De fato, a enzima extracelular é ativada cerca de 1,25 vez com cobalto 10 mM e cerca de 6 vezes com manganês 20 mM (figura 37).

Com o intuito de refinar o estudo do efeito de íons bivalentes sobre a atividade da trealase intracelular, realizamos uma curva de concentração de cálcio, manganês

e cobalto. Entretanto, podemos notar que a enzima intracelular sofre inibição na presença de cálcio. Podemos também observar que a trealase é ativada 2 vezes mais na presença de manganês 20 mM, e 4 vezes mais na presença de cobalto 20 mM. Estes dados foram mostrados na figura 38.

Tabela 7 – Influência de íons, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da trealase extracelular purificada de *M. pulchella*.

Íons (1mM)	Atividade (%)
Controle	100
NaBr	98
NaCl	93
AgNO ₃	110
CaCl ₂	58
MgCl ₂	93
MnCl ₂	150
KCl	94
NH ₄ Cl	94
Al ₂ Cl ₃	57
β -Mercaptoetanol	92
CuCl ₂	89
ZnCl ₂	82
CoCl ₂	114
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	66
Fe ₂ (SO ₄)	39
NH ₄ F	90
HgCl ₂	44
BaCl ₂	98
EDTA	87

O controle equivale a 0,96 U/ml.

Tabela 8 – Influência de íons, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da trealase intracelular purificada de *M. pulchella*.

Íons (1 mM)	Atividade (%)
Controle	100
NaBr	92
NaCl	92
AgNO ₃	131
CaCl ₂	83
MgCl ₂	73
MnCl ₂	141
KCl	82
NH ₄ Cl	80
Al ₂ Cl ₃	42
β -Mercaptoetanol	91
CuCl ₂	62
ZnCl ₂	43
CoCl ₂	140
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	50
Fe ₂ (SO ₄)	29
NH ₄ F	69
HgCl ₂	0
BaCl ₂	78
EDTA	60

O controle equivale a 0,33 U/ml.

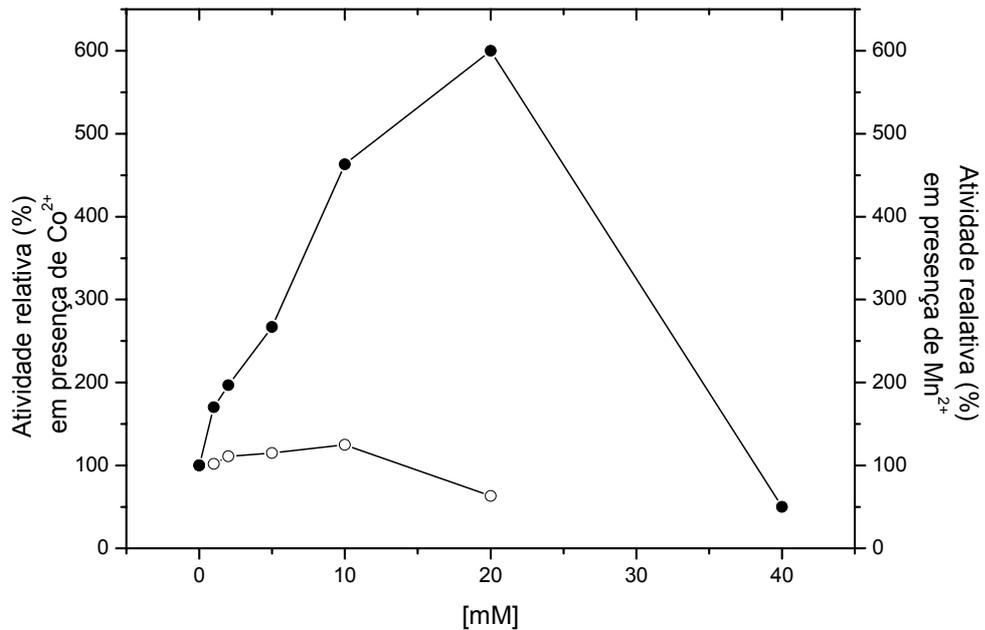


Figura 37 – Influência da concentração de cobalto e manganês na atividade trealásica extracelular de *M. pulchella*. A enzima foi incubada com as concentrações finais de 0mM, 1mM, 2mM, 5mM, 10mM, 20mM e 40mM de cobalto e manganês. A atividade trealásica foi determinada nas condições ótimas de atividade, conforme descrito em material e métodos (item 3.6.1). Símbolos: Atividade relativa (%) em presença de Co^{2+} (○); Atividade realativa (%) em presença de Mn^{2+} (●).

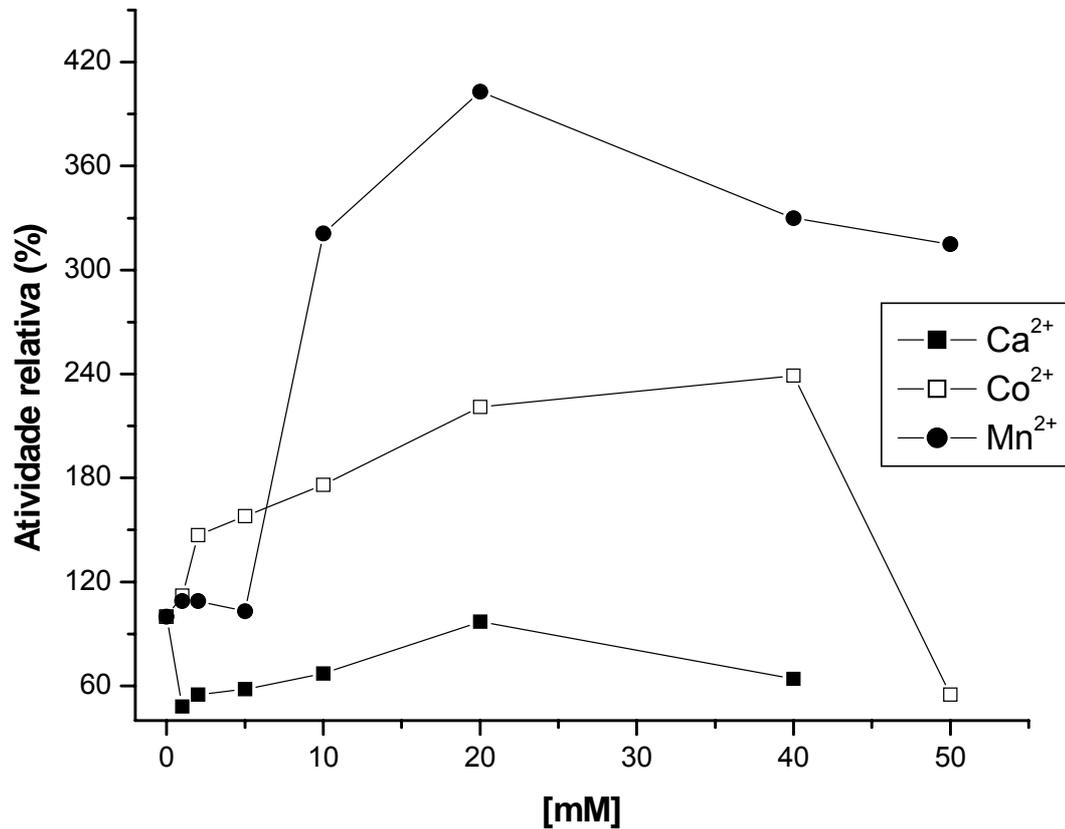


Figura 38 – Influência da concentração de cálcio, cobalto e manganês na atividade de trealase intracelular de *M. pulchella*. A enzima foi incubada com as concentrações finais de 0mM, 1mM, 2mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM e 50 mM de cálcio, cobalto e manganês. A atividade trealásica foi determinada nas condições ótimas de atividade, conforme descrito em material e métodos (item 3.6.1).

4.9.5. Efeito de nucleosídeos fosfato sobre a atividade trealásica

A atividade trealásica de *M. pulchella* foi ensaiada na presença de 1 e 10 mM de ATP, ADP e AMP. A enzima extracelular sofreu cerca de 9 e 21% de inibição na presença de ATP 1 e 10 mM, respectivamente (tabela 9). Na presença de ADP 1 e 10 mM, houve inibição de 11% e 14% da atividade trealásica extracelular de *M. pulchella*, respectivamente (tabela 9). Na presença de AMP 1 e 10 mM, houve inibição de 9 e 11% da atividade trealásica extracelular, respectivamente (tabela 9).

A enzima intracelular se mostrou mais sensível aos nucleotídeos fosfatos, visto que em presença de ATP, a enzima sofreu cerca de 23 e 44% de inibição na presença de 1 e 10 mM, respectivamente. Na presença de ADP 1 mM a enzima é inibida por cerca de 14%, enquanto, AMP 1 mM, ADP 10 mM e AMP 10 mM, inibiu aproximadamente 21% da atividade. Estes dados foram mostrados na tabela 9.

Tabela 9 – Efeito de nucleosídeos fosfato sobre as trealases de *M. pulchella*

Nucleosídeo fosfato (mM)	Atividade relativa (%)	
	Extracelular	Intracelular
Controle	100	100
ATP 1mM	91	77
ATP 10mM	79	66
ADP 1mM	89	86
ADP 10mM	86	76
AMP 1mM	91	79
AMP 10mM	89	79

4.9.6. Estabilidade térmica da trealase extracelular

Para determinar a estabilidade das trealases purificadas frente à temperatura, a enzima foi incubada de 35 até 65°C, por até 60 minutos, na ausência do substrato e dissolvida em água. Após cada intervalo de tempo pré-determinado, as alíquotas eram retiradas e ensaiadas nas condições ótimas de temperatura e pH. Podemos observar que a meia vida da trealase extracelular é de aproximadamente 9,8 minutos à 65°C. Nas demais temperaturas, há um declínio de cerca de 40% na atividade da enzima nos primeiros 15 minutos. Os dados foram mostrados na figura 39.

Com o objetivo de aumentar a estabilidade da enzima extracelular quando incubada a 65°C, nós testamos a sua estabilidade quando diluída em trealose, no qual podemos notar que a enzima praticamente não perde sua atividade ao longo dos 60 minutos (figura 40).

A meia vida da trealase intracelular incubada a 60°C foi de aproximadamente 8 minutos, sendo que nas demais temperaturas, há declínio na atividade da enzima nos primeiros 15 minutos até cerca de 30 minutos de incubação.

Na tentativa de melhorar a estabilidade térmica da trealase intracelular, incubamos a enzima nas temperaturas de 50, 55 e 60°C na presença de trealose 1%. Como podemos observar na figura 42, a enzima à 55°C tem meia vida de 46 minutos. A 60°C, praticamente não notamos diferença na estabilidade térmica da enzima incubada com trealose e incubada com água (figura 42).

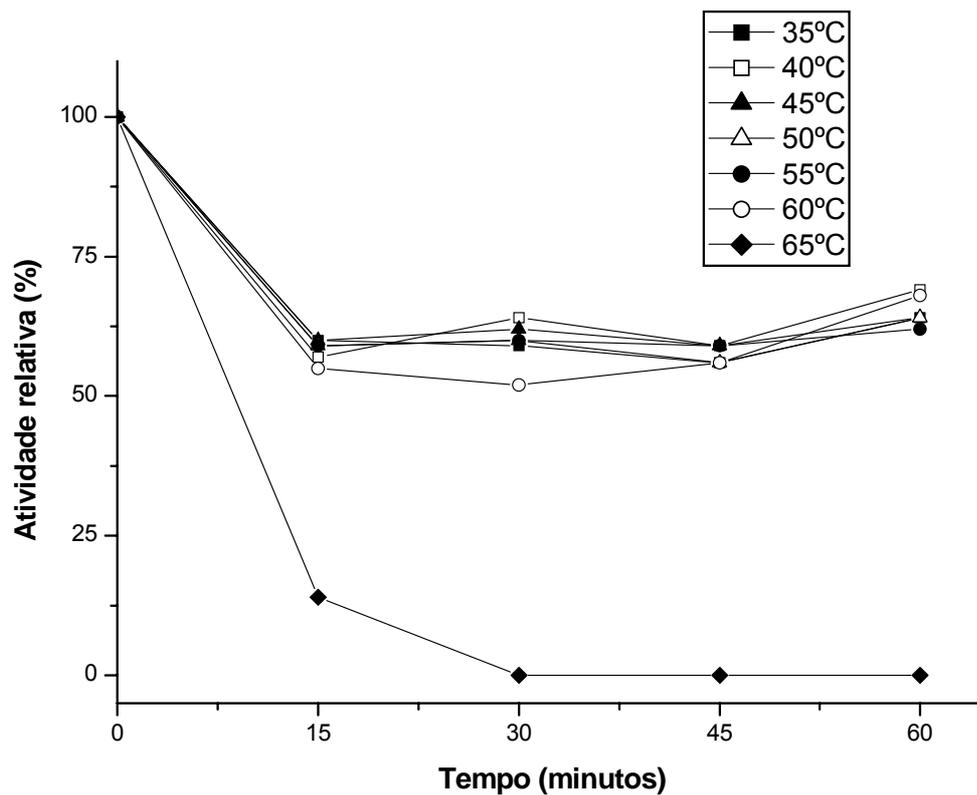


Figura 39 – Termostabilidade da trealase extracelular purificada de *M. pulchella*. A enzima diluída em água foi incubada nas diferentes temperaturas, de 35 a 65°C, e amostras de 0,1 ml foram retiradas nos tempos indicados para dosagem da atividade trealásica a 55°C pelo método de DNS (item 3.6.1).

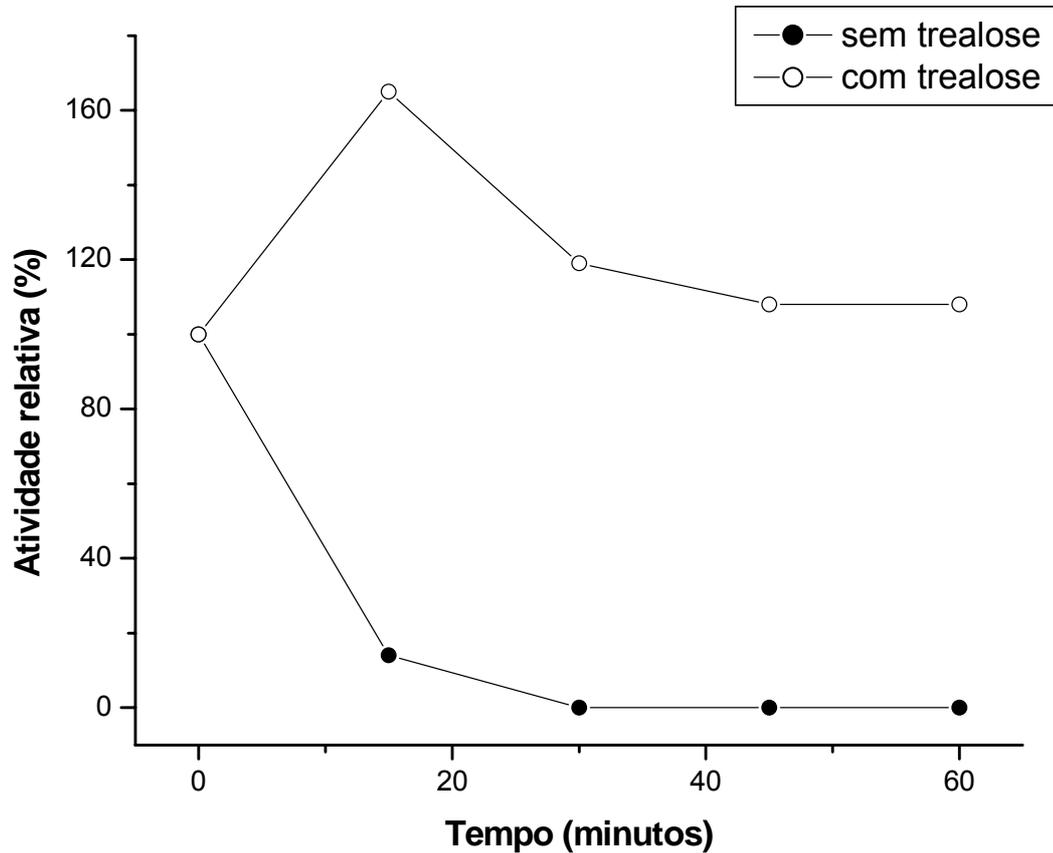


Figura 40 – Termostabilidade da trealase extracelular purificada de *M. pulchella*. enzima diluída em trealose 1% foi incubada na temperatura de 65°C, e amostras de 0,1 ml foram retiradas nos tempos indicados para dosagem da atividade trealásica a 55°C pelo método de DNS (item 3.6.1).

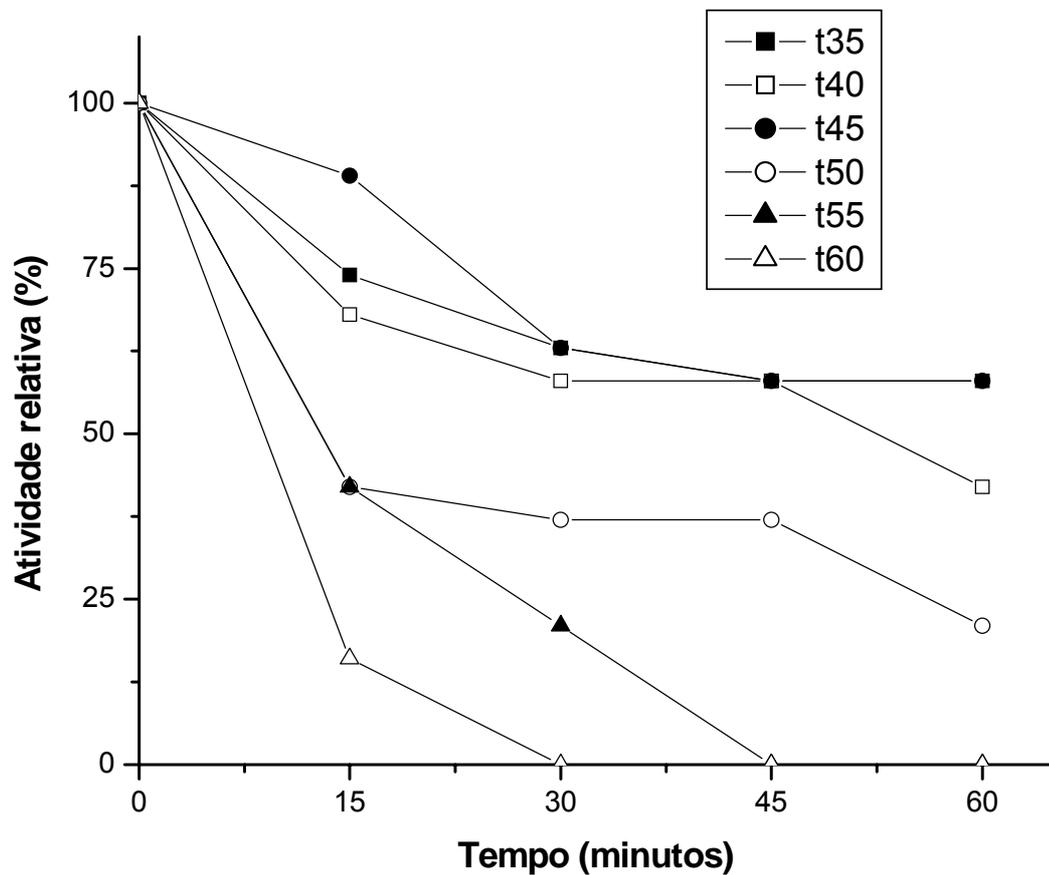


Figura 41 – Termoestabilidade da trealase intracelular purificada de *M. pulchella*. A enzima diluída em água foi incubada nas diferentes temperaturas, de 35 a 60°C, e amostras de 0,1 ml foram retiradas nos tempos indicados para dosagem da atividade trealásica a 55°C pelo método de DNS (item 3.6.1).

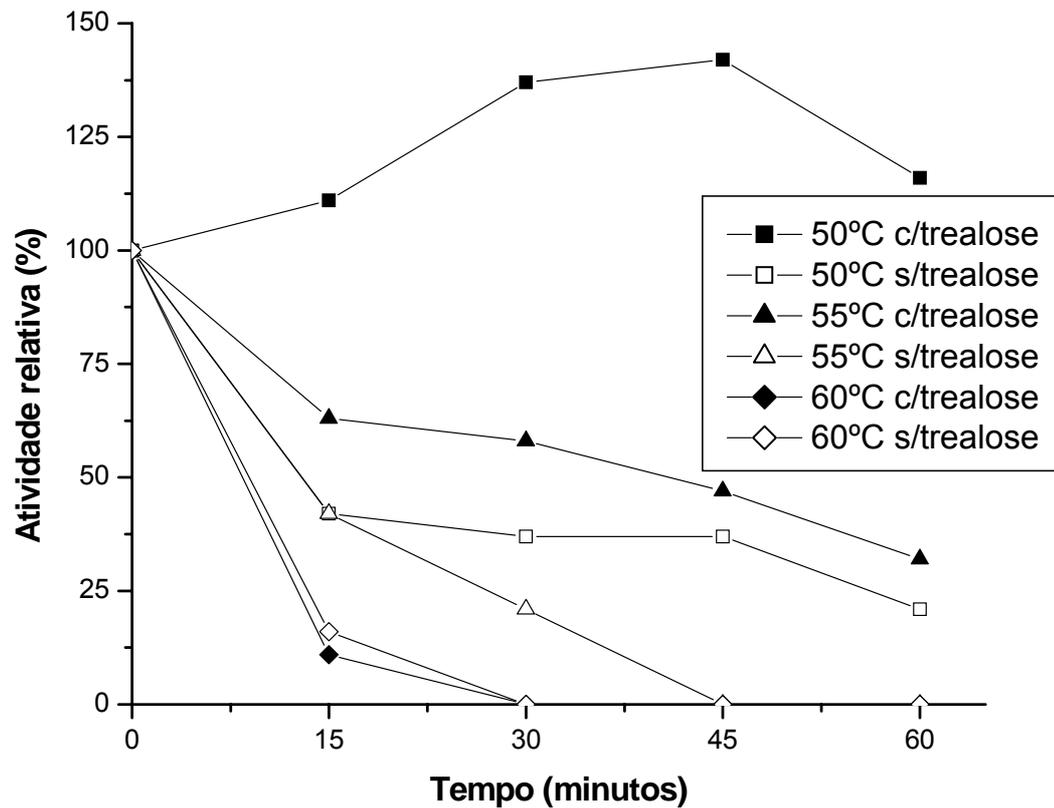


Figura 42 – Termoestabilidade da trealase intracelular purificada de *M. pulchella*. A enzima foi diluída em trealose 1% (nos símbolos fechados) e em água (nos símbolos abertos) e incubada nas temperaturas de 50 a 60°C, e amostras de 0,1 ml foram retiradas nos tempos indicados para dosagem da atividade trealásica a 55°C pelo método de DNS (item 3.6.1).

4.9.7. Análise cinética das trealases purificadas

Para determinarmos os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, foi utilizado o procedimento descrito por Lineweaver & Burk (1934), e a reta fixada usando o programa Origin 6.1.

Na figura 43, temos a representação gráfica do efeito da concentração de trealose sobre a atividade da trealase extracelular. O valor de K_m encontrado para trealose foi de 2,72 mM, e a $V_{m\acute{a}x}$ foi de 90 U/mg de proteína.

Entretanto, para a trealase intracelular, o valor de K_m encontrado para trealose foi de 4,66 mM, e a $V_{m\acute{a}x}$ foi de 90,90 U/mg de proteína, conforme a representação gráfica do efeito da concentração de trealose sobre a atividade da trealase intracelular. Estes dados foram mostrados na figura 44.

4.9.8. Determinação do conteúdo de carboidratos neutros das trealases intra e extracelular purificadas

Através do método fenol-sulfúrico (Dubbois et al., 1956), foi verificada a natureza glicoprotéica das trealases purificadas de *M. pulchella*. O conteúdo de carboidratos foi estimado em 19% para enzima extracelular e 66% para a enzima intracelular.

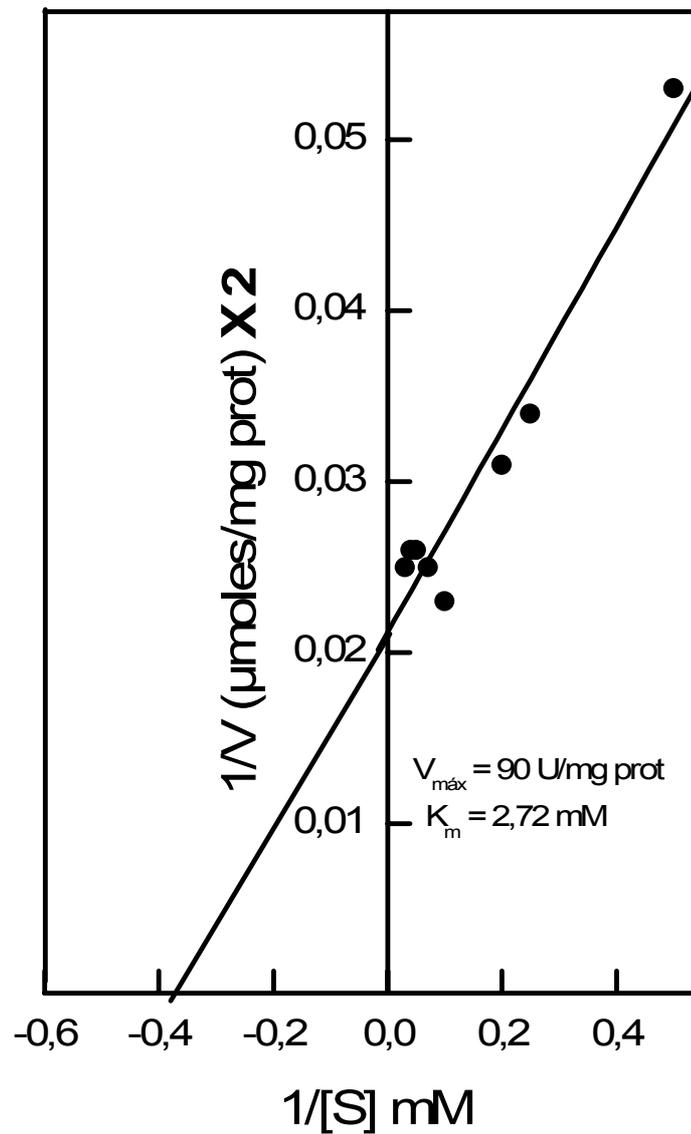


Figura 43 – Determinação do K_m e $V_{máx}$ para a trealase extracelular purificada de *M. pulchella*. Gráfico duplo-recíproco da hidrólise da trealose. Os ensaios foram realizados na faixa de concentração de 1mM a 30mM de trealose. A atividade trealásica foi determinada nas condições ótimas de atividade, conforme descrito em material e métodos (item 3.6.1).

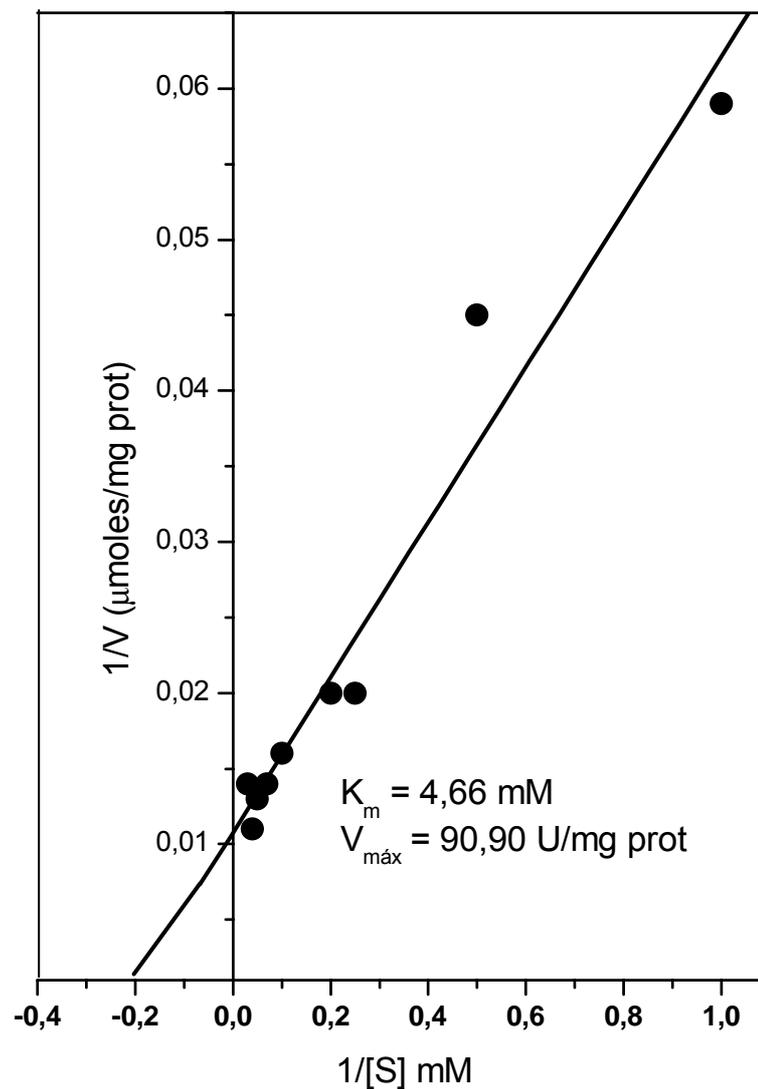


Figura 44 – Determinação do K_m e $V_{\text{máx}}$ para a trealase intracelular purificada de *M. pulchella*. Gráfico duplo-recíproco da hidrólise da trealose. Os ensaios foram realizados na faixa de concentração de 1mM a 30mM de trealose. A atividade trealásica foi determinada nas condições ótimas de atividade, conforme descrito em material e métodos (item 3.6.2).

4.9.9. Especificidade das trealases purificadas de *M. pulchella*

As trealases intra e extracelulares purificadas não hidrolisaram outros substratos como amido, avicel, lactose, maltose, sacarose e rafinose, e sim, as trealase hidrolisam somente trealose, conforme tabela 10.

Tabela 10 – Estudo da especificidade das trealases purificadas de *M. pulchella*

Substrato (concentração)	Atividade Específica (U/mg de proteína)	
	Intracelular	Extracelular
Amido 1%	ND	ND
Avicel 1%	ND	ND
Lactose 1%	ND	ND
Maltose 1%	ND	ND
Sacarose 1%	ND	ND
Rafinose 1%	ND	ND
Trealose 1%	3,84	37

Os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 5,0 (extracelular) e pH 5,5 (intracelular) com diferentes substratos, à 55°C por até 120 minutos. A atividade enzimática foi medida através do método de DNS (item 3.6.1) e por GOD (item 3.6.2). ND - Não detectável.

5. Discussão

5.1. Otimização da síntese de trealase intra e extracelular no meio de cultivo para Malbranchea pulchella

No início deste presente trabalho foi realizado estudo para otimizar o meio de cultivo de *M. pulchella*, a fim de se obter uma atividade trealásica máxima. Visto que o meio de cultivo M6 favoreceu a produção de trealases, outros parâmetros foram determinados tais como: melhor fonte de carbono, tempo de crescimento, influência da concentração de extrato de levedura no meio de cultivo, temperatura e pH ótimo.

M. pulchella produz bons níveis de trealase extracelular quando crescido em meio suplementado com glicose e maltose para trealase intracelular, através de meio crescido em rotação. No entanto, quando comparamos a produção da trealase extracelular crescida em incubadora que movimentava os frascos por excursão, a produção é 8 vezes maior, e comparando a melhor fonte de carbono deste tipo de crescimento, a produção é 11 vezes maior.

Há evidências na literatura, mostrando que o amido é a melhor fonte de carbono para as trealases de fungos termófilos como *Scytalidium thermophilum* e *Chaetomium thermophilum*, que são induzidas na presença deste polissacarídeo (Kadowaki et al., 1996; Almeida et al., 1999). A produção de trealases é fortemente influenciada por amido ou maltose como fonte de carbono provavelmente devido ao fato da existência de uma síntese de trealose alternativa, formando trealose a partir de amido ou maltose (Kadowaki et al., 1996, Giannesi et al., 2006), o que poderia explicar a alta produção de trealase nos fungos termófilos, quando crescidos em meio com amido ou maltose.

A produção aumentada de trealase ocorreu possivelmente pelo fato das células aderirem à parede do frasco de Erlenmeyer, e assim, elas são pouco

banhadas pelo meio, provocando sua dessecação. Assim, os níveis de trealose aumentariam para proteger as proteínas intracelulares (Singer & Lindquist, 1998), e para que os níveis de trealose voltem ao normal, há produção aumentada de trealase (Elbein, 1974; Elbein et al., 2003).

A curva de crescimento de *M. pulchella* foi analisada, e observamos que a atividade específica máxima das trealases extracelular (figura 6) e intracelular (figura 7) ocorreram com 96 horas de crescimento. Comparando com *C. thermophilum*, que produz bons níveis de trealase intracelular com 72 horas (Almeida, et al., 1999), *M. pulchella* necessita de 96 horas sob agitação para produzir bons níveis de trealase, visto que não conseguimos detectar a atividade significativa das trealases em crescimento estacionário e o tempo de incubação para a produção de enzimas varia muito nos diferentes organismos.

A determinação das melhores condições de incubação da enzima bruta com o substrato mostrou que a temperatura ótima corresponde à 55°C (figura 8). Esse valor está próximo da maioria das trealases de fungos termófilos, como *S. thermophilum* (Kadowaki, et al., 1996), *M. rouxii* (Lucio et al., 2005), *H. grisea* (Cardello et al., 1994), que apresentam a temperatura ótima em torno de 60°C. Entretanto, *C. thermophilum*, apresenta a temperatura ótima à 55°C (Almeida et al., 1999), assim como *M. pulchella* estudada no presente trabalho.

As trealases de *M. pulchella* apresentam pH ótimo de 5,0-5,5 (figuras 9 e 10). Esse valor é o mesmo encontrado para o pH ótimo da trealase de outro fungo termófilo, o *H. grisea* (Cardello et. al., 1994).

Normalmente para bom crescimento e produção de trealases, os fungos termófilos necessitam de concentrações de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Fora ilustrado na figura 11, que a produção máxima de trealase é obtida

quando o microrganismo é crescido em meio de cultura adicionado de 0,2 e 0,4% de extrato de levedura para enzima extra e intracelular, respectivamente. *M. pulchella* necessita de menos extrato de levedura quando comparado com os fungos *H. grisea* e *S. thermophilum*, que necessitam de uma concentração de aproximadamente 0,8% (Cardello et al., 1994; Kadowaki et al., 1996). No entanto, *C. thermophilum* necessita de uma concentração de 0,5% de extrato de levedura (Almeida et al., 1999).

Há relatos na literatura que as trealases ácidas de fungos termófilos podem ser ativadas por cálcio, sugerindo a existência de uma nova classe de trealases denominada de “mista”, na qual está presente somente em fungos termófilos. Dessa forma, a trealase extracelular em extrato bruto, mostrou que a trealase extracelular de *M. pulchella* é ativada cerca de 1,5 vez por cálcio, assim como as trealases de *H. grisea* (Zimmermann et al., 1990; Cardello et al., 1994) e de *C. thermophilum* (Almeida et al., 1998). No entanto, ao contrário da trealase extracelular, a intracelular não é ativada por cálcio (figuras 12 e 13).

Através do estudo do efeito da concentração de açúcar redutor presente no meio de cultivo, podemos notar que em condição agitada, passada 72 horas, o açúcar redutor produzido pela degradação do amido e da maltose é rapidamente consumido (figuras 14 e 15).

Contudo, na condição estacionária, não fora obtido a produção de trealases tanto intra como extracelular. Mesmo na presença de amido (figura 16) como fonte de carbono, ocorre primeiramente a sua quebra, e conseqüentemente, a produção de açúcares redutores que atinge o pico por volta de 96 horas, no qual é mantido até 168 horas. Após esse período, o nível de malto-oligossacarídeos começa a cair seqüencialmente, visto que em meios estacionários, é esperado o crescimento mais tardio devido à troca de nutrientes ser mais lenta.

Quando se utiliza maltose como fonte de carbono no crescimento estacionário, o início da queda da produção de açúcar redutor ocorre por volta de 168 horas. Antes deste período, ocorre oscilação nos níveis de açúcares redutores, e isso provavelmente ocorre pelo fato da maltose ter atividade de transglicosilação produzindo componentes α -glicosilados. Essa hipótese é confirmada por Gianessi et al. (2006) que purificou uma α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum* em condições estacionária, a partir de 120 horas, verificando a formação de trealose a partir de amido.

Baseado nessas evidências, podemos propor que o fungo não cresce muito bem em condição estacionária, devido a sua alteração entre a fase lag e log de crescimento.

5.2. Purificação das trealases de *M. pulchella*

Durante o procedimento de purificação das enzimas trealases, foram utilizados três cromatografias para a enzima extracelular, e duas cromatografias para a enzima intracelular. Há relatos de que as trealases de *H. grisea* (Cardello et al., 1994), de *S. thermophilum* (Kadowaki et al, 1996) e *C. thermophilum* (Almeida et al., 1999) foram purificadas através de cromatografia de troca iônica. De fato, também fora purificada a trealase de *C. thermophilum* através de cromatografia de interação hidrofóbica (Almeida et al., 1999).

No final do processo de purificação, obteve-se 84,50 U/mg de proteína da trealase extracelular (tabela 5). Esse valor pode ser considerado muito bom quando comparado com outras trealases extracelulares, como do fungo *Trichoderma reesei*, que no final do processo de purificação produz 50 U/mg de proteína (Vijayakumar et

al., 1978). Já o fungo *H. grisea* produz 9,1 U/mg de proteína (Zimmermann et al., 1990), o *C. thermophilum*, produz 0,34 U/mg de proteína (Almeida et al., 1999) e o *M. rouxii*, produz 1,72 U/mg de proteína (Lucio et al., 2000), valores menores quando comparado com a trealase extracelular de *M. pulchella* estudado no presente trabalho. No entanto *S. thermophilum*, produz 120 U/mg de proteína de trealase extracelular (Kadowaki et al., 1996), valores expressivo, quando comparamos com o fungo estudado neste presente projeto.

Entretanto, no final do processo de purificação usado para trealase intracelular, obteve-se uma atividade específica de 50 U/mg de proteína (tabela 6). Na literatura encontramos outros fungos termófilos, nos quais as trealases intracelulares foram purificadas apresentando expressivas atividades específicas. Um exemplo é o caso do fungo *S. thermophilum*, que produz aproximadamente 3705 U/mg de proteína de trealase intracelular (Kadowaki et al., 1996). Para o *C. thermophilum* foi padronizado um procedimento que no final resulta em atividade específica de aproximadamente 119 U/mg de proteína (Almeida et al., 1999). Dessa forma, o valor encontrado para o procedimento de purificação da trealase intracelular do *M. pulchella* poderia ser considerado baixo, mas mesmo assim o valor é alto se compararmos com os procedimentos utilizados para mesófilos.

Num outro estudo visando verificar as estimativas das massas moleculares das trealases extra e intracelular purificadas, foram realizadas o procedimento de SDS-PAGE (figuras 24 e 29 para extracelular), assim como a cromatografia de filtração (figuras 25 e 30 para intracelular). A partir de diferentes valores de massas moleculares obtidos pelos dois métodos usados para a trealase extracelular (52 kDa por SDS-PAGE e 104 kDa por filtração em gel) podemos propor que a trealase de *M. pulchella* possui duas subunidades de mesma massa, tratando-se portanto de

homodímeros. Além disso, para trealase intracelular, com os diferentes valores de massas moleculares obtidos pelos dois métodos usados (50 kDa para SDS e 150 kDa para HPLC), podemos propor que a trealase de *M. pulchella* possui 3 subunidades de mesma massa, se tratando portanto de homodímeros.

Os valores de massas moleculares encontrados na literatura para algumas trealases ácidas de outros organismos também apresentam estruturas oligoméricas. A massa molecular da trealase extracelular de *M. pulchella* é próxima a encontrada para a trealase ácida de *M. rouxii*, cuja a massa molecular apresenta 110 kDa (Lucio et al., 2000). Não obstante, quando comparamos as massas moleculares das trealases com outros organismos, notamos que elas estão dentro da faixa das trealases descritas na literatura. Como exemplo, podemos citar *C. thermophilum*, cuja trealase ácida é formada por duas subunidades de 98 kDa (Almeida et al., 1999). Também podemos elucidar o fungo *H. grisea*, que possui uma trealase ácida conidial composta por três subunidades de 105 kDa, 98 kDa e 84 kDa (Zimmermann et al., 1990). A trealase ácida de *M. rouxii* possui duas subunidades diferentes, de 45 e 66 kDa (Lucio et al., 2000). A trealase ácida intracelular de *N. crassa*, apresenta 4 subunidades de 88 kDa (White et al., 1985), e por fim, o *S. thermophilum* possui a trealase extracelular formada por 5 subunidades de 82 kDa (Kadowaki et al., 1996).

5.3. Caracterização das trealases purificadas de *M. pulchella*

Os pls das trealases de *M. pulchella* encontrados para trealase extracelular (3,5) e intracelular (3,0) são próximas aos pls encontrados para outras trealases de fungos termófilos, como *C. thermophilum* que apresenta pl para a trealase extracelular de 3,9 (Almeida et al., 1999). Já a trealase de *S. thermophilum* possui pl

em 3,7 e 3,4 para trealase extracelular e intracelular, respectivamente (Kadowaki et al., 1996). As trealases de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* exibe pI de 6,69 (Aquino et al., 2005), sendo assim, diferente dos padrões dos pIs que são próximos de 4,0 quando consideramos a maioria das trealases descritas.

De fato, podemos justificar que as trealases do fungo *M. pulchella* aderem a coluna de DEAE, no pH 7,0, devido aos seus valores de pIs encontrados para trealase extracelular (3,5) e intracelular (3,0) no presente trabalho.

A temperatura ótima aparente de atividade das enzimas foram 55°C para trealase extracelular (figura 35) e 50°C para trealase intracelular (figura 36). Essas temperaturas quando comparadas com as trealases dos demais termófilos estão dentro da faixa encontrada, as quais variam de 50 à 60°C (Zimmermann et al. 1990; Kadowaki et al., 1996; Almeida et al., 1999). Em temperaturas superiores à 55°C observamos uma diminuição da atividade trealásica indicando desnaturação protéica da enzima. Podemos notar também, que as trealases de *M. pulchella* tanto purificada quanto em extrato bruto, exibem uma temperatura ótima de 50-55°C.

As trealases de *M. pulchella* exibem pHs de 5,0-5,5 (figuras 33 e 34). Estes pHs condizem com aqueles encontrados na literatura para trealases ácidas em diversos organismos, como por exemplo, o fungo termófilo *H. grisea* que possui pH ótimo em 5,5 (Cardello et al., 1994). Entretanto, quando comparamos os pHs das trealases de *M. pulchella* em extrato bruto e pura, notamos que praticamente o pH não muda após o processo de purificação.

A trealase extracelular é 6 vezes mais ativa na presença de manganês 20 mM e 1,25 vez mais na presença de cobalto 10 mM. A trealase intracelular foi ativada 4 vezes mais na presença de manganês 20 mM, e 2,4 vezes mais na presença de cobalto 40 mM. Contudo, mesmo variando a concentração de cálcio, houve inibição

da trealase extracelular pelo mesmo. Esses dados sugerem a existência de um grupo de trealases que são ativadas por cobalto e manganês.

Assim como em *M. pulchella*, existem outros termófilos onde há ativação das trealases por manganês e cobalto, como por exemplo, o *S. thermophilum* (Kadowaki et al., 1996), *C. thermophilum* (Almeida et al., 1999) e *H. grisea* (Zimmermann et al., 1990).

Os íons possivelmente agem estabilizando a conformação da enzima ou promovendo agregação das duas subunidades, que juntas poderiam ser mais ativas. Esta explicação foi utilizada para trealase do *Mycobacterium smegmatis*, a qual é ativada por manganês e fosfato inorgânico (Carrol et al., 2007). Outra possível explicação para o efeito dos íons na trealase intra e extracelular de *M. pulchella* é que eles poderiam desagregar a enzima, e conseqüentemente os monômeros seriam mais ativos. Tal fenômeno foi demonstrado para o efeito do cálcio na trealase intracelular de *H. grisea* (Cardello et al., 1994).

No presente trabalho, as trealases de *M. pulchella* sofreram leve inibição por ATP, ADP e AMP, sendo inferior a 15% (tabela 9). A inibição por ATP é mais evidente na trealase intracelular na presença de ATP 10 mM, na qual a enzima sofre 44% de inibição. Normalmente as trealases de fungos termófilos sofrem maior inibição, como a trealase do *C. thermophilum*, cuja inibição por ATP é de 80% na concentração de 1 mM (Almeida et al., 1999). A trealase extracelular de *S. thermophilum* sofre cerca de 88% de inibição por ATP 10 mM (Kadowaki et al., 1996). A trealase de *C. thermophilum*, sofre aproximadamente 53 e 55% de inibição com 1mM de ADP e AMP, respectivamente (Almeida et al., 1999). Além do mais, *S. thermophilum* sofreu cerca de 84 e 57% de inibição com 10 mM de ADP e AMP, respectivamente (Kadowaki et al., 1996).

Em *S. thermophilum*, a inibição por AMP não é expressiva, quando comparado com a inibição por ADP e ATP, que é de 88 e 94%, respectivamente.

15 minutos, a segunda se inativa ao redor dos 45 minutos e a terceira se mantém constante. Esta hipótese também é coerente com os dados obtidos em SDS-PAGE e filtração em gel, os quais sugerem a existência de três subunidades idênticas.

Comparando a meia vida da trealase intracelular com a extracelular, podemos elucidar que a extra é bem mais estável, visto que em extrato bruto ela chega a ser 3,7 vezes mais termorresistente, quando comparado com a intracelular (figuras 18 e 19).

As estabilidades térmicas das enzimas também foram testadas frente ao substrato (trealose), sendo que a enzima extracelular quando incubada a 65°C, praticamente não perde sua atividade ao longo dos 60 minutos. O mesmo acontece com a enzima intracelular à 55°C, onde a enzima tem meia vida a 46 minutos. A 60°C, praticamente não notamos diferença na estabilidade térmica da enzima incubada com trealose e incubada com água. Isto provavelmente ocorre devido ao papel protetor da trealose em proteínas e macromoléculas (Singer & Lindquist, 1998), que em altas temperaturas age protegendo proteínas e macromoléculas.

Há relatos na literatura, evidenciando que as trealases de fungos termófilos são termoestáveis. Como exemplo, temos a trealase de *C. thermophilum* var. *coprophilum*, totalmente estável a 50°C e com meia vida de 6 minutos a 65°C (Almeida et al., 1999). Contudo, a trealase extracelular de *M. pulchella* possui uma meia vida de 9,8 min a 65°C, sendo mais termoestável do que a trealase de *C. thermophilum* (Almeida et al., 1999) e mais termoestável do que a trealase de *S. thermophilum*, que possui meia vida de 4,5 minutos quando incubada a 65°C (Kadowaki, et al., 1996).

O valor de K_m obtido para trealase extracelular foi de 2,72 mM (figura 42) e o valor de K_m obtido para trealase intracelular foi de 4,66 mM (figura 43). Esses

valores são próximos ao encontrado na trealase extracelular de *S. thermophilum*, cujo K_m foi de 3,58 mM (Kadowaki et al.; 1996). A trealase intracelular de *S. thermophilum* apresenta um K_m menor (K_m 2,24 mM) (Kadowaki et al.; 1996) e a trealase de *H. grisea* apresenta K_m de 2,3 mM (Zimmermann et al., 1990). Entretanto, *C. thermophilum* apresenta K_m bem menor para trealase extracelular, cujo K_m foi de 0,63 mM (Almeida et al., 1999).

Não obstante, algumas trealases exibem K_m mais baixo, como por exemplo, *H. lanuginosa* que tem K_m de 0,4 mM (Prasad & Maheshwari, 1978). As trealases de *M. rouxii*, cujo K_m foi de 0,61 mM (Lucio et al., 2000) e as trealases de *R. microsporus*, apresentaram K_m próximos de 0,2 mM (Aquino et al., 2005), também considerados K_m baixos. Usualmente valores de K_m alto são pertinentes a trealases reguláveis e mistas (Jorge et al., 1997).

A trealase extracelular de *M. pulchella* possui 19% do conteúdo de carboidrato, enquanto que a intracelular possui 66%. Alguns autores sugerem que a natureza glicoprotéica das trealases ácidas está relacionada à sua alta estabilidade térmica. No entanto, a trealase de *C. thermophilum* não é glicosilada e apresenta alta estabilidade em presença de cálcio (Almeida et al., 1999), enquanto que a trealase de *S. thermophilum* apresenta aproximadamente 81% do conteúdo de carboidrato e alta estabilidade térmica (Kadowaki et al., 1996).

Por outro lado, a trealase extracelular de *M. pulchella* apresentou 19% de carboidratos, valor próximo ao da trealase de *Thermomyces lanuginosus*, de aproximadamente 20% (Bharadwaj & Maheshwari, 1999). Já a trealase intracelular de *M. pulchella* apresentou aproximadamente 66% de carboidrato, que é um valor próximo ao encontrado para *H. grisea*, com 56% de carboidratos (Zimmermann et

al., 1990) e também para *R. microsporus*, com 72% de carboidratos (Aquino et al., 2005).

Em achados na literatura, encontramos que o teor de carboidrato está diretamente relacionado com a termoestabilidade da enzima, ou seja, enzimas com alto teor de carboidrato seriam mais resistentes do que as enzimas com baixo teor de carboidrato. Para nossa surpresa, comparando a trealase extracelular (19%), com a trealase intracelular (66%), e comparando as suas termoestabilidades, podemos notar que ocorre justamente o contrário, visto que a trealase extracelular (com baixo teor de carboidrato) é mais termoestável do que a trealase intracelular (com alto teor de carboidrato).

As trealases de *M. pulchella* hidrolisaram somente trealose, o que era esperado, considerando que as trealases são específicas para a trealose (Kadowaki et al., 1996; Almeida et. al., 1999).

6. Conclusões

A análise global dos resultados obtidos e apresentados nesta Dissertação de Mestrado permite as seguintes conclusões:

1. O fungo termófilo *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* produz bons níveis de trealase quando crescido em meios contendo glicose, trealose, maltose, amido, xilose, arabinose, frutose ou manose. Aparentemente não existe especificidade para a fonte de carbono, visando a produção da trealase em *M. pulchella*;
2. O crescimento em incubadoras que movimentam os cultivos por excursões aumenta os níveis de trealase em 10 ou mesmo 20 vezes, sugerindo que outros fatores além dos nutricionais podem atuar nesta condição de agitação da cultura e que promovem a produção da trealase;
3. A agitação dos meios de cultivos por excursão gera estresse, uma vez que a tendência do movimento é jogar as células para fora do meio e as mesmas aderem fortemente nas paredes dos frascos e são somente banhadas pelo meio de cultura;
4. Os resultados não permitem ainda a afirmação de que as trealases intra e extracelular são diferentes quando o fungo é desenvolvido em meios com agitação orbital ou em meios em agitação por excursão. Entretanto, seria interessante pesquisar se existem diferenças e no caso de agitação por excursão ocorre a produção de trealases mais relacionadas com o estresse (dessecamento parcial) do com as condições relacionadas com a fonte de carbono;
5. Os dados de utilização da fonte de carbono e aparecimento da enzima mostram que as trealases intra e extracelular ocorrem logo após o consumo de mais de 90% da fonte de carbono. Estes dados sugerem fortemente que a produção da trealase em *M. pulchella* não é vinculada à fonte de carbono e sim ligada ao estágio de desenvolvimento do fungo;

- 6.** Foram padronizados métodos relativamente simples para a purificação das trealases intra e extracelular de *M. pulchella*. As trealases usualmente são difíceis de purificar, exigindo vários passos cromatográficos e terminando com pouca proteína. Os métodos utilizados para a purificação das trealases de *M. pulchella* envolvem somente três passos cromatográficos na seqüência: DEAE-celulose, Phenyl Sepharose e DEAE-celulose. Após este procedimento as enzimas estavam puras conforme análise em PAGE E SDS-PAGE;
- 7.** A análise em PAGE, SDS-PAGE e em coluna de filtração (Bio-Sil-Sec-400 da BIO RAD), mostrou que a trealase extracelular apresenta uma massa molecular de 104 kDa e é constituída de duas subunidades idênticas de 52 kDa). O mesmo tipo de análise mostrou que a intra é constituída de 3 subunidades idênticas e exibindo uma massa molecular aparente de 150 kDa. Estes resultados estão coerentes com a maioria das massas moleculares de trealases de outros microrganismos descritos na literatura e sugerem que as enzimas de *M. pulchella* intra e extracelular podem ser diferentes;
- 8.** Os teores de açúcar encontrados para as trealases foram 19% e 66% para extra e intracelular, respectivamente. Os pontos isoelétricos foram 3,5 e 3,0 para extra e intra, respectivamente. Os dados obtidos colaboram fortemente com a hipótese que as trealases extracelular e intracelular de *M. pulchella* são enzimas diferentes;
- 9.** Os valores de pH e temperatura ótimos para as duas enzimas purificadas também sugerem que se tratam de enzimas diferentes, embora possam ser oriundas de um mesmo gene;
- 10.** O efeito de íons (Mn^{+2} , Co^{+2}) na atividade trealásica de *M. pulchella* sugerem que os mesmos participam na estabilização da conformação da enzima ou na manutenção do estado de agregação que usualmente ocorre nas trealases. É

importante salientar que as enzimas não são ativadas por cálcio e sim inibidas, sugerindo mais uma vez que se trata de enzimas diferentes;

11. O efeito inibidor de ATP e ADP nas trealases de *M. pulchella* não são muito evidentes como acontece para as demais trealases mistas descritas para os fungos termófilos *Humicola grisea* var. *thermoidea*; *H. insolens*; *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* e *Scytalidium thermophilum*. Desta forma, sugerindo que mesmo entre os fungos termófilos pode existir uma diversidade grande de trealases;

12. A análise da estabilidade térmica das trealases mostrou curvas bifásicas sugerindo a existência de dois tipos de populações de moléculas de trealases. Este tipo de dado obtido é coerente com a análise das enzimas purificadas em SDS-PAGE que mostra a existência de homodímeros. As duas enzimas foram protegidas pela presença de trealose durante o choque térmico. Este tipo de resultado era o esperado, uma vez que a trealose é reconhecida como um açúcar importante para a proteção de macromoléculas **in vitro** e **in vivo**. As enzimas nos extratos brutos mostraram-se mais resistentes ao calor do que quando purificadas. Tal fato pode ser explicado pela retirada de íons importantes para proteção térmica ou mesmo de artefatos gerados durante o procedimento de purificação. Além disso, podemos pensar de existências de fatores protéicos existentes no extrato bruto tipo calmodulina. Este argumento é interessante e pode ser sustentados pelo fato da trealase presente no filtrado bruto ser ativada por cálcio e perder esta ativação após a sua purificação;

13. A análise global dos resultados apresentados sugere fortemente a existência uma diversidade muito grande de trealases existentes nos diferentes organismos e principalmente nos fungos filamentosos.

7. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, E.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; TEREZI, H.F. & JORGE, J.A.- Biochemical characterization of a Ca^{2+} -dependent acid trehalase activity from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*. **FEMS Microbiol. Lett.** 171: 11-15, 1999.

AMARAL, F.C. – Clonagem e caracterização molecular da trealase neutra de *Kluyveromyces lactis*. Tese (doutorado). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. p.103, 1996.

ANANDARAJAH, K. & MCKERSIE, B. D. - Manipulating the desiccation tolerance and vigor of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with sucrose, heat shock and abscisic acid. **Plant Cell Rep.** 9: 451-455, 1990.

AQUINO, A. C. M. M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; JORGE, J. A.; TEREZI, H. F. & POLIZELI, M. L. T. M. – Characterization of an acid trehalase produced by the thermotolerant fungus *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: Biochemical properties and immunochemical localisation. **FEMS Microbiol. Lett.** 251: 169-175, 2005.

ATTFIELD, P. V.; RAMAN, A. & NORTHCOTT, C. J. - Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains that accumulate relatively low concentrations of trehalose, and their application in testing the contribution of the disaccharide to stress tolerance. **FEMS Microbiol. Lett.** 94: 271-276, 1992.

BELL, W.; KLAASSEN, P.; OHANACKER, M.; BOLLER, T.; HERWIJER, M.; SCHOPPINK, P.; VAN DER ZEE, P. & WIENKEN, A. - Characterization of the 45KDA subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identify with the product of CIF1, a regulator a carbon catalytic inactivation. **Eur. J. Biochem.** **209**: 951-959, 1992.

BENAROUDJ, N.; LEE, D. H. & GOLDBERG, A. L. - Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. **J. Biol. Chem.** **276**: 24261-24267, 2001.

BERGMEYER, H. U. & BERNT, E. – Methods of enzymatic analysis. First edition, **Worth Publishers** (1974).

BHARADWAJ, G. & MAHESHWARI, R. – A comparison of thermal characteristics and kinetic parameters of trehalases from a thermophilic and a mesophilic fungus. **FEMS Microbiol. Lett.** **181**: 187-193, 1999.

BIRCH, G. B. – Trehaloses. **Adva. Carbohydrate Chem.** **18**: 201-25, 1963.

BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H. J.; Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in Polyacrylamide gels. **Electrophoresis.** **81**: 93-99, 1987.

BONINI, B.M.; NEVES, M.J.; JORGE, J.A. & TERENCEZI, H.F. – Effects of temperature shifts on the metabolism of trehalose in *Neurospora crassa* wild type and a trehalase-

deficient (tre) mutant. Evidence against participation of periplasmic trehalase in the catabolism of intracellular trehalose. **Biochim. Biophys. Acta** 1245: 339-347, 1995.

BONINI, B.M.; VAN DIJCK, P. & THEVELEIN, J.M. – Trehalose metabolism: Enzymatic Pathways and Physiological Functions. The Mycota III **Biochem. Molec. Biol.** 2nd Edition – Springer Verlag, Berlin, 2004.

BRENNAN, P. J. & NIKAIDO, H. - The envelope of mycobacteria. **Annu. Rev. Biochem.** 64: 29-63, 1995.

CABIB, E. & LELOIR, L.F. – The Biosynthesis of trehalose phosphate. **J. Biol. Chem.** 231: 259-275, 1958.

CARDELLO, L.; TERENCEI, H.F.; JORGE J.A. – A cytosolic trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Microbiol.** 140: 1671-1677, 1994.

CARPENTER, J. F. & CROWE, J. H. – The mechanisms of cryoprotection of proteins by solutes. **Cryobiology.** 25: 244-255, 1989.

CARROIL, J. D.; PASTUSZAK, I.; EDAVANA, V. K.; PAN, Y. T. & ELBEIN, A. D. – A novel trehalase from *Mycobacterium smegmatis* – purification, properties, requirements. **FEBS Journal.** 274: 1701-1714, 2007.

COLAÇO, C.; SEM, S.; THANGAVELY, M.; PINDER, S.; ROSER, B. – Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. **Biotechnol.** 10: 1007-1011, 1992.

COONEY, D. G. & EMERSON, R. - Thermophilic fungi: na account of their biology, activities and classification. **San Francisco** - W. H. Freeman, 1964.

CROWE, J. H., CARPENTER, J. F. & CROWE, L. M. – The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annu. Rev. Physiol.** 60: 73-103, 1998.

CROWE, L. M. & CROWE, J. H. - Trehalose and dry dipalmitoyl phosphatidylcholine revisited. **Biochim. Biophys. Acta.** 946: 193-201, 1988.

CSONKA, L.N.; Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiol. Rev.** 53: 121-147, 1989.

d'ENFERT, C.; BONINI, B.M.; ZAPPELLA, P.D.A.; FONTAINE, T.; SILVA, A.M. & TERENCEZI, H.F. – Neutral trehalases catalyze intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. **Mol. Microbiol.** 32: 471-483, 1999.

DAVIS, B. J. – Disk electrophoresis. **Am. N.Y. Acad. Sci.** 121: 404-427, 1964.

DE VIRGILIO, C.; BURCKERT, N.; BELL, W.; JENO, P.; BOLLER, T. & WIENKEN, A. - Disruption of TPS2, the gene encoding the 100KDa subunit of trehalose-6-

phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of T6P and loss of T6P phosphatase activity. **Eur. J. Biochem.** 212: 315-323, 1993.

De VIRGILIO, C.; SIMMEN, U.; HOTTINGER, T.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. – Heat shock induces enzymes of trehalose metabolism, trehalose accumulation and thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*, even in the presence of cycloheximide. **FEBS Lett.** 273: 107-110, 1990.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. – Colorimetric method for determination of sugars and related Substances. **Anal. Chem.** 28: 350-356, 1956.

EIBEIN, A.D. – The metabolism of α -trehalose. **Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.** 30: 227-256, 1974.

ELBEIN, A.D.; PAN, Y.T.; PASTUSZAK, I. & CARROL, D. – New insights on trehalose: a multifuncional molecule. **Glycobiol.** 13: 17-27, 2003.

EMYANITOFF, R.G. & WRIGHT, B.E. – Effect of intracelullar carbohydrates on heat resistance of *Dictiostellium discoideum* spores. **J. Bacteriol.** 140: 1008-1012, 1979.

FRANKS, F.; HATLEY, R.H.M. & MATHIAS, S.F. – Materials science and the production of shelf-stable biologicals. **Biopharm.** 04: 38-42, 1991.

GADD, G.M.; CHALMERS, K. & REED, R. H. – The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.** 48: 249-254, 1987.

GARG, A. K.; KIM, J. K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. D.; KOCHIAN, L. V. & WU, R. J. – Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stress. **Pnas.** 99: 15898-903, 2002.

GIAEVER, H.M.; STYRVOLD, O.B.; KAASEN, I. & STROM, A.R. – Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *E. coli*. **J. Bacteriol.** 170: 2841-2849, 1988.

GIANNESI, G. C.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZI, H. F. & JORGE, J. A. – A novel α -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* that converts maltose into trehalose: Purification and partial characterization of the enzyme. **Process Biochemistry.** 41: 1729-1735, 2006.

HANKS, D.L. & SUSSMAN, A.S. – Localization of trehalose in the ascospores of *Neurospora*: Relation to ascospores dormancy and germination. **J. Bacteriol.** 115: 592-599, 1969.

HAZELL, B. W.; KLETSAS, S.; NEVALAINEN, H. & ATTFIELD, P. V. - Involvement of CIF1 (GGS1/TPS1) in osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters.** 414: 353-358, 1997

HECKER, L.T. & SUSSMAN, A.S. – Localization of trehalase in the ascospores of *Neurospora*; Relation to ascospore dormancy and germination. **J. Bacteriol.** 115: 592-599, 1973.

HEY-FERGUSON, A.; MITCHELL, M. & ELBEIN, A. D. - Trehalose metabolism in germinating spores of *Streptomyces hygroscopicus*. **J. Bacteriol.** 116: 1084-85, 1973.

HOTTINGER, T.; BOLLER, T. & WIEMKEN, A. – Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. **FEMS Lett.** 220: 113-115, 1987.

INOUE, H. & SHIMODA, C. – Changes in trehalose content and trehalase activity during spore germination in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. **Arch. Microbiol.** 129: 19-22, 1981.

JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M.; THEVELEIN, J.M. & TEREZI, H.F. – Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. **FEMS Microbiol. Lett.** 154: 165-171, 1997.

KADOWAKI, M.K.; POLIZELI, M.L.T.M.; TEREZI, H.F. & JORGE, J.A. – Characterization of trehalase activities from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1291: 199-205, 1996.

KANDROR, O.; DELEON, A. & GOLDBERG, A. L. - Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99: 9727-9732, 2002.

KONO, Y.; TAKEDA, S. & KAMEDA, Y. - Lethal activity of a trehalase inhibitor, validoxylamine A, against *Mamestra Brassicae* and *Spodoptera litura*. **J. Pesticide Sci.** 19: 39-42, 1994.

KONO, Y.; TAKEDA, S.; KAMEDA, Y.; TAKAHASHI, M.; MATSUSHITA, K.; NISHIMA, M. & HORI, E. - Lethal activity of trehalase inhibitor, validoxylamine A, and its influence on the blood sugar level in *Bombix mori*. **Appl. Entomol. Zool.** 28: 379-86, 1993.

LAEMMLI, U. K. – Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685, 1970.

LANGE, L.; BREINHOLT; RASMUSSEN, F. W. & NIELSEN, R. I. - Microbial fungicides: the natural choice. **Pesticide Sci.** 39: 155-60, 1993.

LEDERER, E. - Cord factor and related trehalose esters. **Chem. Phys. Lipids.** 16: 91-106, 1976.

LELOIR, L. F. & CABIB, E. - The enzymatic synthesis of trehalose phosphate. **Am. Chem. Soc.** 75: 5445-5446, 1953.

LEVINE, H. & SLADE, L. – Another view of trehalose for drying and stabilizing biological materials. **Biopharm.** 5: 36-40, 1992.

LILLIE, S.H. & PRINGLE, J.R. – Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **J. Bacteriol.** 143: 1384-1394, 1980.

LINEWEAVER, H. & BURK, D. – The determination of the enzyme dissociation. **J. Am. Chem. Soc.** 56: 658-666, 1934.

LONDESBOROUGH, J. & VUORIO, O. - Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex from baker's yeast: purification of a proteolytically activated form. **J. Gen. Microbiol.** 137: 323-330, 1991.

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

LÚCIO, A. K. B.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. & TEREZI, H. F. - Stimulation of hyphal growth in anaerobic cultures of *Mucor rouxii* by extracellular trehalose. Relevance of cell wall-bound activity of acid trehalase for trehalose utilization. **FEMS Microbiol. Lett.** 182: 9-13, 2000.

LÚCIO-ETEROVIC, A. K. B.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. & TEREZI, H. F. – Biochemical characterization of the trehalase of thermophilic fungi: An Enzyme with

mixed properties of neutral and acid trehalase. **Biochim. Biophys. Acta.** 1723: 201-207, 2005.

McBRIDE, M.J. & ZUSMAN, D.R. – Trehalose accumulation in vegetative cells and spores of *Myxococcus xanthus*. **J. Bacteriol.** 171: 6383-9386, nº11, 1989.

MILLER, G. L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analyt. Chem.**, 31: 426-428, 1959.

NEVES, M. J. & FRANÇOIS, J. - On the mechanisms by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.** 288: 859-64, 1992.

NEVES, M.J.; JORGE, J.A.; FRANÇOIS, J. & TERENCEZI, H.F. - Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and on the induction of thermotolerance in *Neurospora crassa*. **FEBS Lett.** 283: 19-22, 1991.

NICOLAUS, B.; GAMBACORTA, A.; BASSO, A. L.; RICCIO, R. & DEROSA, M. - Trehalose in archaebacteria. **Syst. Appl. Microbiol.** 10: 215-19, 1988.

NWAKA, S.; MECHLER, B. & HOLZER, H. - Deletion of ATH1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. **FEBS Letts.** 386: 235-238, 1996.

O'FARREL, P.Z.; GOODMAN, H. M. & O'FARREL, P. H. – High resolution two dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell. 12**: 1133-1142, 1977.

PANEK, A.D. - Trehalose metabolism - new horizons in technological applications. **Braz. J. Med. Biol. Res. 28**: 169-181, 1995.

PRASAD, A.R.S. & MAHESWARI, R. - Purification and properties of trehalase from the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. **Biochim. Biophys. Acta 525**: 162-170, 1978.

ROSER, B. J. - Trehalose, a new approach to premium dried food. **Trends Food Sci Technol. 2**: 166-169, 1991.

SANO, F.; ASAKAWA, N.; INOUE, Y. & SAKURAI, M. – A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. **Cryobiology. 39**: 80-87, 1999.

SCHIRALDI, C.; LERNIA, I. & ROSA, M. - Trehalose production: exploiting novel approaches. **Trends Biotechnol. 20(10)**: 420-425, 2002.

SINGER, M. A. & LINDQUIST, S. - Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. The Yin and Yang of trehalose. **Trends Biotechnol. 16**: 460-468, 1998.

STAMBUCK, E. U.; DE ARAUJO, P. S.; PANEK, A. D. & SERRANO, R. - Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.** 237: 874-881, 1996.

SU, Z. H.; IKEDA, M.; SATO, Y.; SAITO, H.; IMAI, K.; ISOBE, M. & YAMASHITA, O. - Molecular characterization of ovary trehalase of the silkworm *Bombix mori* and its transcriptional activation by diapause hormone. **Biochim. Biophys. Acta.** 1218: 366-74, 1994.

SUSSMAN, A. S. - The role of trehalose in the activation of dormant ascospores of *Neurospora*. **Rev. Biol.** 36: 109-116, 1961.

THEVELEIN, J. M. - Activation of trehalase by membrane depolarizing agents in yeast ascospores. **J. Bacteriol.** 158: 337-339, nº1, 1984 (a).

THEVELEIN, J. M. - Regulation of trehalase activity by phosphorylation-dephosphorylation during developmental transitions in fungi. **Exp. Mycol.** 12: 1-12, 1988.

THEVELEIN, J. M. - Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function, in the Mycota III. **Biochemistry and Molecular Biology**, Springer Verlag, Berlin, 1996.

THEVELEIN, J. M. - Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiol. Rev.** 48: 42-59, 1984 (b).

THEVELEIN, J. M. & JONES, K. A. – A reversibility characteristics of glucose-induced trehalase activation associated with the breaking of dormancy in yeast ascospores. **Eur. J. Biochem.** 136: 583-7, 1983.

VAN ASSCHE, J. A.; VAN LAERE, A. J. & CARLIER, A. R. – Trehalose metabolism in dormant and activated spores of *Phycomyces blakesleenus*. **Planta.** 139: 171-6, 1978.

VAN LAERE, A. – Trehalose, reserve and or stress metabolic? **FEMS Microbiol. Rev.** 63: n°3, 201-10, 1989.

VANDERCAMMEN, A.; FRANÇOIS, J. M. & HERS, H. G. - Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.** 182: 613-620, 1989.

VUORIO, O.; KALKKINEM, N. & LONDESBOROUGH, J. - Cloning of two related genes encoding the 56kDa and 123kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.** 216: 846-861, 1993.

WEIMKEN, A. - Trehalose in yeast, stress protectante rather than reserve carbohydrate. **Ant. Van. Leeuw.** 59: 209-17, 1990.

WHITE, C.; LEE, D. B. & FREE, S. *Neurospora* trehalase and its structural gene. **Genetics.** 110: 217-227, 1985.

WIGGERS, H. A. L. - Trehalose dans le segle ergote. **Ann. Oharm. Pozna. 01**: 129, 1832.

ZIMMERMANN, A. L. S.; TERENZI, H. F. & JORGE, J. A. - Purification and properties of an extracellular conidial trehalase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Bioch. Biophys. Acta. 1036**: 41-46, 1990.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)