

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

“Caracterização bioquímica de uma maltase de *Chaetomium thermophilum* e *Saccharomycopsis fibuligera*: descrição de um novo sistema enzimático de síntese de trealose”.

GIOVANA CRISTINA GIANNESI

Orientador: Prof. Dr. João Atílio Jorge

Tese apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- USP, como parte das exigências para a obtenção do Título de DOUTOR em CIÊNCIAS- Área de Concentração: BIOLOGIA COMPARADA.

Ribeirão Preto

2006

INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xiii

SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvii
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
1.1. Estrutura e Ocorrência.....	1
1.2. Degradação de trealose.....	2
1.3. Ação catalítica das α -glucosidases.....	3
1.4. Funções da trealose.....	7
1.5. Síntese de trealose.....	10
1.6. Obtenção comercial da trealose.....	16
 2. OBJETIVO GERAL.....	 17
2.1. Objetivos específicos.....	17
 3. MATERIAL & MÉTODOS.....	 18
3.1. Organismos.....	18
3.2. Manutenção e crescimento.....	18
3.2.1. Meio sólido.....	18
3.2.1.1. <i>Chaetomium thermophilum</i>	18
3.2.1.2. <i>Mutante exo-1 de Neurospora crassa</i>	19
3.2.1.3. <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.2.2. Meio líquido.....	19
3.2.2.1. Meio de cultivo <i>M₅</i>	19
3.2.2.2. Meio de cultivo <i>YPS 1</i>	20
3.2.2.3. Meio líquido de Vogel (Vogel, 1956)	20
3.2.2.4. Meio de cultivo <i>YPS 2 modificado</i>	20
3.3. Determinação da atividade de α -glucosidase e trealase.....	20
3.3.1. Dosagem da atividade de α -glucosidase e trealase presente em <i>C. thermophilum</i>	21
3.3.2. Dosagem da atividade de α -glucosidase presente em leveduras de <i>S. fibuligera</i> e <i>S. cerevisiae</i>	21

3.4. Dosagem da atividade glucoamilásica presente no mutante (exo-1) de <i>N. crassa</i> através da reação de DNS.....	23
3.5. Dosagem de proteína.....	23
3.6. Purificação da α -glucosidase extracelular de <i>C. thermophilum</i>	23
3.7. Purificação da glucoamilase produzida pelo mutante (exo-1) de <i>Neurospora crassa</i>	25
3.8. Purificação da α -glucosidase intracelular de <i>S. fibuligera</i> 2390 isolada nos Estados Unidos.....	26
3.9. Determinação da pureza das frações isoladas.....	27
3.9.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE) para a α -glucosidase purificada de <i>C. thermophilum</i>	27
3.9.2. PAGE para a α -glucosidase de <i>S. fibuligera</i>	27
3.9.3. Determinação das atividades glucosidásicas extracelular de <i>C. thermophilum</i> e intracelular de <i>S. fibuligera</i> após PAGE.....	28
3.9.3.1. Determinação de atividade maltásica de <i>C. thermophilum</i>	28
3.9.3.2. Determinação de atividade maltásica de <i>S. fibuligera</i>	29
3.9.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	29
3.9.5. Estimativa da massa molecular das α -glucosidases extra (<i>C. thermophilum</i>) e intracelular (<i>S. fibuligera</i>) purificadas.....	30
3.9.5.1. Estimativa da massa molecular por cromatografia de filtração.....	30
3.9.5.2. Estimativa das massas moleculares das α -glucosidases purificadas de <i>C. thermophilum</i> e <i>S. fibuligera</i> por SDS-PAGE.....	31
3.10. Determinação de carboidratos neutros das α -glucosidases purificadas de <i>C. thermophilum</i> e <i>S. fibuligera</i>	31
3.11. Detecção de glicoproteínas em gel de poliacrilamida (PAGE) para α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	32
3.12. Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$).....	32
3.13. Determinação do ponto isoelétrico para as α -glucosidases.....	32

3.14. Produção de trealose a partir de maltose via reação de transglicosilação catalisada pela α -glucosidase.....	33
3.14.1. Produção de trealose via reação de transglicosilação catalisada pela α -glucosidase de <i>C. thermophilum</i>	33
3.14.2. Produção de trealose via reação de transglicosilação catalisada pela α -glucosidase de <i>S. fibuligera</i>	34
3.15. Degradação dos maltooligossacarídeos produzidos via reação de transglicosilação por ação da glucoamilase semi-purificada do mutante exo-1 de <i>Neurospora crassa</i>	34
3.16. TLC.....	35
3.17. Análise dos produtos via reação de transglicosilação pela glucosidase extracelular de <i>C. thermophilum</i> em HPLC.....	35
3.18. Imunoensaio contra a glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	36
3.18.1. Imunização.....	36
3.18.2. Teste ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	37
3.19. Técnica de Western Blotting.....	38
3.20. Extração diferencial e localização da proteína de interesse usando a técnica de Western blotting em culturas de <i>C. thermophilum</i>	40
3.21. Acúmulo de trealose durante o choque térmico.....	42
3.22. Acúmulo de trealose usando o meio YPS 1.....	43
3.23. Dosagem de trealose total.....	43
3.24. Produção de trealose nas culturas de <i>S. fibuligera</i> (2390 e 2622).....	44
3.25. Produção de trealose nas culturas de <i>S. cerevisiae</i>	46
3.26. Diminuição da maltose e produção de trealose e maltooligossacarídeos observados pelo método de DNS em leveduras.....	47
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Purificação da atividade α -glucosidásica extracelular de <i>C. thermophilum</i>	49

4.2. Estimativa da massa molecular da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	57
4.3. Influência da temperatura na atividade da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	57
4.4. Influência do pH do meio de reação na atividade da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	60
4.5. Efeito de íons sobre a atividade da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	63
4.6. Estabilidade térmica da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	63
4.7. Especificidade ao substrato e efeito de açúcares na atividade da α -glucosidase extracelular de <i>C. thermophilum</i>	66
4.8. Determinação de carboidratos neutros na atividade da α -glucosidase extracelular de <i>C. thermophilum</i>	66
4.9. Determinação de carboidratos em gel de poliacrilamida.....	68
4.10. Determinação das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$	68
4.11. Determinação do ponto isoeletrico da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	74
4.12. Testes imunoquímicos.....	74
4.13. Estudo da localização celular da proteína de interesse através da técnica de western blotting	74
4.14. Produção de trealose e maltooligossacarídeos pela α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	79
4.15. Detecção de trealose nos meios de cultivo por ação da trealase purificada de <i>S. thermophilum</i>	79
4.16. Degradação dos maltooligossacarídeos produzidos por reação de transglicosilação por ação da glucoamilase parcialmente purificada do mutante exo-1 de <i>Neurospora crassa</i>	80
4.17. Detecção de trealose produzida por reação de transglicosilação em HPLC.....	80

4.18. Acúmulo de trealose usando o meio YPS 1 em culturas de <i>C. thermophilum</i>	85
4.19. Acúmulo de trealose durante choque térmico utilizando culturas de <i>C. thermophilum</i>	85
4.20. Detecção de trealose usando as linhagens de <i>S. fibuligera</i> 2390 e 2622.....	90
4.21. Detecção de trealose através de reação de transglicosilação usando as linhagens de <i>S. fibuligera</i> 2390 e 2622.....	90
4.22. Quantificação da trealose produzida em glicose ou amido como fonte de carbono de <i>S. fibuligera</i> 2390 e 2622.....	91
4.23. Produção de trealose através de reação de transglicosilação utilizando culturas de <i>S. fibuligera</i>	95
4.24. Tentativa de síntese de trealose através de reação de transglicosilação em <i>S. cerevisiae</i>	95
4.25. Condições ótimas para produção da α -glucosidase intracelular de <i>S. fibuligera</i> 2390 isolada nos Estados Unidos.....	100
4.26. Purificação da α -glucosidase intracelular de <i>S. fibuligera</i> 2390 isolada nos Estados Unidos.....	100
4.27. Estimativa da massa molecular da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	107
4.28. Influência da temperatura na atividade da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	107
4.29. Influência do pH no meio de reação sob a atividade da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	111
4.30. Efeito de íons sobre a atividade da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	111
4.31. Estabilidade térmica da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	114
4.32. Especificidade ao substrato e efeito de açúcares na atividade de α -glucosidase intracelular de <i>S. fibuligera</i>	114

4.33. Determinação de carboidratos neutros.....	117
4.34. Determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max}	117
4.35. Determinação do ponto isoelétrico da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	121
4.36. Produção de trealose e maltooligossacarídeos pela α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i>	121
4.37. Degradação da trealose produzida via reação de transglicosilação por ação da trealase purificada de <i>S. thermophilum</i>	121
5. DISCUSSÃO.....	124
6. REFERÊNCIAS.....	143
7. ANEXO	

Lista de Figuras

Figura 1- Substratos típicos para as α -glucosidases.....	6
Figura 2- Funções da trealose.....	9
Figura 3- Esquema da síntese de trealose por ação da trealose-6-fosfato sintase (tps1) e da trealose-6-fosfato fosfatase (tps2).....	11
Figura 4- Esquema da síntese de trealose pela ação da maltooligosil trealose sintase (MTSase) e maltooligosil trealose tetrahidrolase (MTHase).....	13
Figura 5- Esquema da síntese de trealose a partir de maltose pela ação da trealose.....	14
Figura 6- Cromatograma do produto de reação catalisada pela enzima parcialmente purificada de <i>Pimelobacter</i> sp. R 48.....	15
Figura 7- Determinação enzimática da glicose liberada pela ação da α -glucosidase e da trealase sobre maltose e trealose.....	22
Figura 8- Acúmulo de trealose durante o choque térmico.....	42
Figura 9- Produção de trealose nas culturas de <i>S. fibuligera</i> (2390 e 2622).....	44
Figura 10- Produção de trealose nas culturas de <i>S. cerevisiae</i>	46
Figura 11– Tempo de crescimento para obtenção da α -glucosidase extracelular de <i>C. thermophilum</i>	51
Figura 12– Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose da α -glucosidase extracelular de <i>C. thermophilum</i>	53

Figura 13– Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-celulose da α -glucosidase extracelular (pico I da DEAE-celulose) de <i>C. thermophilum</i>	54
Figura 14– Cromatografia em coluna de Octil-Sepharose (hidrofóbica) da α -glucosidase extracelular de <i>C. thermophilum</i>	55
Figura 15– Eletroforese em gel de poliacrilamida da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	56
Figura 16- Determinação da massa molecular da α -glucosidase purificada de <i>C. thermophilum</i> por cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-100).....	58
Figura 17- Determinação da massa molecular por SDS-PAGE 9% da α -glucosidase purificada de <i>C. thermophilum</i>	59
Figura 18– Curva da temperatura ótima de atividade da α -glucosidase purificada de <i>C. thermophilum</i>	61
Figura 19– Determinação do pH ótimo de atividade de α -glucosidase extracelular de <i>C. thermophilum</i>	62
Figura 20- Estabilidade térmica da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	65
Figura 21- Determinação de glicoproteína em gel de poliacrilamida da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	69
Figura 22- Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	70

Figura 23– Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i> em amido como substrato.....	71
Figura 24– Efeito da trealose na atividade da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	72
Figura 25– Representação de Lineweaver-Burk para o efeito da trealose na atividade da α -glucosidase extracelular de <i>C. thermophilum</i>	73
Figura 26– Determinação do ponto isoelétrico da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	76
Figura 27– Localização celular da proteína de interesse presente no citosol e na membrana usando diferentes fontes de carbono.....	77
Figura 28– Localização celular da proteína de interesse presente no filtrado da cultura usando diferentes fontes de carbono.....	78
Figura 29– Reação de transglicosilação por ação da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	81
Figura 30– Degradação da trealose presente nos meios de cultivo por ação da trealase pura.....	82
Figura 31– Degradação dos maltooligossacarídeos produzidos através de reação de transglicosilação pela glucoamilase parcialmente purificada do mutante exo-1 de <i>N. crassa</i>	83
Figura 32– Produção de trealose através de reação de transglicosilação analisados em HPLC.....	84

Figura 33– Produção de trealose micelial em culturas desenvolvidas em diferentes temperaturas.....	88
Figura 34– Efeito de mudanças de temperatura sobre a concentração de trealose em cultivos de <i>C. thermophilum</i>	89
Figura 35– Detecção de trealose nas linhagens de <i>S. fibuligera</i> 2390 e 2622 crescido em amido como fonte de carbono.....	92
Figura 36– Produção de trealose via reação de transglicosilação em <i>S. fibuligera</i>	93
Figura 37– Quantificação da trealose produzida em culturas de <i>S. fibuligera</i> 2390 e 2622.....	94
Figura 38– Produção de trealose via reação de transglicosilação com as células intactas de <i>S. fibuligera</i> 2390 e 2622.....	96
Figura 39– Produção de trealose via reação de transglicosilação demonstrada em TLC.....	97
Figura 40– Tentativa de síntese de trealose através de reação de transglicosilação em <i>S. cerevisiae</i>	99
Figura 41– Temperatura ótima de atividade de α -glucosidase intracelular de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	101
Figura 42– Curva de tempo para a produção da atividade α -glucosidase intracelular de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	102

Figura 43 – Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose da α -glucosidase intracelular de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	104
Figura 44 – Cromatografia em coluna de Octil-Sepharose (hidrofóbica) da α -glucosidase intracelular de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	105
Figura 45 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	106
Figura 46 - Determinação da massa molecular por SDS-PAGE 6% da α -glucosidase intracelular purificada.....	108
Figura 47 - Determinação da massa molecular da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> por cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-100).....	109
Figura 48 – Curva de temperatura ótima da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	110
Figura 49 – Determinação do pH ótimo de atividade da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	112
Figura 50 – Estabilidade térmica da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	115
Figura 51 – Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	118
Figura 52 – Efeito da trealose na atividade da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	119

Figura 53 – Representação de Lineweaver & Burk para o efeito da trealose na atividade da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	120
Figura 54 – Determinação do ponto isoelétrico da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	122
Figura 55 – Reação de transglicosilação realizada com a enzima purificada de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	123
Figura 56 – Degradação da trealose produzida via reação de transglicosilação por ação da trealase pura de <i>S. thermophilum</i>	124

Lista de Tabelas

Tabela 1- Purificação da α -glucosidase extracelular de <i>C. thermophilum</i>	52
Tabela 2- Efeito de íons sobre a atividade da α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	64
Tabela 3- Especificidade de α -glucosidase extracelular purificada de <i>C. thermophilum</i>	67
Tabela 4- Produção de trealose em culturas desenvolvidas em diferentes temperaturas em <i>C. thermophilum</i>	87
Tabela 5- Purificação da α -glucosidase intracelular de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	103
Tabela 6– Efeito de íons sobre a atividade da α -glucosidase intracelular de <i>S. fibuligera</i> 2390.....	113
Tabela 7– Especificidade da α -glucosidase intracelular purificada de <i>S. fibuligera</i>	116

SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs Absorbância

YPS	Yeast starch agar
CM	Carboximetil celulose
DEAE	Dietilaminoetil
DNS	Ácido-3,5-dinitrosalicílico
EC	Enzyme commission
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GOD	Glicose oxidase
KDa	Kilodalton
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
K_m	Constante de Michaelis-Menten
V_{máx}	Velocidade Máxima
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
IgG	Imunoglobulina G
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
TLC	Thin-Layer Chromatographic
TCA	Ácido tricloroacético
PBS	Solução tampão fosfato salina
BSA	Soro Albumina Bovina
OPD	o-Fenilenediamino diidroclorito
PVDF	Polyvinyledene difluoride membrane transfer
q.s.p	Quantidade suficiente para
rpm	rotação por minuto
v/v	Volume por volume

RESUMO

α -glucosidases (α -D-glucosídeo glucohydrolase) formam um grupo de glicosídeos hidrolases com ampla especificidade, liberando glicose como resíduos finais de substratos α -ligados. Um número de α -glucosidases também catalisam reação de transglicosilação produzindo componentes α -glicosilados.

Recentemente foi descrito em bactérias uma nova via de síntese de trealose de maltose por reação de transglicosilação. *Chaetomium thermophilum* e *Saccharomycopsis fibuligera* foram bons produtores de trealose. Estudos preliminares mostraram a presença de uma atividade maltásica que produziu trealose de maltose por transglicosilação por estes organismos. Uma α -glucosidase extracelular constitutiva de *C. thermophilum* var. *coprophilum* foi purificada e caracterizada. O procedimento de purificação envolveu coluna de DEAE-celulose, CM-celulose e Octil-Sepharose. Produtos de transglicosilação foram analisados em TLC. A enzima exibiu uma concentração de substrato de 14% e uma aparente massa molecular de 107KDa, estimada por filtração em gel. Análise por SDS-PAGE revelou duas bandas de 22 e 26KDa, sugerindo que a enzima é constituída de duas subunidades. O pH e temperatura ótima foram 7.0 e 60°C, respectivamente. A enzima foi termoestável acima de 20 minutos quando incubado a 55°C e exibiu uma meia vida de 54 e 8 minutos quando incubados a 55 e 60°C, respectivamente. A termoinativação fornecida a 55 ou 60°C era bifásico, sugerindo que a enzima tenha 2 estados de conformação ou a presença de isoenzimas. Em ordem de preferência, a enzima hidrolisou maltose, amilose, amido, maltooligossacarídeos e isomaltose. Os valores de K_m e V_{max} foram para maltose $0.55 \pm 0.04\text{mM}$ e $34.16 \pm 2.73\text{U/mg}$ de proteínas e para amido $4.35 \pm 0.42\text{mg}$ e $4.40 \pm 0.42\text{U/mg}$ de proteínas. A enzima exibiu atividade de transglicosilação produzindo trealose e maltooligossacarídeos de 5% de maltose. O produto inicial da reação de transglicosilação era trealose e posteriormente, os maltooligossacarídeos também foram acumulados. A trealose inibiu atividade de glicosil hidrolase e transglicosilase.

A purificação e algumas propriedades de uma enzima micelial de *S. fibuligera* crescida em amido como fonte de carbono também foram analisados. O procedimento de purificação consistiu de precipitação com acetona, coluna de DEAE-celulose e Octil-Sepharose. Após o passo de Octil-Sepharose, a atividade

específica era de 14U/mg de proteína e uma purificação de 37 vezes foi atingida, com a produção de 65%. Análises em PAGE mostrou uma única banda corada por Comassie Blue. Análise por SDS-PAGE mostrou duas bandas polipeptídicas, sugerindo que a enzima nativa é constituída de duas subunidades com 105KDa e 11KDa. O pH e temperatura ótima foram 5.0 e 45°C. Os valores de K_m e V_{max} da enzima sobre maltose foram 0.46mM e 17U/mg de proteínas, respectivamente. A enzima hidrolisou preferencialmente maltose, mas também atuou sobre amilose, amido e maltooligossacarídeos, exceto p-nitrofenil- α -glucopiranosídeo, sugerindo que a enzima seja uma típica maltase. A atividade de α -glucosidase sob maltose era inibida pela trealose. Como detectado por TLC, a enzima purificada converteu maltose (5%) em trealose e maltooligossacarídeos por reação de transglicosilação. Maltooligossacarídeos não atuou como substrato em reação de transglicosilação.

O mecanismo de síntese de trealose e maltooligossacarídeos pelo *C. thermophilum* e *S. fibuligera* não é totalmente elucidado. Porém, a presente observação sugere que as enzimas destes organismos produziram trealose diretamente de maltose. Finalmente, nós poderíamos sugerir que a atividade de transglicosilação exibida pela α -glucosidase poderia explicar os grandes níveis de trealose produzida por este organismo crescido sob amido ou maltose como fonte de carbono.

SUMMARY

α -Glucosidase (α -D-glucoside glucohydrolase) form a group of exo-acting glycoside hydrolases with ample specificity, which release α -D-glucose from the non-reducing end of α -linked substrates. A number of α -glucosidases also catalyze the transglycosylation reaction producing α -glycosylated compounds. Recently were described in bacteria new routes involving the conversion of maltose into trehalose by transglycosylation reactions. *Chaetomium thermophilum* e *Saccharomycopsis fibuligera* were known as good trehalose producer. Preliminary studies showed the presence of a maltase activity that produced trehalose from maltose by transglycosylation in these organisms. A constitutive extracellular α -glucosidase from *C. thermophilum* var. *coprophilum* was purified and characterized. Enzyme purification involved DEAE-celulose, CM-cellulose and Octyl-Sepharose columns. Transglycosylated products were analyzed by TLC. The enzyme exhibited a carbohydrate content of 14% and an apparent molecular mass of 107 kDa, estimated by gel filtration. Analysis by SDS-PAGE revealed two polypeptide bands of 22 and 26 kDa, suggesting that the enzyme was constituted of two subunits. Optima of pH and temperature were 7.0 and 60°C, respectively. The enzyme was thermostable up to 20 min when incubated at 55°C and exhibited a half-life of 54 and 8 min when incubated at 55°C and 60°C, respectively. The thermoinactivation profile at 55°C or 60°C was biphasic, suggesting that the enzyme had two states of conformation, or the presence of isoenzymes. These data were consistent with the two protein bands observed in SDS-PAGE. The enzyme hydrolysed maltose, amylose, starch, maltooligosaccharides and isomaltose, in order of preference. The K_m and V_{max} values were $0.55 \pm 0.04\text{mM}$ and $34.16 \pm 2.73\text{U/mg protein}$ for maltose and $4.35 \pm 0.42\text{mg}$ and $4.40 \pm 0.42\text{U/mg protein}$ for starch. The enzyme exhibited transglycosylation activity producing trehalose and maltooligosaccharides from 5% maltose. At early stages of the transglycosylation reaction trehalose was the predominant product; at later stages maltooligosaccharides were also accumulated. Trehalose inhibited both glycosyl hydrolase and transglycosylase activities.

The purification and some properties of a mycelial enzyme of *S. fibuligera* grown on starch as carbon source also were analysed. The purification procedure consisted of precipitation with acetone, DEAE-cellulose and Octyl-Sepharose chromatography. After the Octyl-Sepharose step, the specific activity was 14U/mg protein and 37-fold purification was achieved, with a yield of 65%. PAGE analysis showed a single band stained with Coomassie Blue. Analysis by SDS-PAGE showed two polypeptide bands, suggesting that the native enzyme was composed of two subunits with 105kDa and 119kDa. Maltase activity was maximal at pH 5.0 and 45°C. The K_m and V_{max} values for maltose of the purified enzyme were 0.46mM and 17U/mg protein, respectively. Although the enzyme preferentially hydrolyzed maltose, it also cleaved amylose, starch and maltooligosaccharides, but not p-nitrophenyl α -glucopyranoside, suggesting that the enzyme was a typical maltase. α -Glucosidase activity on maltose was inhibited by trehalose. At a higher concentration (5%) maltose was converted into trehalose and other maltooligosaccharides by transglycosylation reactions, as detected by TLC analysis. Maltooligosaccharides did not act as substrates for transglycosylation reaction. The mechanism of synthesis of trehalose and maltooligosaccharides by *C. thermophilum* and *S. fibuligera* are not yet completely elucidated. However, the present observations suggested that the enzyme produced trehalose directly from maltose. Finally, we would like to suggest that the transglycosylation activity exhibited by α -glucosidase might explain the large level of trehalose produced by this organism grown on starch or maltose.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura e Ocorrência

A trealose [D-glicopiranosil-D-glicopiranosídeo] é um dissacarídeo não redutor constituído por dois resíduos de glicose no qual possui 3 isômeros contendo a forma piranose: α,α -trealose, α,β -trealose e β,β -trealose. Entre eles, α,α -trealose é o isômero mais comum sendo encontrado em uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas, insetos e outros invertebrados (Elbein, 1974; Friedman, 1978; Van Laere, 1989). Trealose é muito comum em leveduras e fungos onde é encontrado em esporos, corpo de frutificação e células vegetativas (Trevelyan & Harrison, 1956; Nwaka & Holzer, 1998). Ascosporos de *Neurospora tetrasperma* possui 10% de trealose com base em seu peso seco (Sussman & Lingappa, 1959). Muitas espécies de líquens (Lindberg, 1955) e algas (Augier, 1954) também contêm este dissacarídeo, embora encontrado em concentrações mais baixas do que em leveduras. A trealose também é encontrada em uma grande diversidade de bactérias, incluindo *Streptomyces hygroscopicus* e outras espécies de *Streptomyces* (Martin et al., 1986), várias mycobacteria, como *Mycobacterium smegmatis* e *tuberculosis* (Elbein & Mitchell, 1973) e corynebacteria (Shimakata & Minatagawa, 2000). Em mycobacteria e corynebacteria, este dissacarídeo desempenha um papel estrutural como componente da parede celular, mas pode servir também para outras funções. Ele está presente também em *Escherichia coli* (Kaasen et al., 1994), *Rhizobium* sp. e *Sulfolobus acidocaldarius* (Maruta et al., 1996^a; 1996^b), *Pimelobacter* sp. R 48 (Nishimoto et al., 1995), *Arthrobacter*

sp. Q 36 (Maruta et al., 1996^c), entre outros. Em muitos destes organismos, a função da trealose ainda não está clara. Vários organismos listados parecem ter uma via de síntese de trealose não usual.

No Reino animal, a trealose foi primeiro relatada em insetos, onde é encontrada na hemolinfa (Wyatt & Kalf, 1957) e em larvas (Fairbairn, 1958). No inseto adulto, os níveis de trealose caem rapidamente em certas atividades que requerem energia, como o voo (Evans & Dethier, 1957), indicando o papel deste dissacarídeo como uma fonte de glicose. Este dissacarídeo também ocorre em invertebrados (Friedman, 1960). Esta ampla ocorrência de α,α - trealose entre diversos organismos vivos demonstra sua ampla distribuição e sugere que a trealose desempenhe um papel importante no mundo biológico.

1.2. Degradação de trealose

Trealase (α,α -trealose-1-D-glicohidrolase, EC 3.2.1.28) é a enzima responsável pela hidrólise da trealose em 2 moléculas de glicose, sendo encontrada em grande variedade de organismos, como bactérias, fungos, protozoários, nematodos, plantas, insetos, nas microvilosidades intestinais e rins de vertebrados (Elbein, 1974; Yonemaya & Lever, 1987). Esta enzima foi primeiro relatada em *Aspergillus niger* (Bourquelot, 1893) e, por Fischer em 1895 em *S. cerevisiae* (revisado por Elbein, 1974).

As trealases de fungos podem ser divididas em 2 tipos: o primeiro tipo com um pH ótimo ao redor de 4.5, sendo encontrada no meio vacuolar ou extracelular, apresentando alta estabilidade. A trealase neutra, assim denominada por apresentar pH ótimo ao redor de 7.0, está localizada no citosol,

sendo regulada por fosforilação dependente de AMPc (Thevelein, 1984). Vários estudos tem demonstrado que fungos filamentosos termofílicos, como *Scytalidium thermophilum* (Kadowaki et al., 1996) e *Chaetomium thermophilum* (Almeida et al., 1999), produzem trealase ácida a qual aparentemente exibem propriedades mistas de enzimas ácida e neutra, sugerindo a existência de uma possível terceira classe de trealases (Jorge et al., 1997; Lúcio-Eterovic et al., 2005).

A trealase pode ser de considerável importância na regulação dos níveis de trealose na célula. Os níveis de trealose são grandemente aumentados em várias células quando são expostos a condições de estresse, portanto, em alguns casos, a trealase pode desempenhar um papel em remover a trealose e devolver a célula novamente em homeostase uma vez que a célula é submetida a condições adversas ou fornecer glicose como fonte de carbono (revisto por Elbein, 2003).

Já a maltose que é um isômero da trealose é constituída por duas moléculas de glicose unidas por ligação $\alpha(1\rightarrow4)$, sendo hidrolisada pela maltase (α -glucosidase) em glicose como produto (Kelly et al., 1983). Esta enzima é encontrada em plantas, bactérias, leveduras e em humanos.

1.3. Ação catalítica das α -glucosidases

α -glucosidases (EC 3.2.1.20, α -D-glucosídeo glicohidrolase) catalisam a liberação de α -glicose do terminal não redutor de substratos, maltooligossacarídeos, α -glucosídeos e α -glucanos (Frandsen & Svensson, 1998). Vários tipos de α -glucosidases têm sido purificadas e investigadas. Muitas α -glucosidases hidrolisam não somente α -glucosídeos sintéticos e oligossacarídeos

mas, α -glucanos como amido e glicogênio (revisado por Yamamoto et al., 2004). Oligo-1,6-glucosidase (EC 3.2.1.10) e sacarase-isomaltase (EC 3.2.1.48/EC 3.2.1.10) também são classificadas como α -glucosidases (Frandsen & Svensson, 1998). As α -glucosidases são classificadas em 3 tipos (**figura 1**), de acordo com sua estrutura primária e especificidade de substrato (Okuyama et al., 2005; Chiba, 1997; Frandsen & Svensson, 1998). O tipo I hidrolisa sacarose e aril glicosídeos melhor do que maltose; o tipo II prefere maltose e isomaltose e tem baixa atividade sobre aril glicosídeos; o tipo III exibe a mesma especificidade do tipo II, mas também ataca polissacarídeos tanto como amilose e amido (revisado por Giannesi et al., 2006). α -Glucosidases extraídas de fungos hidrolisam preferencialmente cadeias curtas de substratos (Tanaka et al., 2002; Kita et al., 1991 e 1996), mas as enzimas de *Mucor javanicus* (Yamasaki et al., 1973), *Paecilomyces varioti* (Oguma et al., 1992), e espécies de *Penicillium* (Yamasaki et al., 1976 e 1977) hidrolisam amido em velocidades comparáveis para aquelas de cadeias curtas de substratos. α -Glucosidases de fungos e de outras fontes também catalisam reação de transglicosilação, produzindo componentes α -glicosilados (Frandsen & Svensson, 1998; Kita et al., 1991; Yamasaki et al., 1973; Mcleary & Gibson, 1989; Kobayashi et al., 2003; Kato et al., 2002^a; Wimmer, 1997). α -Glucosidases de *Aspergillus nidulans* e *A. niger* produzem isomaltose e panose de maltose e maltooligossacarídeos por reação de transglicosilação (Kato et al., 2002^b). Em geral, a transglicosilação ocorre pela transferência do resíduo glicosil do doador para o grupo hidroxil do aceptor. No caso de altas concentrações de doador, o doador também pode agir como aceptor. Nos fungos termófilos *Scytalidium thermophilum* e *Chaetomium*

thermophilum a presença de traços de trealose de maltose por transglicosilação poderia explicar a indução de trealase nestes organismos (Giannesi, 2002). Estes microrganismos termófilos têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, pois muitos são capazes de viver em temperaturas nas quais, muitas proteínas e ácidos nucléicos desnaturam. Em vista disso, os organismos que vivem em tais temperaturas devem possuir mecanismos que os capacitem à sobrevivência (Cardello et al., 1994).

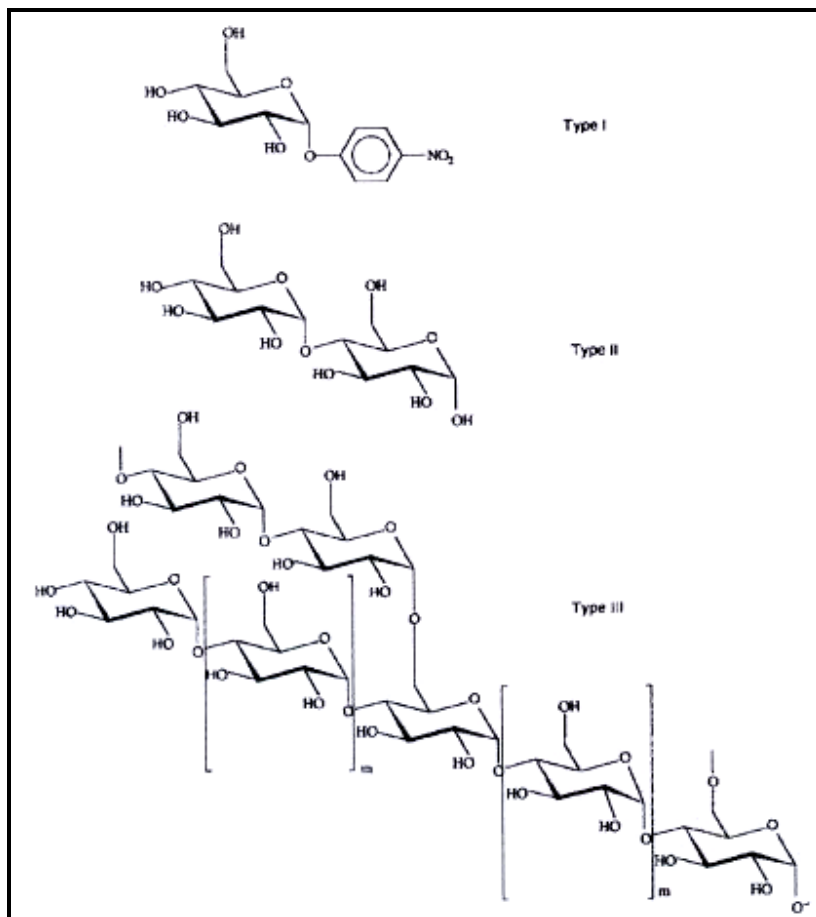


Figura 1- Substratos típicos para as α -glucosidases: **tipo I**, p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo; **tipo II**, maltose; **tipo III**, amilopectina (Frandsen & Svensson, 1998).

1.4. Funções da trealose

A trealose durante muito tempo foi considerada simplesmente como um carboidrato de reserva. Porém, estudos subseqüentes mostraram que este açúcar tem um papel importante na proteção contra condições adversas como estresse térmico, dessecação, estresse osmótico, entre outros (Hottiger, 1987; Gadd, 1987; Csonka, 1989; Giaever, 1988). Pelo fato de ser estável e não redutor, este dissacarídeo é o único açúcar capaz de proteger biomoléculas contra ambientes adversos e tem um papel importante na sobrevivência de algumas plantas e insetos, denominados anidrobiontes, mesmo quando a maioria de sua água do corpo é removida. Alguns destes organismos podem permanecer neste estado durante décadas até a água voltar a ser disponível. Organismos anidrobionticos geralmente contêm altas concentrações de trealose e algumas vezes outros dissacarídeos e oligossacarídeos (revisto por Elbein, 2003). A habilidade destes organismos e outros sobreviverem na ausência de água tem mostrado uma forte relação com a síntese de trealose (Madin & Crowe, 1975; Womersley, 1981). A trealose também é acumulada em resposta ao estresse térmico. Um importante estudo *in vivo* e *in vitro* mostrou que este dissacarídeo protege as células estabilizando proteínas em altas temperaturas, demonstrando que este açúcar reduz a agregação de proteínas e mantém a cadeia polipeptídica em um estado parcialmente enovelado, facilitando seu renovelamento por ação de chaperoninas celulares (**figura 2**) (Singer & Lindquist, 1998). Outro papel da trealose esta relacionada com a proteção de células contra superóxido, sugerindo que o acúmulo de trealose atue como seqüestrador de radical livre (Benaroudj et al., 2001). Células bacterianas respondem a pressão osmótica extracelular

modulando sua atividade citoplasmática de água com a síntese de solutos compatíveis. A trealose efetivamente previne o fluxo de água através da membrana celular causado pelo gradiente de água (Choi et al., 2006).

A trealose também é um estabilizador de enzimas de restrição (Colaço et al., 1992), anticorpo (Blakeley et al., 1990), vacinas (Arya, 2000), células sangüíneas de mamíferos (Wolkers et al., 2001), biomassas, preparações farmacêuticas e mesmo órgãos para transplante (revisto Schiraldi et al., 2002). Embora muitos componentes que estabilizam proteínas possam prevenir, por exemplo, a dissociação de proteínas com várias subunidades, a trealose é a mais efetiva na estabilização de proteínas em condições extremas. Este efeito poderia ser explicado pela sua estrutura química, como: alta hidrofília, caráter não redutor e a ausência de pontes de hidrogênio internas (Panek, 1995). Duas hipóteses foram propostas para explicar o efeito protetor em nível molecular. A primeira sugere que a trealose ocupa o lugar das moléculas de água presentes na superfície das macromoléculas que são essenciais para a manutenção da estrutura terciária. As pontes de hidrogênio então efetivadas entre os vários grupos hidroxilas da trealose, no qual resultaria em um efeito estabilizador melhor sob condições físicas adversas, como calor, congelamento, dessecação, comparado às pontes de hidrogênio da água (Saenger, 1989; Otting et al., 1991). A segunda hipótese é baseada na tendência de soluções de trealose sofrerem uma “vitrificação” e não uma cristalização sob dessecação, o que resultaria num estado físico protetor para macromoléculas embebidas. As macromoléculas congelariam na forma nativa, sem distorção de sua estrutura

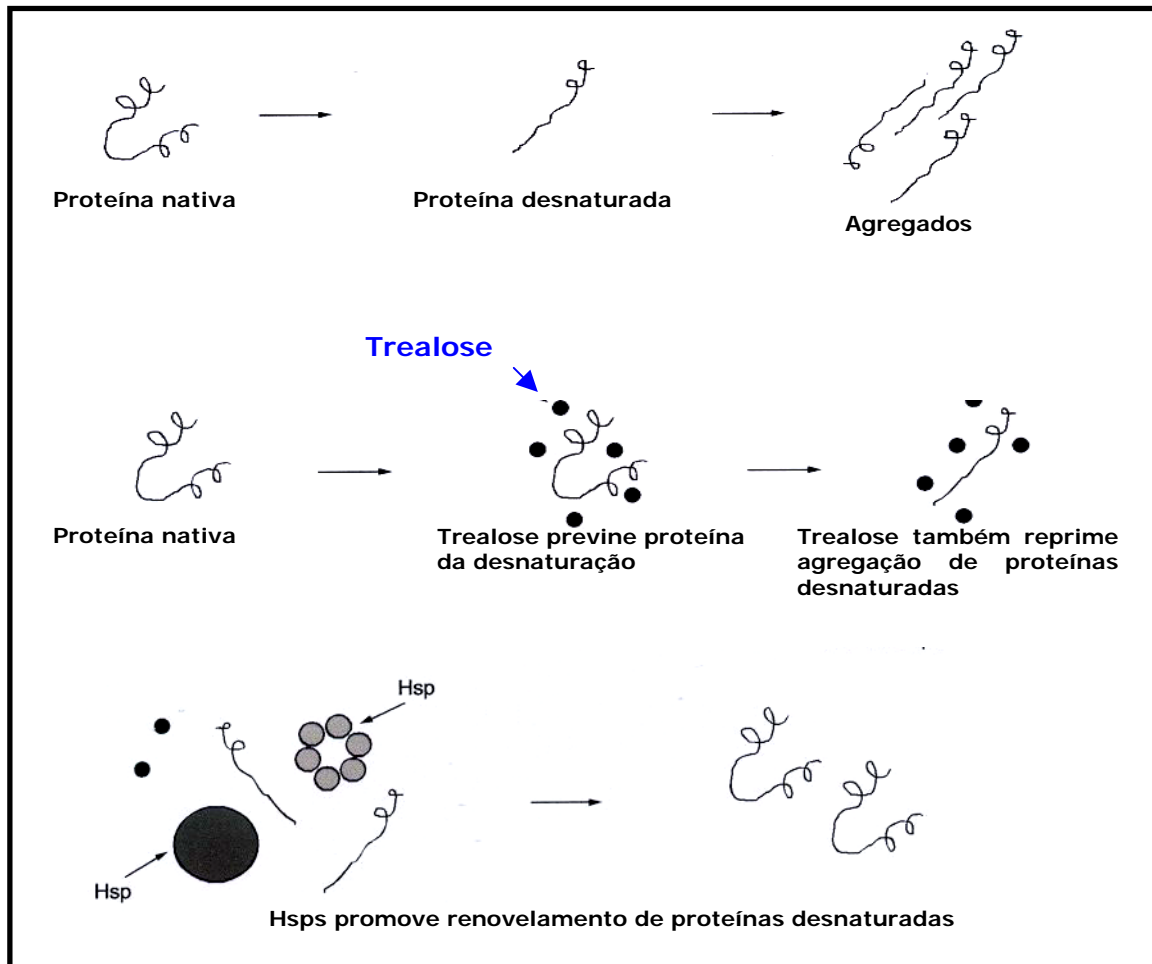


Figura 2- Altas temperaturas causam desnaturação de proteínas. Proteínas não enoveladas podem se associar para formarem agregados. *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza grandes quantidades de trealose durante choque térmico. Este dissacarídeo estabiliza proteínas em seu estado nativo e previne agregação de proteínas que tenham sido desnaturadas. Chaperoninas moleculares promovem a reativação de substratos desnaturados que tenham sido preservados de agregação (modificado a partir de Singer & Lindquist, 1998).

durante a desidratação (Franks et al., 1991; Colaço et al., 1992; Levine & Slade, 1992).

1.5. Síntese de trealose

Pelo menos três vias diferentes para a síntese de trealose têm sido relatadas, dirigindo para a produção de trealose-6-fosfato ou trealose livre. A via de síntese de trealose melhor estudada é constituída pela trealose-6-fosfato sintase (TPS1 ou OtsA em *E. coli*) que catalisa a transferência de glicose de UDP-glicose para glicose-6-fosfato produzindo trealose-6-fosfato e UDP. Uma segunda enzima, trealose-6-fosfato fosfatase (TPS2 ou OtsB em *E. coli*), converte a trealose-6-fosfato em trealose livre (revisado por Elbein, 2003). Este sistema enzimático emprega componentes de alta energia, sendo UDP-glicose e glicose-6-fosfato os substratos iniciais e trealose e fosfato inorgânico seus produtos finais (Cabib & Leloir, 1958) (**figura 3**). Embora a sintase e a fosfatase representem a via clássica demonstrada para a produção de trealose em vários organismos, outras vias têm sido relatadas em bactérias para a produção deste carboidrato.

O novo sistema enzimático para a síntese de trealose envolve uma maltooligosil trealose sintase (MTSase) e uma maltooligosil trealose tetrahidrolase (MTHase), como relatado em arqueobactérias, *Arthrobacter* sp Q36 (Saito et al., 1998; Nakano et al., 1994; Nakada et al., 1995^a), *Sulfolobus acidocaldarius* e *Sulfolobus solfataricus* (Nakada et al., 1996^a, 1996^b; Kato et al., 1996^a, 1996^b, 1996^c).

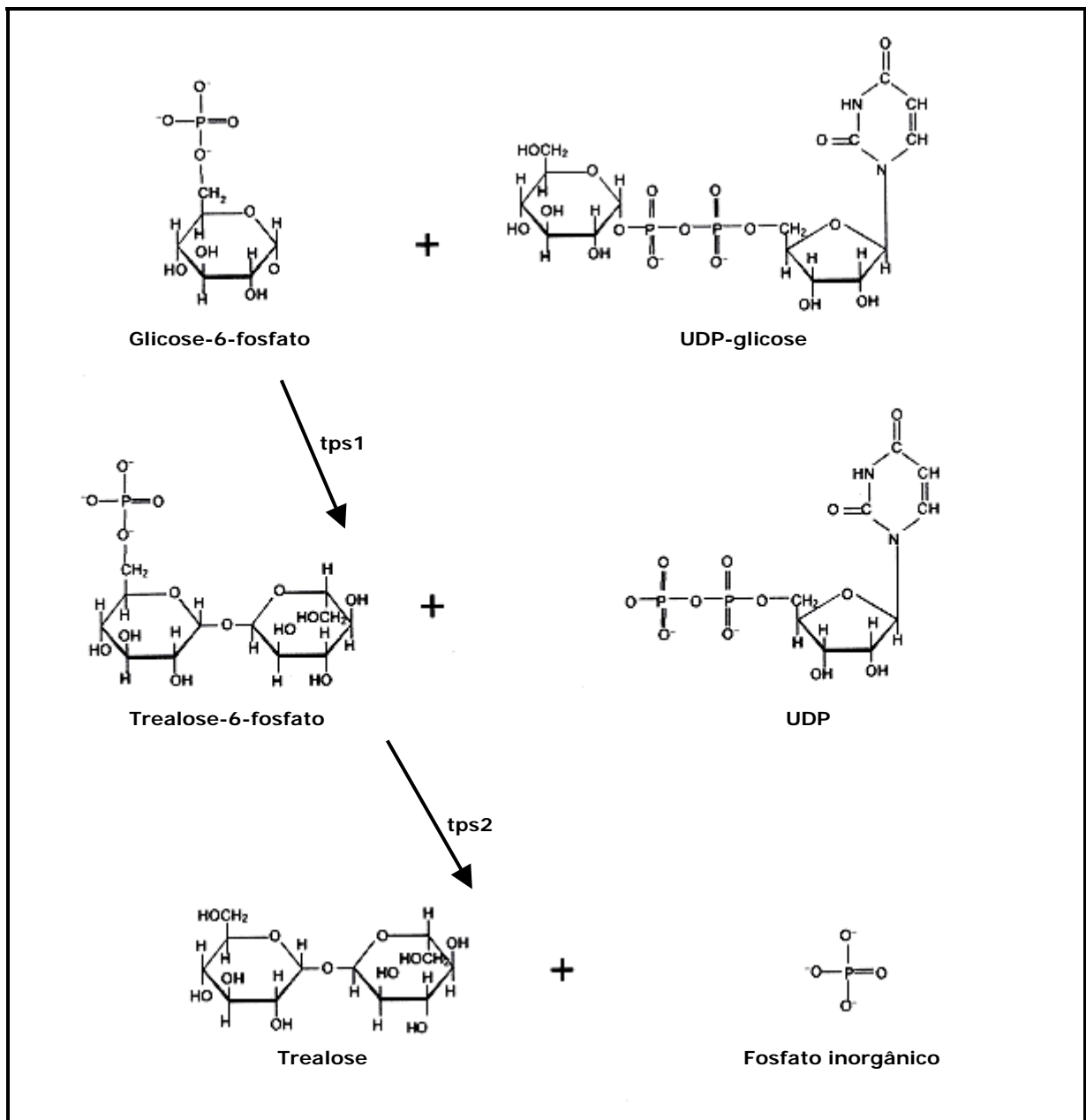


Figura 3- Esquema da síntese de trealose por ação da trealose-6-fosfato sintase (*tps1*) e da trealose-6-fosfato fosfatase (*tps2*) (Cabib & Leloir, 1958).

No primeiro passo, pela ação da maltooligosil trealose sintase, os maltooligossacarídeos são convertidos em um sacarídeo não redutor, maltooligosil trealose, por um processo de transglicosilação, mas não age sobre maltose. O produto da reação, maltooligosil trealose, é hidrolisado em trealose e maltooligossacarídeos pela ação da maltooligosil trealose tetrahidrolase (**figura 4**). Estudos também realizados por NISHIMOTO e colaboradores (Nishimoto et al., 1995, 1996^a, 1996^b) em arqueobactérias como *Pimelobacter* sp R 48, *Pseudomonas putida* e *Thermus aquaticus*, demonstraram a existência de uma enzima, trealose sintase, cuja síntese de trealose ocorre a partir de maltose como substrato de reação. A trealose sintase também pode ser considerada como uma glicosiltransferase já que converte a maltose em trealose através da modificação da ligação glicosídica, α -1,4 para α -1,1 (**figura 5**). O custo da produção de trealose, torna-se bastante reduzido utilizando estes sistemas alternativos independentes de gasto de energia relatados em arqueobactérias quando comparado com o sistema clássico de produção de trealose (Nakada et al., 1995^a, 1995^b, 1996^a, 1996^b ; Nishimoto et al., 1995, 1996^a, 1996^b; Maruta et al., 1995).

A enzima trealose fosforilase (EC 2.4.1.64) descoberta em *Euglena gracilis* (Belocopitow & Marechal, 1970), têm sido detectada em muitos fungos. A enzima atua na mobilização assim como na biossíntese de trealose e têm sido chamada de trealose sintase. No basidiomiceto *Grifola frondosa*, ocorre a formação de trealose de D-glicose e α -D-glicose-1-fosfato como substrato (Saito et al., 1998).

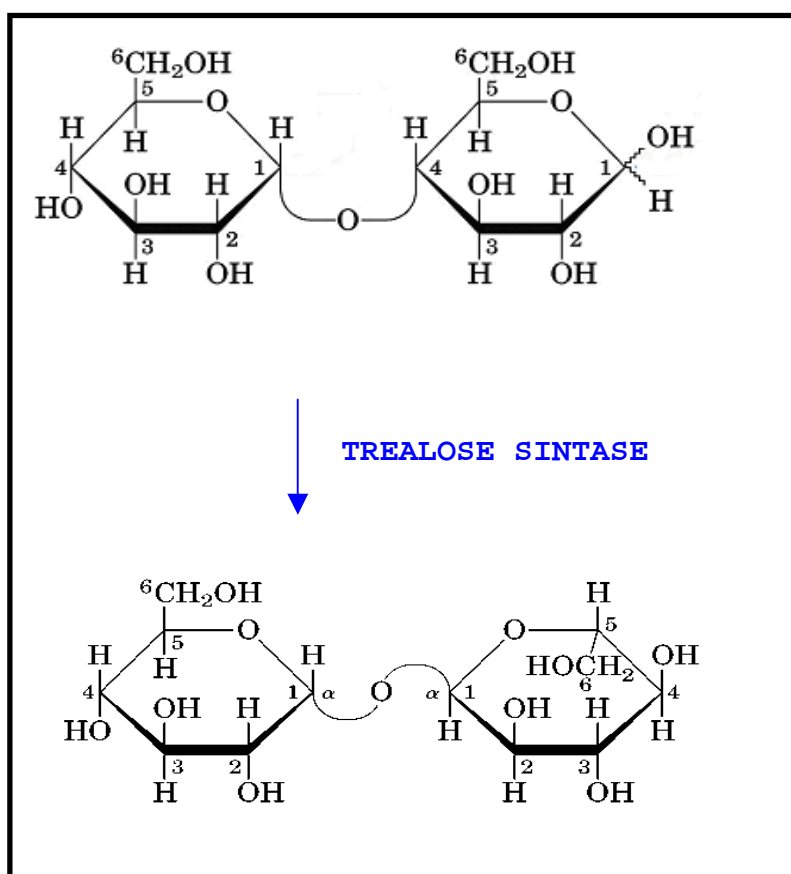


Figura 5- Esquema da síntese de trealose a partir de maltose pela ação da trealose sintase (conversão da ligação $\alpha(1\rightarrow4)$ da maltose em ligação $\alpha(1\rightarrow1)$ com formação de trealose).

Estudos com arqueobactérias demonstraram a existência de uma nova via para a síntese de trealose independente de grupos fosfatos. No cromatograma abaixo (**figura 6**), observa-se o produto de reação catalisada pela enzima parcialmente purificada de *Pimelobacter* sp R 48, a qual converteu diretamente maltose em trealose (Nishimoto et al., 1995).

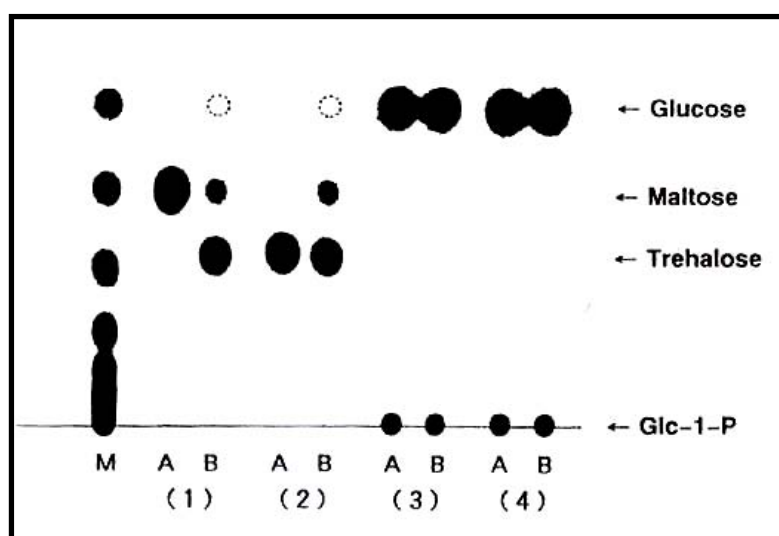


Figura 6- Cromatograma do produto de reação catalisada pela enzima parcialmente purificada de *Pimelobacter* sp. R 48. A mistura de reação (volume final: 1mL) continha 0.2mL de enzima parcialmente purificada e sacarídeos, (1) 5%(w/v) maltose, (2) 5%(w/v) trealose, (3) 5%(w/v) glicose e 5%(w/v) α -glicose-1-fosfato, ou (4) 5%(w/v) glicose e 5%(w/v) β -glicose-1-fosfato era incubado em pH 7.0 a 40°C. (A) 0h, (B) 24h, (M) maltooligossacarídeos.

1.6. Obtenção comercial da trealose

A trealose é usualmente extraída de células de leveduras. Porém este método é inadequado para a produção devido a baixa produção e alto custo. Em alguns casos, a síntese de trealose por enzimas microbianas tem sido usada na produção industrial de trealose no Japão. Infelizmente, os detalhes dos processos de produção de trealose em escala industrial, não estão disponíveis ao domínio público (Ma et al., 2005). O estudo e aplicação das enzimas da via alternativa para a síntese de trealose a nível industrial está sendo uma forma de baratear o custo de produção de trealose, uma vez que não se dispõe de componentes de alta energia para a sua produção.

Dessa forma, é interessante verificar a existência e quantificar a produção de trealose através das vias alternativas em diferentes espécies de organismos, como, por exemplo, leveduras e fungos filamentosos.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar um sistema enzimático alternativo de síntese de trealose em *C. thermophilum* e espécies de leveduras (*S. fibuligera* e *S. cerevisiae*) comparando com as já descritas em arqueobactérias.

2.1. Objetivos específicos

Considerando que a atividade da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*, exibe atividade de hidrólise e também de glicosiltransferase produzindo trealose e que espécies de levedura também possuem o novo sistema enzimático na produção de trealose a partir de maltose, os nossos objetivos específicos foram:

- (i) caracterizar bioquímica e fisiologicamente as glucosidases extracelular de *Chaetomium thermophilum* e intracelular de *Saccharomycopsis fibuligera* as quais produzem trealose a partir de maltose como substrato;
- (ii) comparar as propriedades das enzimas purificadas com as já descritas na literatura para bactérias;
- (iii) estudar a produção de trealose frente a diferentes meios de cultivo e ao choque térmico;
- (iv) produzir anticorpos anti-glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*;
- (v) estudar a localização celular da proteína de interesse;
- (vi) estudar a produção de trealose em diferentes linhagens de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomycopsis fibuligera* comparando com a produção de trealose em fungos filamentosos.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. Organismos

Os organismos usados neste trabalho foram: a) *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* cedido gentilmente pela "American Type Culture Collection"(ATCC), número 16451, Rockville Maryland, USA; b) *Neurospora crassa* SF 26 (mutante **exo-1**) obtido através do Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, Kansas- USA; Foram utilizadas duas linhagens de *Saccharomycopsis fibuligera* para o estudo de produção de trealose: a linhagem de *S. fibuligera* 2390 NRRL-7464 isolada nos Estados Unidos; a linhagem de *S. fibuligera* 2622 DSM-70554 isolada na Alemanha. Como controle usamos a levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, uma das mais conhecidas sob o aspecto bioquímico e fisiológico e que serviu de comparação com outros organismos em estudo.

3.2. Manutenção e crescimento

3.2.1. Meio sólido

3.2.1.1. *Chaetomium thermophilum*

O fungo *C. thermophilum* era mantido em meio sólido composto de farinha de aveia (Quaker) 4% e ágar 1.8%. As culturas em ágar-inclinado eram desenvolvidas a 40°C por uma semana e posteriormente mantidas em geladeira até o momento de uso.

3.2.1.2. Mutante *exo-1* de *Neurospora crassa*

As linhagens do *exo-1* foram mantidas em culturas preparadas em tubos de ensaio contendo 5mL de meio sólido, composto por sais de Vogel (Vogel, 1956) suplementado com sacarose 2%, ágar 1.5% e biotina (5mg/mL). Após os inóculos, as culturas em ágar inclinado foram mantidas à temperatura ambiente por 7 dias. Em seguida, as culturas foram conservadas em geladeira até o momento do uso.

3.2.1.3. *Saccharomycopsis fibuligera* e *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens de *S. fibuligera* e *S. cerevisiae* eram mantidos em meio sólido constituído de extrato de levedura 0.3%, extrato de malte 0.3%, peptona 0.5%, glicose 1% e ágar 2%. O meio era esterilizado e mantidos inclinados, sendo o inóculo realizado com uma alça de platina. Posteriormente, ambas as linhagens foram mantidas a 25°C por um período de 5 dias.

3.2.2. Meio líquido

3.2.2.1. Meio de cultivo M₅

Culturas foram desenvolvidas em meio líquido contendo: NaCl 0.5%; CaCl₂ 0.1%; peptona 0.1%; extrato de levedura 0.8% e amido 1%, como fonte de carbono. O pH era acertado com NaCl 1N. Os inóculos foram feitos com suspensão de 1mL de conídios (10⁷) e as culturas foram desenvolvidas sob condição estacionária a 40°C por um período de 120 horas.

3.2.2.2. Meio de cultivo YPS 1

O meio líquido era composto de amido ou glicose 1.5%; extrato de levedura 1.6%; $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ 0.1%; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0.05%; traços de elementos Vogel (Vogel, 1964) 0.05mL. Os inóculos foram feitos com suspensão de 1mL de conídios (10^7) e o crescimento era realizado a 40 e 50°C, sob agitação por 24 horas.

3.2.2.3. Meio líquido de Vogel (Vogel, 1956)

Os cultivos em meio líquido eram compostos por meio salino Vogel suplementado com amido 1% como fonte de carbono. Foram feitos os inóculos contendo 1mL de suspensão de conídios (10^7) e o crescimento realizado sem agitação em estufa a 30°C por 7 dias.

3.2.2.4. Meio de cultivo YPS 2 modificado

O meio líquido para o crescimento do organismo era constituído por amido ou glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%. Após o inóculo a cultura era mantida sob agitação a 100rpm a 27°C por um período de 24 horas.

3.3. Determinação da atividade de α -glucosidase e trealase

A atividade enzimática da α -glucosidase ou trealase sobre maltose e trealose, respectivamente era determinada quantitativamente através da glicose liberada no meio de reação pelo método de glicose oxidase (Bergmeyer & Bernt, 1974), utilizando o kit disponível no comércio (Labtest) (**figura 7**). O método era

padronizado por uma curva-padrão de concentração de glicose na faixa de 2-10 μ g.

3.3.1. Dosagem da atividade de α -glucosidase e trealase presente em *C. thermophilum*

A mistura de reação para a atividade de α -glucosidase, era constituída de 2.5mL de tampão fosfato monobásico de sódio 100mM, pH 7.0, contendo maltose 1%, 2.5mL de enzima diluída, incubados a 60°C. A mistura de reação para a atividade de trealase era constituída de MÊS 100mM pH 6.5 + CaCl₂ 1mM + trealose 1mg/mL na concentração final. A temperatura usada para atividade trealásica era de 55°C. Nos tempos desejados, alíquotas eram retiradas e o produto liberado era dosado através do método de glicose oxidase.

Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto, nas condições de ensaio. A atividade específica (AE) foi expressa em número de unidades de atividade enzimática total por miligrama de proteína total.

3.3.2. Dosagem da atividade de α -glucosidase presente em leveduras de *S. fibuligera* e *S. cerevisiae*

A mistura de reação para a atividade glucosidásica, era constituída de 2.5mL de tampão McIlvaine, pH 5.0, contendo maltose 1%, 2.5mL de enzima diluída, incubados a 40°C. Nos tempos desejados, alíquotas eram retiradas e o produto liberado era dosado através do método de glicose oxidase.

Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose por minuto, nas condições de ensaio. A atividade específica (AE) foi expressa em número de unidades de atividade enzimática total por miligrama de proteína total.

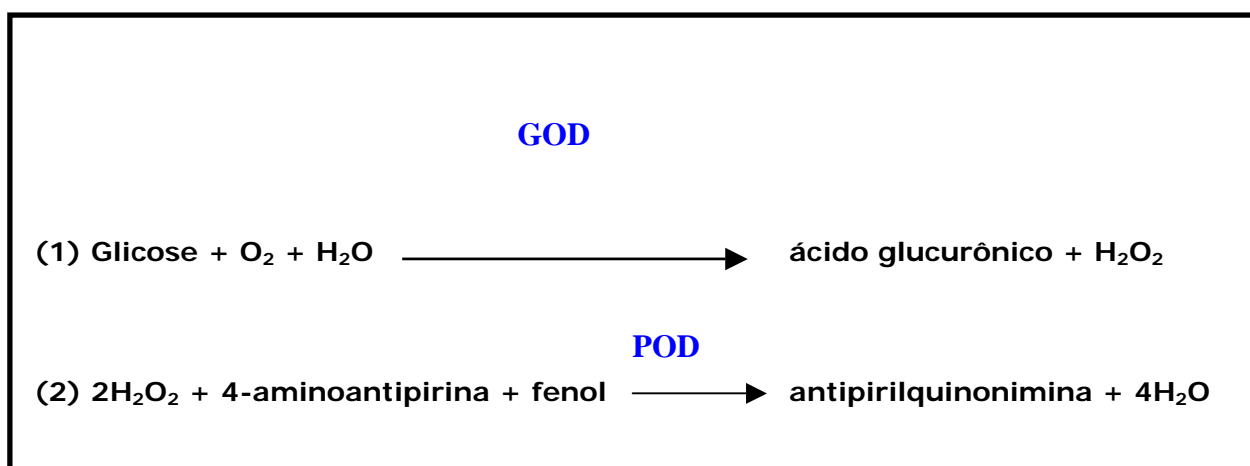


Figura 7- Determinação enzimática da glicose liberada pela ação da α -glucosidase e da trealase sobre maltose e trealose, respectivamente. (1) oxidação da glicose pela glicose oxidase (GOD- β -D-glicose: oxigênio-1-oxirredutase); (2) reação oxidativa de acoplamento do peróxido de hidrogênio formado catalisada pela hidrogênio-peróxido oxidorredutase (POD).

3.4. Dosagem da atividade glucoamilásica presente no mutante (exo-1) de *N. crassa* através da reação de DNS

A determinação da atividade enzimática sobre amido foi investigada pela determinação de açúcares redutores formados durante a incubação da enzima com amido como substrato. Utilizou-se o reagente DNS descrito por Miller (1959).

A mistura de reação foi constituída de 2,5mL de solução de amido 1%, dissolvido em tampão acetato de sódio 10mM pH 5.5 e 2.5mL da enzima devidamente diluída. Após a incubação da mistura de reação a 60°C, alíquotas de 1mL eram retiradas nos tempos desejados e adicionadas em tubos de reação contendo o reagente DNS (1:1) para a dosagem em absorbância em 540nm, utilizando uma curva padrão de glicose 1mg/mL.

Uma unidade enzimática era definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto, nas condições de ensaio. A atividade específica (AE) era expressa em número de unidades de atividade enzimática total por miligrama de proteína total.

3.5. Dosagem de proteína

A dosagem de proteína era realizada pelo método de Lowry (1951) utilizando soroalbumina bovina como padrão.

3.6. Purificação da α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum*

O *C. thermophilum* era cultivado em meio M₅ com amido 1% como fonte de carbono, por 120 horas a 40°C sob condição estacionária. Após este período o

meio de cultura era filtrado a vácuo em funil de Büchner, utilizando o filtrado para os procedimentos de purificação. O filtrado (contendo a enzima extracelular) era dialisado e, posteriormente liofilizado, seguido de precipitação com acetona (2v). A amostra foi então ressuspensa em tampão acetato 10mM pH 5.5 e, aplicada em coluna de DEAE-celulose (11 x 1.5cm), previamente equilibrada no mesmo tampão, sendo a amostra eluída juntamente com o tampão. Frações contendo 5mL por tubo foram coletadas e submetidas à leitura de proteínas em 280nm e a atividade glucosidásica em absorbância em 505nm conforme o **item 3.3 e 3.3.1**. Os tubos foram reunidos e aplicados em coluna de CM-celulose (10 x 1.5cm) também equilibrada com tampão acetato 10mM pH 5.5. Após a aplicação da amostra na coluna, a mesma foi lavada com uma certa quantidade de tampão sendo eluída com o aumento da força iônica, para uma concentração de NaCl de 0-500mM. As frações onde era eluída a atividade glucosidásica foram reunidas, dialisadas, liofilizadas, ressuspensa em tampão Tris-HCl 50mM pH 7.0 com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M e, aplicadas em coluna de octil-sepharose (5.5 X 1.5cm) devidamente equilibrada com o mesmo tampão. A seguir, a coluna era lavada com o próprio tampão de equilíbrio da coluna seguida de um gradiente inverso de 1 a 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frações de 2.5mL eram coletadas para a leitura de absorbância em 280nm e determinação da atividade glucosidásica em 505nm. As amostras foram reunidas, dialisadas e liofilizadas. O material era ressuspensa em água destilada para a análise do grau de pureza e experimentos de caracterização.

3.7. Purificação da glucoamilase produzida pelo mutante (exo-1) de *Neurospora crassa* (Spinelli et al., 1996)

Culturas do mutante exo-1 eram mantidas em Erlenmeyer de 2 litros (4 frascos) com amido 1%, como fonte de carbono, foram usadas para a purificação da glucoamilase após 7 dias a 30°C, sob condição estacionária. Completado o período de crescimento, o filtrado da cultura foi separado da massa micelial (20.55g) por filtração à vácuo, sendo as células miceliais rompidas, com areia tratada, ressuspensa em 50mL de água destilada e centrifugadas a 10.000rpm por 20 minutos. Utilizou-se o sobrenadante contendo a enzima de interesse, sendo esta levada a 60% de saturação pela adição de sulfato de amônio sólido com agitação lenta e constante em banho de gelo. Após esse período, o precipitado foi recolhido por centrifugação a 10.000g por 20 minutos a 4°C, redissolvido em 4 mL de tampão acetato de sódio 10mM pH 5.5 e NaCl 100mM e, este foi dialisado contra o próprio tampão por um período de 24 horas. Posteriormente, o material dialisado foi aplicado a uma coluna de filtração Sephadex G-100 (93.5 x 2cm) equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 10mM pH 5.5 e NaCl 100mM. As frações com atividade amilolítica foram reunidas sendo a mistura resultante precipitada com 2 volumes de acetona (v/v). O material precipitado foi recolhido por centrifugação a 17.000g por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensa em 1 mL de água destilada e, esta enzima parcialmente purificada foi usada a fim de verificar a degradação dos maltooligossacarídeos produzidos por reação de transglicosilação com maltose como substrato, utilizando a glucosidase purificada de *C. thermophilum*.

3.8. Purificação da α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* 2390 isolada nos Estados Unidos.

Culturas de *S. fibuligera* era mantida em meio **YPS 2**, com amido como fonte de carbono, por um período de 72 horas a 27°C, sob condição agitada. Após este período a cultura era filtrada à vácuo em funil de Buchner e a massa celular congelada para ser utilizada posteriormente nos processos de purificação. A massa celular era macerada em cadinho com 2 volumes de areia lavada e ressuspensa em tampão Tris-HCl 50mM pH 7.0. Posteriormente, a amostra era precipitada com 2 volumes de acetona. Após 1 hora de repouso, a suspensão era centrifugada a 10.000rpm por 20 minutos. O sobrenadante era descartado e o precipitado era ressuspensa em tampão acetato 10mM pH 5.5, aplicados posteriormente em coluna de troca iônica (DEAE-celulose). A coluna de DEAE-celulose (11 x 1.5cm) era previamente equilibrada em tampão acetato 10mM pH 5.5. Após aplicação da amostra na coluna, esta era lavada com o próprio tampão de equilíbrio. Frações de 5mL eram coletadas e a enzima era eluída com um gradiente linear de 0-0.5M de NaCl dissolvido no tampão de equilíbrio. As frações com atividade de α -glucosidase foram reunidas, dialisadas, liofilizadas, ressuspensas em tampão Tris-HCl 50mM pH 7.0 contendo 1M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e aplicadas em coluna de octil-sepharose (5.5 X 1.5cm) devidamente equilibrada com o mesmo tampão. A seguir, a coluna era lavada com o próprio tampão de equilíbrio da coluna e era aplicado um gradiente inverso de 1 a 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frações de 2.5mL eram coletadas para a leitura de absorbância em 280nm e determinação da atividade α -glucosidase em 505nm. As amostras foram

reunidas, dialisadas e liofilizadas. O material era ressuspendido em água destilada para a análise do grau de pureza e experimentos de caracterização.

3.9. Determinação da pureza das frações isoladas

3.9.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE) para a α -glucosidase purificada de *C. thermophilum*

A determinação da pureza era realizada através de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (PAGE) conforme metodologia descrita por Reisfeld (1962), para proteínas básicas.

O gel numa concentração de 6% de acrilamida cuja espessura era 0.75mm era polimerizado em placas de vidro (9.5cm X 8.0cm). As amostras analisadas foram diluídas em tampão de amostra (tampão de corrida na proporção 1:1), pH 4.5 contendo 0.002% de verde de metila e 5% de glicerol. As eletroforeses foram realizadas em tampão de corrida pH 4.5 (constituído de 3.12g de β -alanina e 0.8mL de ácido acético glacial em 1000mL de água destilada) durante 4-5 horas, a temperatura ambiente sob corrente de 30mA e 120V. O gel foi corado com Comassie Blue R-250 para coloração de proteínas.

3.9.2. PAGE para a α -glucosidase de *S. fibuligera*

A determinação da pureza era realizada através de corridas eletroforéticas em géis de poliacrilamida (PAGE) conforme metodologia descrita por Davis (1964), para proteínas ácidas.

O gel numa concentração de 6% de acrilamida cuja espessura era 0.75mm era polimerizado em placas de vidro (9.5cm X 8.0cm). As amostras da enzima de *S. fibuligera* a serem analisadas foram diluídas na proporção 1:1 em tampão Tris 0.025mM, pH 6.8, contendo 0.002% de azul de bromofenol e 5% de glicerol. As eletroforeses foram realizadas em tampão constituído de Tris 50mM e glicina 36mM pH 6.8, durante 2 horas, a temperatura ambiente sob corrente de 30mA e 120V. O gel foi corado com Comassie Blue R-250 para coloração de proteínas.

3.9.3. Determinação das atividades glucosidásicas extracelular de *C. thermophilum* e intracelular de *S. fibuligera* após PAGE

3.9.3.1. Determinação de atividade maltásica de *C. thermophilum*

Para a determinação da atividade de α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum* em géis de eletroforese foram feitos como descritos no **item 3.9.1** e **3.9.4**. Após a corrida eletroforética, os géis eram equilibrados através de quatro trocas sucessivas de 20 minutos com 50mL de tampão fosfato monobásico de sódio 200mM pH 7.0, sem substrato. A revelação da atividade de glucosidase era feita incubando-se o gel a 37°C, no escuro, em tampão fosfato monobásico de sódio 100mM pH 7.0, com maltose 1%, além de azul de nitro tetrazólico 0.4mg/mL, metassulfato de fenazina 0.2mg/mL e 30U de glicose oxidase por um período de 10 a 30 minutos, dependendo da atividade enzimática. Após o aparecimento da banda, o gel era lavado exaustivamente com água destilada.

3.9.3.2. Determinação de atividade maltásica de *S. fibuligera*

A determinação da atividade de α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* em gel de eletroforese foi realizada como descrito no **item 3.9.2**. Após a corrida eletroforética, o gel era equilibrado através de quatro trocas sucessivas de 20 minutos com 50mL de tampão McIlvaine pH 5.0, sem substrato. A revelação da atividade de glucosidase era feita incubando-se o gel a 37°C, no escuro, em uma solução de 20mL como volume final, contendo, tampão McIlvaine pH 5.0, maltose 1%, azul de nitro tetrazólico 0.4mg/mL, metassulfato de fenazina 0.2mg/mL e 30U de glicose oxidase, por um período de 10 a 30 minutos, dependendo da atividade enzimática. Após o aparecimento da banda, o gel era lavado exaustivamente com água destilada.

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

A fim de se confirmar os dados obtidos através da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE), também foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), segundo metodologia de Laemmli (1970). Foram utilizados géis em placa (9.5cm X 8.0cm) na concentração de 6-12% de acrilamida. As amostras foram diluídas nas proporções de 1:1 em tampão de amostra (glicerol 20%, SDS 7%, azul de bromofenol 0.002%, β -mercaptoetanol 10% e Trizma 0.12M, pH 6.75) e aquecidas durante 5 minutos em água fervente. As eletroforeses foram realizadas a temperatura ambiente na presença de tampão Tris 0.025M, glicina 0.18M e SDS 0.1%, pH 8.3, sob corrente de 30mA e 120V. Após a corrida o gel

era retirado da placa e a revelação da proteína era feita com Comassie Blue R-250.

3.9.5. Estimativa da massa molecular das α -glucosidases extra (*C. thermophilum*) e intracelular (*S.fibuligera*) purificadas

3.9.5.1. Estimativa da massa molecular por cromatografia de filtração

A cromatografia de filtração em gel foi realizada em coluna Sephadex G-100 (93.5 x 2cm) equilibrada e eluída com tampão fosfato monobásico de sódio 100mM pH 6.0, contendo NaCl 100mM. Frações de 1.5mL eram coletadas automaticamente e a atividade das α -glucosidases extra (*C. thermophilum*) e intracelular (*S. fibuligera*) eram dosadas como descrito nos **itens 3.3.1 e 3.3.2**. O volume de exclusão da coluna (V_o) foi de 88.2mL. Para a calibração da coluna foram utilizados os seguintes padrões de massa molecular: Álcool desidrogenase (150KDa), BSA (66KDa), Anidrase carbônica (29KDa) e Citocromo C (12.5KDa).

As massas moleculares das α -glucosidases purificadas foram estimadas através da construção de um gráfico que continha na ordenada a massa molecular dos padrões e, na abscissa a razão V_e/V_o (onde V_e = volume de eluição da coluna e V_o = "void" da coluna). O valor de V_e de cada amostra foi considerado como sendo a somatória dos volumes das frações coletadas desde a aplicação da amostra até a fração onde, registrava-se maior leitura de absorbância em 280nm.

3.9.5.2. Estimativa das massas moleculares das α -glucosidases purificadas de *C. thermophilum* e *S. fibuligera* por SDS-PAGE

As massas moleculares das α -glucosidases também foram estimadas por SDS-PAGE, conforme descrito no **item 3.9.4**. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as proteínas: Miosina (205KDa), β -Galactosidase (116KDa), fosforilase b (97.4KDa), BSA (66KDa), ovoalbumina (45KDa) e anidrase carbônica (29KDa).

As massas moleculares das α -glucosidases extra (*C. thermophilum*) e intracelular (*S. fibuligera*) purificadas foram estimadas através do coeficiente de migração da proteína em relação aos padrões (Rf). O Rf foi obtido pela relação de migração entre a proteína e o frente azul de bromofenol.

3.10. Determinação de carboidratos neutros das α -glucosidases purificadas de *C. thermophilum* e *S. fibuligera*

Os conteúdos de carboidratos das α -glucosidases purificadas foram estimados através da metodologia de fenol-sulfúrico de Dubois et al (1956), utilizando-se a glicose como padrão. Aliquotas das enzimas purificadas, contendo aproximadamente 20 μ g de proteínas, foram diluídas a um volume de 2.0mL com água destilada. Em seguida, 50 μ L de fenol a 80% foram adicionados e 5.0mL de ácido sulfúrico concentrado. Essa mistura foi deixada em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente e 15 minutos a temperatura de 30°C. Após esse período, foram feitas as leituras em absorbância a 490nm. Procedimento idêntico foi conduzido com solução padrão de glicose.

3.11. Detecção de glicoproteínas em gel de poliacrilamida (PAGE) para α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

Após a corrida eletroforética das amostras em gel de poliacrilamida (PAGE) conforme descrito no **item 3.9.1**, o gel era lavado com uma solução contendo 25mL de isopropanol 25% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) durante duas horas (2 vezes). Posteriormente, colocamos o gel durante duas horas em uma solução contendo isopropanol 25%, ácido acético 10% e timol 0.2% para a visualização da presença de açúcares na molécula. Em seguida, o gel era adicionado em uma solução de ácido sulfúrico 80% (v/v) e etanol 20% (v/v), sob agitação a 37°C, para que a cor opalescente desaparecesse e a banda contendo os açúcares fossem observados com mais nitidez.

3.12. Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$)

A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para as enzimas purificadas foram calculados pelo procedimento proposto por Lineaweaver & Burk (1934), utilizando maltose e amido como substrato. Mistura de trealose e maltose também foram usados para testes cinéticos. Os experimentos foram realizados com $n=4$ e a reta foi calculada também por regressão linear segundo o programa Computacional Sigraf (Leone et al., 1992).

3.13. Determinação do ponto isoelétrico para as α -glucosidases

Os pontos isoelétricos das α -glucosidases 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 da Pharmalite com uma faixa de

pH entre 3.0 a 10.0 e a concentração dos géis era de 5%. Foram preparados dois géis, sendo que em um a amostra purificada estava presente e em outro tubo a amostra contendo água (controle). Após focalização por 6 horas a 500V, o gel controle era fatiado em porções de 0.5cm, e cada porção era imersa em 2.0mL 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 os géis contendo as enzimas purificadas foram coradas com Comassie Blue R 250 e os valores de pI foram obtidos de acordo com os dados correspondentes ao gel controle, contendo anfólitos de 3-10.

3.14. Produção de trealose a partir de maltose via reação de transglicosilação catalisada pela α -glucosidase

3.14.1. Produção de trealose via reação de transglicosilação catalisada pela α -glucosidase de *C. thermophilum*

A mistura de reação era constituída de 200 μ L do filtrado da cultura ou a enzima purificada e 200 μ L de maltose 5% em tampão fosfato monobásico de sódio 100mM, pH 7.0. A mistura com um volume final de 400 μ L era incubada a 45°C por diferentes períodos (0-25 horas). A reação era bloqueada por incubação de 50 μ L da reação em banho de água fervente por 5 minutos e posteriormente foram adicionados 10 μ L TCA 100%. Em seguida, as amostras eram centrifugadas a 14.000rpm por 5 minutos e 1 μ L do sobrenadante eram aplicados em placas de cromatografia de camada delgada de sílica-TLC (Kiesegel 60, Merck Co).

3.14.2. Produção de trealose via reação de transglicosilação catalisada pela α -glucosidase de *S. fibuligera*

A mistura de reação era constituída de 200 μ L do filtrado, macerado celular ou da enzima intracelular purificada e 200 μ L de maltose 5% em tampão McIlvaine pH 5.0 ou em tampão fosfato monobásico de sódio 100mM, pH 7.0. A mistura com um volume final de 400 μ L era incubada a 45°C por diferentes períodos (0-25 horas). A reação era bloqueada por adição de 50 μ L da reação em banho de água fervente por 5 minutos e posterior adição de 10 μ L TCA 100%. Em seguida, as amostras eram centrifugadas a 14.000rpm por 5 minutos e 1 μ L do sobrenadante eram aplicados em placas de cromatografia de camada delgada de sílica-TLC (Kieselgel 60, Merck Co).

3.15. Degradação dos maltooligossacarídeos produzidos via reação de transglicosilação por ação da glucoamilase semi-purificada do mutante *exo-1* de *Neurospora crassa*

Após a produção de trealose e maltooligossacarídeos por reação de transglicosilação por ação da α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum*, os 350 μ L de volume obtido foram fervidos e 100 μ L da glucoamilase (1U) foi adicionada na reação. Uma alíquota de 50 μ L foi retirada e fervida, sendo considerada o tempo zero (controle). A incubação foi feita a 60°C por 12 horas, sendo a mistura fervida após este período por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 10 μ L de TCA 100% em 50 μ L da mistura. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em TLC para verificar os produtos de reação.

3.16. TLC

Após um período de incubação, as amostras foram analisadas por cromatografia ascendente em camada de sílica. O sistema de solvente era composto por n-butanol:piridina:água na proporção de (7:3:1) (v/v). A revelação era realizada através de "spray" de uma solução contendo orcinol 0.2% em solução de ácido sulfúrico e metanol na proporção (1:9) (v/v). As manchas foram visualizadas após incubação em estufa a 110°C.

3.17. Análise dos produtos via reação de transglicosilação pela glucosidase extracelular de *C. thermophilum* em HPLC

A análise do produto de reação era feita através de coluna Shimpack CLC-NH₂ (Shimadzu Co.) para carboidratos e a eluição era feita com sistema de solvente orgânico com acetonitrila (82%) como fase móvel. A análise da produção de trealose via reação de transglicosilação em HPLC foi realizada, após incubação com a enzima purificada em tampão fosfato 10mM pH 7.0 + maltose 5% a 40°C por 20 horas. Um detector de índice de refração foi usado nas análises, através de um fluxo de 1.5mL/minuto. Padrões contendo, trealose 10mg/mL e maltose 5%, foram usados como controle. A temperatura do forno era mantida a 40°C, nas condições de ensaio estabelecidas.

3.18. Imunoensaio contra a glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

3.18.1. Imunização

Coelhos New Zealand foram imunizados por aplicações de injeções subcutâneas (1.8mL) no dorso de cada animal contendo a glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum* diluída na proporção de 1:1 com os Adjuvantes utilizados ou com salina 0.9%. A imunização seguiu três etapas: na primeira utilizou-se Adjuvante de Freund Completo. Após 21 dias, realizou-se a segunda aplicação com Adjuvante de Freund Incompleto. Passados mais 21 dias, a terceira aplicação foi realizada com salina. Em todas estas etapas foram utilizadas (300µg) de proteína total. Após 7 dias da última aplicação o sangue foi coletado mediante punção cardíaca (60mL), sendo mantido a 4°C por 1 hora. O soro foi recolhido através de uma filtração com gaze e utilizado para a purificação da fração de IgG.

Primeiramente, 25mL de soro foi mantido a 56°C por 30 minutos. Após este período o soro foi precipitado por adição de 12.5mL de uma solução de sulfato de amônio saturado deixado por uma noite, a 4°C e centrifugado a 8.000rpm por 5 minutos. O precipitado foi ressuspendido com 12.5mL de sulfato de amônio 40% (p/v) e novamente centrifugado nas mesmas condições descritas acima. O precipitado foi então dissolvido em 12.5mL de salina 0.9% (p/v) mais tampão fosfato de sódio 0.02M, pH 7.5, dialisado por 3 dias contra tampão fosfato e aplicado em uma coluna de DEAE-celulose, equilibrada e eluída com o tampão fosfato descrito acima onde a fração de IgG não interagiu com a resina.

Foi aplicado então, um gradiente contínuo de NaCl de 0 a 1M no próprio tampão para retirada de IgM e demais proteínas adsorvidas. A fração contendo IgG foi dialisada contra água, liofilizada, ressuspensa em tampão PBS [composto de NaCl 0.8% (p/v), KCl 0.02% (p/v), Na₂HPO₄ 0.144% (p/v), KH₂PO₄ 0.024% (p/v), pH 7.4 e 0.1% (p/v) de BSA]. Após estes procedimentos a amostra foi filtrada (filtro Nalgene 0.45µm), e utilizada para a quantificação por teste ELISA dos anticorpos anti-glucosidásica.

3.18.2. Teste ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Inicialmente, a amostra do antígeno foi quantificada pelo método de Lowry (1951) e diluída em tampão carbonato/bicarbonato (Na₂CO₃ 15mM e NaHCO₃ 35mM de água Milli-Q), pH 7.4. A placa de poliestireno de Corning de alta afinidade foi sensibilizada com o antígeno diluído (máximo de 30ng/poço) durante uma noite, a 4°C. A placa foi lavada 5 vezes com PBS mais Tween 20 0.05%, bloqueada com 200µL por poço de tampão de bloqueio (BSA 1% em PBS) por uma hora a 37°C, e novamente lavada.

As frações de IgG contendo os anticorpos foram diluídos seriamente em log de 10 ou log de 2 em tampão diluente (tampão de bloqueio mais Tween 20 0.05%, distribuída nos poços (100µL/poço) excluindo-se o branco (poço 1) da reação, mantido a 4°C, durante uma noite. Após este período a placa foi novamente lavada, e adicionou-se 100µL/poço da solução de anticorpos conjugados à peroxidase contra imunoglobulinas de coelhos diluídos 1:1000 em tampão diluente por 1 hora, a 37°C. A placa foi novamente lavada como descrito anteriormente. Em seguida, adicionou-se 100µL/poço da solução de substrato

OPD (o-fenilenediamine dihydrochloride) composto de 10mg do substrato para 10mL de diluente de OPD. A placa foi coberta com papel alumínio e deixada a temperatura ambiente de 5 a 15 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50µL/poço de solução de ácido sulfúrico 16% (v/v) e a quantificação dos anticorpos realizada em leitor de ELISA com filtro a 490nm.

3.19. Técnica de Western Blotting

Este método permite identificar um antígeno em uma mistura complexa de proteínas. A primeira etapa envolve uma eletroforese (SDS-PAGE ou PAGE) das proteínas a serem analisadas. Após a eletroforese, o gel era incubado por 20 minutos em tampão de transferência (Tris 3.03g; glicina 14.4g; metanol 200mL; água destilada q.s.p 1000mL).

Posteriormente, organizou-se o gel na forma de sanduíche (esponja, gel, membrana e esponja) e fez-se a transferência para membrana. A transferência foi feita usando uma voltagem de 30mV/15mA com o próprio tampão de transferência por um período de 1 hora e 30 minutos. Após a transferência a membrana era colocada em uma placa de Petri e, adicionou-se o corante Ponceau em ácido acético 1%, para observar e avaliar o processo de transferência. Em seguida, a membrana era descorada com água destilada abundante até a retirada do corante. Neste momento, adicionou-se o tampão de bloqueio (Leite em pó molico 1.25g; Tris 1M pH 7.5 1.25mL; Tween 20 0.075mL; água q.s.p 25mL) 15mL onde foi incubado a 4° C, durante uma noite sob uma mesa agitadora.

No dia seguinte a membrana era lavada 3 vezes por 5 minutos com tampão Tris-HCl 10mM pH 7.5 (25mL) a temperatura ambiente.

A membrana então, era incubada por 30 minutos com 15mL de tampão imunoblot (Leite em pó molico 1.25g; Tris 1M pH 7.5 1.25mL; NaCl 5M 0.75mL; Tween 20 12.5μL; Água q.s.p 25mL).

O anticorpo primário contendo IgG purificado (diluição **1:300**) era adicionado aos 15mL (60μL). Este era mantido a temperatura ambiente sob agitação por um período de 2 horas. A membrana era lavada novamente com tampão Tris-HCl 10mM pH 7.5, 3 vezes por 5 minutos, com 25mL cada, a fim de retirar o máximo de anticorpo que não tinha aderido a proteína de interesse.

Posteriormente, a membrana era incubada durante 30 minutos com 15mL de tampão imunoblot, para preencher os espaços vazios. A membrana era então, incubada com 15μL de anticorpo secundário contendo peroxidase (diluição **1:1000**), no próprio tampão imunoblot durante, 1 hora e 30 minutos.

O material era lavado com tampão Tris-HCl 10mM pH 7.5, 3 vezes por 5 minutos, com 25mL cada.

Então, revelamos o material com a **solução reveladora** (Tris-HCl 0.05M pH 6.8 20mL; 4-cloro naft-1 em metanol 0.3% 5mL; H₂O₂ 30% 0.03mL).

A placa de Petri era coberta com papel alumínio (evitar exposição a luz), onde permaneceu sob agitação por um período de 5 minutos. A reação era paralisada pela lavagem da membrana com água destilada.

A visualização de uma banda permite determinar a presença de anticorpos específicos para um antígeno do extrato protéico.

3.20. Extração diferencial e localização da proteína de interesse usando a técnica de Western blotting em culturas de *C. thermophilum*.

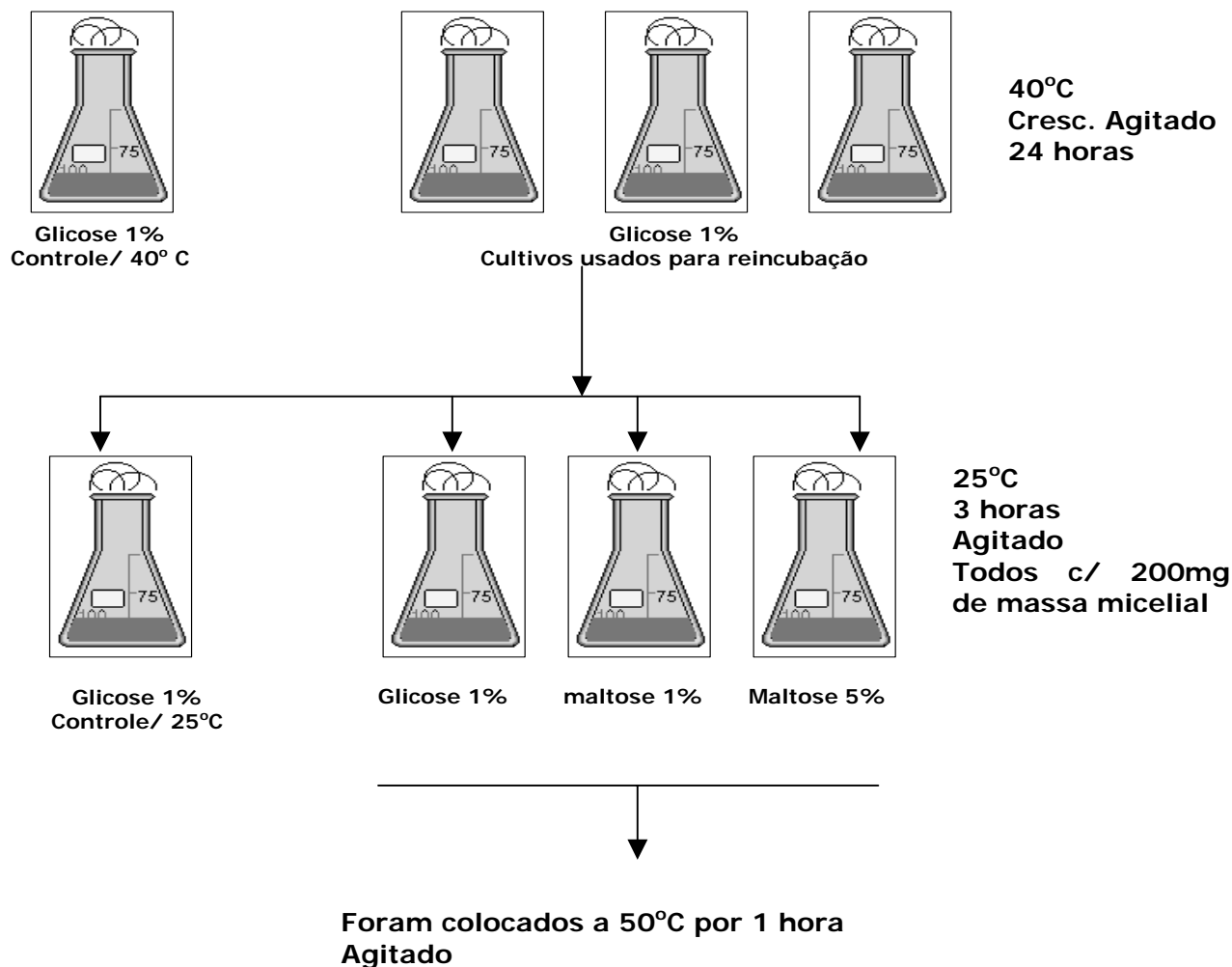
As culturas de *C. thermophilum* foram desenvolvidas em meio M₅ por um período de 120 horas sob condição estacionária a 40°C, com glicose, amido ou maltose, como fonte de carbono. Após este período, as culturas eram filtradas sendo, o micélio de cada cultura lavado em tampão PBS pH 7.5 e imediatamente congelados a -20°C até o momento do uso. Para obtenção das proteínas citosólicas e da fração obtida da membrana de cada preparação, as massas epiteliais foram individualmente congeladas em nitrogênio líquido e trituradas num grau até a obtenção de um pó fino. Em seguida, cada macerado obtido foi ressuscitado em 10 mL do tampão A (Tris-HCl 25 mM pH 7.5; PMSF 1mM; MG 132 50µM; E-64 1µM; Leupeptina 1µM; EDTA 0.5mM) para extração das proteínas citosólicas. Para a clarificação do extrato, as amostras foram inicialmente centrifugadas a 10.000rpm por 20 minutos e, após coleta dos sobrenadantes, os mesmos foram submetidos a ultracentrifugação a 35.000rpm por 45 minutos. O material insolúvel obtido após a primeira centrifugação era utilizado para obtenção das proteínas de membrana. Para este propósito os “pellets” obtidos foram novamente ressuscitados em 2mL de tampão A (3 vezes), seguido de centrifugação a 10.000rpm por 5 minutos para eliminação de proteínas citosólicas que porventura ainda estivessem presentes em cada preparação. Os “pellets” foram individualmente macerados em grau na presença de 2mL do tampão B (Tris-HCl 25mM pH 7.5; uréia 7M; tiouréia 2M; CHAPS 4%; glicerol 5%) para extração das proteínas de membrana. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos e os sobrenadantes obtidos

submetidos a uma diálise durante 12 horas contra 3 litros de tampão Tris-HCl 25 mM pH 7.5 a 4°C. Após diálise, as proteínas precipitadas presentes em solução foram recuperadas por centrifugação a 10.000rpm por 10 minutos. A análise do sobrenadante obtido por SDS-PAGE a 12% não demonstrou presença significativa de proteínas. Por outro lado, quase a totalidade das proteínas de membrana eram encontradas nos “pellets” obtidos, os quais foram diretamente solubilizados no tampão de amostra (Tris-HCl 60mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.001%). O filtrado da cultura (proteína extracelular) num volume de 100mL foi primeiramente, dialisado contra água. Posteriormente liofilizado, precipitado com 2 volumes de acetona (seguir-se o mesmo procedimento da purificação para extração da enzima extracelular) e após 2 horas foram centrifugados a 10.000rpm por 15 minutos. O precipitado era ressuspenso em 2mL de água destilada o qual foram usados para a localização da proteína de interesse. Cerca de 15µL de cada preparação foi avaliado por SDS-PAGE 12% seguido de coloração por Coomassie Blue R 250. Para os experimentos de “immunoblotting”, cerca de 20µg de cada fração citosólica serviu como a quantidade protéica de referência para estimar quantidades equivalentes de proteínas de membrana a serem transferidas para o papel de nitrocelulose (GIBCO), essencialmente como descrito por Towbin et al., 1992.

3.21. Acúmulo de trealose durante o choque térmico

As culturas de *C. thermophilum* eram desenvolvidas em meio M₅ (item

3.2.2.1), como representado na **figura 8**, abaixo:



Posteriormente a este período os meios mantidos a 50°C e os controles (glicose 40°C e glicose 25°C), foram usados na quantificação de trealose conforme descrito no **item 3. 23**.

3.22. Acúmulo de trealose usando o meio YPS 1

O cultivo de *C. thermophilum* era realizado em Erlenmeyer de 125mL em meio **YPS 1** com amido ou glicose como fonte de carbono sob agitação a 40° ou 50°C por um período de 24 horas. Posteriormente, 200mg da massa micelial de cada meio era retirado para dosagem de trealose, conforme descrito no **item**

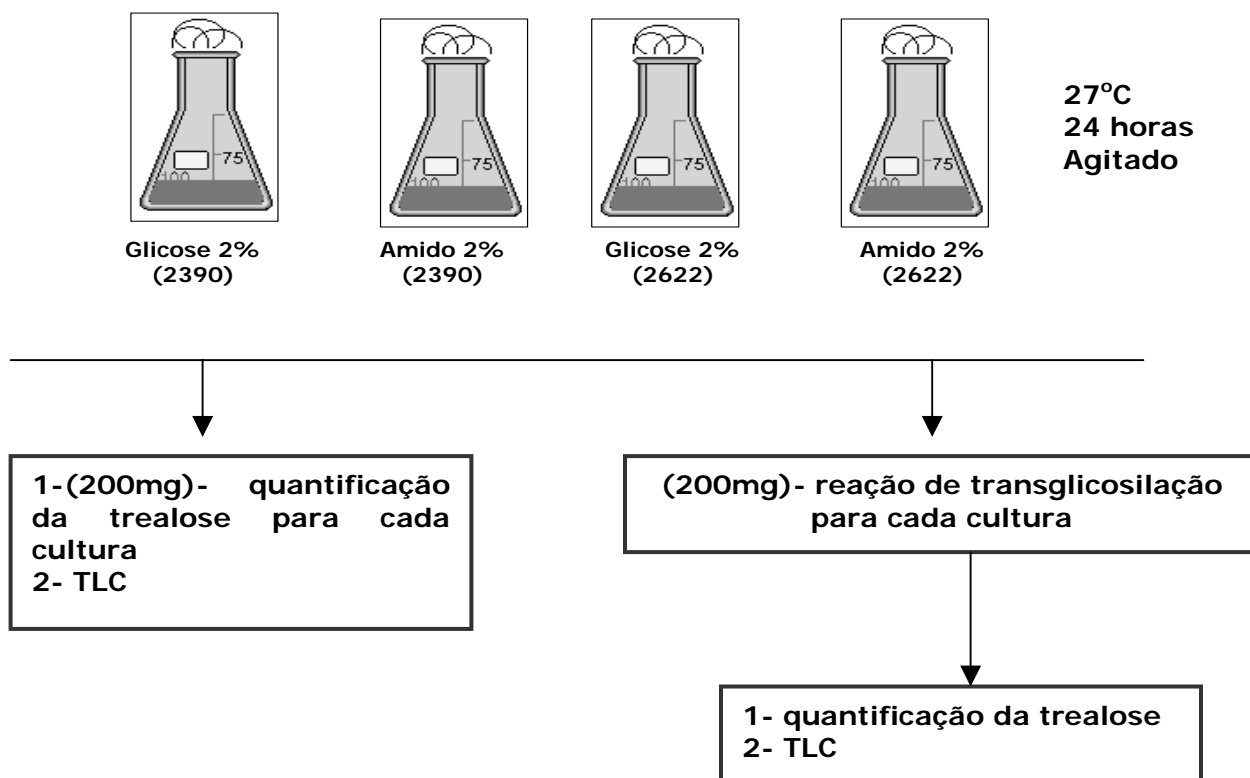
3.23. Produção de trealose via reação de transglicosilação também foram realizados nestas culturas.

3.23. Dosagem de trealose total

As células intactas ou a massa micelial obtidas a partir do **item 3.21** e **3.22** foi devidamente pesada e a cada 200mg eram adicionados 1.5mL de Na_2CO_3 0.25M e a extração feita em banho fervente por 20 minutos. Em seguida, as amostras eram centrifugadas a 5.000rpm por 5 minutos e uma alíquota de 200 μL do sobrenadante era utilizada para a dosagem de trealose. O pH desta alíquota era levado a 5.5 com a adição de 100 μL de ácido acético 1M e 100 μL de tampão acetato de sódio 300mM + CaCl_2 30mM. Uma alíquota de 100 μL desta amostra era separada e a reação iniciada pela adição de 100 μL (1U) de trealase conidial de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Zimmermann et al., 1990) ou 100 μL de trealase pura de *Scytalidium thermophilum* (Kadowaki, 1996). A incubação se processava por 30 minutos a 40°C e era interrompida em banho fervente por 10 minutos. A glicose proveniente da hidrólise da trealose era dosada usando o Kit de glicose oxidase, como descrito nos **itens 3.3** e **3.3.1**.

3.24. Produção de trealose nas culturas de *S. fibuligera* (2390 e 2622)

As culturas de leveduras eram desenvolvidas em meio **YPS 2** (item 3.2.2.4) usadas na quantificação de trealose presentes nos cultivos e via reação de transglicosilação, como representado na **figura 9**, abaixo:

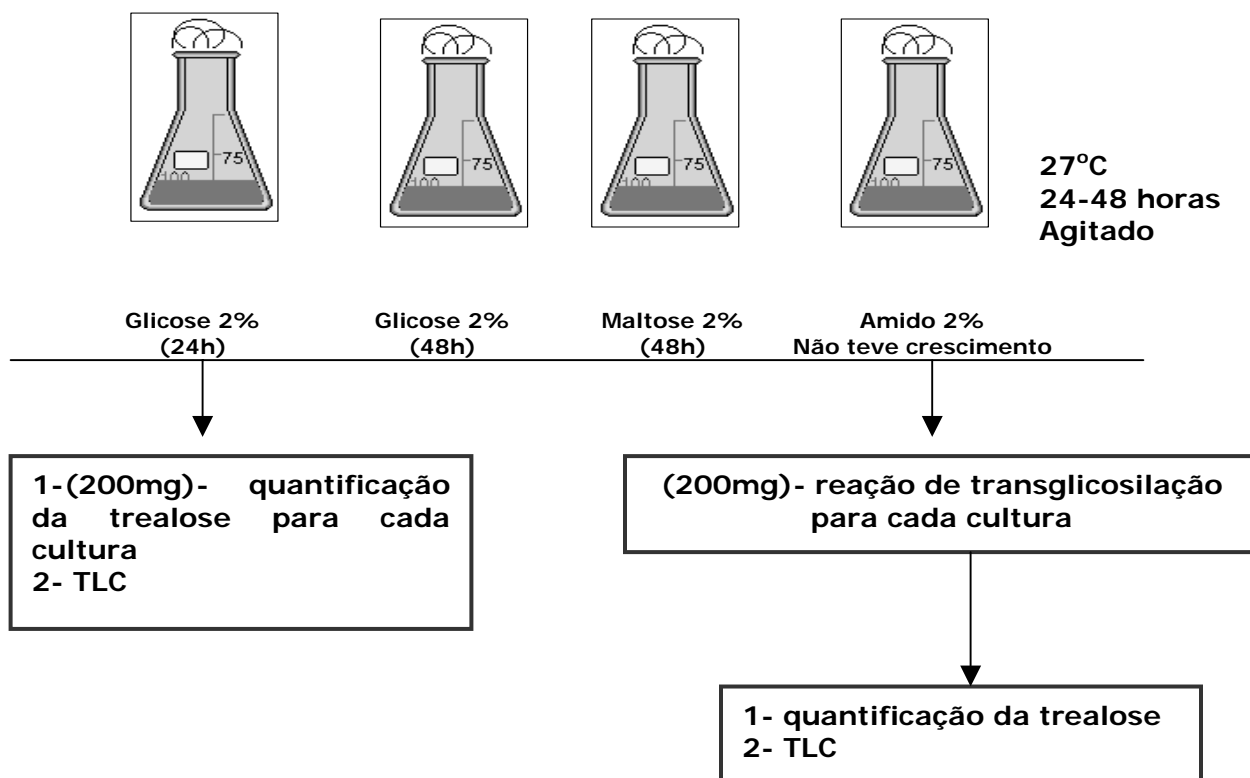


Após um período de 24 horas nos quais foram observadas as produções celulares, sob condição de agitação (100rpm), a 27°C, as células eram posteriormente, filtradas e lavadas com água estéril. As células eram divididas em duas porções iguais (200mg cada), sendo uma incubada em Na_2CO_3 para dosagem de trealose (item 3.23), retirando-se uma alíquota de 50 μL + 10 μL de TCA 100% que foram adicionadas para aplicação em TLC. A outra porção contendo 200mg de células era incubada em 1mL de tampão fosfato 100mM pH

7.0 + maltose 5% a 45°C por um período de 20 horas, a fim de detectar a produção de trealose via reação de transglicosilação. Após este período as amostras foram fervidas por 10 minutos, centrifugadas a 14.000rpm por 10 minutos. Em seguida, 200µL da mistura de reação eram retiradas sendo adicionados 100µL de ácido acético 1M e 100µL de tampão acetato de sódio 300mM + CaCl₂ 30mM. Uma alíquota de 100µL desta amostra era separada e a reação iniciada pela adição de 100µL de trealase pura de *Scytalidium thermophilum* (Kadowaki, 1996). A incubação se processava por 30 minutos a 40°C e era interrompida em banho fervente por 10 minutos. A glicose proveniente da hidrólise da trealose era dosada usando o Kit de glicose oxidase. Uma outra alíquota era retirada (50µL) e adicionada a 10µL de TCA 100% para aplicação em TLC.

3.25. Produção de trealose nas culturas de *S. cerevisiae*

As culturas de *S. cerevisiae* eram desenvolvidas em meio **YPS 2** (item 3.2.2.4) usadas na quantificação de trealose presentes nos cultivos e via reação de transglicosilação, como representado na **figura 10**, abaixo:



Culturas de *S. cerevisiae* foram desenvolvidas por um período de 24-48 horas no qual foram observadas as produções celulares, sob condição de agitação (100rpm) a 27°C. As células eram posteriormente, filtradas e lavadas com água estéril. As células eram divididas em duas porções iguais (200mg cada), sendo uma das porções incubadas em Na_2CO_3 para dosagem de trealose (item 3.23), retirando-se também uma alíquota de 50 μL + 10 μL de TCA 100% que foram

adicionadas para aplicação em TLC. E, a outra porção contendo 200mg de células eram incubadas em 1mL de tampão fosfato 100mM pH 7.0 + maltose 5% a 45°C por um período de 20 horas, a fim de detectar a produção de trealose via reação de transglicosilação. Após este período as amostras foram fervidas por 10 minutos e centrifugadas a 14.000rpm por igual período. Em seguida, 200µL da mistura de reação eram retiradas sendo adicionados 100µL de ácido acético 1M e 100µL de tampão acetato de sódio 300mM + CaCl₂ 30mM. Uma alíquota de 100µL desta amostra era separada e a reação iniciada pela adição de 100µL de trealase pura de *Scytalidium thermophilum* (Kadowaki, 1996). A incubação se processava por 30 minutos a 40°C e era interrompida em banho fervente por 10 minutos. A glicose proveniente da hidrólise da trealose era dosada usando o Kit de glicose oxidase. Uma outra alíquota era retirada (50µL) e adicionada a 10µL de TCA 100% para aplicação em TLC.

3.26. Diminuição da maltose e produção de trealose e maltooligossacarídeos observados pelo método de DNS em leveduras

As leveduras (*S. cerevisiae* e *S. fibuligera* 2390 e 2622) eram cultivadas em meio **YPS 2** como descrito no item **3.2.2.4**, onde utilizou-se amido como fonte de carbono para *S. fibuligera* e maltose para *S. cerevisiae*. Após 48 horas de cultivo, os meios foram filtrados, as células eram congeladas para posterior obtenção da enzima. A extração, realizou-se com areia lavada e 0.5mL do extrato, contendo a enzima intracelular, era usado para a análise. As amostras eram incubadas a 40°C em tampão fosfato 100mM pH 7.0 + maltose 5%. Em

diferentes tempos de reação (0, 4, 8 e 24h), alíquotas eram retiradas, fervidas e dosadas pelo método de DNS ou aplicadas em TLC.

4. RESULTADOS

4.1. Purificação da atividade α -glucosidásica extracelular de *C. thermophilum*

Para a obtenção do filtrado contendo a α -glucosidase com atividade de hidrolase e glicosiltransferase, foram preparados meios de cultura contendo o fungo *C. thermophilum*, sendo os inóculos mantidos a 40°C por um período de 120 horas sob condição estacionária, onde obteve-se maior produção de α -glucosidase (**figura 11**). Na sequência foram iniciados os procedimentos de isolamento e purificação, sendo importante separar a enzima que possuía atividade de síntese de trealose de maltose. Podemos observar a sequência de operação empregadas na purificação representadas na **tabela 1**. O procedimento empregado produziu uma purificação de 67 vezes, recuperação de 14% e uma atividade específica de 33.3.

Nas **figuras 12, 13, e 14**, estão representados os perfis cromatográficos da α -glucosidase extracelular. A coluna de DEAE-celulose mostra que a enzima foi eluída com o próprio tampão da coluna como descrito em material e métodos. Uma maltase clássica a qual apresenta atividade de hidrólise sobre maltose, mesmo em altas concentrações, era eluída no gradiente desta cromatografia, ou seja, quando a mesma era aplicada em uma reação de transglicosilação, contendo 20% de maltose como substrato, este era degradado ocorrendo a formação somente de glicose como produto final (**figura 12**). As frações reunidas do pico I da DEAE-celulose foram aplicadas em CM-celulose, devidamente equilibrada em tampão acetato 10mM pH 5.5. A eluição da atividade de α -

glucosidase em cromatografia de CM-celulose é mostrada na **figura 13**. O pico I não aderiu a coluna e foi eluído juntamente com a maior parte de proteínas. O pico II era eluído em um gradiente de sal e foi o único que exibiu atividade de glicosilhidrolase e de transglicosilação. As frações do pico II foram reunidas, devidamente dialisadas, liofilizadas, redissolvidas em tampão Tris-HCl 50mM pH 7.0, com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M o qual foi o passo determinante na purificação em coluna de Octil- Sepharose (**figura 14**).

A α -glucosidase extracelular purificada mostrou uma única banda em PAGE quando corada com Comassie Blue (**figura 15 A**) ou pela dosagem da atividade enzimática (**figura 15 B**). Análises em SDS-PAGE sem ferver, a amostra mostrou uma única banda corada por Comassie Blue (**figura 15 D**), assim como a sua atividade (**figura 15 C**). Podemos observar também que em SDS-PAGE 10%, com a amostra fervida, a α -glucosidase exibiu 2 bandas de similar intensidade (**figura 15 E**).

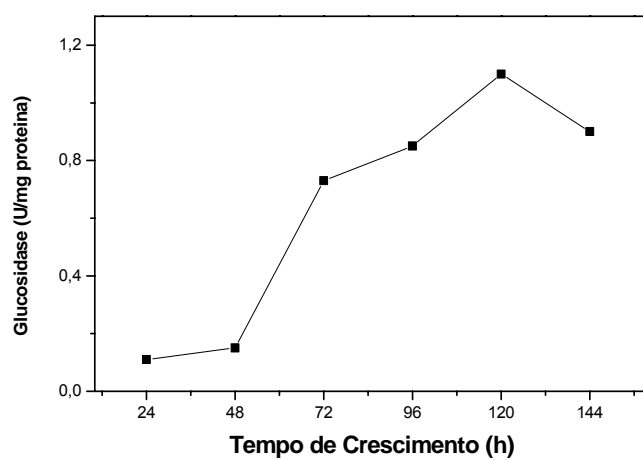


Figura 11– Tempo de crescimento para obtenção da α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum*. Culturas foram desenvolvidas em M₅, com amido como fonte de carbono. A cada 24 horas a dosagem enzimática era analisada como descrito em material e métodos.

Tabela 1- Purificação da α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum*

Etapas	Prot. total (mg)	Ativ. Total (U)	Ativ. Esp. (U/mg)	Purif. (vezes)	Recup. (%)
Precip. Acetona	138	73	0.5	1	100
DEAE-celulose	42	122	2.9	6	167
CM-celulose	8.7	73	8.4	17	100
Octil Sepharose	0.3	10	33.3	67	14

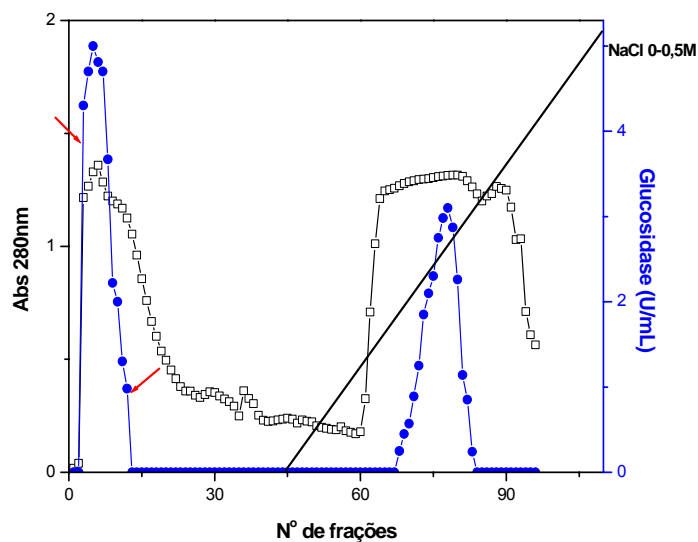


Figura 12– Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose da α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum*. A coluna (1.5 X 11cm) foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 10mM pH 5.5. Frações de 5.0mL foram coletadas e submetidas à leitura de proteínas em absorvância a 280nm (□) e dosagem de atividade α -glucosidásica (U/mL) (•). As flechas indicam as frações reunidas.

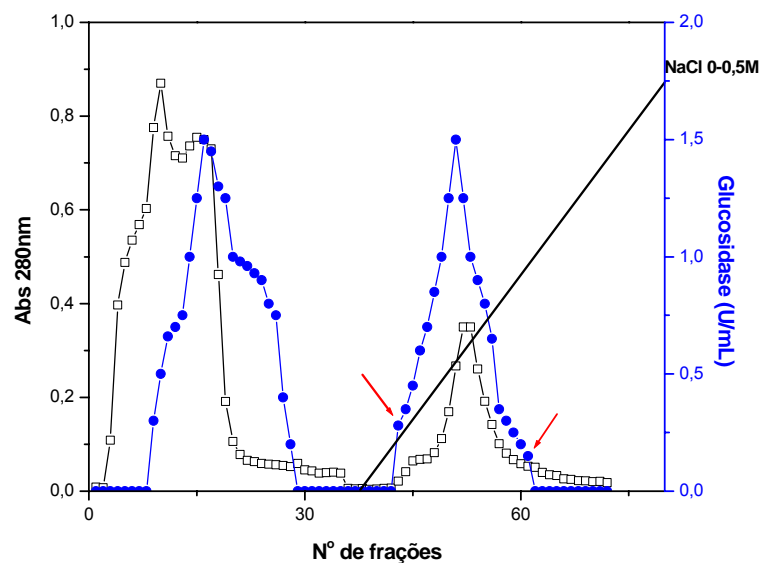


Figura 13 – Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-celulose da α -glucosidase extracelular (pico I da DEAE-celulose) de *C. thermophilum*. A coluna (1.5 X 10 cm) foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10mM pH 5.5 e, após aplicação da amostra, a coluna era lavada com tampão de equilíbrio diminuindo o número de contaminantes. Posteriormente, era aplicado um gradiente linear de 0-0,5M de NaCl a coluna. Frações de 5.0mL foram coletadas e submetidas à leitura de proteínas em absorbância a 280nm (□) e dosagem de atividade α -glucosidásica (U/mL) (•). As flechas indicam as frações reunidas.

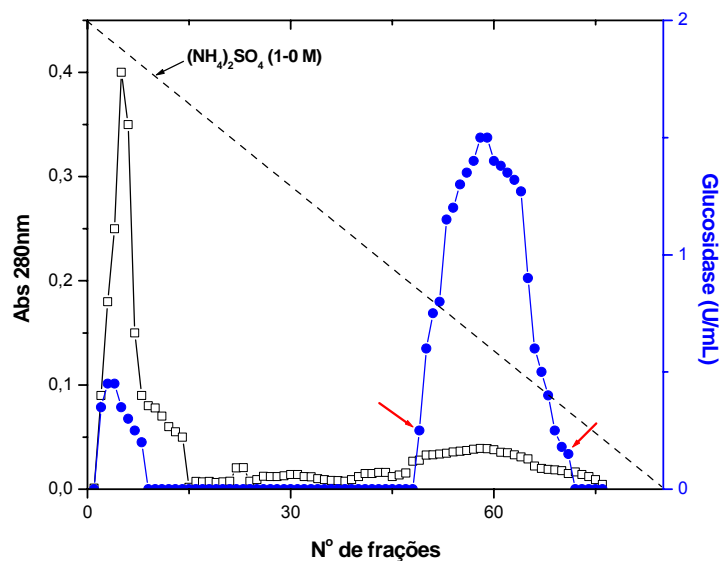


Figura 14 – Cromatografia em coluna de Octil- Sepharose (hidrofóbica) da α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum*. A coluna (1.5 X 5.5 cm) foi equilibrada em tampão Tris-HCl 50mM pH 7.0, contendo 1M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Após aplicação da amostra (pico II da CM-celulose) a coluna era lavada com o próprio tampão e aplicou-se posteriormente, um gradiente de 1-0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frações de 2.5mL eram coletadas para a leitura de absorbância em 280nm (□) e atividade α -glucosidásica (U/mL) (●). As flechas indicam as frações reunidas.

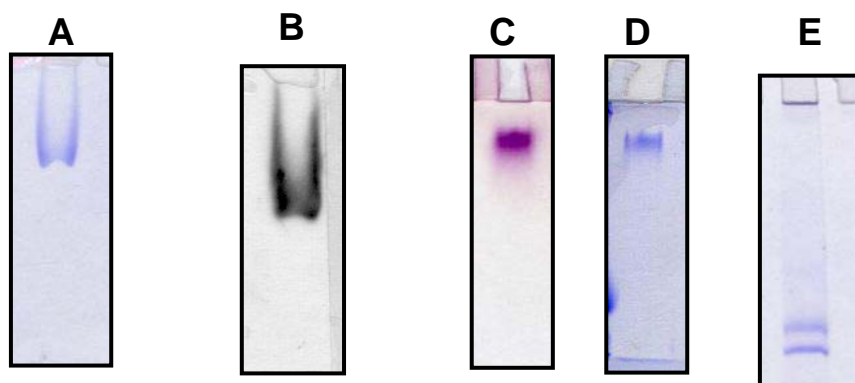


Figura 15– Eletroforese em gel de poliacrilamida da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*.(A) **PAGE 4.3-** a concentração de acrilamida no gel era 6%, sendo corado com Comassie Brilliant Blue R 250; **(B) PAGE 4.3-** (6%) - gel de atividade α -glucosidase extracelular revelado como descrito em material e métodos; **(C) SDS-PAGE-** (amostra não fervida) (10%) atividade de α -glucosidase extracelular purificada como descrito em material e métodos; **(D) SDS-PAGE** (amostra não fervida) (10%) corada por Comassie Blue; **(E) SDS-PAGE** - a concentração do gel era de 10% de acrilamida. Amostra fervida da α -glucosidase purificada constituída de duas bandas polipeptídicas.

4.2. Estimativa da massa molecular da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

Para estimar a massa molecular da α -glucosidase extracelular purificada, duas metodologias foram empregadas. A primeira foi por cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-100. Através do gráfico, mostrado na **figura 14**, foi estimada a massa molecular nativa da α -glucosidase extracelular purificada como sendo da ordem 107 KDa.

A segunda metodologia empregada foi a de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições semi-desnaturantes (sem ferver) de acordo com Laemmli (1970), utilizando-se o detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A **figura 15** mostra a massa molecular da α -glucosidase extracelular purificada estimada em 136 KDa.

Também verificamos o peso molecular das bandas desnaturadas em gel de SDS (10%) e observamos que a α -glucosidase possui 4 subunidades, sendo 2 subunidades estimadas em 22KDa e 2 subunidades com 26KDa.

4.3. Influência da temperatura na atividade da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

A temperatura ótima de atuação da enzima purificada foi estimada quando incubada na faixa de 35 a 70°C. Os resultados estão apresentados na **figura 18**. Observamos que a melhor temperatura para atividade de α -glucosidase extracelular foi 60°C. A 65°C a enzima apresentou uma atividade de aproximadamente 97%, possuindo uma queda brusca de 67%, a 70°C. Já em

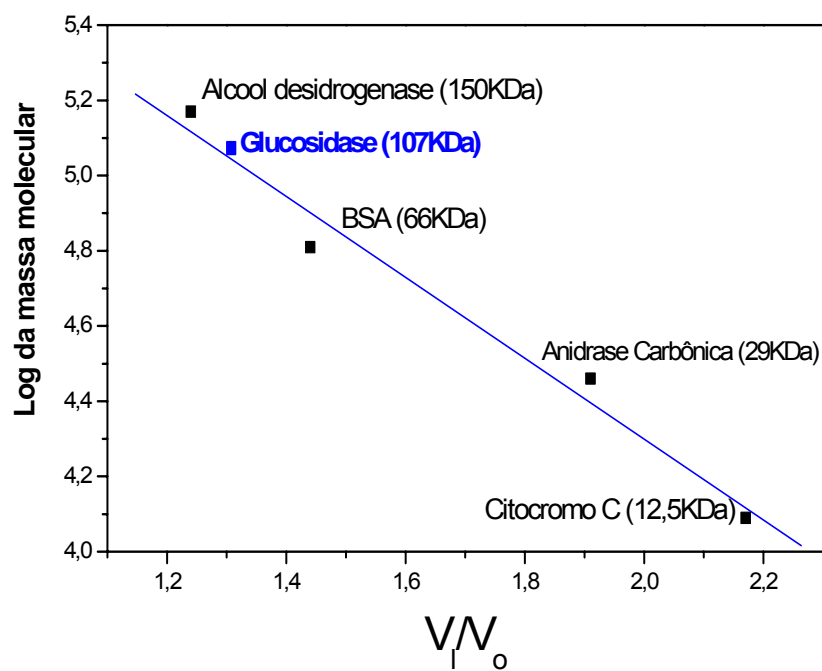


Figura 16- Determinação da massa molecular da α -glucosidase purificada de *C. thermophilum* por cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-100), conforme descrito no item 3.9.5.1.

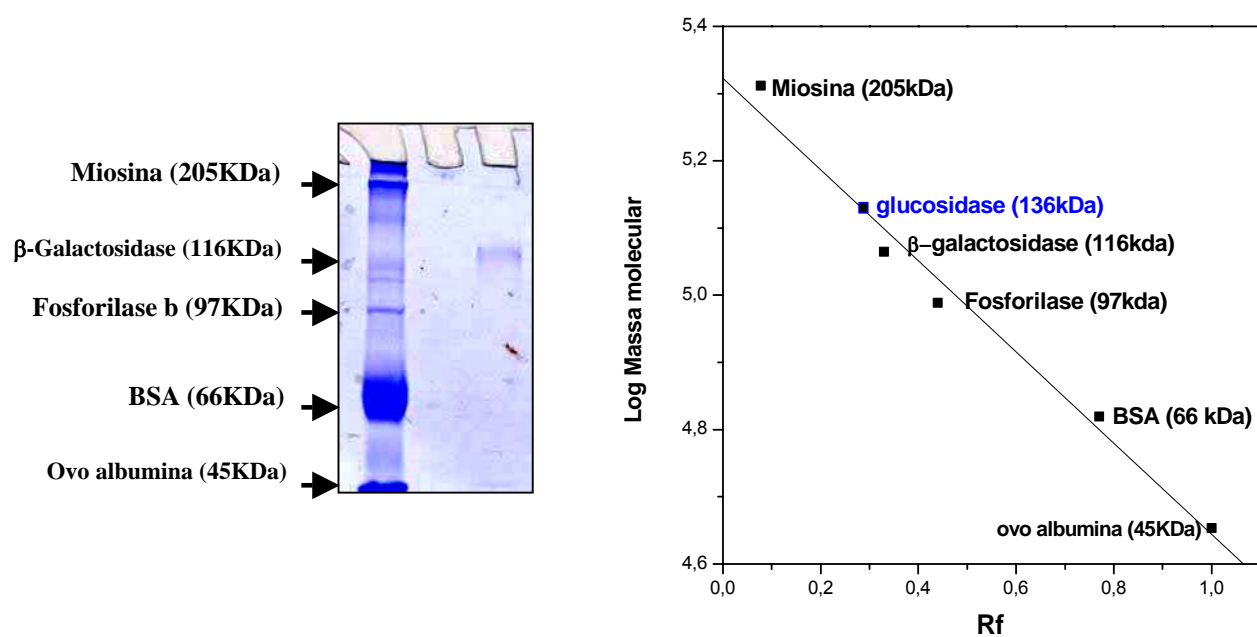


Figura 17- Determinação da massa molecular por SDS-PAGE 9% da α -glucosidase purificada de *C. thermophilum* semi-desnaturada, de acordo com a metodologia de Laemmli (1970), conforme descrito no item 3.9.5.2.

baixas temperaturas, 45, 50 e 55°C a atividade glucosidásica aumentou linearmente com valores aproximados de 23, 60 e 75%, respectivamente.

4.4. Influência do pH do meio de reação na atividade da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

A α -glucosidase exibiu uma ampla faixa de pH ótimo entre 4.5 a 7.0 (**Figura 19**), sendo que em pH 3.5 a enzima purificada foi praticamente inativa. Em pH 4.0 e 7.5, manteve-se com aproximadamente 80% da atividade enzimática, decaindo bruscamente em pH 8.0. Os tampões utilizados para as análises dos pHs foram tampão McIlvaine (3.5-8.0) e tampão fosfato 100mM (6.0-8.0).

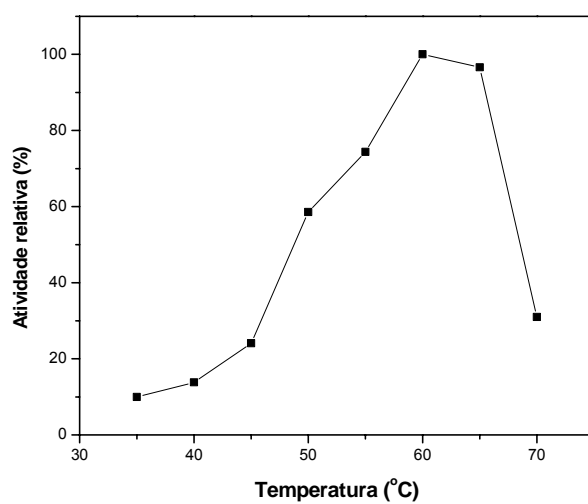


Figura 18 – Curva da temperatura ótima de atividade da α -glucosidase purificada de *C. thermophilum*. A atividade da α -glucosidase purificada foi determinada nas condições ótimas de atividade, em temperatura variando de 35 a 70°C.

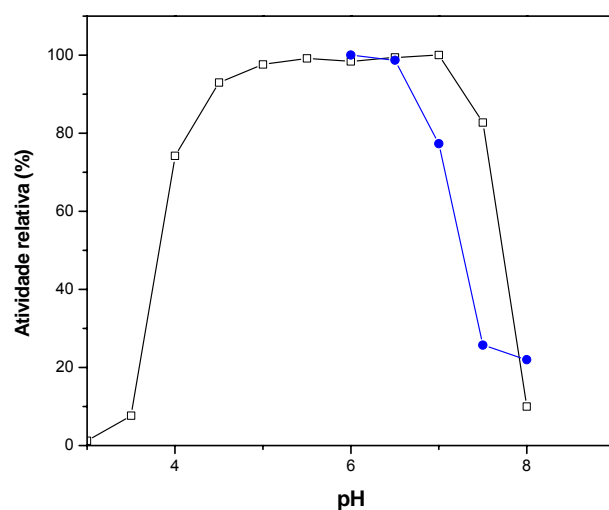


Figura 19– Determinação do pH ótimo de atividade de α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum*. Os tampões utilizados foram: solução McIlvaine na faixa de pH entre 3.5 a 8.0 (□) e tampão fosfato monobásico de sódio 100mM na faixa entre 6.0 a 8.0 (•). A atividade foi determinada nas condições ótimas de atividade.

4.5. Efeito de íons sobre a atividade da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

Foi investigado o efeito de vários íons em diferentes concentrações sobre a atividade de α -glucosidase (**tabela 2**). Podemos observar que alguns íons tiveram efeito inibitório sobre a atividade da enzima, como Ag^+ , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} . O Hg^{+2} e a Ag^+ inibiram drasticamente a atividade enzimática em 100%. Outros íons tiveram pouco efeito sobre a atividade da enzima purificada, com exceção do Zn^{+2} e do Cu^{+2} os quais inibiram ao redor de 70 e 54%, respectivamente, da atividade enzimática. A presença de EDTA apresentou uma ligeira diminuição (9%) na atividade da α -glucosidase, sugerindo que a atividade da enzima seja independente de metais, mas, a presença desses íons estariam promovendo a inibição da atividade glucosidásica.

4.6. Estabilidade térmica da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

Para determinar a estabilidade da α -glucosidase purificada frente a temperatura, a enzima foi incubada a 50, 55 e 60°C, por até 60 minutos. Após esse período foram determinadas as atividades remanescentes. Na **figura 20**, podemos observar que a meia-vida da α -glucosidase extracelular incubada a 55 e 60°C, foi de 54 e 8 minutos, respectivamente. A α -glucosidase na temperatura de 50 e 55°C, não sofreu inativação térmica acentuada como observado a 60°C, sugerindo que a 50 e 55°C, a enzima é altamente estável. Em 65°C, a enzima demonstrou completa desnaturação nos primeiros 10 minutos de incubação (dados não mostrados).

Tabela 2- Efeito de íons sobre a atividade da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

Íons (1mM)	U/mL	%
Controle	16,8	100
AgNO ₃	0	0
AlCl ₃	11	65
BaCl ₂	12,4	74
CaCl ₂	14,5	86
CoCl ₂	8,3	49
EDTA	15,3	91
FeSO ₄	14,5	86
HgCl ₂	0	0
KCl	12,6	75
MgCl ₂	16,3	97
MnCl ₂	16,8	100
NH ₄ Cl	16,6	99
ZnCl ₂	5,1	30
CuSO ₄	7,7	46

Os valores correspondem a média de pelo menos 4 experimentos.
Controle: sem adição de íons.

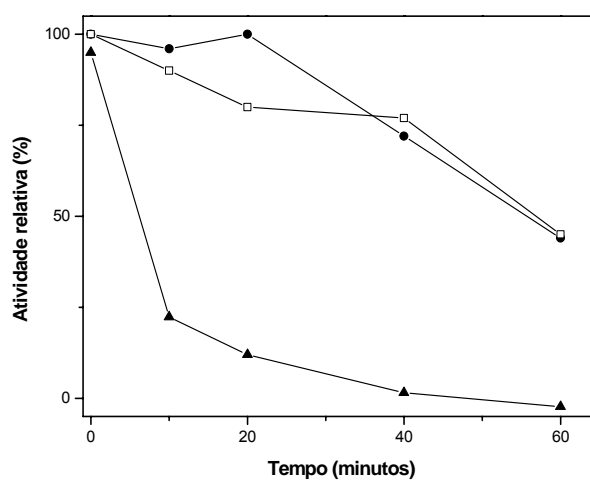


Figura 20- Estabilidade térmica da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*. A enzima era incubada a 50, 55 e 60°C, encontrando-se em água e nos tempos indicados de 0 a 60 minutos, alíquotas eram retiradas para as dosagens enzimáticas. Símbolos: (▲) 60° C; (●) 50° C; (□) 55°C.

4.7. Especificidade ao substrato e efeito de açúcares na atividade da α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum*

A α -glucosidase purificada não hidrolisou outros substratos dissacarídeos, exceto a maltose. No entanto, teve ação catalítica sobre maltooligossacarídeos, amido, amilose e isomaltose (**tabela 3**). Podemos observar ainda que apesar da enzima não possuir atividade catalítica sobre trealose, este açúcar promoveu a inibição da atividade de hidrolase da α -glucosidase na mistura de substrato. Também podemos sugerir que amido, maltooligossacarídeos e maltose são hidrolisados pela mesma enzima, já que não observamos uma somatória dos valores apresentados sobre a atividade de α -glucosidase quando os mesmos foram usados em uma mistura.

4.8. Determinação de carboidratos neutros na atividade da α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum*

O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Dubois et al (1956), utilizando-se glicose como padrão.

O conteúdo de carboidratos determinado para a α -glucosidase extracelular purificada foi 14%, sugerindo que a enzima seja uma glicoproteína. Como sabemos, a maioria das enzimas extracelulares são glicoproteínas, apresentando certa quantidade de açúcares presentes na molécula.

Tabela 3- Especificidade de α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

Substrato (1%)	Atividade residual (%)
Maltose	100
Amilose	71 \pm 5
Amido	65 \pm 4
Maltooligossacarídeos (dp 4-10)	32 \pm 3
Isomaltose	12 \pm 0,9
Trealose	ND
Celobiose	ND
Celulose	ND
Sacarose	ND
Rafinose	ND
Xilana	ND
p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo	ND
p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo	ND
p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo	ND
maltose + trealose	68 \pm 5
maltose + amido	108 \pm 9
maltose + maltooligossacarídeos	98 \pm 5
maltose + amilose	128 \pm 7

Condições: A α -glucosidase purificada foi incubada em diferentes substratos com tampão fosfato 100mM pH 7.0. ND: atividade não detectada pelo método utilizado. Os dados representam o desvio padrão de pelo menos três experimentos diferentes.

4.9. Determinação de carboidratos em gel de poliacrilamida

Os carboidratos presentes na molécula da enzima purificada podem ser observados em PAGE 4.3 (6%) (**figura 21**), demonstrando a natureza glicoproteica da enzima purificada.

4.10. Determinação das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$

A determinação dos parâmetros cinéticos da α -glucosidase extracelular foi realizado com maltose como substrato, variando as concentrações de 0.025 a 3mM. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados conforme procedimento descrito por Lineweaver & Burk (1934). A enzima demonstrou inibição para concentração de substrato acima de 1mM o que nos fez considerar concentrações de molaridades mais baixa para análise do K_m e da $V_{m\acute{a}x}$. Os valores do K_m e da $V_{m\acute{a}x}$ obtido pela enzima purificada foram $0.55 \pm 0.04\text{mM}$ e $34.16 \pm 2.73 \text{ U/mg}$ proteínas totais, respectivamente (**figura 22**).

A determinação dos parâmetros cinéticos com amido como substrato foram realizados com a concentração de 0.25 a 6mg por tubo de reação. O K_m e a $V_{m\acute{a}x}$ obtido pela enzima foram $4.35 \pm 0.42\text{mg/mL}$ e $4.4 \pm 0.42\text{U/mg}$ proteínas totais, respectivamente (**figura 23**).

Sendo a trealose um inibidor da atividade α -glucosidase, realizamos um teste cinético sendo os dados aplicados em gráfico a fim de determinar se o inibidor atua de forma competitiva ou não-competitiva. Usando a trealose nas concentrações de 1 e 5mM, observamos que a trealose promoveu apenas diminuição da $V_{m\acute{a}x}$ (**figura 24 e 25**).

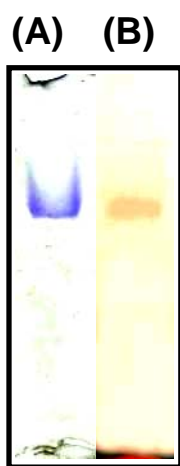


Figura 21- Determinação de glicoproteína em gel de poliacrilamida da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*. (A) Page (4.3) 6%, corado com Comassie Blue R 250; **(B)** Page (4.3) 6%, presença de glicoproteína como descrito em material e métodos.

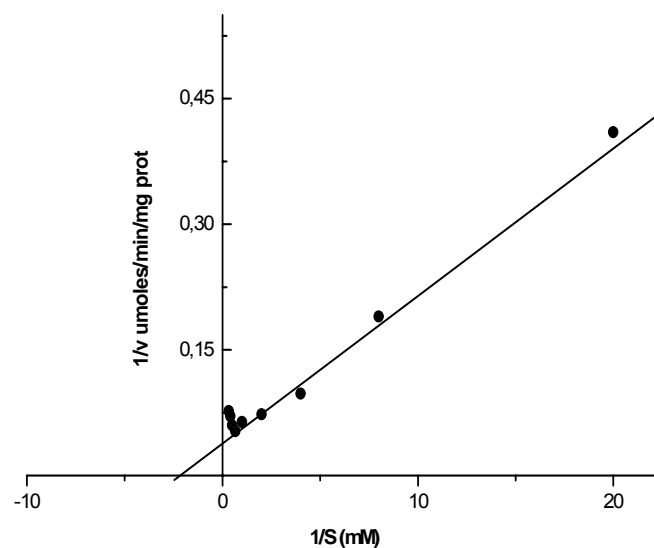


Figura 22- Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*. Os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine pH 7.0 a 60°C, usando maltose 0.025-3mM como substrato de reação.

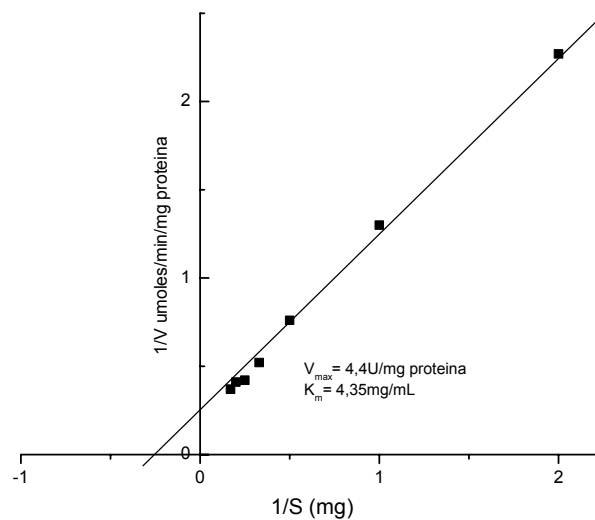


Figura 23– Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum* em amido como substrato. Os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine pH 7.0 a 60°C, usando amido 0.25-6mg como substrato de reação.

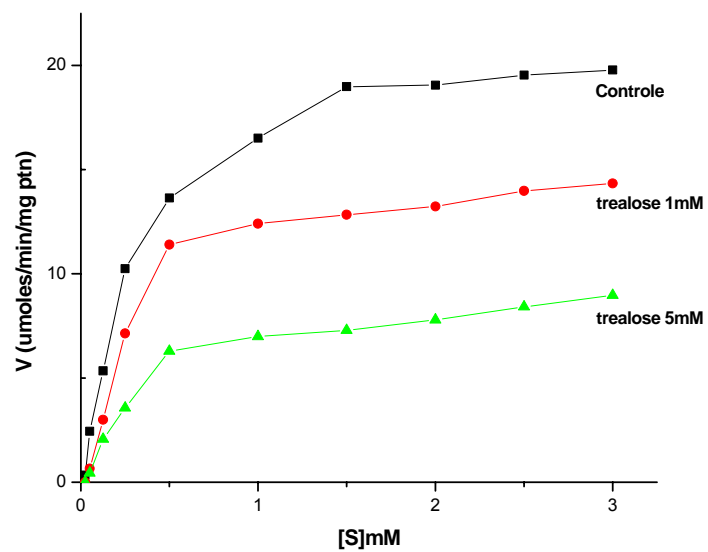


Figura 24- Efeito da trealose na atividade da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*. Os ensaios foram feitos em tampão McIlvaine pH 7.0 em diferentes concentrações de substrato (maltose 0.025-3mM). Na legenda estão indicadas as concentrações de trealose utilizada no experimento.

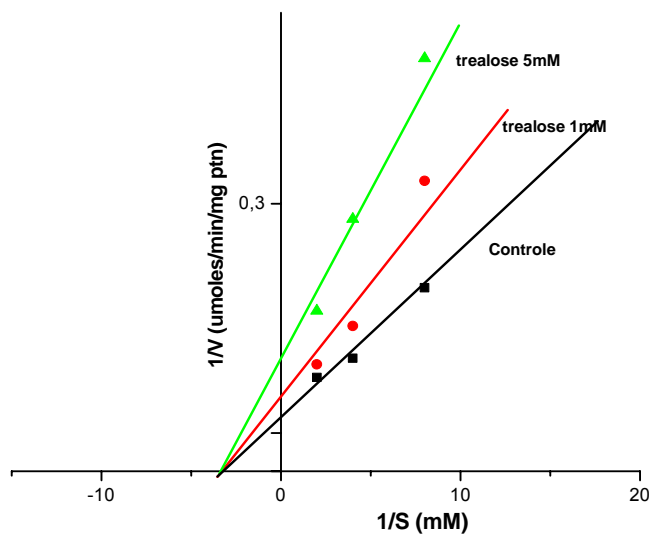


Figura 25- Representação de Lineweaver-Burk para o efeito da trealose na atividade da α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum*. Os ensaios foram feitos em tampão McIlvaine pH 7.0 a 60°C. Na legenda estão indicadas as concentrações de trealose utilizada no experimento.

4.11. Determinação do ponto isoelétrico da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

O ponto isoelétrico da α -glucosidase extracelular purificada foi medido por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida, conforme descrito no **item 3.13**.

Na **figura 26**, observamos o ponto isoelétrico da enzima, com valor ao redor de 6.5.

4.12. Testes imunoquímicos

A proteína extracelular produzida por *C. thermophilum* foi usada como antígeno para a produção de anticorpos.

Teste Elisa: a titulação obtida com o teste Elisa foi da ordem de 1:100 para a enzima extracelular.

4.13. Estudo da localização celular da proteína de interesse através da técnica de western blotting

Como apresentado na **figura 27 B**, a proteína foi localizada em todas as fontes de carbono. Interessante notar que a proteína de interesse apresenta diferentes pesos moleculares da citosólica e de membrana. Pode-se notar também que em presença de maltose 5%, a proteína estava presente no citosol mas, não se encontrava presente na membrana (**figura 27 B: 1 e 2**). Esta metodologia foi repetida várias vezes, incluindo diferentes tempos de crescimento e apresentando o mesmo perfil. Com amido como fonte de carbono, podemos observar isoformas da proteína presente tanto na membrana como na região citosólica (**figura 27 B: 3 e 4**). Em glicose, como fonte de carbono, observamos

pesos moleculares diferentes da proteína citosólica e de membrana (**figura 27 B: 5 e 6**). As proteínas presentes nos filtrados das culturas, apresentaram similaridades quanto ao peso molecular das proteínas presentes no citosol e na membrana (**figura 28**).

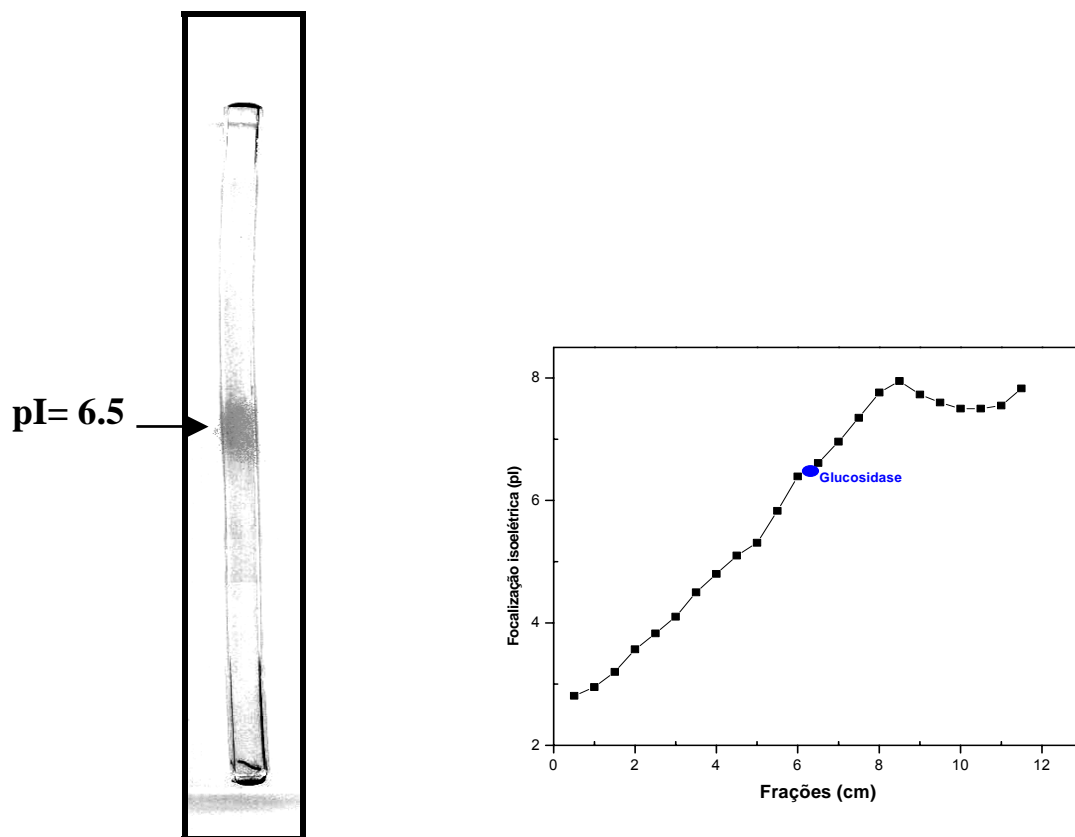


Figura 26— Determinação do ponto isoelétrico da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*. A determinação foi realizada em gel de poliacrilamida de disco, e concentração de 5%. O pI da enzima purificada foi determinado conforme descrito no **item 3.13**.

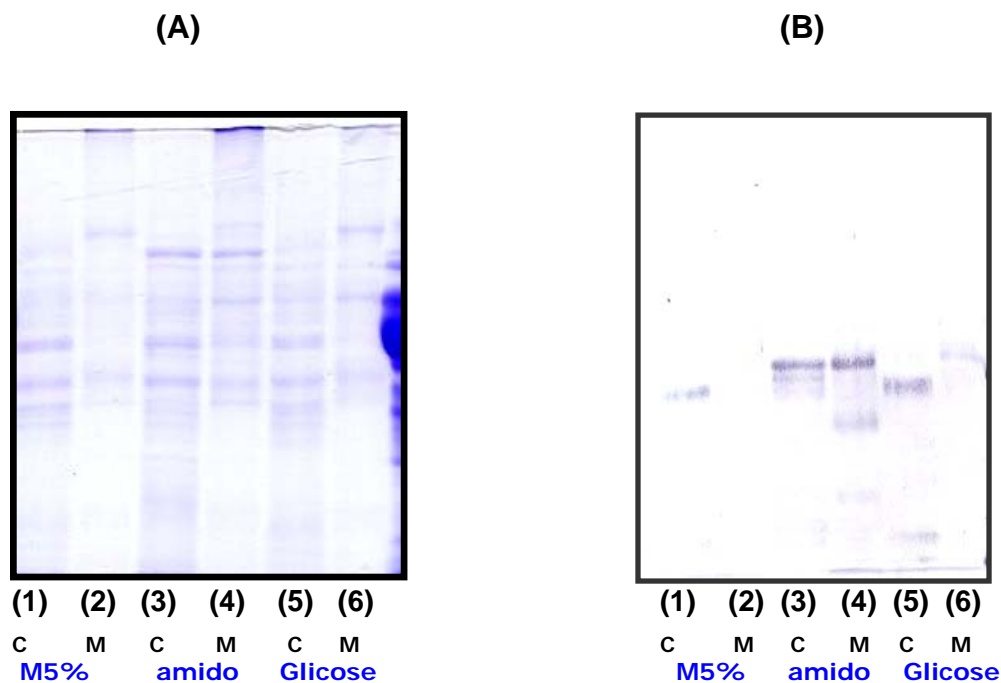


Figura 27- Localização celular da proteína de interesse presente no citosol e na membrana usando diferentes fontes de carbono. Raias (A) SDS 12%, com 15 μ L das amostras aplicadas; (B) western blotting; (1) e (2) proteína citosólica (C) e de membrana (M), crescida em maltose 5%, respectivamente; (3) e (4) proteína citosólica (C) e de membrana (M), crescida em amido 1%, respectivamente; (5) e (6) proteína citosólica (C) e de membrana (M), crescida em glicose 1%, respectivamente. A transferência para membrana era realizada como descrito no **item 3.18**.

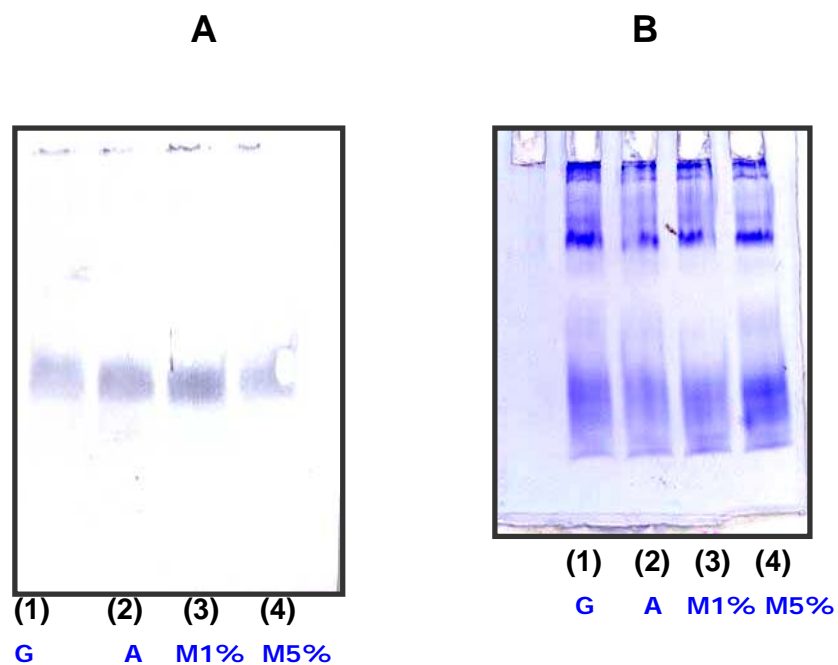


Figura 28- Localização celular da proteína de interesse presente no filtrado da cultura usando diferentes fontes de carbono. Raias: (A) western blotting; (B) SDS 12%, com 15 μ L da amostra aplicada; (1) glicose 1%; (2) amido 1%; (3) maltose 1%; (4) maltose 5% usados como fonte de carbono no crescimento celular.

4.14. Produção de trealose e maltooligossacarídeos pela α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*

Um teste qualitativo para a atividade de transglicosilação, usando TLC, mostrou que a α -glucosidase era capaz de produzir maltooligossacarídeos de maltose 5% (**figura 29 A**), como substrato conforme descrito no **item 3.14.1**. A reação de transglicosilação mostrou que nas primeiras 8 horas de reação pequenos oligossacarídeos e glicose foram produzidos. Após 8 horas, também observamos produção de outros maltooligossacarídeos de cadeias maiores (**figura 29 A**). Tratamento da amostra de 8 horas, a partir de reação de transglicosilação com a trealase purificada de *S. thermophilum* (Kadowaki et al., 1996), a qual é específica para trealose, demonstrou que o produto da reação de transglicosilação era trealose, já que a banda desaparece após tratamento com trealase (**figura 29 B: 6**).

4.15. Detecção de trealose nos meios de cultivo por ação da trealase purificada de *S. thermophilum*

A trealose era detectada em meios de cultivo cotendo amido ou maltose como fonte de carbono. Utilizamos meios de cultivo onde a produção de trealose mostrou-se elevada com maltose, 120 horas, sob condição de agitação e com amido, 96 horas, sob condição estacionária a 40° C para tratamento com trealase pura a fim de confirmar os traços de trealose presente nestes meios. Os traços de trealose produzidos nos meios de cultivo com amido, como fonte de carbono poderia sugerir uma explicação para a indução da atividade trealásica presente neste meio. Uma vez observado a produção de trealose nos meios de cultivo,

através de TLC, fervemos estas alíquotas para evitar qualquer ação enzimática e incubamos com trealase pura, a 55°C, por uma noite (20 horas) a fim de confirmar a presença de trealose. De acordo com a **figura 30**, observamos a degradação da trealose presente nos meios de cultivo por ação da trealase pura com glicose como produto final.

4.16. Degradação dos maltooligossacarídeos produzidos por reação de transglicosilação por ação da glucoamilase parcialmente purificada do mutante *exo-1* de *Neurospora crassa*

A mistura de reação era composta pela α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum* purificada em tampão fosfato 100mM pH 7.0 e maltose 5%. A mistura foi incubada a 45°C por um período de 24 horas onde, foram observados a presença de trealose e maltooligossacarídeos como produto. Após esse período a mistura era fervida a fim de evitar qualquer reação secundária. Em seguida, a enzima parcialmente purificada do mutante *exo-1* com atividade amilolítica era adicionada na mistura, observando a degradação dos maltooligossacarídeos produzidos após um período de 12 horas de incubação, a 60° C (**figura 29B: 8; figura 31**).

4.17. Detecção de trealose produzida por reação de transglicosilação em HPLC

A produção de trealose via reação de transglicosilação era observado em HPLC (**figura 32**), com maltose como substrato, utilizando a α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*.

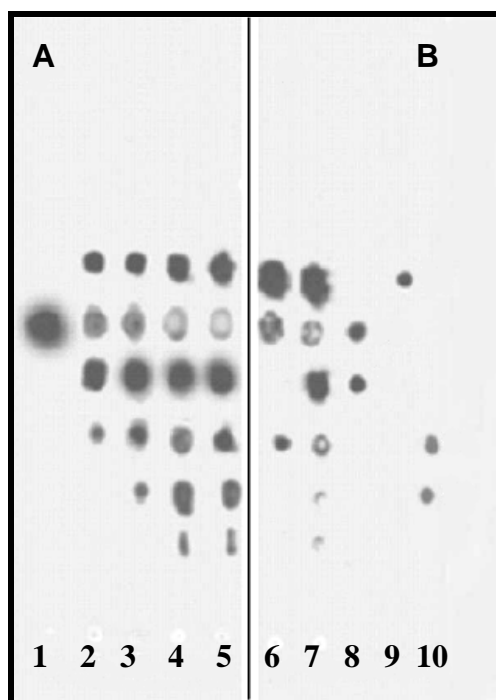


Figura 29- Reação de transglicosilação por ação da α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*. A enzima foi incubada com maltose 5% em tampão fosfato 100mM pH 7.0, a 45°C, por um período de 0, 8, 16, 24 e 36 horas **(A)**. Produto de reação de transglicosilação tratada com a trealase pura ou glucoamilase **(B)**. Posteriormente, a mistura era fervida e, TCA 100% era adicionado, a fim de parar a reação. Posteriormente, alíquotas foram aplicadas em TLC (item 3.14.1 e 3.16). **Raias:** 1) **Controle, 0h**; 2) **8h**; 3) **16h**; 4) **24h**; 5) **36h**; 6) **tratado durante 12h com 0.1U de trealase**; 7) **tratamento com 1U de glucoamilase**; 8, 9 e 10) padrões: trealose e maltose, glicose, maltotetrose e maltopentose 10mg/mL, respectivamente.

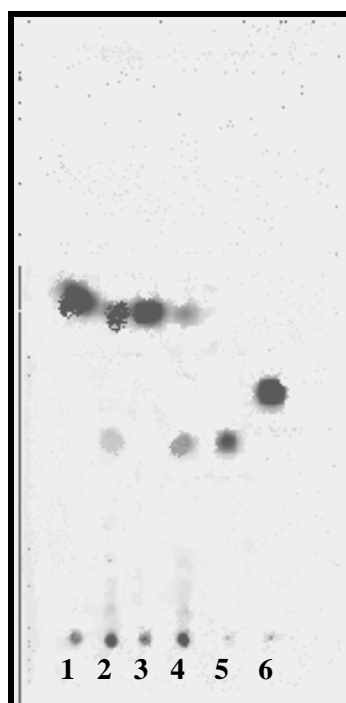


Figura 30- Degradação da trealose presente nos meios de cultivo por ação da trealase pura (Kadowaki,1996). As alíquotas fervidas foram incubadas com trealase pura em tampão MÊS 100mM pH 6.5 a 55° C. Fervemos a amostra e adicionamos 5 μ L de TCA 100%, a 50 μ L da mistura de reação. Centrifugamos e aplicamos em TLC. O solvente de corrida utilizada e a revelação estão descritos no **item 3.16. Raias:** 1) meio de cultivo com maltose/120h/agitado + reação com trealase pura, **20h**; 2) meio de cultivo com maltose/120h/agitado + reação com trealase pura, **0h**; 3) meio de cultivo com amido/96h/estacionário + reação com trealase pura, **20h**; 4) meio de cultivo com amido/96h/estacionário + reação com trealase pura, **0h**; 5 e 6) padrões: trealose e maltose 5mg/mL, respectivamente.

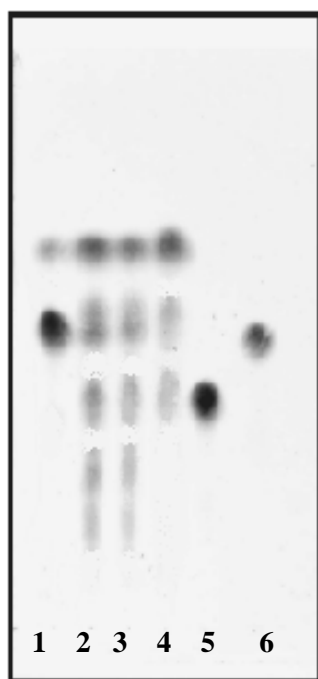
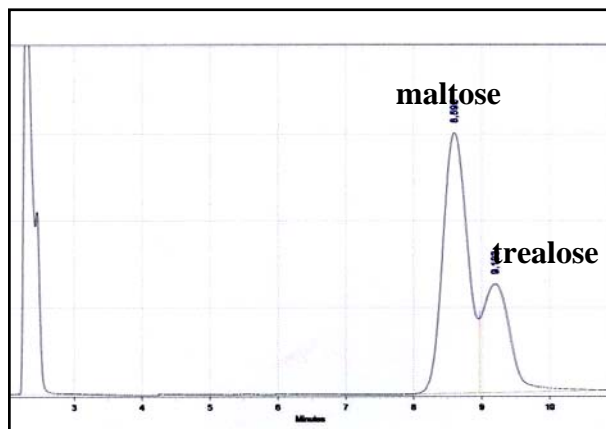
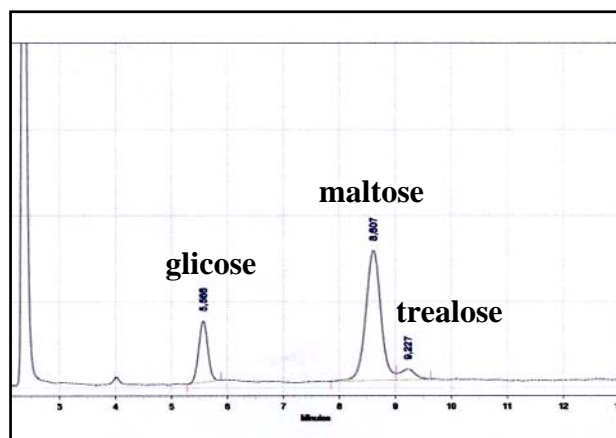


Figura 31- Degradação dos maltooligossacarídeos produzidos através de reação de transglicosilação pela glucoamilase parcialmente purificada do mutante *exo-1* de *N. crassa*. Toda metodologia usada para verificar a degradação dos maltooligossacarídeos estão descritos nos **itens 3.15 e 3.16**. **Raias: (1)** controle, α -glucosidase purificada + maltose 5%, **0h**; **(2)** produção de trealose e maltooligossacarídeos pela α -glucosidase purificada, **24h**; **(3)** controle, trealose e maltooligossacarídeos produzidos por reação de transglicosilação + glucoamilase, **0h**; **(4)** degradação dos maltooligossacarídeos pela glucoamilase parcialmente purificada, **4h**; **(5 e 6)** padrões: trealose e maltose 10mg/mL, respectivamente.

(A)



(B)



(C)

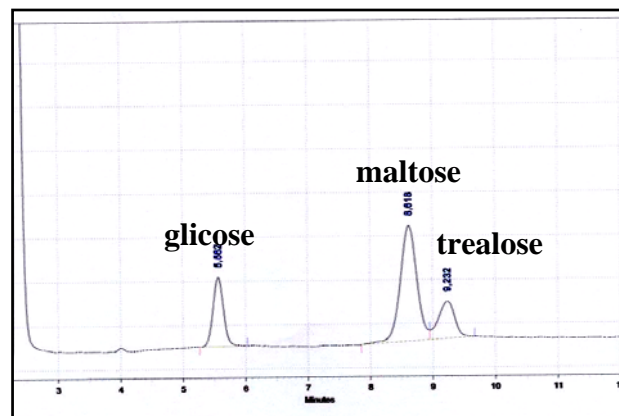


Figura 32- Produção de trealose através de reação de transglicosilação analisados em HPLC. A mistura de reação contendo α -glucosidase em tampão fosfato 10mM pH 7.0 + maltose 5% foram analisados em HPLC, após incubação por 20 horas. Utilizamos acetonitrila 82%, como fase móvel em coluna Shimpack CLC-NH₂, com um fluxo de 1.5mL/min. **(A)** padrões: maltose 5% e trealose 100mg/mL; **(B)** Controle: **0h**; **(C)** **20h**.

4.18. Acúmulo de trealose usando o meio YPS 1 em culturas de *C. thermophilum*

Culturas de *C. thermophilum* foram desenvolvidas a 40 e 50°C em meio **YPS 1**, como descrito em material e métodos. A massa micelial obtida em glicose, como fonte de carbono, a 40 e 50°C, foram 5.1 e 6.1g, respectivamente. Em amido como fonte de carbono, observamos uma massa micelial menor, obtendo nas temperaturas de 40 e 50°C, 3.6 e 3.7g em peso úmido, respectivamente. No entanto, a quantificação de trealose foi mais significativa nos meios desenvolvidos a 50°C do que em 40°C. Os resultados apresentam uma produção de trealose de 69 e 27% quando crescido em glicose e amido a 50°C, respectivamente (**tabela 4**). O acúmulo de trealose por grama de massa micelial (mg/g) a 50°C, em glicose foi 42% mais alto do que a 40°C, nas mesmas condições de cultivo. Isso também foi demonstrado em amido a 50°C, obtendo um valor de 14% mais alto, com relação as culturas crescidas a 40° C (**figura 33**).

4.19. Acúmulo de trealose durante choque térmico utilizando culturas de *C. thermophilum*

Alteração da temperatura de 40°C para 50°C, em cultivos de *C. thermophilum* em meio M₅ não demonstraram aumentos nos níveis de trealose (Almeida, 1998). O acúmulo de trealose era observado quando o organismo era submetido por um curto período do tempo ao frio (25°C) e posteriormente, a 50°C, sugerindo que a trealose estaria sendo produzida como forma de proteção em condições adversas de temperaturas (**figura 34**). Isso era verificado em

culturas crescidas em glicose 1% como fonte de carbono. Em culturas cujo choque térmico tinha sido realizado na reincubação com maltose 1 ou 5% como fonte de carbono não foi observado acúmulo de trealose.

Tabela 4- Produção de trealose em culturas desenvolvidas em diferentes temperaturas em *C. thermophilum*

Fonte de carbono	Temperatura (°C)	Massa micelial (g)	Proteínas (mg/mL)	Trealose (umoles/mg prot.)
Glicose	40°C	5.1	1.9	1.63
Glicose	50°C	6.1	1.6	2.75
Amido	40°C	3.6	2.0	2.05
Amido	50°C	3.7	1.8	2.61

Crescimento em meio líquido YPS 1 sob agitação 110rpm/min por 24h. 200mg de massa foram retiradas para a dosagem de trealose conforme **item 3.23**. Os resultados representam a média de pelo menos 3 experimentos.

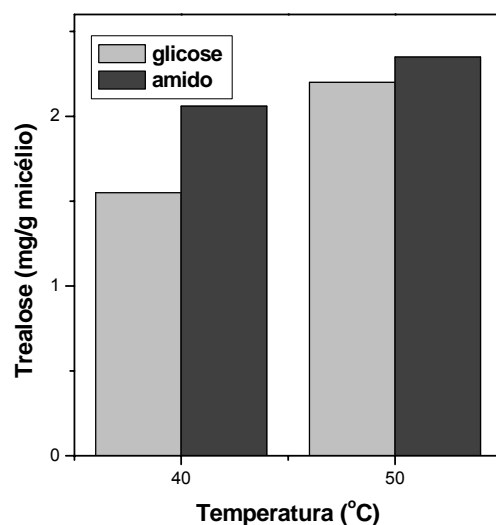


Figura 33– Produção de trealose micelial em culturas desenvolvidas em diferentes temperaturas. Após o crescimento em meio líquido YPS 1 sob agitação 110rpm/min por um período de 24 horas, a massa micelial foi pesada retirando-se 200mg para a dosagem de trealose (**item 3.23**). A quantificação de trealose foi realizada através de uma curva de glicose. Os resultados representam a média de pelo menos 3 experimentos.

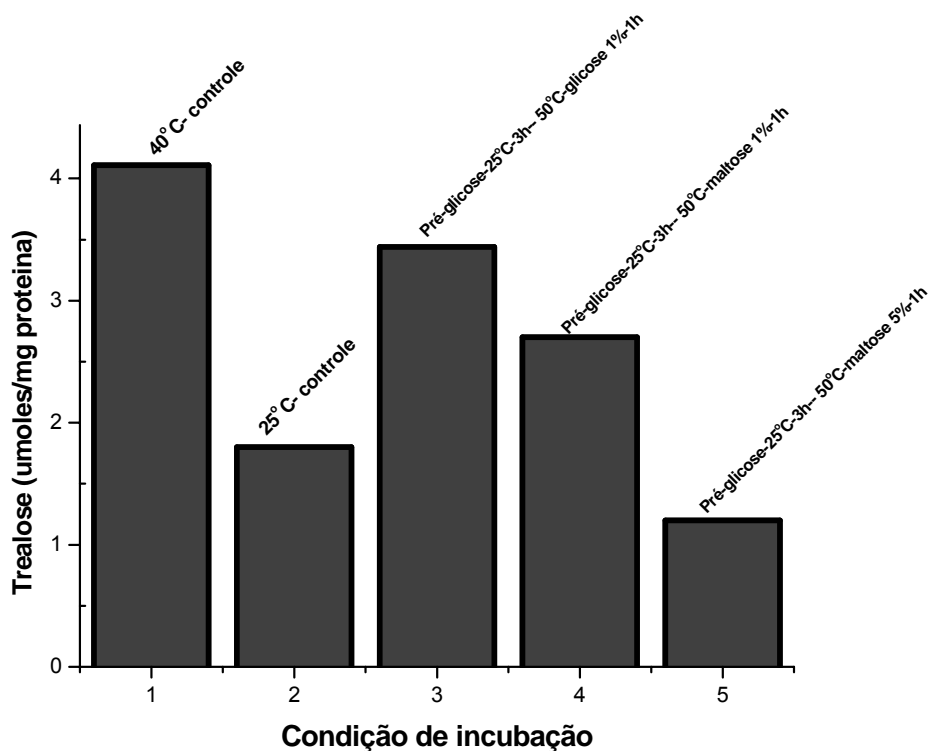


Figura 34– Efeito de mudanças de temperatura sobre a concentração de trealose em cultivos de *C. thermophilum*. Após o tempo de incubação desejado, as massas miceliais dos meios foram usados para a dosagem de trealose como descrito no **item 3.23**: **(1) controle**: pré cultivo (40°C durante 28h); **(2) controle**: reincubação a 25°C com glicose 1% por 3h; **(3)** reincubação com glicose 1% a 50°C por 1h; **(4)** na reincubação com maltose 1% a 50°C por 1h; **(5)** na reincubação com maltose 5% por 1h.

Chi e colaboradores (2003) verificaram a produção de trealose, 18% (g/g peso seco) a partir de amido em mutante de *Saccharomycopsis fibuligera*. A

produção de trealose produzida por *S. fibuligera* era superior à apresentada pelo *C. thermophilum*. A síntese de trealose em meio com amido poderia estar relacionada com a presença do sistema alternativo independente de gasto de energia. Na tentativa de verificar se a síntese de trealose também ocorria na presença de maltose como substrato, utilizamos as linhagens de *S. fibuligera*. Uma vez observado a presença de trealose a partir de maltose como substrato em leveduras de *S. fibuligera* 2390 (extraída dos Estados Unidos) e 2622 (extraída da Alemanha), tentamos purificar a enzima de interesse, a fim de comparar com os resultados já existentes para o fungo filamentoso de *C. thermophilum*.

4.20. Detecção de trealose usando as linhagens de *S. fibuligera* 2390 e 2622

As culturas foram desenvolvidas em meio **YPS 2**, com amido ou glicose como fonte de carbono, a 27°C por 24 horas. Após o tempo de crescimento separamos o filtrado das células, verificando a presença de trealose no meio intracelular de ambas as linhagens (**figura 35**).

4.21. Detecção de trealose através de reação de transglicosilação usando as linhagens de *S. fibuligera* 2390 e 2622

A produção de trealose também era observada através de reação de transglicosilação. Utilizamos o macerado celular, já que a atividade não era observada no meio extracelular (**figura 36**). A produção de trealose era verificada quando amido foi usado como fonte de carbono. No entanto, a síntese

de trealose não era detectada quando glicose era usada como fonte de carbono nas mesmas condições.

4.22. Quantificação da trealose produzida em glicose ou amido como fonte de carbono de *S. fibuligera* 2390 e 2622

As culturas de *S. fibuligera* desenvolvidas em amido ou glicose como fonte de carbono foram pesadas, sendo 200mg das células usadas para quantificação de trealose. Na **figura 37**, observamos que a produção de trealose foi ao redor de 5.16 μ moles/mg de proteínas na linhagem 2390 e 2.64 μ moles/mg de proteínas na linhagem 2622 ambas em amido como fonte de carbono. Já com glicose como fonte de carbono a produção de trealose foi bastante baixa, ao redor de 0.62 e 1.89 μ moles/mg de proteínas para as linhagens 2390 e 2622, respectivamente.

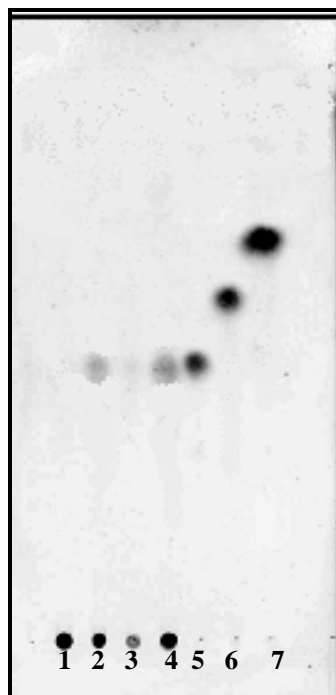


Figura 35- Detecção de trealose nas linhagens de *S. fibuligera* 2390 e 2622 crescido em amido como fonte de carbono. Após 24 horas de cultivo, aplicou-se 1,5µL do meio extracelular e do macerado das células (intracelular) em TLC, sem reação de transglicosilação. Raias: **(1)** e **(2)** meio extra e intracelular de *S. fibuligera* 2390; **(3)** e **(4)** meio extra e intracelular de *S. fibuligera* 2622; **(5)** **(6)** e **(7)** padrões: trealose, maltose e glicose 10mg/mL, respectivamente.

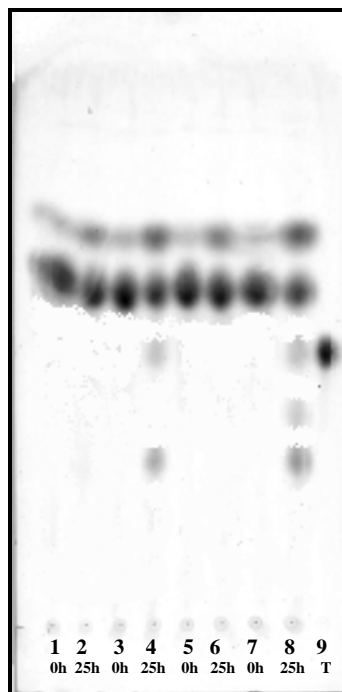


Figura 36– Produção de trealose via reação de transglicosilação. Realizado com o macerado celular (intracelular) das duas linhagens de *S. fibuligera* (2390 e 2622), como descrito em materiais e métodos. Raias: **(1)** e **(2)** *S. fibuligera* 2390 crescido em glicose; **(3)** e **(4)** *S. fibuligera* 2390 crescido em amido; **(5)** e **(6)** *S. fibuligera* 2622 crescido em glicose; **(7)** e **(8)** *S. fibuligera* 2622 crescida em amido; **(9)** padrão: trealose 10mg/mL.

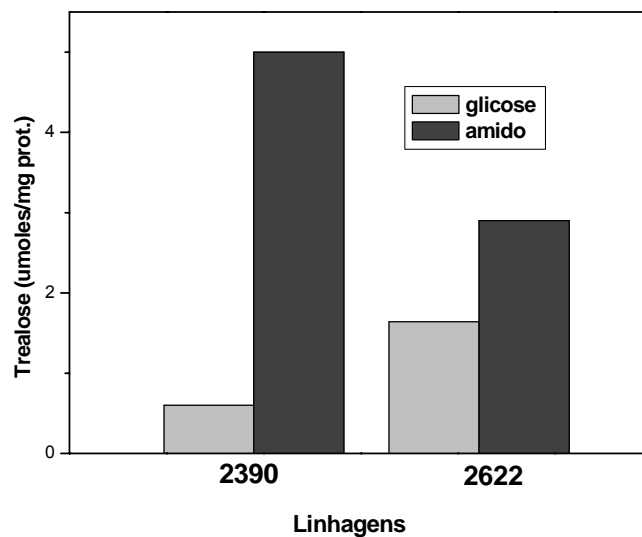


Figura 37– Quantificação da trealose produzida em culturas de *S. fibuligera* 2390 e 2622. A produção de trealose foi verificada usando macerado celular das duas linhagens em amido ou glicose como fonte de carbono. A quantificação da trealose foi realizada com a trealase pura de *Scytalidium thermophilum* (Kadowaki, 1996), como descrito em material e métodos.

4.23. Produção de trealose através de reação de transglicosilação utilizando culturas de *S. fibuligera*

De acordo com a **figura 38**, notamos que existe uma produção elevada de trealose quando maltose 5% era usada como substrato em reação de transglicosilação “in vitro”. Um estudo realizado com as células intactas das duas linhagens, apresentaram uma produção de 64mg de trealose (por grama de células intactas) em amido e 48mg em glicose como fonte de carbono para a linhagem 2390 e aproximadamente 50mg em glicose e amido como fonte de carbono para a linhagem 2622. A produção de trealose também era verificada em TLC (**figura 39**).

4.24. Tentativa de síntese de trealose através de reação de transglicosilação em *S. cerevisiae*

As linhagens de leveduras, *S. fibuligera* 2390 e 2622 e *S. cerevisiae* foram usadas nos experimentos de modo comparativo. A maltose em altas concentrações era usada como substrato na reação de transglicosilação. A síntese de trealose e de maltooligossacarídeos não foi observada em *S. cerevisiae* (**figura 40**).

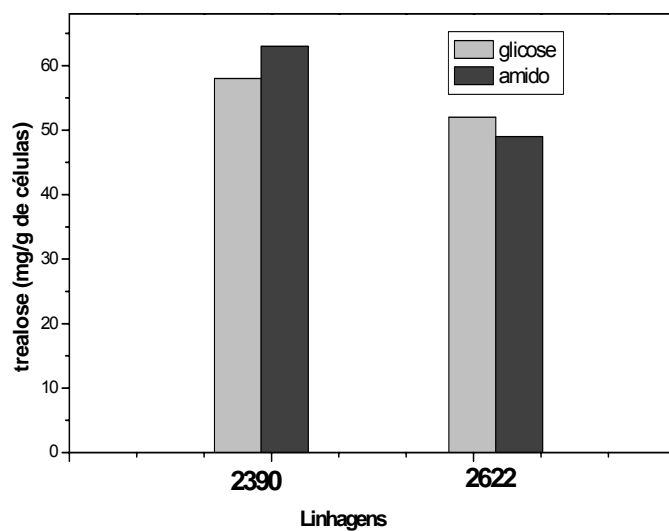


Figura 38– Produção de trealose via reação de transglicosilação com as células intactas de *S. fibuligera* 2390 e 2622. A produção de trealose foi verificada quando maltose 5% foi usada como substrato de reação (item 3.14). A quantificação da trealose foi realizada com a trealase pura de *S. thermophilum* (Kadowaki, 1996), como descrito em material e métodos.



Figura 39– Produção de trealose via reação de transglicosilação demonstrada em TLC. Células intactas foram usadas em tampão fosfato 100mM pH 7.0 + maltose 5% para produção de trealose, como descrito em material e métodos. Raias: **(1)** Controle, **0h**; **(2)** e **(3)** linhagem 2390 crescida por 20h em glicose e amido, respectivamente; **(4)** e **(5)** linhagem 2622 crescida por 20h em glicose e amido, respectivamente; **(6)** padrão: trealose 10mg/mL.

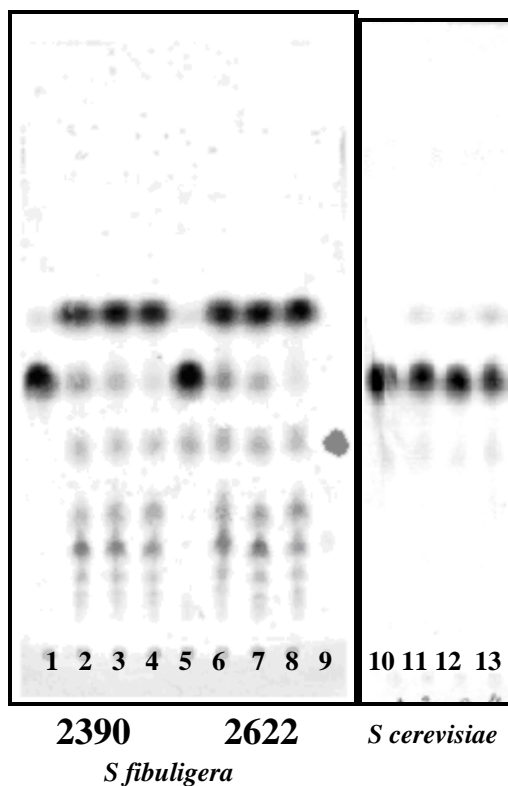


Figura 40- Tentativa de síntese de trealose através de reação de transglicosilação em *S. cerevisiae*. As amostras contendo a enzima intracelular eram incubadas a 40°C em tampão fosfato 100mM pH 7.0 + maltose 5%. Alíquotas eram retiradas em diferentes tempos de reação, fervidas e aplicadas em TLC. **Raias: (1, 2, 3 e 4)-** 0, 4, 8 e 24h de reação, respectivamente; **(5, 6, 7 e 8)-** 0, 4, 8 e 24h de reação, respectivamente; **(9)** padrão: trealose 10mg/mL; **(10, 11, 12 e 13)-** 0, 4, 8 e 24h de reação, respectivamente.

4.25. Condições ótimas para produção da α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* 2390 isolada nos Estados Unidos

Culturas de *S. fibuligera* 2390 foram desenvolvidas em meio **YPS 2**, com amido como fonte de carbono, a 27°C/100rpm, sendo utilizadas na purificação da enzima de interesse, já que esta linhagem apresentou maior produção de trealose quando comparada com a linhagem 2622, isolada na Alemanha. A fim de seguir a enzima de interesse, verificamos a temperatura ótima de atividade ao redor de 40°C (**figura 41**). Em diferentes tempos de cultivos a atividade catalítica da α -glucosidase intracelular era observada. Na **figura 42**, observamos a produção de atividade enzimática em 72 horas de cultivo.

4.26. Purificação da α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* 2390 isolada nos Estados Unidos

O procedimento de purificação da enzima de interesse era importante separar a enzima que possuía atividade de síntese de trealose através da via alternativa. Podemos observar as seqüências de operações empregadas na purificação representadas na **tabela 5**. O procedimento produziu uma purificação de 37,4-vezes e a enzima com uma atividade específica de 14,2U/mg de proteínas.

Nas **figuras 43 e 44**, estão representados os perfis cromatográficos da α -glucosidase intracelular. A enzima interagiu em coluna de DEAE-celulose, sendo eluída com o aumento da força iônica de 300mM de NaCl (**figura 43**). A coluna de octil-sepharose foi o passo determinante no processo de purificação

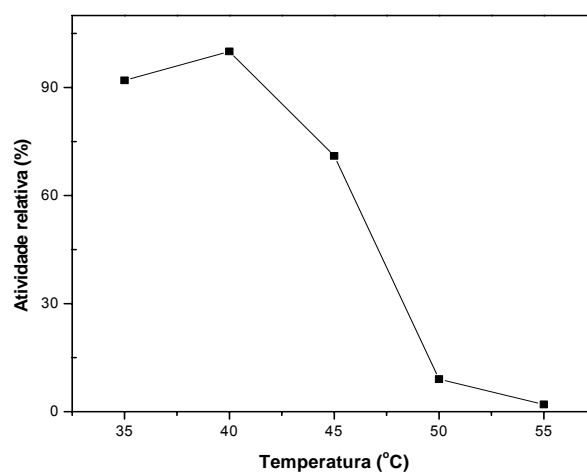


Figura 41– Temperatura ótima de atividade de α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* 2390. O organismo foi crescido em amido como fonte de carbono por 24horas sob agitação constante. O tampão de reação era constituído de tampão fosfato 100mM pH 7.0 + maltose 1%. A atividade enzimática foi medida pelo Kit de glicose oxidase, como descrito em material e métodos.

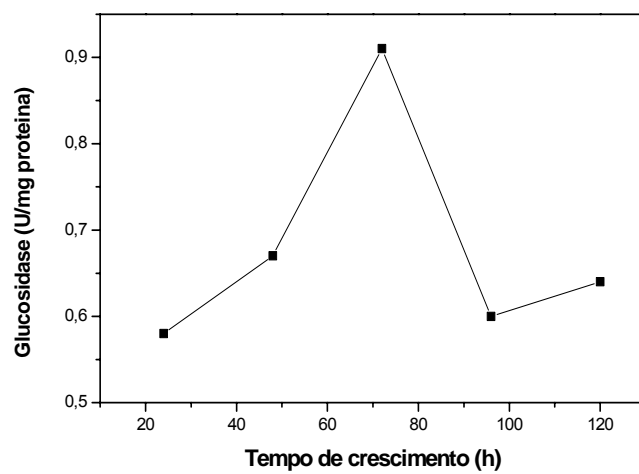


Figura 42– Curva de tempo para a produção da atividade α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* 2390. Culturas foram desenvolvidas em meio **YPS 2**, com amido como fonte de carbono. A cada 24 horas, a dosagem enzimática era analisada como descrito em material e métodos.

Tabela 5 - Purificação da α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* 2390

Etapas	Prot. Total (mg)	Ativ. Total (U)	Ativ. Esp. (U/mg)	Purif. (vezes)	Recup. (%)
Extrato Bruto	346	130	0,38	1	100
Pó acetônico	115	198	1,72	4,5	152
DEAE-celulose	45	182	4,0	10,5	140
Octil-Sepharose	6	85	14,2	37,4	65

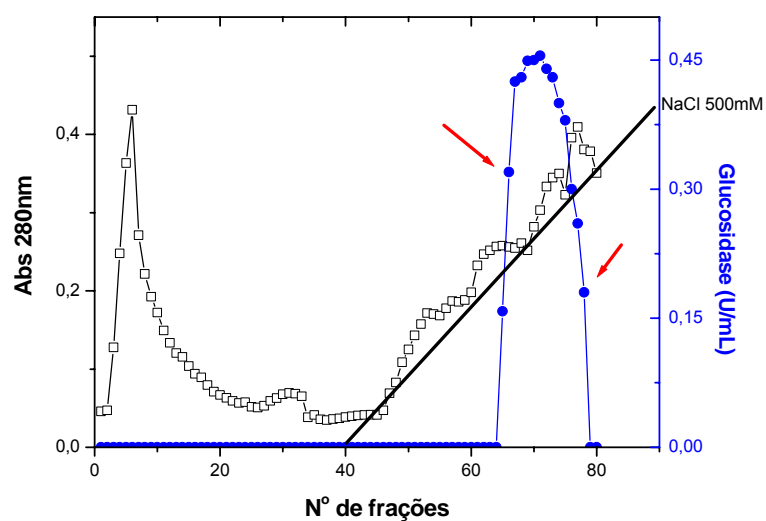


Figura 43– Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose da α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* 2390. A coluna (1.5 x 11cm) foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio pH 5.5. Frações de 5.0mL foram coletados. Posteriormente, um gradiente de NaCl (0-0.5M) era aplicado e as amostras coletadas eram submetidas à leitura de proteínas em absorbância a 280nm (□) e dosagem de α -glucosidase (U/mL) (●). As flechas indicam as frações reunidas.

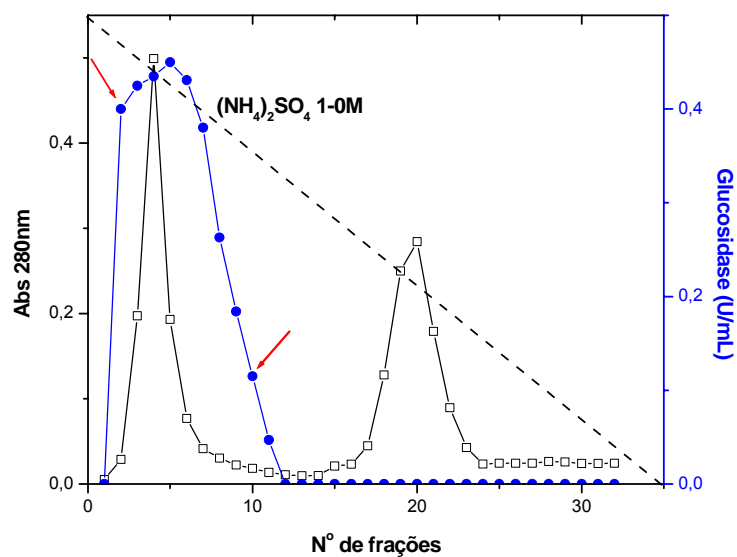


Figura 44– Cromatografia em coluna de Octil-Sepharose (hidrofóbica) da α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* 2390. A coluna (1.5 x 5.5cm) foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 50mM pH 7.0, contendo 1M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Após a aplicação da amostra a coluna era lavada com o próprio tampão e aplicou-se, posteriormente, um gradiente de 1-0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frações de 2.5mL eram coletadas para a leitura de absorbância em a 280nm (□) e dosagem de α -glucosidase (U/mL) (●). As flechas indicam as frações reunidas.

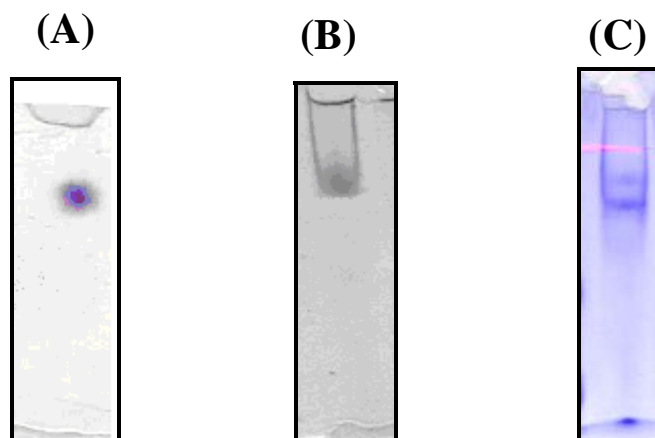


Figura 45– Eletroforese em gel de poliacrilamida da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390. PAGE 8.9- a concentração de poliacrilamida era 6%, sendo: **(A)** atividade glucosidásica e **(B)** corado com Comassie Brilliant Blue R 250; **(C) SDS-PAGE-** a concentração do gel era de 6% de acrilamida. Amostra fervida de α -glucosidase intracelular purificada constituída de duas bandas polipeptídicas.

eliminando grandes quantidades de contaminantes (**figura 44**), o qual pode ser observada através de eletroforese (**figura 45**).

Na **figura 45**, podemos verificar uma única banda em PAGE 8.9, e duas bandas em SDS-PAGE 6%, sugerindo que a enzima seja constituída de duas cadeias polipeptídicas de pesos moleculares próximos.

4.27. Estimativa da massa molecular da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390.

Para estimar a massa molecular da α -glucosidase intracelular purificada, foram utilizadas duas metodologias. A primeira foi a de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes de acordo com Laemmli (1970), utilizando-se o detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A **figura 46** demonstra que a massa molecular da α -glucosidase intracelular purificada era estimada ao redor de 120KDa para uma banda e 106KDa para outra banda, como demonstrado em SDS, respectivamente.

A segunda foi por cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-100. Através do gráfico, mostrado na **figura 47**, foi estimada a massa molecular nativa da α -glucosidase intracelular purificada como sendo da ordem de 190KDa.

4.28. Influência da temperatura na atividade da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390.

A α -glucosidase intracelular foi incubada com maltose, seu substrato em diferentes temperaturas, variando de 30 a 50°C, para determinação ótima de atividade α -glucosidásica. Os resultados estão apresentados na **figura 48**.

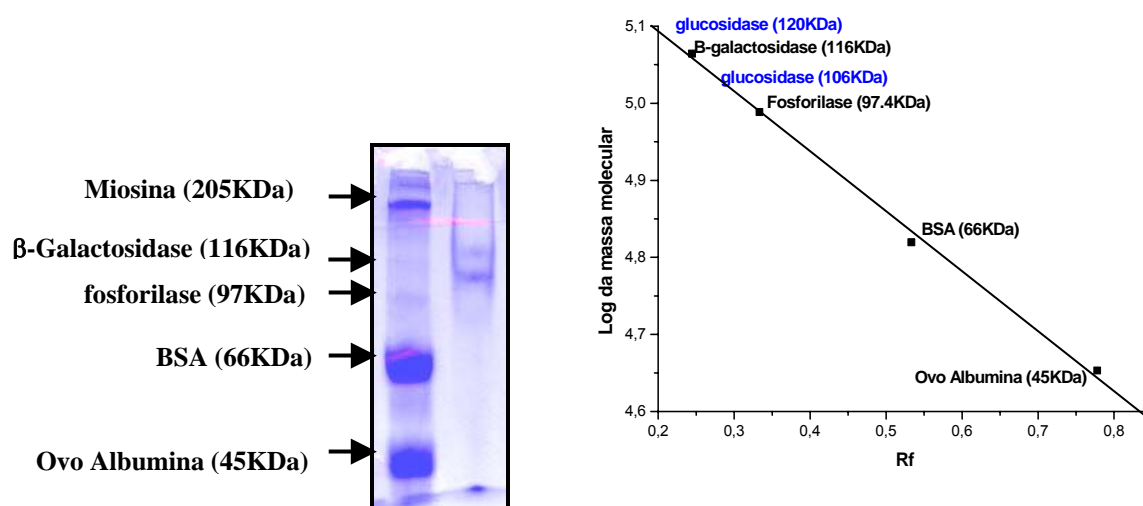


Figura 46- Determinação da massa molecular por SDS-PAGE 6% da α -glucosidase intracelular purificada, de acordo com a metodologia de Laemmli (1970), conforme descrito no item 3.9.5.2.

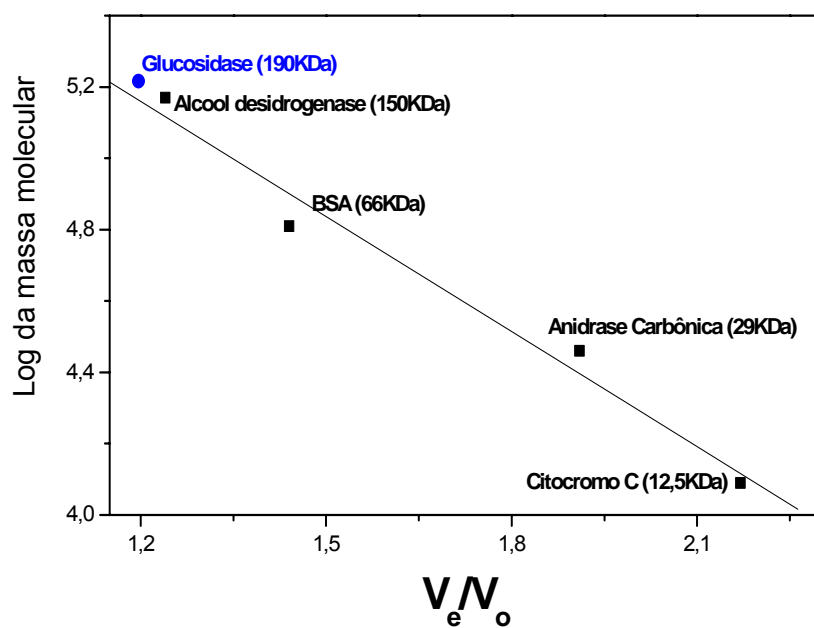


Figura 47- Determinação da massa molecular da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* por cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-100), conforme descrito no item 3.9.5.1.

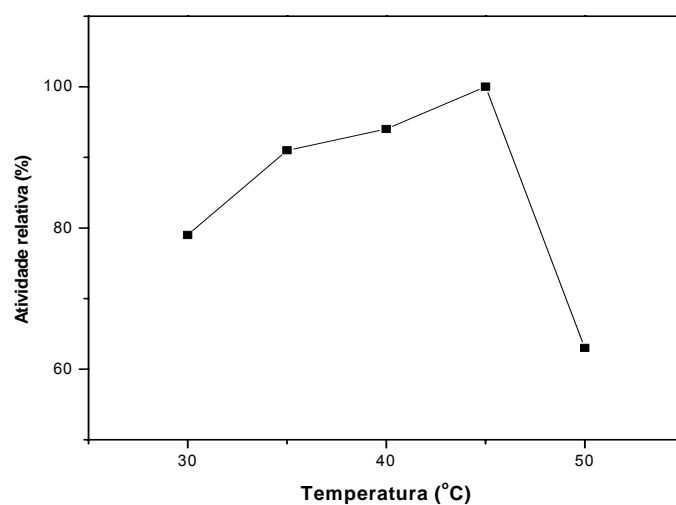


Figura 48— Curva de temperatura ótima da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390. A atividade da α -glucosidase purificada foi determinada nas condições ótimas de atividade, em temperaturas variando de 30 a 50°C.

Observamos que a melhor temperatura para a atividade de α -glucosidase intracelular foi 45°C.

4.29. Influência do pH no meio de reação sob a atividade da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390.

Acima de 3.0, a atividade α -glucosidásica aumentou linearmente apresentando um pH ótimo ao redor de 5.0 (**figura 49**), decrescendo em valores de pH acima de 5.0. Em pHs acima de 7.0, a atividade enzimática foi praticamente inativa. O tampão utilizado para as análises dos pHs foi McIlvaine (3.0-8.0).

4.30. Efeito de íons sobre a atividade da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390.

O efeito de vários íons em diferentes concentrações foi observado sobre a atividade de α -glucosidase (**tabela 6**). Podemos observar que Hg^{+2} e Ag^{+} inibiram drasticamente a atividade enzimática em 76 e 91%, respectivamente. O cobalto também promoveu inibição da atividade ao redor de 21%. No entanto, outros íons utilizados não causaram efeito sobre a atividade da α -glucosidase. O EDTA também não interferiu na atividade da enzima, sugerindo que a atividade da enzima seja independente de metais.

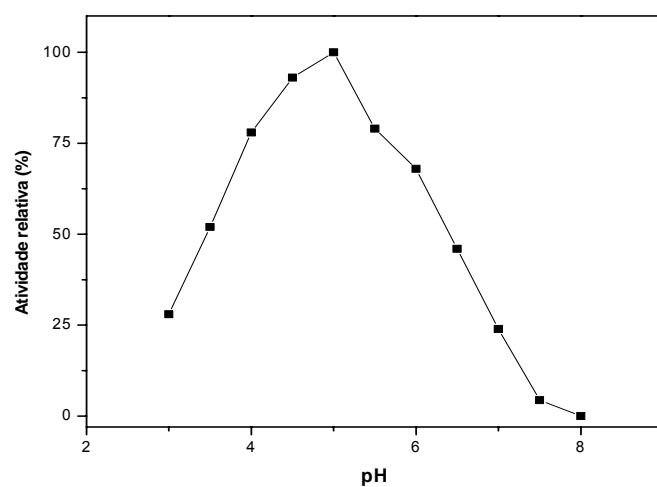


Figura 49– Determinação do pH ótimo de atividade da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390. O tampão utilizado era McIlvaine na faixa de 3.0 a 8.0. A atividade foi determinada nas condições ótimas de atividade.

Tabela 6– Efeito de íons sobre a atividade da α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* 2390.

ÍONS (1mM)	U/mL	%
Controle	7.6	100
NaCl	7.2	95
BaCl₂	7.3	96
KCl	7.5	99
ZnCl₂	7.7	101
MgCl₂	7.7	101
CaCl₂	7.7	101
NH₄Cl	7.6	100
CoCl₂	6.0	79
CuCl₂	7.2	95
AgNO₃	0.7	9
FeSO₄	7.3	96
AlCl₃ x 6H₂O	7.5	99
HgCl₂	1.8	24
EDTA	7.7	101

Os valores correspondem a média de pelo menos 3 experimentos.
Controle: sem adição de íons.

4.31. Estabilidade térmica da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390.

Para determinar a estabilidade da α -glucosidase purificada frente a temperatura, a enzima foi incubada a 45, 50 e 55°C, por até 60 minutos, após este período foram determinadas as atividades remanescentes. Na **figura 50**, podemos observar que a meia vida da α -glucosidase intracelular a 50 e 55°C, foi de 24 e 10 minutos, respectivamente.

4.32. Especificidade ao substrato e efeito de açúcares na atividade de α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera*

A α -glucosidase purificada não hidrolisou outros substratos dissacarídeos, exceto maltose. No entanto, teve ação catalítica sobre maltooligossacarídeos, amido e amilose, mas a atividade de ambos foi ao redor de 20%, quando comparado com maltose (**tabela 7**). Verificou-se também que em uma mistura de maltose e trealose a atividade catalítica da enzima era reduzida em 46%. Além disso, a presença de amido junto com maltose provocou uma inibição em 11% em relação à quantidade residual observada quando maltose era fornecido como único substrato.

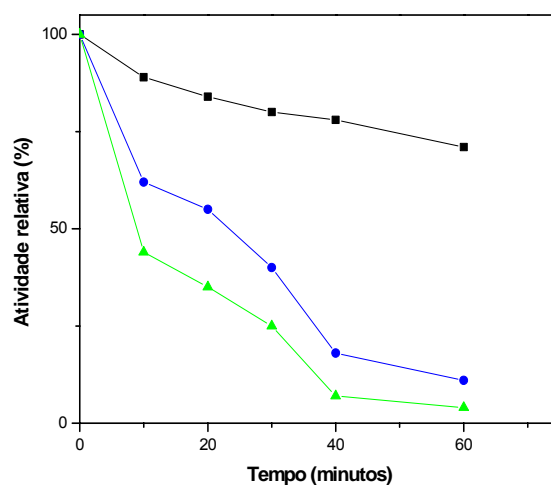


Figura 50– Estabilidade térmica da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390. A enzima foi incubada a 45, 50 e 55°C, encontrando-se em água e nos tempos indicados de 0 a 60 minutos, alíquotas eram retiradas para as dosagens enzimáticas. Símbolos: (■) 45°C; (●) 50°C; (▲) 55°C.

Tabela 7– Especificidade da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera*

Substrato (1%)	Atividade residual (%)
Maltose	100
Maltooligossacarídeos	23
Amido	17
Isomaltose	ND
Amilose	23
Trealose	ND
Sacarose	ND
Rafinose	ND
p-nitro-fenil-α-D-glucopiranosídeo	ND
Maltose + amido	89
Maltose + trealose	56

Condições: A glucosidase purificada foi incubada em diferentes substratos em tampão McIlvaine pH 5.0.
 ND: atividade não detectada pelo método utilizado.

4.33. Determinação de carboidratos neutros

O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Dubois et al (1956), utilizando-se glicose como padrão.

α -Glucosidase é uma glicoproteína, apresentando 68% de açúcares na composição.

4. 34. Determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max}

A determinação dos parâmetros cinéticos da α -glucosidase intracelular foi realizado com maltose como substrato, variando as concentrações de 0.025 a 3mM. Os valores de K_m e V_{max} foram determinados conforme procedimento descrito por Lineweaver & Burk (1934). Os valores de K_m e V_{max} obtido pela enzima purificada foram 0.4mM e 17U/mg proteínas totais, respectivamente (**figura 51**).

A trealose é um inibidor da atividade α -glucosidase. Assim, realizamos um teste cinético sendo os dados aplicados em gráfico a fim de determinar se o inibidor atua de forma competitiva ou não-competitiva. Usando a trealose na concentração de 1 e 5mM, observamos que a trealose promoveu uma inibição de forma não-competitiva, com uma diminuição da $V_{m\acute{a}x}$ na presença de trealose (**figura 52 e 53**).

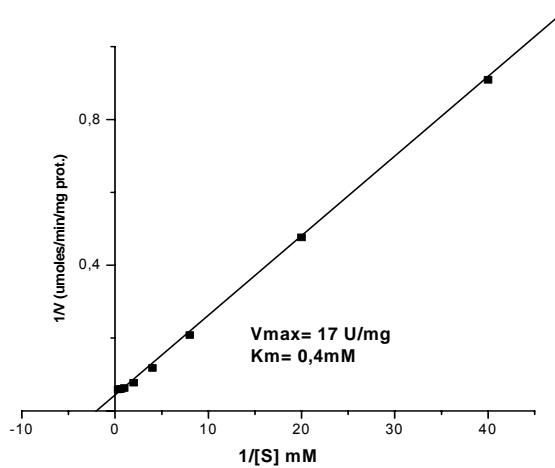
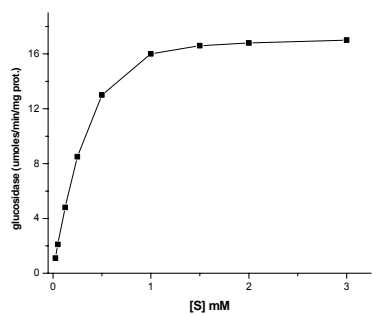


Figura 51– Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390. Os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine pH 5.0 a 45°C, usando maltose 0.025-3mM.

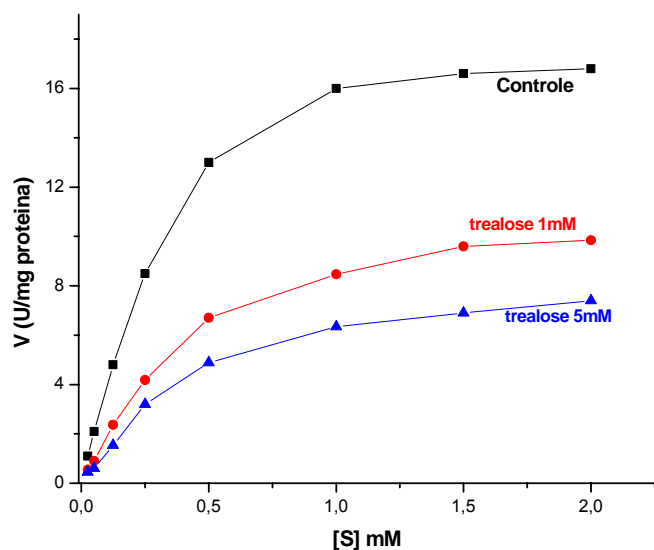


Figura 52– Efeito da trealose na atividade da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390. Os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine pH 5.0 a 45°C em diferentes concentrações de substratos (controle: maltose 0.025-1.5mM) e trealose (1 ou 5mM). Na legenda estão indicadas as concentrações de trealose utilizada no experimento.

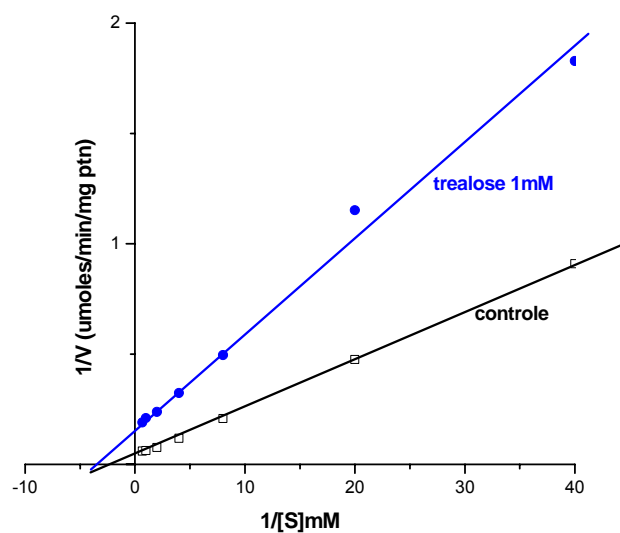


Figura 53– Representação de Lineweaver & Burk para o efeito da trealose na atividade da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390. Os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine pH 5.0 a 45°C. Na legenda está indicada a concentração de trealose e maltose (controle) utilizada no experimento.

4.35. Determinação do ponto isoelétrico da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390

O ponto isoelétrico da α -glucosidase intracelular purificada foi medido por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida , conforme descrito no **item 3.13**.

Na **figura 54**, observamos que o ponto isoelétrico da enzima, foi ao redor de 4.2.

4.36. Produção de trealose e maltooligossacarídeos pela α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera*

A produção de trealose era observada via reação de transglicosilação com maltose 5%, como substrato, conforme **item 3.14.2**. A enzima demonstrou catalisar a síntese de trealose e maltooligossacarídeos a partir de maltose como observado na **figura 55**. Isso sugere a presença de uma via alternativa de síntese de trealose independente de gasto de energia.

4.37. Degradação da trealose produzida via reação de transglicosilação por ação da trealase purificada de *S. thermophilum* (Kadowaki, 1996)

Após a produção de trealose pela α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* a partir de maltose como substrato, observados em TLC, incubamos a mistura de reação contendo trealose e maltooligossacarídeos e incubamos com trealase pura, a 55°C, por uma noite (12 horas) a fim de confirmar que o produto de transglicosilação era de fato trealose. Os dados obtidos e apresentados na **figura 56**, confirmam que um dos produtos da reação de transglicosilação trata-se de trealose.

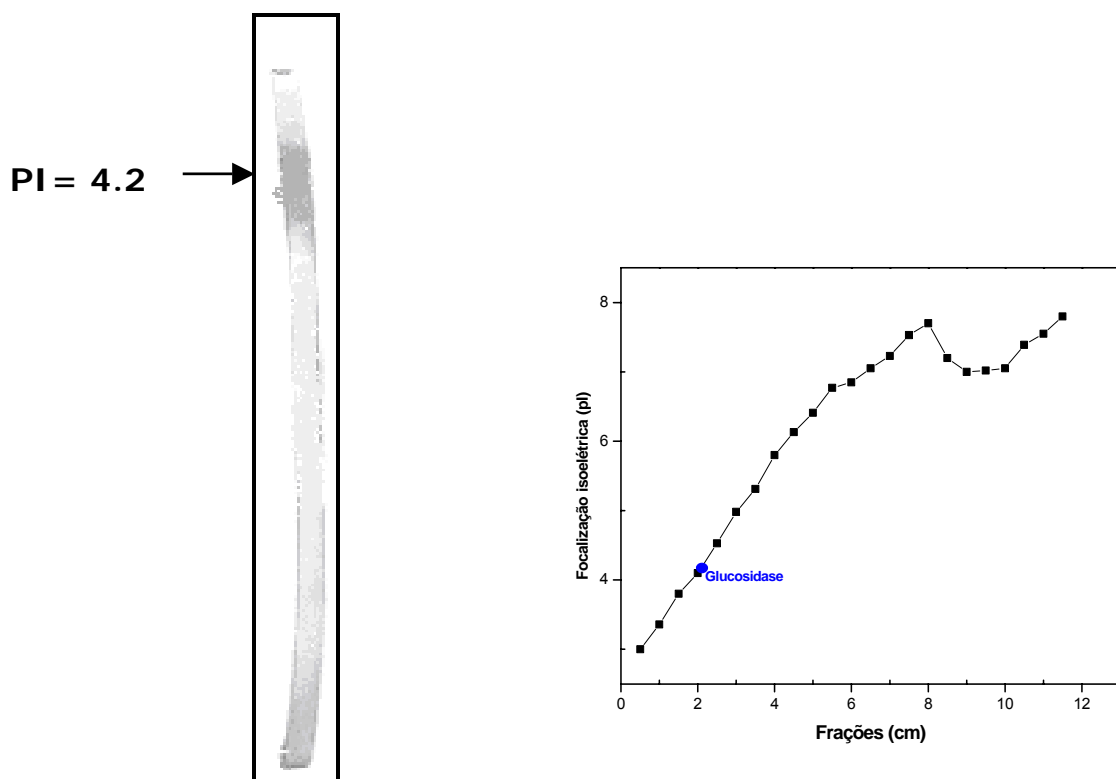


Figura 54— Determinação do ponto isoeletrico da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390. A determinação foi realizada em gel de poliacrilamida de disco, e concentração de 5%. O pI da enzima purificada foi determinado conforme descrito no **item 3.13**.

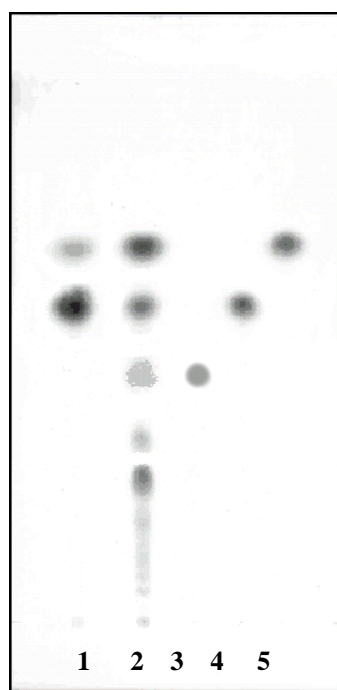


Figura 55– Reação de transglicosilação realizada com a enzima purificada de *S. fibuligera* 2390. O experimento foi realizado em tampão McIlvaine pH 5.0, com maltose 5% como substrato. Nos tempos de 0 e 24 horas alíquotas eram retiradas e aplicadas em TLC. O solvente de corrida utilizado era n-butanol:piridina:água (7:3:1). Raias: 1) **0h**; 2) **24h**; 3, 4 e 5) **padrões:** trealose, maltose e glicose 10mg/mL, respectivamente.

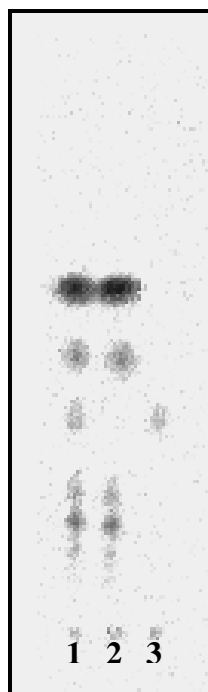


Figura 56— Degradação da trealose produzida via reação de transglicosilação por ação da trealase pura de *S. thermophilum*. O experimento foi realizado em tampão McIlvaine pH 5.0, com maltose 5% como substrato. Após um período de 24 horas de reação, alíquotas foram retiradas, fervidas e incubadas com trealase pura por um período de uma noite, a 55°C. Após este período a mistura de reação era fervida e aplicada em TLC. O solvente de corrida utilizado era n-butanol:piridina:água (7:3:1). Raias: 1) trealose e maltooligossacarídeos produzidos por reação de transglicosilação; 2) degradação da trealose produzida pela ação da trealase; 3) trealose 10mg/mL.

5. DISCUSSÃO

A produção de trealase intracelular de *C. thermophilum* é fortemente influenciada por amido e maltose como fonte de carbono. Quando esse organismo termófilo era crescido em meio suplementado com amido 1%, a produção de trealase era cerca de duas vezes o valor encontrado quando trealose era oferecida como a principal fonte de carbono (Almeida, 1998). Resultados similares foram encontrados no *S. thermophilum* (Kadowaki et al., 1996) que é anamórfico de *C. thermophilum* (Ames, 1961; Arx, 1984, 1986; Cannon, 1986). Testes preliminares executados em nosso laboratório sugeriram a possibilidade de existência de síntese de trealose em *S. thermophilum* a partir de maltose (Kadowaki, 1996), o que poderia explicar a alta produção de trealase nos fungos termófilos, quando crescidos em meio com amido. A produção de trealose de maltose é citada na literatura em vários organismos como em *Pimelobacter* sp R 48, *Pseudomonas putida* e *Thermus aquaticus* (Nishimoto et al., 1995, 1996^a, 1996^b), *Thermus caldophilus* (Koh et al., 1998, 2003; Cho et al., 2006) e *Thermus thermophilus* HB-8 (Zdzienko & Synowiecki, 2006). Um número de α -glucosidases, também exibem reação de transglicosilação produzindo componentes α -glicosilados. Isso é demonstrado na literatura para as α -glucosidases dos fungos *A. niger* (Vetere et al., 2000), *A. nidulans* (Kato et al., 2002^a, 2002^b), *A. oryzae* (Tonomura et al., 1961) e *M. alliacea* (Tanaka et al., 2002), os quais exibem atividade de transglicosilação com maltose como doador de grupos glicosídeos. Até o momento não se tinham relatos de uma via alternativa de síntese de trealose em fungos filamentosos, com produção de

trealose a partir de maltose. Testes preliminares de nosso laboratório demonstraram a existência de um sistema alternativo de síntese de trealose de maltose em fungos filamentosos termófilos, como *C. thermophilum* e *S. thermophilum* (Giannesi, 2002).

Dessa forma fomos estimulados a purificar e caracterizar o novo sistema enzimático de síntese de trealose independente de gasto de energia, empregando *C. thermophilum*. O nível de α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum* atingiu o valor mais alto em 120 horas de cultivo, sob condição estacionária, usando amido como fonte de carbono (**figura 11**). Posteriormente a este tempo de cultivo, a enzima de interesse foi usada nos procedimentos de purificação. Como era esperado, a α -glucosidase purificada mostrou atividade de hidrolase e glicosiltransferase quando maltose era usada como substrato, sendo que a produção de trealose só era verificada em altas concentrações deste carboidrato (**figura 29**). Esse sistema enzimático é interessante, já que não se utiliza grupamentos fosfatos para a síntese de trealose, como descrito na via enzimática clássica (Cabib & Leloir, 1958). Foram utilizados vários procedimentos para a purificação da α -glucosidase extracelular. O procedimento utilizado para esta purificação, foi uma precipitação com acetona, DEAE-celulose, CM-celulose e como último passo, coluna de Octil-sepharose. A enzima foi purificada 67 vezes com uma atividade específica de 33.3 U/mg e um rendimento de 14% (**tabela 1**). A α -glucosidase extracelular purificada apresentou duas bandas polipeptídicas em SDS-PAGE e uma banda quando a amostra não era fervida em condição desnaturante, ambas coradas com Comassie Brilliant Blue R 250. A banda de atividade de α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum* após purificação

correspondeu à uma única banda corada por Comassie Blue em PAGE e SDS-PAGE (amostra não fervida) (**figura 15**).

A massa molecular da α -glucosidase extracelular purificada foi estimada por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100, valor estimado foi de 107KDa (**figura 16**). Em SDS-PAGE (amostra não fervida), a enzima purificada exibiu uma massa molecular na ordem de 136KDa (**figura 17**). A massa molecular da enzima purificada de *C. thermophilum* é similar a glicosiltransferase de *Thermus caldophilus* o qual apresentou uma massa molecular de 110KDa em coluna de filtração (Koh et al., 2003), *Thermus aquaticus* (105KDa) (Nishimoto et al., 1996^b), entre outros. A α -glucosidase do fungo *M. alliace* possui uma massa molecular mais baixo do que a transglicosidase de *C. thermophilum* na ordem de 92KDa em coluna de filtração. No entanto, apresentou 2 heterosubunidade (Tanaka et al., 2002) enquanto a α -glucosidase extracelular de *C. thermophilum* apresentou 4 subunidades, sendo 2 com 22KDa e 2 com 26KDa (**figura 15**). Já a α -glucosidase de *Acremonium implicatum*, demonstrou ser uma proteína tetramérica onde cada monômero consistiu de 2 cadeias polipeptídicas com 51 e 60KDa (Yamamoto et al., 2004). As subunidades de *C. thermophilum* também demonstrou ser uma proteína tetramérica já que este fungo filamentoso apresentou 4 subunidades. Já a α -glucosidase de *Candida albicans*, pertencente ao tipo II o qual prefere maltose e isomaltose e tem baixa atividade sobre aril glicosídeos, apresentou duas cadeias polipeptídicas de 36 e 47Kda (Torre-Bouscoulet et al., 2004). A uma ampla classe de valores de massa molecular e formas oligoméricas que tem sido descrita para α -glucosidases de um número de fontes (Fradsen & Svensson, 1998), variando

em fungos de formas monoméricas para tetraméricas (Tanaka et al., 2002; Kobayashi et al., 2003; Yamamoto et al., 2004). O conteúdo de carboidratos determinado para a enzima pura, de 14%, mostra que a α -glucosidase é pouco glicosilada. A presença de glicosilação foi também demonstrada em PAGE (**figura 21**). A presença de carboidratos na molécula poderia explicar a variação encontrada nos valores de massa molecular estimado por coluna de filtração e SDS-PAGE.

A α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum* teve um pH ótimo de atividade ao redor de 7.0, mas, a atividade enzimática não foi muito afetada em uma faixa de 4.5-7.0 (**figura 19**). Em pH 4.5, 5.0 e 6.5 a velocidade da reação era, respectivamente, 92, 98 e 99% dos valores máximos atingidos em pH 7.0. Em pH 8.0, a atividade enzimática atingiu 10% da máxima. A maioria das α -glucosidases purificadas de várias fontes, exibem pH ótimo entre 4.5 a 7.0 (Frandsen & Svensson, 1998; Tanaka et al., 2002; Kita et al., 1991, 1996).

Em temperaturas de 35 a 60°C, a atividade enzimática aumentou linearmente, atingindo a máxima em 60°C (**figura 18**). Em 65°C, a atividade enzimática diminuiu somente 3% do valor máximo. Porém, a 70°C, a atividade detectada atingiu somente 33% do valor máximo. A maioria das α -glucosidases de fungos exibem temperatura ótima de 35 a 65°C (Tanaka et al., 2002; Kobayash et al., 2003; Yamamoto et al., 2004; Okuyama et al., 2005).

A atividade glucosidásica extracelular purificada foi inibida pela maioria dos íons testados principalmente Cu^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} e Ag^{+} . O Hg^{+2} e Ag^{+1} inibiram a atividade enzimática em 100%, enquanto o Zn^{+2} e Cu^{+2} , promoveram uma inibição de 70 e 52%, respectivamente, da atividade de α -glucosidase

extracelular de *C. thermophilum*. A incubação com íons cobre a uma concentração final de 1mM em *T. thermophilum*, não influenciou a atividade de glicosiltransferase (Zdziebło & Synowieck, 2006). Porém, enzimas análogas de *Pimelobacter* sp R 48 e de *T. aquaticus* foram fortemente inibidas na mesma concentração de íons cobre (Nishimoto et al., 1996^a, 1996^b), assim como a de *Pseudomonas putida* (Ma et al., 2005). A presença de EDTA demonstrou uma leve inibição na atividade de α -glucosidase extracelular (**tabela 2**). Isto sugere que metais não foram necessários para a atividade da enzima. Estes resultados estão de acordo com os apresentados em *Arthrobacter* sp. Q36 por Nakada (1995^a, 1995^b), *Sulfolobus acidocaldarius* (Nakada et al., 1996^a, 1996^b), *Thermus aquaticus* (Nishimoto et al., 1996^b), *Pimelobacter* sp R 48 (Nishimoto et al., 1996^a) e *Thermus caldophilus* (Koh et al., 1998).

A α -glucosidase extracelular purificada mostrou boa termoresistência a 50 e 55° C, sendo a curva de ambas mantidas constantes, com 100% de atividade até os primeiros 20 minutos. Posteriormente, observou-se uma queda de 20 % na atividade enzimática aos 40 minutos, decaindo aproximadamente 50%, a 60 minutos de incubação em ambas temperaturas de 50 e 55°C. Em 60°C, a enzima mostrou menor termoresistência com uma meia vida de 8.0 minutos (**figura 20**). A termoestabilidade da enzima purificada foi completamente afetada quando a enzima foi incubada a 65°C, não detectando a atividade enzimática em qualquer tempo de incubação (dados não mostrados). A termoinativação apresentada em 55 ou 60°C, foi bifásico, sugerindo que a enzima tem dois estados conformacionais ou a presença de isoenzimas. Estes dados são consistentes com as duas bandas polipeptídicas observadas em SDS-PAGE (**figura 15**).

A α -glucosidase extracelular purificada de *C. thermophilum*, mostrou alta especificidade sobre maltose não degradando outros dissacarídeos, exceto maltose. Embora a trealose, não seja substrato para a enzima purificada, este dissacarídeo promoveu uma inibição da hidrólise de maltose, inibindo em torno de 30% da atividade enzimática. (**tabela 3**). Amido e maltooligossacarídeos também foram hidrolisados pela α -glucosidase extracelular purificada. No entanto, a atividade residual não apresentou somatória quando utilizamos maltose e amido ou maltose e maltooligossacarídeos. Estes resultados sugerem que a atividade hidrolítica, poderia ser atribuída a uma única enzima, uma vez que os resultados não foram aditivos, indicando que a enzima é uma α -glucosidase, uma vez que a maltose é o substrato favorito e portanto, poderia pertencer ao tipo III, já que a enzima atua também sobre polissacarídeos. A enzima também não promoveu atividade catalítica sobre substratos sintéticos (**tabela 3**). Já a trealose sintase de *T. thermophilus* o qual produz trealose de maltose, catalisou a clivagem das ligações α -1,4-glicosídicas de p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeos (Zdzieblo & Synowieck, 2002). Porém, a trealose sintase de *Pimelobacter* sp R 48, *Pseudomonas putida* H 262 e várias outras bactérias foram ativas somente sob maltose como substrato (Nishimoto et al., 1996^a, Schiraldi et al., 2002). Já o amido e maltooligossacarídeos foram menos preferencialmente hidrolisados pela enzima purificada de *C. thermophilum*, demonstrando diferentes especificidades de substratos. Já a α -glucosidase do fungo *M. alliacea* demonstrou alta atividade catalítica frente a vários substratos incluindo, maltose, kojibiose, nigerose, substrato sintético, amido, glicogênio, entre outros (Tanaka et al., 2002).

A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} frente a maltose como substrato, indicaram valores de $0.55 \pm 0.04 \text{ mM}$ e $34.16 \pm 2.73 \text{ U/mg}$ de proteínas totais, respectivamente. É interessante observar, que valores próximos ou acima de 3 mM de maltose como substrato a enzima apresenta uma aparente inibição na atividade, sugerindo que a enzima estaria promovendo atividade de síntese e não de hidrólise em valores mais altos de substrato (**figura 22**). Com amido como substrato, obteve-se um K_m alto em torno de $4.35 \pm 0.42 \text{ mg/mL}$ e V_{max} $4.4 \pm 0.42 \text{ U/mg}$ de proteína (**figura 23**). A presença de trealose não afetou a afinidade da α -glucosidase purificada para maltose e amido, mas diminuiu ao redor de 4.8 e 3.9 vezes do valor da $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente (**figura 24 e 25**). A maioria das α -glucosidases purificadas não hidrolisam trealose, exceto α -glucosidases de *M. allioacea* (Tanaka et al., 2002), *A. nidulans* (Kato et al., 2002) e *Candida albicans* (Torre-Boscoulet et al., 2004).

O ponto isoelétrico da α -glucosidase extracelular purificada é 6.5 (**figura 26**), sendo próximo as enzimas de *Sulfolobus acidocaldarius* (pI 5.9) (Nakada et al., 1996) e de *Sulfolobus solfataricus* KM 1 (pI 6.1) (Kato et al., 1996).

A produção de anticorpos anti-glucosidase extracelular com atividade de glicosiltransferase serviu para o estudo da localização da enzima. A enzima foi localizada no citosol e nos meios de cultivo em amido 1%, maltose 5% ou glicose 1%, usados como fonte de carbono. No entanto, a enzima não estava presente na membrana em glicose 1% ou maltose 5%, usadas como fonte de carbono. A enzima também era detectada em amido 1%. Isto sugere que a síntese da enzima responsável pela produção de trealose, seja constitutiva. Possivelmente não conseguimos detectar a presença da enzima na membrana, por esta se

encontrar em baixas concentrações ou pelo fato de ser excretada, não se encontrando presa a membrana (**figura 27 e 28**).

Atividade de transglicosilação foi demonstrada pela α -glucosidase purificada quando maltose era usada em altas concentrações. Com 8 horas de reação a presença de trealose é verificada em TLC, sendo os traços de maltooligossacarídeos evidenciados com mais intensidade em 16, 24 e 36 horas. Isso sugere que a síntese de trealose seja fornecida a partir de maltose como substrato e não de maltooligossacarídeos maiores. Também observamos a liberação de uma pequena quantidade de glicose através da atividade de hidrolase (**figura 29**). As glicosiltransferases catalisam a conversão de maltose em trealose e também liberam uma pequena quantidade de glicose através da atividade de hidrólise sobre maltose (Zdziebło & Synowiec, 2006). Isso também é observado em *A. nidulans* que converte maltose em isomaltose (Kato et al., 2002^a, 2002^b) e de *Actinoplanes* sp., nos quais produziram trealose de maltose com liberação de glicose como produto por ação da hidrolase (Choi & Shin, 2004).

A produção de trealose nos meios de cultivo utilizando amido 1% ou maltose 1% como fonte de carbono, foram observados em TLC. Os traços de trealose produzidos com amido como fonte de carbono poderiam sugerir uma explicação para a indução da atividade trealásica presente nos meios de cultivos contendo estas fontes de carbono. A trealose presente nos meios de cultivos, foram degradados pela trealase pura da *S. thermophilum*, confirmando que o carboidrato observado em cromatografia em camada delgada era trealose (**figura 30**). A produção de trealose em amido como fonte de carbono através do

sistema alternativo, poderia justificar a alta atividade trealásica quando os fungos filamentosos de *S. thermophilum* (Kadowaki, 1996) e *C. thermophilum* (Almeida, 1998) eram crescidos em amido como fonte de carbono.

Os maltooligossacarídeos produzidos via reação de transglicosilação foram degradados pela glucoamilase purificada do mutante *exo-1* de *Neurospora crassa* (**figura 29 e 31**). Isso sugere que os maltooligossacarídeos formados a partir de maltose são constituídos de ligações glicosídicas α -1,4 e não ligação glicosídica α -1,1 nos resíduos terminais como a maltooligosiltrealose sintetizado pela MTSa (**figura 4**), sugerindo que estes oligômeros de carboidratos poderiam ser maltopentose e maltotetrose (Nakada et al., 1995^a, Nakada et al., 1996^a, 1996^b; Kato et al., 1996^a, 1996^b, 1996^c).

A produção de trealose através de reação de transglicosilação com maltose como substrato, era observado também em um HPLC, verificando que a presença de trealose como produto, e a liberação de pequenas quantidades de glicose através da atividade de hidrolase (**figura 32**). No entanto, a produção de trealose foi menor do que a apresentada em HPLC pelo *T. thermophilum* (Zdzieblo & Synowieck, 2006) mas, pode-se observar que além da produção de trealose, pequenas quantidades de glicose era liberada como produto, similar ao apresentado pelo *C. thermophilum* (Giannesi et al., 2006) e por *A. nidulans* (Kato et al., 2002^a, 2002^b).

A análise da resposta ao choque térmico em *C. thermophilum* revelou alguns fatores já observados em algumas espécies de fungos (revisado por Oberson et al., 1999). A baixa quantidade de trealose encontrada em *C. thermophilum* crescido em temperatura (40°C), mostrou que a presença deste

dissacarídeo não estava relacionada a termofilia mas, com a resposta ao estresse. Isso pode ser verificado em crescimento a 50°C, em meio YPS 1 com glicose ou amido 1%, como fonte de carbono, onde obteve-se um aumento nos níveis de trealose de 69 e 27%, respectivamente. Em glicose como fonte de carbono a via clássica de síntese de trealose poderia se encontrar ativa, assim como a via alternativa, já que se acredita que esta seja induzida constitutivamente. O acúmulo de trealose observado a 50°C, poderia ser a razão porque esta temperatura não inibe o crescimento (**tabela 4**). A produção de trealose por grama de massa micelial a 50°C foi de 42 e 14% mais alto do que a 40°C, em glicose e amido como fonte de carbono, respectivamente (**figura 33**). Estes valores estão de acordo com os apresentados por Oberson e colaboradores (1999) onde, verificou-se em cultivos de *C. thermophilum* com amido, como fonte de carbono, o acúmulo de trealose citosólica em aproximadamente 5% (peso) em 45°C, para 13.5% em 53°C, correspondendo a um aumento de 3 vezes (revisado por Jepsen & Jensen, 2004).

Análises da resposta ao choque térmico em *C. thermophilum* revelou alguns fatores típicos já observado em algumas espécies de fungos como *Scytalidium thermophilum* (Kadowaki et al., 1996), *Humicola grisea* (Neves et al., 1991) e *C. thermophilum* (Almeida et al., 1999). No entanto, na reincubação com maltose 1% e maltose 5%, colocados previamente a 25°C, e posteriormente, a 50°C (choque térmico) não foram observados acúmulo de trealose como em glicose 1%. Isso sugere que o fator determinante para a indução da via alternativa de síntese de trealose não seja o stress térmico (**figura 34**).

É a primeira vez que esta sendo relatado uma enzima de fungos filamentosos que em adição para sua atividade de glicosil hidrolase, também possui atividade de glicosiltransferase com produção de trealose a partir de maltose via reação de transglicosilação. Podemos postular que a atividade de transglicosilação exibida pela α -glucosidase de *C. thermophilum* poderiam explicar os grandes níveis de trealases produzidas pelos fungos termofílicos crescidos em amido ou maltose (Almeida et al., 1999; Kadowaki et al., 1996). Talvez, nestes organismos a trealase poderia ser induzida pela trealose produzida por atividade de transglicosilação por ação da α -glucosidase.

Estudos também foram realizados em linhagens de leveduras, a fim de verificar se o sistema alternativo de síntese de trealose estava presente nestes organismos. Chi e colaboradores (2003) verificaram a produção de altas concentrações de trealose, 18% (g/g peso seco) de amido em mutante de *Saccharomycopsis fibuligera*. A linhagem de *S. fibuligera* 2390 isolada nos Estados Unidos e 2622 isolada na Alemanha foram usadas em nosso laboratório, a fim de verificar se a produção de trealose por estes microrganismos ocorria através do sistema alternativo. Na **figura 35**, observamos a produção de trealose em meios de cultura com amido como fonte de carbono. Ao contrário, do apresentado por *C. thermophilum*, onde uma α -glucosidase extracelular com atividade de transglicosilação foi purificada, a trealose só era verificada no meio intracelular de culturas com amido, como fonte de carbono. Isto sugere que a enzima não esteja presente no meio extracelular ou que a trealose que por ventura tenha sido sintetizada esteja em concentrações muito baixa. A produção de trealose também era observada via reação de transglicosilação em ambas as

linhagens de *S. fibuligera* 2390 e 2622, mas, somente em culturas onde o amido era usado como fonte de carbono (**figura 36**). A produção de trealose pelo *S. fibuligera* 2390 analisado em nosso laboratório, em amido como fonte de carbono, demonstrou um aumento de 8 vezes, quando comparado com culturas crescidas em glicose como fonte de carbono. Esta linhagem também apresentou um aumento de 50%, na produção de trealose, quando comparado com a levedura de *S. fibuligera* 2622, ambas nas mesmas condições de crescimento (**figura 37**).

A produção de trealose via reação de transglicosilação com células intactas, demonstrou uma produção de 62mg/g de células em *S. fibuligera* 2390 e, ao redor de 50mg/g de células em *S. fibuligera* 2622. Estes foram bastante baixos quando comparados com os resultados obtidos do mutante de *S. fibuligera* (Chi et al., 2003). Essa diferença pode ser justificada pela ausência de trealase no mutante Tre⁻ de *S. fibuligera*, com manutenção da trealose produzida.

A levedura de *S. cerevisiae*, ao contrário, de *S. fibuligera* 2390 e 2622, não apresentou produção de trealose e maltooligossacarídeos pelo sistema alternativo como observado em TLC (**figura 40**). Em *S. fibuligera* 2390 e 2622, a redução de açúcar redutor foi bastante acentuada, sendo mais evidente na linhagem 2390, onde observou-se a produção de trealose e maltooligossacarídeos através de reação de transglicosilação, ao contrário, do apresentado pelo *S. cerevisiae*.

Uma vez verificada que a produção de trealose era mais elevada em *S. fibuligera* 2390, a enzima intracelular com atividade de glicosiltransferase foi purificada e também serviu de comparação com a enzima extracelular de *C. thermophilum*.

As culturas de *S. fibuligera* 2390, era mantida em condições ótimas de crescimento, onde a atividade enzimática atingiu sua máxima em 72 horas de cultivo, em amido como fonte de carbono (**figura 42**). A temperatura ótima de atividade, verificada a partir do extrato bruto foi 40°C (**figura 41**).

Os procedimentos para a purificação da enzima de interesse, compreenderam: precipitação com acetona, DEAE-celulose e octil-sepharose. A enzima foi purificada 37.4-vezes com uma atividade específica de 14.2U/mg de proteínas e um rendimento de 65% (**tabela 5**). A α -glucosidase do molusco *Aplysia fasciata* também apresentou um alto rendimento de 74% nos processos de purificação (Andreotti et al., 2006) e 33% para *Acremonium implicatum* (Yamamoto et al., 2004) e *Geobacillus thermodenitrificans* (Ezeji & Bahl, 2006). Apesar de utilizarmos a mesma metodologia empregada na purificação da enzima de *C. thermophilum*, a enzima de *S. fibuligera*, se diferenciou da enzima de *C. thermophilum*, através da interação em coluna de DEAE-celulose, sugerindo que a enzima seja uma proteína ácida (**figura 43**). A enzima intracelular de *S. fibuligera* 2390, não interagiu em coluna de octil-sepharose, mas, foi o passo determinante para a purificação da enzima, com eliminação de grandes quantidades de contaminantes como observado através de um gradiente inverso (**figura 44**).

A enzima intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390 foi considerada como α -glucosidase, uma vez que promoveu hidrólise de maltose e atividade de transglicosilação com produção de trealose de maltose. A maioria das α -glucosidases promovem atividade de transglicosilação, como é citado na literatura para *A. niger* (Kita et al., 1991), *M. alliacea* (Tanaka et al., 2002),

Paecilomyces varioti (Kobayash et al., 2003), *T. thermophilum* (Zdziebło & Synowiecki, 2006), entre outros. No entanto, é a primeira vez que se relata a produção de trealose em fungos filamentosos termófilos a partir de transglicosilação, como *C. thermophilum* e espécies de leveduras como *S. fibuligera*.

α -Glucosidase intracelular de *S. fibuligera* 2390, apresentou uma única banda em PAGE para proteínas ácidas e duas bandas em SDS-PAGE, sugerindo que a nossa enzima seja um heterodímero, já que apresentou pesos moleculares diferentes (**figura 45**). A enzima de *S. fibuligera* 2390, apresentou duas bandas em SDS-PAGE, mesmo quando a amostra não era fervida. Isto sugere que a α -glucosidase intracelular *S. fibuligera* é muito mais sensível, ao SDS e mercaptoetanol não apresentando atividade quando estes compostos eram adicionados. Enquanto a α -glucosidase de *C. thermophilum*, apresentou atividade na presença de SDS e de mercaptoetanol, sugerindo que a α -glucosidase de fungos filamentosos termófilos sejam menos sensíveis a estes componentes do que espécies de leveduras (**figura 15**).

A massa molecular da α -glucosidase intracelular foi estimada em SDS-PAGE, cujo valor estimado foi de 120KDa e a outra de 106KDa (**figura 46**). Esta massa molecular é um valor aproximado, já que a molécula apresentou, 68% de açúcar, sendo uma glicoproteína. α -glucosidase de *Schizosaccharomyces pombe* também apresentou alta glicosilação, o qual incluiu 88%, de componentes de açúcar (Okuyama et al., 2005). A massa molecular da α -glucosidase intracelular purificada foi estimada por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100, valor estimado foi de 190KDa (**figura 47**). A massa molecular

de *C. thermophilum* ao contrário, apresentou metade da massa, quando comparada com a de *S. fibuligera*. Na literatura, as α -glucosidases de *A. nidulans* (Kato et al., 2002), *M. alliacea* (Tanaka et al., 2002) e *Cândida albicans* (Torre-Bouscoulet et al., 2004), consistiram de duas heterosubunidades, sendo características básicas de algumas α -glucosidases. Por outro lado, α -glucosidase de *G. thermodenitrificans* apresenta como uma proteína monomérica em coluna de filtração e por SDS (Ezeji & Bahl, 2006).

A α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* 2390, teve um pH ótimo ao redor de 5.0 (**figura 49**). Em pHs de 3.0 a 4.5, a atividade aumentou linearmente, com uma produção de 28, 52, 78 e 93%, do valor da atividade máxima, decaindo em pHs acima de 5.0. No pH de 7.5 a enzima apresentou uma produção de atividade ao redor de 4%, permanecendo inativa em pH 8.0. Estes valores estão de acordo com os dados apresentados na literatura para as α -glucosidases purificadas de várias fontes, onde exibem pH ótimo entre 4.5 a 7.0 (Frandsen & Svensson, 1998; Tanaka et al., 2002; Kita et al., 1991, 1996).

A α -glucosidase intracelular purificada, apresentou um aumento da atividade entre 30 e 45°C, obtendo atividade máxima, a 45°C (**figura 48**). A 50°C, a enzima, apresentou uma queda de 37%, do valor da máxima. A temperatura ótima de 45°C, apresentada pela glucosidase de *Streptomyces* E383A foi idêntica a apresentada pelo *S. fibuligera* (Faijis et al., 2006).

A maioria das α -glucosidases de fungos exibem temperatura ótima de 35 a 65°C (Tanaka et al., 2002; Kobayash et al., 2003; Yamamoto et al., 2004; Okuyama et al., 2005).

O efeito de íons sob a atividade da α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* foi similar a obtida pelo fungo filamentoso de *C. thermophilum*, uma vez que ambas as α -glucosidases purificadas foram independentes de metais. A Ag^{+2} e Hg^{+2} inibiram drasticamente a atividade enzimática de *S. fibuligera* em 91 e 76%, respectivamente (**tabela 6**). A atividade de α -glucosidase intracelular purificada sem a presença de cofatores, também é citado na literatura para a trealose sintase de *T. caldophilus* (Koh et al., 2003).

A enzima apresentou uma queda brusca nos primeiros 10 minutos quando incubada a 50 ou 55°C, de 40 e 56% da atividade enzimática, respectivamente. Após os 10 minutos a enzima foi termoestável durante os próximos 30 minutos a 45°C, onde apresentou uma queda máxima de 25%, aos 60 minutos de incubação. A 50 e 55°C, a enzima purificada demonstrou uma meia vida de 24 e 10 minutos, respectivamente (**figura 50**).

A α -glucosidase intracelular de *S. fibuligera* purificada foi testada com vários possíveis substratos e a velocidade de hidrólise com maltose como substrato foi comparado (**tabela 7**). A enzima hidrolisou amilose, amido e maltooligossacarídeos, com velocidade de 23, 17 e 23%, comparado com maltose como substrato. Esta preferência a substratos com cadeia curta de glicosídeos, sugere que a enzima pertença ao tipo III, similar a α -glucosidase de *C. thermophilum*. A α -glucosidase intracelular purificada de *S. fibuligera* não teve ação catalítica sobre substratos sintéticos. A α -glucosidase de *T. thermophilus* (Zdzieblo & Synowieki, 2006) e *Bacillus subtilis* (Schonert et al., 1999) ao contrário, teve atividade sobre p-nitro-fenil- α -D-glucopiranosídeo, pertencendo a classe I das glucosidases. Já o substrato preferido para a α -glucosidase de *G.*

thermodenitrificans são dissacarídeos e cadeias curtas de oligossacarídeos, pertencendo ao tipo II (Ezeji & Bahl, 2006). Embora a trealose não seja substrato para a ação da α -glucosidase purificada de *S. fibuligera*, este carboidrato inibiu a atividade enzimática quando presente com maltose em uma mistura de reação.

Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a enzima purificada de *S. fibuligera* 2390 foi de 0.4mM e 17U/mg de proteínas (**figura 51**). Estes resultados sugerem que ambas as α -glucosidases purificadas possuem a mesma afinidade pela maltose, já que a α -glucosidase de *C. thermophilum* apresentou um K_m de 0.55mM. No entanto, a $V_{m\acute{a}x}$ do fungo filamentoso foi 2 vezes mais alto daquele apresentado pela levedura. A presença de trealose no meio de reação promoveu a inibição da $V_{m\acute{a}x}$, não alterando a afinidade da enzima pela maltose (**figura 52 e 53**).

O ponto isoelétrico da α -glucosidase intracelular purificada é 4.2 (**figura 54**). Este resultado é bastante similar aos apresentados pela trealose sintase que promove síntese de trealose de maltose em *T. aquaticus* e de *Pimelobacter* sp, ambas com $pI=4.6$ (Nishimoto et al., 1996^a, 1996^b). A enzima de *Arthrobacter* sp Q36 que promove a síntese de maltooligosiltrealose possui um pI de 4.1 (Nakada et al., 1995^a).

A α -glucosidase de *S. fibuligera* 2390, demonstrou sintetizar trealose e maltooligossacarídeos via reação de transglicosilação com maltose 5% como substrato. Durante a reação uma pequena quantidade de glicose era liberada por ação da α -glucosidase purificada de *S. fibuligera* (**figura 55**). Estes resultados sugerem que as atividades de glicosil hidrolase e glicosiltransferase residem na mesma enzima. Isso também era demonstrado em *T. thermophilus* (Zdzieblo & Synowiecki, 2006). O mecanismo de síntese de trealose e maltooligossacarídeos

pelo *S. fibuligera* não foi completamente elucidado. Porém, os resultados sugerem que a enzima produziu trealose diretamente de maltose, como apresentado pelo *C. thermophilum* (**figura 29**). A produção de trealose de maltose também citada na literatura em *Pimelobacter* sp R 48, *Pseudomonas putida* e *Thermus aquaticus* (Nishimoto et al., 1995, 1996^a, 1996^b), *Thermus caldophilus* (Koh et al., 1998, 2003; Cho et al., 2006) e *Thermus thermophilus* HB-8 (Zdziebło & Synowiecki, 2006). Um número de α -glucosidases, também exibem reação de transglicosilação produzindo componentes α -glicosilados como apresentado para os fungos *A. niger* (Vetere et al., 2000), *A. nidulans* (Kato et al., 2002^a, 2002^b), *A. oryzae* (Tonomura et al., 1961) e *M. alliacea* (Tanaka et al., 2002), os quais exibem atividade de transglicosilação com maltose como doador de grupos glicosídeos. A confirmação dos traços de trealose observados em TLC pela reação de transglicosilação foi realizada com a trealase pura de *S. thermophilum* o qual promoveu a degradação da trealose liberando glicose como produto (**figura 56** Trealose sintase que interconverte maltose e trealose catalisando um rearranjo das ligações glicosídicas α -1,4 da maltose para ligações α -1,1 de trealose, e vice versa, foram descritos em *Pimelobacter* sp (Nishimoto et al., 1996^a), e outras bactérias, como *Mycobacterium smegmatis* (Pan et al., 2004) e *T. thermophilus* (Zdziebło & Synowiecki, 2006), as α -glucosidases de *C. thermophilum* e *S. fibuligera* não converte trealose em maltose. α -glucosidases usualmente são capazes de catalisar reação de transglicosilação (Tanaka et al., 2002).

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que as α -glucosidases de fungos filamentosos e de uma espécie de levedura também possuem o sistema

alternativo de síntese de trealose a partir de maltose, através de reação de transglicosilação, como apresentado pelas arqueobactérias (Nishimoto et al., 1995, 1996^a, 1996^b; Zdzieblo & Synowiecki, 2006; Nakada et al., 1995; Koh et al., 1998, 2003; Cho et al., 2006). A descoberta deste sistema é importante, uma vez que alguns microrganismos, como fungos filamentosos e espécies de leveduras possuem uma via para a síntese de trealose, independente de gasto de energia.

6. REFERÊNCIAS

Lúcio-Eterovic, A.K.B.; Jorge, J.A. ; Polizeli, M.L.T.M.; Terenzi, H.F. Biochemical characterisation of the trehalase of thermophilic fungi: An enzyme with mixed properties of neutral and acid trehalase. *Biochim. et Biophys. Acta.* v. 1723:p. 201-207, 2005.

Almeida, E.M.; Polizeli, M.L.T.M.; Terenzi, 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.*v.171:p. 11-15, 1999.

Almeida, E.M. *Purificação e caracterização da trealase de Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*. Ribeirão Preto, Tese (Doutorado) 109p- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1998.

Ames, L.M. A monograph of the Chaetomiaceae. U.S. *Army. Res. Dev. Ser.* v.2:p. 1-125, 1961.

Arya, S.C. Stabilization of vaccines: to be or not to be. *Vaccine.* v.19:p. 595-597, 2000.

Arx, J.A.; von. Dreyfuss, M.; Müller, E. A revaluation of *Chaetomium* and Chaetomiaceae. *Persoonia*. v.12:p. 169-179, 1984.

Arx, J.A.; Guarro, J.; Figueras, M.J. The ascomycete genus *Chaetomium*. *Nova Heol. Suppl.* v.84:p. 1-162, 1986.

Augier, J. The Biochemistry of a North American algae, *Tuomeya-fluviatilis*. *Compt. Rend.* v.239:p. 87-89, 1954.

Belocopitow, E.; Maréchal, L.R. Metabolism of trehalose in *Euglena gracilis*- Partial purification and some properties of trehalose phosphorilase. *The J. Biol. Chem.* v.10:p. 3223-3228, 1972.

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.* v.276:p. 24261-24267, 2001.

Bergmeyer, H.U.; Bernt, E. In methods of enzymatic analysis. Edited by H. U. Bergmeyer. Verlag-Chimie- *Academic Press, New York*. v.3:p. 1205-1215, 1974.

Blakeley, D. Dry instant blood typing plate for bedside use. *Lancet*. v.336:p. 854-855, 1990.

Bonini, B.M.; Van Dijck, P.; Thevelein, J.M. Trehalose Metabolism: Enzymatic Pathways and Physiological Functions. *Biochem. and Molec. Biol. Cap.*15: p. 291-321, 2004.

Cannon, P.F.; Minter, D.W. The Rhytismataceae of the Indian sobcontinent. *Commonw. Mycol. Inst. Mycol.* v.155:p. 1-123, 1986.

Cabib, E.; Leloir, L.F. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* v.231:p. 259-275, 1958.

Cardello, L.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. A cytosolic trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Microbiol.* v.140:p. 1671-1677, 1994.

Chi, Z.; Liu, J.; Zang, W. Trehalose accumulation from soluble starch by *Saccharomycopsis fibuligera* sdu. *Enzyme Microb. Technol.*v.38:p. 240-246, 2001.

Chi, Z.; Liu, J.; Ji, J.; Meng, Z. Enhanced conversion of soluble starch to trehalose by a mutant of *Saccharomycopsis fibuligera* sdu. *J. Biotechnol.* v.102:p. 135-141, 2003.

Chiba, S. Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.61:p. 1233-1239, 1997.

Cho, Y.; Park, O.; Shin, H. Immobilization of thermostable trehalose synthase for the production of trehalose. *Enz. and Microb. Technol.* v.39:p. 108-113, 2006.

Choi, B.T.; Shin, C.S Isolation and characterization of a novel intracellular glucosyltransferase from the acarbose producer *Actinoplanes* sp. CKD 485-16. *Appl. Microbiol. Biotech.* v.65:p. 273-280, 2004.

Choi, Y.; Cho, K.W.; Jeong, K.; Jun, S. Molecular dynamics simulations of trehalose as a 'dynamic reducer' for solvent water molecules in the hydration shell. *Carb. Res.* v.341:p. 1020-1028, 2006.

Colaço, C.; Sem, S.; Thangavely, M.; Pinder, S.; Roser, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose simplified molecular biology. *Biotech.* v.10:p. 1007-1011, 1992.

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

Davis, B.J. Disk electrophoresis. *Am. N. Y. Acad. Sci.* v.121:p. 404-427, 1964.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Simth, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* v.28:p. 350-356, 1956.

Elbein, A.D.; Mitchell, M. Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis*, and the purification and properties of the glycogen synthase. *J. Bacteriol.* v.113:p. 863-873, 1973.

Elbein, A.D.; Pan, Y.T.; Pastuszak, I.; Carroll, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiol.* v.13:p. 17R-27R, 2003.

Elbein, A.D. The metabolism of α,α -trehalose. *Adv. Carb. Chem. Biochem.* v.30: p. 227-256, 1974.

Evans, D.R.; Dethier, V. G. The regulation of taste thresholds for sugars in the blowfly. *J. Insect Physiol.* v.1:p. 3-17, 1957.

Ezeji, T.; Bahl, H. Purification, characterization, and synergistic action of phtate-resistant α -amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. *J. of Biotechnol.* v.xx:p. Xxx-xxx, 2006.

Fairbairn, D. Glucose, trehalose and glycogen in *Porrocaecum decipiens* larvae. *Nature.* v.181:p. 1593-1594, 1958.

Frandsen, T.P.; Svensson, B. Plant α -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Molec. Biol.* v.37:p. 1-13, 1998.

Franks, F.; Hatley, R.H.M.; Mathias, S.F. Materials science and the production of shelf-stable biologicals. *Biopharm.* v.4:p. 38-42, 1991.

Friedman, S. The purification and properties of trehalase isolated from *Phormia regina*, MEIG. *Arch. Biochem. Biophys.* v.87:p. 252-258, 1960.

Friedman, S. Trehalose regulation, one aspect of metabolic homeostasis. *Ann. Rev. Entomol.* v.23: p.389-407, 1978.

Gadd, G.M.; Chalmers, K.; Reed, R.H. The role trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*v.48:p. 249-254, 1987.

Giaever, H.M.; Styrvold, O.B.; Kaasen, I.; Strom, A.R. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *E. coli*. *J. Bacteriol.* v.170:p. 2841-2849, 1988.

Giannesi, G.C.; Polizeli, M.L.T.M.; Terenzi, 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. *Proc. Biochem.*v.41:p. 1729-1735, 2006.

Giannesi, G.C. *Estudo da síntese de trealose em Chaetomium thermophilum var. coprophilum: demonstração da existência de uma nova via envolvendo reação de transglicosilação*-Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado) 78p- FMRP; Universidade de São Paulo, 2002.

Hong, S.H.; Marmur, J. Primary structure of the maltase gene of the MAL6 locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene*. v.41:p. 75-84, 1986.

Hottiger, T.; Boller, T.; Wiemken, A. A rapid changes of heat and dessication tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperatures shifts. *FEBS Lett.* v.220:p. 113-115, 1987.

Jepsen, H. F.; Jensen, B. Accumulation of trehalose in the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* var *coprophilum* in response to heat or salt stress. *Soil Biol. & Biochem.* v.36:p. 1669-1674, 2004.

Jorge, J.A.; Polizeli, M.L.T.M.; Thevelein, J.M.; Terenzi, H.F. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* v.154:p. 165-171, 1997.

Kaasen, L.; McDougall, J.; Strom, A.R. Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *Gene*. v.145:p. 9-15, 1994.

Kadowaki, M.K.; Polizeli, M.L.T.M.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. Characterization of trehalase activities from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Biochim. Biophys Acta*. v.1291:p.199-205, 1996.

Kadowaki, M.K. *Purificação e caracterização das trealases: Extracelular, Intracelular e Conidial de *Scytalidium thermophilum**. Ribeirão Preto, Tese (Doutorado) 104p- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1999.

Kato, M.; Miura, Y.; Kettoku, M.; Komeda, T.; Iwamatsu, A.; Kobayashi, K. Reaction mechanism of a new Glycosyltrehalose-hydrolyzing enzyme isolated from the Hyperthermophilic Archaeum, *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.60:p. 925-928, 1996^a.

Kato, M.; Miura, Y.; Kettoku, M.; Shindo, K.; Iwamatsu, A.; Kobayashi, K. Purification and characterization of new trehalose-producing enzymes isolated from the Hyperthermophilic Archae, *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.60:p. 546-550, 1996^b.

Kato, M.; Miura, Y.; Kettoku, M.; Shindo, K.; Iwamatsu, A.; Kobayashi, K. Reaction mechanism of a new Glycosyltrehalose-producing enzyme isolated from the Hyperthermophilic Archaeum, *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.60:p. 921-924, 1996^c.

Kato, M. Trehalose production with a new enzymatic system from *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* v.6:p. 223-233, 1999.

Kato, N.; Murakoshi, Y.; Kato, M.; Kobayashi, T.; Tsukagoshi, N. Isomaltose formed by α -glucosidases triggers amylase induction in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* v.42:p. 43-50, 2002^a.

Kato, N.; Suyama, S.; Shirokane, M.; Kato, M.; Kobayashi, T.; Tsukagoshi, N. Novel α -Glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity. *Appl. Env. Microb.* v.68:p. 1250-1256, 2002^b.

Kelly, C.T.; Fogarty, W.M. Microbial α -glucosidases. *Process Biochem.* v.18:p. 6-12, 1983.

Kimura, A.; Takada, M.; Sakai, O.; Matsui, H.; Takai, N.; Takayanagi, T.; Nishimura, I.; Uozumi, T.; Chiba, S. Complete amino acid sequence of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.56:p. 1368-1370, 1992.

Kita, A.; Matsui, H.; Somoto, A.; Kimura, A.; Takata, M.; Chiba, S. Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* v.55: p.2327-2335, 1991.

Kita, A.; Matsui, H.; Honma, M.; Chiba, S. Ezymatic properties of three α -glucosidases from *Aspergillus oryzae*. *J. Appl. Glycosci.* v.43:p. 325-330, 1996.

Kobayashi, I.; Tokuda, M.; Konda, T.; Nakano, H.; Kitahata, S. Purification and characterization of a new type of α -glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce α -1,3- and α -1,2-linked oligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.67:p. 29-35, 2003.

Koh, S.; Shin, H.; Kim, J.S.; Lee D.; Lee, S.Y. Trehalose synthesis from maltose by a thermostable trehalose synthase from *Thermus caldophilus*. *Biotech. Lett.* v.20:p. 757-761, 1998.

Koh, S.; Kim, J.; Shin, H.; Lee, D.; Bae, J.; Kim, D.; Lee, D. Mechanistic study of the intramolecular conversion of maltose to trehalose by *Thermus caldophilus* GK 24 trehalose synthase. *Carb. Res.* v.338:p. 1339-1343, 2003.

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

Leone, F.A.; Degreve, L.; Baranauskas, J.A Sigraf- A versatile computer program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem. educ.* v.20:p. 94-96, 1992.

Levine, H.; Slade, L. Another view of trehalose for drying and stabilizing biological materials. *Biopharm.* v.5:p. 36-40, 1992.

Lindberg, B. Studies on the chemistry of lichens. Investigation of a *Dermatocarpon* and some *Roccella* species. *Acta Chem. Scand.* v.9:p. 917-919, 1955.

Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of the enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem.* v.56:p. 658-666, 1934.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v.193:p. 265-276, 1951.

Ma, Y.; Xue, L.; Sun, Da-Ven. Characteristics of trehalose synthase from permeabilized *Pseudomonas putida* cells and its application in converting maltose into trehalose. *J. Food Engineer.* v. 77:p. 342-347, 2006.

Madin, K.A.C.; Crowe, J.H. Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. *J. Exp. Zool.* v.193:p. 335-342, 1975.

Martin, M.C.; Dias, L.A.; Manzanal, M.B.; Hardisson, C. Role of trehalose in the sporos of *Streptomyces*. *FEMS Micro. Lett.* v.35:p. 49-54, 1986.

Maruta, K.; Nakada, T.; Kubota, M.; Chaen, H.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y. Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.59:p. 1829-1834, 1995.

Maruta, K.; Hattori, K.; Nakada, T.; Kubota, M.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes *Rhizobium* sp. M-11. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.60:p. 717-720, 1996^a.

Maruta, K.; Mitsuzumi, H.; Nakada, T.; Kubota, M.; Chaen, H.; Sugimoto, T.; Fukuda, S.; Kurimoto, M. Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1291:p. 177-181, 1996^b.

Maruta, K.; Hattori, K.; Nakada, T.; Kubota, M.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M. Cloning of sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1289:p. 10-13, 1996^c.

McCleary, B.V.; Gibson, T.S. Purification, properties, and industrial significance of transglucosidase from *Aspergillus niger*. *Carb. Res.* v.185:p. 147-162, 1989.

McIlvaine, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* v.49:p. 183-186, 1921.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* v.31:p. 426-428, 1959.

Nakada, T.; Maruta, K.; Tsusaki, K.; Kubota, M.; Chaen, H.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y. Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.59:p. 2210-2214, 1995^a.

Nakada, T.; Maruta, K.; Mitsuzumi, H.; Kubota, M.; Chaen, H.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y. Purification and characterization of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose trehalo-hydrolase, from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.59:p. 2215-2218, 1995^b.

Nakada, T.; Ikegami, S.; Chaen, H.; Kubota, M.; Fukuda, S.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y. Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose synthase from the thermoacidophilic Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.60:p. 263-266, 1996^a.

Nakada, T.; Ikegami, S.; Chaen, H.; Kubota, M.; Fukuda, S.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y. Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose trehalohydrolase from the thermoacidophilic Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.60:p. 267-270, 1996^b.

Nakamura, A.; Nishimura, I.; Yokoyama, A.; Lee, D.G.; Hidaka, M.; Masaki, H.; Kimira, A.; Chiba, S. Cloning and sequencing of an α -glucosidase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *A. nidulans*. *J. Biotech.* v.53:p. 75-84, 1997.

Nakano, H.; Moriwaki, M.; Washino, T.; Kitahata, S. Formation of trehalose and its 2-deoxy analogs through condensation by a trehalase from *Lobosphaera* sp. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.58:p. 1435-1438, 1994.

Neves, M. J.; Jorge, J.A.; François, J.M.; Terenzi, H.F. Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and on the induction of thermotolerance in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* v.283:p. 19-22, 1991.

Nishimoto, T.; Nakano, M.; Ikegami, S.; Chaen, H.; Fukuda, S.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y. Existence of a novel enzyme converting maltose into trehalose. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.59: p.2189-2190, 1995.

Nishimoto, T.; Nakano, M.; Nakada, T.; Chaen, H.; Fukuda, S.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R 48. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.60:p. 640-644, 1996^a.

Nishimoto, T.; Nakada, T.; Chaen, H.; Fukuda, S.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y. Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.60:p. 835-839, 1996^b.

Nwaka, S.; Holzer, H. Molecular biology of trehalose and trehalases in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* v.58:p. 197-237, 1998.

Oberson, J.; Rawyler, A.; Brandle, R.; Canevascini, G. Analysis of the heat-shock response displayed by two *Chaetomium* species originating from different thermal environments. *Fungal Genetics and Biol.* v.26:p. 178-189, 1999.

O'Farrel, P.Z.; Goodman, H.M. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell.* v.12:p. 1133-1142, 1977.

Oguma, T.; Matsui, H.; Tanida, M.; Takao, S.; Honma, S.; Chiba, S. Purification and substrate specificity of α -glucosidase from *Paecilomyces varioti* AHU 9471. *Biosci. Biotech. Biochem.* v.56:p. 1906-1910, 1992.

Okuyama, M.; Tanimoto, Y.; Ito, T.; Anzai, A.; Mori, H.; Kimura, A.; Matsui, H.; Chiba, S. Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enzyme and Microbial Techn.* v.37:p. 472-480, 2005.

Okuyama, M.; Okuno, A.; Shimizu, N.; Mori, H.; Kimura, A.; Chiba, S. Carboxyl group of residue Asp647 as possible proton donor in catalytic reaction of α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* v.268:p. 2270-2280, 2001.

Otting, G.; Liepinsh, E.; Wuthrick, K. Protein hydration in aqueous solution. *Science*. v.254:p. 974-980, 1991.

Pan, Y.T.; Y.T.; Edavana, V.K.; Jourdain, W.J.; Edmondson, R.; Carroll, J.D.; Pastuszal, I. Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis*: purification, cloning, expression, and properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.*v.271:p. 4259-4269, 2004.

Panek, A.D. Trehalose metabolism- new horizons in technological applications. *Braz. J. Med. Biol. Rev.* v.28:p.169-181, 1995.

Reisfeld, R.A.; Lewis, U.J.; Williams, D.E. Disk electroforesis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*. v.195:p. 281-283, 1962.

Saenger, W. Structure and dynamics of water surrounding biomolecules. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* v.16:p. 93-114, 1989.

Saito, K.; Kase, T.; Takahashi, E.; Takahashi, E.; Horinouchi, S. Purification and characterization of a trehalose synthase from the Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Appl. Env. Microbiol.* v.64:p. 4340-4345, 1998.

Schick, I.; Haltrich, D.; Kulbe, K.D. Trehalose phosphorylase from *Pichia fermentans* and its role in the metabolism of trehalose. *Appl. Microbiol. Biotech.* v.43:p. 1088-1095, 1995.

Schiraldi, C.; Di Lernia, I.; De Rosa, M. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends in Biotech.* v.20:p. 420-425, 2002.

Schonert, S.; Buder, T.; Dahl, M.K. Properties of maltose-inducible α -glucosidase MA1L (sucrase-isomaltase-maltase) in *Bacillus subtilis*: evidence for its contribution to maltodextrin utilization. *Res. Microbiol.* v.150:p. 167-177, 1999.

Shimakata, T.; Minatagawa, Y. Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii*. *Arch. Biochem. Biophys.* v.380:p. 331-338, 2000.

Singer, M.A.; Lindquist, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. *TIB Tech.* v.16:p. 460-468, 1998.

Spinelli, L.B.B.; Polizeli, M.L.T.M.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. Biochemical characterization of glucoamylase from the hyperproducer *exo-1* mutant strain of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol. Lett.*v.138:p. 173-177, 1996.

Sugimoto, M.; Suzuki, Y. Molecular cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding α -glucosidase from *Mucor javanicus*. *J. Biochem.* v.119:p. 500-505, 1996.

Sussman, A.S.; Lingappa, B.T. Role of trehalose in ascospores of *Neurospora tetrasperma*. *Science.* v.130:p. 1343-1344, 1959.

Tanaka, Y.; Aki, T.; Hidaka, Y.; Furuya, Y.; Kawamoto, S.S.; Ono, K.; Suzuki, O. Purification and Characterization of a novel fungal α -Glucosidase from *Mortierella alliacea* with Starch-hydrolytic Activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* v.66:p. 2415-2423, 2002.

Takata, H.; Kuriki, T.; Okada, S.; Takesada, Y.; Lizuka, M.; Imanaka.; N; Imanaka, T. Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α -(1-4) and α -(1-6)-glucosidic linkages. *J. Biol. Chem.* v. 267:p. 18447-18452, 1992.

Thevelein, J.M. Regulation of trehalose metabolism in fungi. *Microbiol. Rev.* v.48:p. 42-59, 1984.

Tonomura, K.; Suzuki, H.; Nakamura, N.; Kuraya, K.; Tanabe, O. On the inducers of α -amylase formation an *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* v. 25:p. 1-6, 1961.

Torre-Bouscoulet, M.E.; López-Romero, E.; Balcázar-Orozco, R.; Calvo-Méndez, C.; Flores-Carreón, A. Partial purification and biochemical characterization of a soluble α -glucosidase II-like activity from *Candida albicans*. *FEMS Microb. Let.*v.236:p. 123-128, 2004.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotech.* v.24:p. 145-149, 1992.

Trevelyan, W.E.; Harrison, J.S. Studies on yeast metabolism. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. *Biochem. J.* v.62:p. 177-182, 1956.

Van Laere, A. Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiol. Rev.* v.63:p. 201-210, 1989.

Vetere, A.; Gamini, A.; Campa, C.; Paoletti, S. Regiospecific Transglycolytic Synthesis and Structural Characterization of 6-O- α -Glucopyranosyl-Glucopyranose (Isomaltose). *Biochem. and Biophys. Res. Communic.* v.274:p. 99-104, 2000.

Vogel, H.F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Amer. Naturalist.* v.98:p. 435-446, 1964.

Vogel, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N.). *Microbiol. Genet. Bull.* v.13:p. 42-43, 1956.

Watanabe, K.; Kitamura, H.; Iha, H.; Suzuki, Y. Primary structure of the oligo-1,6-glucosidase of *Bacillus cereus* ATCC7064 deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene. *Eur. J. Biochem.* v.192:p. 609-620, 1990.

Wyatt, G.R.; Kalf, G.F. The chemistry of insect hemolymph. Trehalose and other carbohydrates. *J. Gen. Physiol.* v.40:p. 833-846, 1957.

Wimmer, B.; Lottspeich, F.; Ritter, J.; Bronnenmeier, K. A novel type of thermostable α -D-glucosidase from *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* exhibiting maltodextrinohydrolase activity. *Biochem. J.* v.328:p. 581-586, 1997.

Wolkers, W.F. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology.* v.4:p. 79-87, 2001.

Womersley, C. Biochemical and physiological aspects of anhydrobiosis. *Comp. Biochem. Physiol.* v.70B:p. 669-678, 1981.

Yamamoto, T.; Unno, T.; Watanabe, Y.; Yamamoto, M.; Okuyama, M.; Mori, H.; Chiba, S.; Kimura, A. Purification and characterization of *Acremonium implicatum* α -glucosidase having for α -1.3-glucosidic linkage. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1700:p. 189-198, 2004.

Yamasaki, Y.; Miyaki, T.; Suzuki, Y. Properties of crystalline α -glucosidase from *Mucor javanicus*. *Agric. Biol. Chem.* v.37:p. 251-259, 1973.

Yamasaki, Y.; Susuki, Y.; Ozawa, J. Purification and properties of α -glucosidase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.* v.40:p. 669-676, 1976.

Yamasaki, Y.; Susuki, Y.; Ozawa, J. Purification and properties of α -glucosidase from *Penicillium oxalicum*. *Agric. Biol. Chem.*v.41:p. 1451-1458, 1977.

Yonemaya, Y.; Lever, J.E. Apical trehalase expression associated with cell patterning after inducer treatment of LLC-PK monolayers. *J. Cell. Physiol.* v.131:p. 330-341, 1987.

Zdzieblo, A.; Synowiecki, J. New source of the thermostable α -glucosidase suitable for single step starch processing. *Food Chem.* v.79:p. 485-491, 2002.

Zdzieblo, A.; Synowieck, J. Production of trehalose by intramolecular transglucosylation of maltose catalysed by a new enzyme from *Thermus thermophilum* HB-8. *Food Chem.*v.96:p. 8-13, 2006.

Zimmermann, A.L.S; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. Purification and properties of an extracellular conidial trehalase from *Humicola grisea* var *thermoidea*. *Biochem. Biophys. Acta.* v.1036:p. 41-46, 1990.