

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

TRANSFORMAÇÃO DE L-TIROSINA À  
L-DOPA PELA AÇÃO DA TIROSINASE  
MICROBIANA

Célia Taeko Zenin

Orientador:

Dr. YONG KUN PARK

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em "Ciências de Alimentos".

Campinas

1978

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

## AGRADECIMENTOS

De maneira especial, a autora agradece:

Ao Dr. YONG KUN PARK orientador do presente trabalho.

Ao Dr. ANDRÉ TOSELLO, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Dr. FUMIO YOKOYA, Coordenador do Curso de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior financiadora da bolsa de estudos.

Por possibilitarem a execução desta tese:

Ao Professor Dr. J. WOLF, do Departamento de Microbiologia da Universidade de Leeds, Inglaterra, pela tipificação do microrganismo selecionado.

Ao sempre amigo e mestre Dr. GILVAN WOSIACK, da Universidade - Estadual de Londrina, pelo incentivo para continuar com os meus estudos.

Aos colegas Professor Dr. EDGAR MARANCENBAUM e Professor RENATO BONATELLI JÚNIOR, da Universidade Estadual de Campinas, pela colaboração.

À colega CÉLIA ARAUJO DA SILVA, pela dedicação e carinho.

Aos demais amigos e colegas, pelo estímulo e colaboração recebida para a realização deste trabalho.

## CONTEÚDO

	página
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	vi
SUMÁRIO	vii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Seleção de microrganismos produtores de tirosinase.	13
3.1.1 Coleta de amostras do solo	13
3.1.2 Isolamento de microrganismos	13
3.1.3 Teste para produção	14
3.1.4 Teste para produção	15
3.1.5 Cromatografia de papel	16
3.1.6 Dosagem de L-DOPA	16
3.2. Produção de tirosinase microbiana	17
3.2.1 Meio de cultura para produção de tirosinase	17
3.2.2 Preparação de inóculo	18

	página
3.2.3 Fermentação	18
3.2.4 e 3.2.5 Estudo da relação entre tempo e alteração de pH do meio de fermentação, crescimento de microrganismo e produção de enzima	18
3.3. Semipurificação da tirosinase	19
3.3.1 Fracionamento com sulfato de amonio	20
3.3.2 Diálise	20
3.3.3 Liofilização	20
3.4. Estudo de características enzimáticas da tirosinase semipurificada	20
3.4.1 Efeito de pH na atividade enzimática	21
3.4.2 Efeito de pH na estabilidade da enzima	21
3.4.3 Efeito de temperatura na atividade enzimática	22
3.4.4 Termoestabilidade da enzima	22
3.4.5 Efeito de sais minerais na atividade enzimática	22
3.4.6 Efeito de inibidores na atividade enzimática	23
3.4.7 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática	23
3.4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida	24
3.5. Enzima imobilizada natural	25
3.5.1 Estudo de características da enzima imobilizada natural	25
3.5.2 Transformação de L-tirosina para L-DOPA	26

	página
3.6. Atividade de tirosinase	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Seleção de microrganismos produtores de tirosinase	29
4.2. Produção de tirosinase microbiana	29
4.3. Estudo de características enzimáticas da tirosinase semipurificada	30
4.3.1 Efeito de pH na atividade enzimática	30
4.3.2 Efeito de pH na estabilidade da enzi- ma	31
4.3.3 Efeito de temperatura na atividade en- zimática	31
4.3.4 Termoestabilidade da enzima	31
4.3.5 Efeito de sais minerais na atividade enzimática	32
4.3.6 Efeito de inibidores na atividade enzi- mática	32
4.3.7 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática	32
4.3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida	32
4.4. Estudo de Características enzimáticas da tiro- sinase na forma de enzima imobilizada natural (cell-bound enzyme)	33
4.5. Transformação de L-tirosina a L-DOPA	34

	página
5. DISCUSSÃO	35
5.1. Seleção de microrganismos	35
5.2. Produção de enzima	35
5.3. Semipurificação	37
5.4. Efeito de pH na atividade enzimática	37
5.5. Efeito de pH na estabilidade enzimática	38
5.6. Efeito de temperatura na atividade enzimática e termoestabilidade da enzima	38
5.7. Efeito de sais minerais na atividade enzimática	39
5.8. Efeito de inibidores na atividade enzimática	39
5.9. Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática	39
5.10. Eletroforese	40
5.11. Estudo de características enzimáticas da tirosinase na forma de enzima imobilizada natural	40
5.12. Transformação de L-tirosina para L-DOPA	41
6. CONCLUSÕES	43
7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 1.	Produção de tirosinase por <u>B.subtilis</u> . 46
FIGURA 2.	Efeito de pH na transformação de L-tirosina para L-DOPA. 47
FIGURA 3.	Efeito de pH na atividade de tirosinase. 48
FIGURA 4.	Efeito de pH na estabilidade de tirosinase. 49
FIGURA 5.	Termoestabilidade da tirosinase. 50
FIGURA 6.	Efeito da concentração do substrato na atividade de tirosinase semipurificada. 51
FIGURA 7.	Eletroforese em gel de poliacrilamida da tirosinase semipurificada. 52
FIGURA 8.	Efeito da concentração do substrato na atividade de tirosinase na forma de enzima imobilizada natural (cell-bound enzyme). 53
FIGURA 9.	Transformação de L-tirosina a L-DOPA. 54



## ÍNDICE DE TABELAS

	página
TABELA I.      Composição de meio de cultura.	55
TABELA II.     Efeito de inibidores de    tirosinase de <u>B.subtilis</u> .	56
TABELA III.    Microrganismos produtores de tirosi nase.	57

## SUMÁRIO

De duzentos e quarenta e nove linhagens de microrganismos isolados do solo foi encontrado quatro linhagens produtoras de tirosinase, das quais escolheu-se a linhagem que produziu maior atividade de tirosinase. Esta, foi classificada como Bacillus subtilis e verificada que produz a enzima intracelularmente.

Dentre vários meios de cultura testados, o microrganismo crescido no meio constituído de 1% de peptona, 1% de levedura e 2% de glicose, a pH 7,0, apresentou melhor rendimento na produção de tirosinase.

O estudo da produção de tirosinase por B. subtilis foi realizado no minifermentador da New Brunswick modelo M-1000, à 30°C e 1 vvm de aeração, com o meio de cultura acima descrito. No decurso da fermentação foi verificado que o valor de pH do meio de cultura cai durante a fase exponencial de crescimento, retornando ao nível ligeiramente acima do inicial no fim dessa fase. A produção da enzima foi verificada no fim da fase exponencial de crescimento, atingindo o máximo de produção à 48 horas de incubação, com uma atividade  $5,7 \times 10^{-2}$  unidades de tirosinase por mililitro de suspensão celular.

Algumas características enzimáticas da tirosinase intracelular de B.subtilis foram estudadas na forma semipurificada e na forma de enzima imobilizada natural (cell-bound enzyme). A enzima semipurificada pelo fracionamento com sulfato de amônio apresentou pH ótimo 7,0 , temperatura ótima de 25°C e estabilidade em pH na faixa de 6,0 a 7,5. A sua atividade não foi alterada na presença de ions metálicos como  $Al_2(SO_4)_3$ ,  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $BaSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$  e  $KCl$ , porém foi inibida na presença dos agentes quelantes KCN, tiouréia, dietilditiocarbamato de sódio e cisteína. A eletroforese da tirosinase semipurificada mostrou que a enzima move em direção ao catodo à pH 4,0. O estudo cinético da enzima apresentou respectivamente para os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$   $7,5 \times 10^{-4}$  M de L-tirosina e  $13,5 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de L-DOPA/min/mg de proteína. A tirosinase na forma de enzima imobilizada natural apresentou características semelhantes à tirosinase na forma semipurificada, exceto na cinética de enzima , sendo obtido os valores de  $9,0 \times 10^{-4}$  M de L-tirosina e  $7,1 \times 10^{-4}$   $\mu$ moles de L-DOPA/min/mg de massa celular, respectivamente para  $K_m$  e  $V_{max}$ .

A conversão de L-tirosina à L-DOPA pela tirosinase de B.subtilis foi realizada com suspensão de células intactas contendo  $11 \times 10^{-4}$  unidades de tirosinase por mililitro e substrato L-tirosina em três diferentes concentrações. Estes foram incubados à

30°C, pH 7,0, por 40 horas, adicionando-se periodicamente ácido ascórbico para prevenir a oxidação do produto formado. O máximo de conversão de L-tirosina para L-DOPA foi obtido quando a concentração do substrato foi de 12mM.

## SUMMARY

Two hundred forty nine strains of microorganisms were isolated from soil, and four strains were to be producers of tyrosine . One of strains, wich is classified as Bacillus subtilis , was best producer of tyrosinase, and the enzyme was produced - intracellularly.

The best culture medium for the production of tyrosine by B. subtilis was found to be: 1% peptone, 1% yeast and 2% glucose, at pH 7,0.

The study on the enzyme production by the strain was done with the culture medium, described above in a minifermentor ( New Brunswick model M-1000 ) at 30°C with aeration (one volume / volume/minute). Time course of fermentation by B.subtilis demonstrated that the pH has fallen during exponential cell growth and elevated at the end of the phase. Enzyme production has begun at end of the exponential cell growth and achieved maximum enzyme production at 48 hours of incubation with an activity of  $5,7 \times 10^{-2}$  units of tyrosinase per mililiter of cell suspension.

Characterization for both, cell bound and semipurified tyrosinase from B.subtilis were studied. The semipurified enzyme with

ammonium sulfate fractionation showed as following. Optimum pH and temperature were around 7,0 and 25°C. The enzyme was stable at pH between 6,0 and 7,5. Metal ions such as  $Al_2(SO_4)_3$ ,  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $BaSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$  and  $KCl$  not influenced on tyrosinase activity.  $KCN$ , thiourea, sodium diethildithiocarbamate and cysteine have inhibited the enzyme activity. Electro - phoretic behavior of tyrosinase showed that the enzyme moved forward cathod at pH 4,0. Kinetic study of the enzyme showed that values of both  $K_m$  and  $V_{max}$  were  $7.5 \times 10^{-4}$  M of L-tyrosine and  $13.5 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles of L-DOPA/min/mg of protein, respectively Cell bound tyrosinase exhibited similar characteristics except enzyme kinetics and values for both  $K_m$  and  $V_{max}$  were  $9.0 \times 10^{-4}$  M of L-tyrosine and  $7.1 \times 10^{-4}$   $\mu$ moles of L-DOPA/min/mg of cell suspension.

Conversion of L-tyrosine to L-DOPA by B.subtilis tyrosinase was performed by cell bound tyrosinase containing  $11 \times 10^{-4}$  units of enzyme activity per ml and substrate (L-tyrosine) of three differents concentrations, at 30°C, pH 7,0 for 40 hours, and periodically ,ascorbic acid was added to reaction mixture to prevent further oxidation of the product.The maximum conversion of L-tyrosine to L-DOPA was obtained when the substrate concentration was 12 mM.

## 1. INTRODUÇÃO

Sendo comprovada a eficiência de 3,4-dihidroxifenil-L-alanina - (L-DOPA) na terapêutica da síndrome de Parkinson, são grandes - as expectativas de se obter processos econômicos para a sua produção.

Nestes últimos 7 anos, o processo de síntese enzimática utili - zando os microrganismos vem tomando grandes dimensões, embora - estejam patenteados os processos de síntese orgânica e de extra - ção direta de L-DOPA das plantas.

A síntese enzimática de um modo geral é simples, evitando pro - cessos complicados que envolvem a síntese orgânica. A obtenção - de L-DOPA diretamente das plantas, depende da área de plantio , de número de colheitas e dos fatores ambientais, os quais são de difícil controle. No entanto, a produção de L-DOPA pelo pro - cesso enzimático é rápido, além de possibilitar a otimização - das condições de produção.

São diversas as vias de síntese enzimática e diversos os micror - ganismos que produzem as enzimas. Este trabalho propõe-se a se - lecionar microrganismos produtores de tirosinase (EC 1.10.3.1), para a síntese de L-DOPA a partir de L-tirosina, e estudar as - características enzimáticas e a cinética de produção da enzima.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

3,4-dihidroxifenil-L-alanina (L-DOPA) é um aminoácido importante que primeiro foi sintetizado e depois descoberto na natureza. Em 1911, FUNK (1) obteve este composto pelo método descrito por Erlenmeyer e Halsey para a síntese de L-tirosina. Em 1913, GUGGENHEIM isolou 3,4-dihidroxifenil-L-alanina de folhas frescas de Vicia faba (2).

Em 1914, STEPHENS e WEIZMANN (3) sintetizaram o composto pela condensação de etil ftalominomalonato com brometo de piperonil, procedimento clássico de Sorensen para obtenção de  $\alpha$ -aminoácidos.

Em 1920, MILLER (4) isolou 3,4-dihidroxifenil-L-alanina das sementes de Stizolobium sp e observou que o extrato aquoso logo se tornava colorido.

Em 1921, HIRAI (5) aplicou a síntese de Erlenmeyer modificada - por Sasaki para a preparação de 3,4-dihidroxifenil-L-alanina.

Seguiram-se diversas síntese de 3,4-dihidroxifenil-L-alanina, em 1977, ZENIN e PARK (6) isolaram das sementes de Stizolobium atherinum 5% do composto, pela extração aquosa e purificaram-no em colunas de Alumina ácida e Dowex 50-X8.



A L-DOPA é um aminoácido importante, porque atualmente é utilizado como um tratamento específico para a doença de Parkinson (7,8,9,10). Por este motivo vários pesquisadores se preocuparam em desenvolver processos econômicos para a sua produção.

Atualmente existe três métodos para a produção de L-DOPA a síntese orgânica, a extração direta do produto das plantas e a síntese bioquímica utilizando enzimas microbianas. A síntese orgânica e a extração direta do produto das plantas envolvem procedimentos complexos que encarecem a produção, por outro lado a síntese por enzimas microbianas são menos dispendiosas por serem simples e específicas, facilitando a produção de L-DOPA (11,12,13)

Com o desenvolvimento da microbiologia e bioquímica industrial, tornou-se possível a obtenção de aminoácidos a baixo custo, estimulando ainda mais a síntese enzimática de L-DOPA a partir destes. Assim sendo citaremos alguns processos de síntese enzimática.

Tirosina hidroxilase é uma enzima específica que cataliza a hidroxilação de L-tirosina a L-DOPA. Em 1964, NAGATSU et al (14) - demonstraram a presença desta enzima no cérebro, na medula da adrenal e nos tecidos de inervação simpática de alguns mamíferos, verificando que esta requer para a sua atividade derivados de tetrahydropteridina.

IKEDA et al (15) estudando a inibição de tirosina hidroxilase pu

rificada da adrenal e do cérebro pela fenilalanina, verificaram que a última pode ser hidroxilada por estas preparações produzindo L-tirosina e então DOPA. Verificaram também algumas evidências que sugere que a hidroxilação de fenilalanina é catalizada pela tirosina hidroxilase e não pela fenilalanina específica similar à enzima do fígado, sendo que a enzima apresenta maior afinidade à L-tirosina do que à fenilalanina.

ARONSON et al (16) verificaram que o extrato cru de Bacillus cereus converte para DOPA os substratos tirosina, m-tirosina e fenilalanina, apresentando maior afinidade para tirosina seguido de m-tirosina e fenilalanina. Verificaram também que a DOPA-adicionada, não foi posteriormente metabolizada, sendo portanto uma tirosina hidroxilase. Esta enzima requer para a sua atividade a presença do cofator NADH.

Tirosina fenol liase ou  $\beta$ -tirosinase é uma enzima capaz de catalizar várias reações tais como  $\alpha$ ,  $\beta$ -eliminação,  $\beta$ -substituição e racemização. Em 1969, KUMAGAI et al (17) relataram a síntese de L-DOPA a partir de L-tirosina e pirocatecol, via  $\beta$ -substituição, com a enzima obtida das células de Escherichia intermedia, cristalizada de acordo com o método descrito por YAMADA et al (18). A enzima cristalina requer piridoxal fosfato como cofator para a sua atividade.

De acordo com a literatura é muito comum encontrar microrganismos

mos que catalizam concomitantemente a hidroxilação e a deaminação de compostos aromáticos. Para evitar este problema, em 1969, SIH et al (19) introduziram grupos N-bloqueadores, N-carbobenzoxi (N-CBZ), N-formil e N-tert-butoxicarbonil (t-BOC) na L-tirosina para proteger o grupo amino, com as vantagens de que as tirosinas N-substituídas são mais solúveis e inertes à ação de racemases. Selecionaram vários microrganismos capazes de catalizar a formação de L-DOPA N-substituídas a partir de L-tirosina N-substituídas, principalmente fungos, conseguindo uma produção de 25,3% com Gliocladium deliquescens e 30% com Aspergillus ochraceus.

ENEI et al (20) demonstraram que a tirosina fenol liase de Escherichia intermedia sintetiza a L-DOPA a partir de D,L-serina e pirocatecol, via  $\beta$ -substituição.

A tirosinase é uma enzima que cataliza a hidroxilação de L-tirosina para L-DOPA e então subsequentemente para halacromo e melanina. Em 1971, HANEDA et al (21) sintetizaram L-DOPA a partir de L-tirosina com a enzima tirosinase, utilizando células intactas de Aspergillus chevalieri IFO 4086 e Aspergillus oryzae IAM 2625. Procedendo a síntese em condições acídicas obtiveram 80% de conversão de L-tirosina para L-DOPA, e em pH neutro ou alcalino verificaram que a L-tirosina é degradada para outros metabolitos e a L-DOPA não é acumulada. Em condições acídicas -

obtiveram 80% de conversão de L-tirosina para L-DOPA, com a adição de ácido ascórbico no sistema de reação aumentaram a formação de L-DOPA para 100%.

ENEI et al (22) sintetizaram L-tirosina ou L-DOPA a partir de ácido piruvico, amonia e fenol ou pirocatecol pela reação reversa de  $\alpha$ ,  $\beta$ -eliminação, com a tírosina fenol liase de Escherichia intermedia.

ENEI et al (23) verificaram a distribuição de tirosina fenol liase, encontrando várias bactérias, maioria das quais pertencentes à família Enterobacteriaceae, especialmente dos gêneros Escherichia, Proteus e Erwinia. Os autores selecionaram Erwinia herbicola ATCC 21434 e utilizaram células intactas para catalizar a síntese de L-tirosina ou L-DOPA a partir de L-serina e fenol ou pirocatecol, por apresentarem alta atividade enzimática.

YAMADA et al (24) estudaram as condições de cultura de Erwinia herbicola ATCC 21434 sendo observado os seguintes resultados. As adições de piridoxina no meio de cultura aumenta a formação de enzima sugerindo que é utilizada como precursor do cofator - piridoxal fosfato. Os aminoácidos D, L-metionina, D, L-alanina e glicina; ions ferroso; glicerol; mais ácido succinico promovem aumento na formação de enzima tão bem quanto o crescimento celular. A presença de indutor L-tirosina no meio de cultura foi es

sencial para a formação de enzima. Fenilalanina e ácido pirúvico tiveram efeito sinérgico na indução de enzima pela L-tirosina.

Depois de verificarem que muitas espécies de actinomicetos crescidos no meio peptona-extrato de carne-agar causam escurecimento de marrom a preto no meio, surgiu vários estudos sobre a reação de tirosinase nos mesmos. Em 1972, LERCH e ETTLINGER (25) isolaram tirosinase do organismo do Reino Procaryotae, Streptomyces glaucens, e comparou com aqueles dos organismos do Reino Eucaryotae. Verificaram que em contraste com os organismos do Reino Eucaryotae, cogumelo e Neurospora crassa, esta produz tirosinase simples com peso molecular bem menor em relação a eles. A tirosinase de Streptomyces também difere das tirosinases de fungos pela sua termoestabilidade, em geral os fungos são mais termoestáveis com exceção da tirosinase de Neurospora.

YOSHIDA et al (26) verificaram que após o recente sucesso de Hagi e Nakayama no ano de 1972 em desenvolver processo fermentativo para a produção industrial de L-tirosina, aumentaram os interesses em obter a preparação de L-DOPA a partir de L-tirosina. Os autores obtiveram bons resultados com Vibrio tyrosinaticus; a reação de hidroxilação de L-tirosina para L-DOPA é bastante simples, conseguindo melhorar a produção com adições intermitentes de substrato em pequenas quantidades, talvez este devesse à

baixa solubilidade do substrato e à inibição da síntese de L-DOPA em altas concentrações de substrato. A adição de antioxidante como ácido ascórbico e hidrazina melhoraram consideravelmente a formação de L-DOPA. Em condições seletivas produziu 4 mg/ml de L-DOPA a partir de 4,3 mg/ml de L-tirosina. Também utilizaram outros derivados de L-tirosina tais como N-acetil-L-tirosina amida, N-acetil-L-tirosina, L-tirosina amida, L-tirosina metil ester e L-tirosina benzil ester para a produção de derivados de L-DOPA.

HANEDA et al (27) continuando os seus estudos com gênero Aspergillus, verificaram que a atividade de tirosinase de Aspergillus oryzae N° 15042 foi suprimida na presença de glicose e o aumento no suprimento de oxigênio aumentou a atividade. Verificaram também que o tratamento ácido dos micélios aumenta o pH ótimo da reação de 3,5 para 6,0.

SINGH et al (28) sintetizaram in vitro a L-DOPA a partir de L-tirosina e N-formil-L-tirosina com suspensão celular de mutante de Pseudomonas D 101, o derivado de N-formil-L-tirosina foi o melhor substrato, aumentando a síntese total na presença de cobre, cisteína e ácido ascórbico.

A DOPA transaminase é uma enzima que cataliza a reação de transaminação entre 3,4-dihidroxifenilpiruvato (DOPP) com certos -

aminoácidos para formar 3,4-dihidroxifenil-L-alanina. Em 1973 , NAGASAKI et al (29) estudaram algumas propriedades de DOPA tran saminase usando o extrato celular de Alcaligenes faecalis IAM - 1015 como fonte de enzima e L-glutamato, L-aspartato e L-fenila lanina como doadores de grupo amino. Foi postulado a existência de três tipos de transaminase Aspartato DOPA transaminase (ADT), glutamato DOPA transaminase (GDT) e fenilalanina DOPA transami nase (PDT). O pH ótimo destas enzimas foram verificados em tor no do pH alcalino. As enzimas foram instáveis em torno de pH á cido e inativadas na temperatura acima de 60°C.

Foi obtido como continuação do trabalho anterior (30) 80% de DO PA e 90% de dimetoxifenilalanina (DMPA) usando as misturas de L-glutamato e L-aspartato como doadores de grupo amino. Quando adicionaram dimetoxifenilpiruvato (DMPP) e piridoxina HCl no meio de cultura para verificar o seu efeito na produção de DOPA transaminase, não obtiveram aumento na produção, mas detectaram DMPA por cromatografia em camada delgada e a gás, no meio fermen tado por 48 horas.

YOSHIDA et al (31) estudaram a produção de 3,4-dihidroxifenil-L-alanina pela tirosinase de Pseudomonas melanogenum ATCC 17806, verificaram que o microrganismo requer metionina, cisteína, cis tina, cistationina, homocisteína e homocistina para o crescimen to. Entretanto, a adição destes aminoácidos diminuíram conside-

ravelmente a produção de L-DOPA pela bactéria,

A produção de L-DOPA pela bactéria foi posteriormente afetada pela quantidade de substrato, o método de sua adição e a adição de antioxidantes, foi como no caso de Vibrio tyrosinaticus. Sob condições favoráveis produziu cerca de 8 mg/ml de L-DOPA a partir de 8,6 mg/ml de L-tirosina.

Continuando os estudos verificaram as propriedades de tirosinase de Pseudomonas melanogenum com o seu extrato cru (32). A temperatura e o pH ótimo foram respectivamente de 23°C e 6,8. L-tirosina, D-tirosina, m-tirosina, N-acetil-L-tirosina e L-DOPA foram utilizados como substrato pela enzima. Foram obtidos os seguintes valores de Km, L-tirosina  $6,9 \times 10^{-4}$  M, D-tirosina  $1,43 \times 10^{-3}$  M e L-DOPA  $9,9 \times 10^{-4}$  M. A enzima foi inibida pelos agentes quelantes de cobre L-cisteína, L-homocisteína, tioureia e dietil-ditiocarbamato e a inibição foi completamente revertida pela adição de excesso de cobre.

Posteriormente, conseguiram melhorar a atividade de tirosinase de 150 a 160% da cepa original pela mutação com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG). Obtiveram um mutante de 3-aminotirosina-resistente que produziu 14 a 15 mg/ml de L-DOPA a partir de 26 mg/ml de L-tirosina. Quando a concentração celular de mistura de reação foi aumentada de quatro vezes a concentração ce-



lular da cultura fermentada, a produção de L-DOPA alcançou 21 mg/ml a partir de 52 mg/ml de L-tirosina (33).

ROSAZZA et al (34) continuando os seus estudos com Aspergillus ochraceus verificaram que este deu baixa produção de DOPA quando incubado com N-formil-L-tirosina. Inversamente Gliocladium deliquescens converteu preferencialmente N-formil-L-tirosina para N-formil-L-DOPA, sendo a sua produção aumentada na presença de hidrocinaurato. Os possíveis mecanismos de aumento de produção pelo hidrocinaurato são a indução de hidroxilase aromática e a inibição de atividade acilase que foi constatado no microrganismo.

SHIBATA et al (35) selecionaram Streptomyces roseochromogenes para a capacidade de converter N-formil-L-tirosina para N-formil-L-DOPA, identificando a formação do produto por espectro de absorção de ultravioleta e infravermelho do produto deacilado e espectro de fluorescência de produto de reação com ferricianeto. Introduziu cromatografia líquida de alta pressão para a rápida-análise de N-formil-L-DOPA formado e a N-formil-L-tirosina residual.

NAGASAKI et al (36) isolaram do solo Enterobacter cloacae NB 320 microrganismo produtor de DOPA transaminase. Dos diversos substratos testados os melhores doadores de grupo amino foram L-glu

tamato, L-fenilalanina e L-aspartato, porém o L-glutamato foi o mais proveitoso para a enzima. A produção de glutamato DOPA - transaminase foi induzida pela adição de asparagina e glutamina.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Seleção de Microrganismos produtores de tirosinase

Tendo em vista a seleção de microrganismos capazes de produzir tirosinase para a conversão de L-tirosina à 3,4-dihidroxifenil-L-alanina (L-DOPA), inúmeras culturas de microrganismos foram isoladas e testadas, conforme os itens a seguir.

##### 3.1.1. Coleta de amostras do solo

Amostras de terra foram coletadas de diferentes regiões - do Estado de São Paulo e Paraná, próximos às margens dos rios ou do interior das matas cerradas, onde as condições ambientais são bastante favoráveis ao crescimento dos microrganismos. Aproximadamente 100 gramas de terra foram colhidas e acondicionadas em sacos plásticos, tendo sido tomado o cuidado de remover previamente os resíduos de animais e vegetais da superfície do solo. A amostra foi retirada de uma profundidade máxima de cinco (5) centímetros e quando várias amostras foram coletadas de uma mesma região, foi guardada uma distância mínima de um quilometro.

##### 3.1.2. Isolamento de microrganismos

Foram preparadas placas e tubos de ensaio contendo meio

agar-nutriente para o isolamento de bactérias e meio agar-batata (extrato de batata 100g, glicose 40g e agar 20g, por litro de água destilada) para o isolamento de fungos. Cerca de 1 grama de terra foi adicionada a 10 ml de água estéril, agitada e deixada em repouso por 10 minutos. As placas de agar-nutriente e agar batata foram inoculadas com o líquido sobrenadante e incubadas respectivamente a 30°C por 24 a 48 horas para o desenvolvimento de bactérias e a 30°C por 2 a 4 dias para o desenvolvimento de fungos. As colônias isoladas das placas foram repicadas em tubos de ensaio contendo os seus devidos meios e incubadas a 30°C até o desenvolvimento satisfatório das culturas e estas foram testadas quanto à produção de tirosinase.

### 3.1.3. Teste para produção de tirosinase

Para determinar a presença de tirosinase os microrganismos isolados do solo foram crescidos em meios de composição definida. As bactérias foram cultivadas no meio 1 (26) e os fungos no meio 3, cujas composições estão indicadas na tabela I.

Os meios de cultivo foram distribuídos em frascos de erlenmeyer de 250 ml, num volume de 20 ml, fechados com tampão de algodão para manter as condições assépticas e esterilizadas a 121°C por 15 minutos na autoclave da Fabbe modelo 103. Para cada fermentação foi mantido um frasco para o controle de eventuais contaminações. O pH dos meios foram ajustados para 7,0 antes da es

terilização, não ocorrendo uma alteração sensível após o mesmo.

Os frascos de erlenmeyer contendo os meios de cultura esterilizados foram inoculados com os microrganismos isolados do solo e incubados entre 27 a 30°C, à velocidade constante de 250 rpm, no agitador rotatório da New Brunswick modelo 0531. Após um período de fermentação de 48 horas para as bactérias e de 3 a 5 dias para os fungos, os meios de cultura fermentados foram testados quanto à atividade enzimática, como será citado no próximo item 3.1.4.

3.1.4. Ao meio de cultura fermentado foi adicionado 5 ml de acetato de butila, e após agitar por um período de 30 minutos à temperatura ambiente, o solvente orgânico foi retirado - por sucção com o auxílio da trompa de vácuo. O pH foi ajustado para 5,5 com HCl ou NaOH 0,1N. A 5 ml de meio assim tratado foi adicionado 5 ml de substrato contendo 25 µmoles de L-tirosina e 150 µmoles de ácido ascórbico, a pH 5,5. A cada frasco foi adicionado uma película de acetato de butila para evitar eventuais contaminações. Após 15 horas de incubação com agitação constante de 100 rpm entre 27 a 30°C, o sistema de incubação foi centrifugado e a formação de L-DOPA verificada por cromatografia de papel e método de ARNOW, como estão citados nos itens 3.1.5 e 3.1.6.

Quando a reação era positiva a massa celular da bactéria, *Streptomyces* ou fungo era separada do meio de cultura por centrifugação, lavada três vezes em água deionizada e a atividade enzimática testada em ambas, na massa celular e no sobrenadante, para verificar se a enzima é intra ou extracelular.

### 3.1.5. Cromatografia de papel

A L-DOPA foi analisada qualitativamente pelo método de cromatografia citado por YOSHIDA et al (26).

No papel de cromatografia de Whatman nº 1 foi aplicado 40µl de padrão de L-DOPA 1 mg/ml e as amostras de reações no tempo zero e 15 horas.

O papel com aplicações foi corrido por 3 horas no sentido ascendente, pelo sistema solvente n-butanol: ácido acético água na proporção de 4:1:2. Após a corrida, a cromatografia foi seca e revelada com reagente de Arnow. O papel de cromatografia foi rapidamente percorrido na mistura equivalente de HCl 0,1N com reagente molibdo-nitroso e logo em seguida na solução de NaOH 1N. O produto foi identificado pelo Rf semelhante ao padrão e pela coloração da mancha, avermelhada.

### 3.1.6. Dosagem de L-DOPA

Após a detecção de L-DOPA pela cromatografia, a formação-

do produto foi analisado quantitativamente pelo método de ARNOW (37) verificando a quantidade de produto formado na curva padrão. O método está baseado na observação de que 3,4-dihidroxifenil-L-alanina em meio ácido na presença do reagente molibdo-nitroso dá um composto de coloração amarela, o qual muda para vermelho com a adição de excesso de alcali. Esta coloração é medida espectrofotometricamente à 510 nm de comprimento de onda, no espectrofotômetro da Coleman 295.

### 3.2. Produção de tirosinase microbiana

A linhagem de microrganismo que produz maior atividade de tirosinase selecionada de acordo com o método citado no item 3.1. foi utilizado para a produção de tirosinase, como serão citados abaixo.

Também foi usado para preparação de enzimas na forma de células-intactas ou seja na forma de enzima imobilizada natural e enzima semipurificada para estudo de suas características e transformação de L-tirosina para L-DOPA, como serão citados nos itens 3.2.3 e 3.4.

#### 3.2.1. Meio de cultura para a produção de tirosinase

Após verificar que a linhagem selecionada apresentava maior produção de enzima no meio 3, este foi utilizado para a preparação de inóculo e produção de enzima. A sua preparação está cita

da no item 3.1.3.

### 3.2.2. Preparação de inóculo

Para a preparação de inóculo, 20 ml de meio 3 contido num frasco de erlenmeyer de 250 ml foi inoculado com a linhagem selecionada e incubada no agitador rotatório a 250 rpm de agitações por um período de 48 horas.

### 3.2.3. Fermentação

A fermentação foi realizada no minifermentador da NEW - BRUNSWICK, modelo M-1000. A 700 ml de meio de cultura foi adicionado 14 ml de inóculo (2% v/v) preparado de acordo com o item 3.2.2. Após 48 horas de fermentação a 30°C com aeração de 1 vvm (volume/volume/minuto), a massa celular foi separada pela centrifugação e lavada três vezes com água deionizada. Uma parte da massa celular foi ressuspendida para ser usada como fonte de enzima para estudo de suas características e transformação de L-tirosina para L-DOPA, a outra parte foi lisada para extrair e semipurificar a enzima intracelular.

3.2.4. O estudo da relação entre tempo e alteração de pH no meio de fermentação, crescimento de microrganismo e produção de enzima foram realizados de acordo com o item 3.3.1.



3.2.5. A enzima foi produzida de acordo com o item 3.2.3. porém periodicamente foi retirada uma alíquota para a medida de pH. Após o mesmo, o crescimento do microrganismo foi determinado espectrofotometricamente pela leitura da absorbância a 660 nm de comprimento de onda, após a massa celular ter sido lavada três vezes e ressuspendida adequadamente com a água deionizada.

Para determinar o aparecimento da atividade, o sistema de incubação foi constituído de 5 ml de massa celular lavada e reconstituída ao volume original com água deionizada, 2,5 ml de L-tirosina 10mM e 2,5 ml de ácido ascórbico 60mM, a pH 5,5. Esta mistura foi incubada a 30°C no agitador rotatório a 100 rpm por 30 minutos, e em seguida centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 5°C, o sobrenadante foi analisado conforme o item 3.1.6 e a atividade calculada como  $\mu$ moles de L-DOPA, por minuto, por mililitro de suspensão celular.

### 3.3. Semipurificação de tirosinase

Para a extração da enzima intracelular, 50g de pasta celular preparada de acordo com o item 3.2. foi ressuspendida a 600 ml com tampão fosfato 50mM a pH 7,0 e tratada com 20 mg de lisozima da Sigma contendo 2.500 unidades/mg. A mistura foi incubada uma noite a 37°C e centrifugada para eliminar materiais insolúveis.

O sobrenadante obtido foi tratado de acordo com os procedimentos

a serem citados nos próximos itens.

### 3.3.1. Fracionamento com sulfato de amonio

O sobrenadante foi precipitado com sulfato de amonio a 80% de saturação, decantado uma noite a 4°C e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos.

### 3.3.2. Dialise

O precipitado obtido foi dissolvido em 50 ml de água deionizada, colocado no saco de dialise contra água deionizada a 4°C por 48 horas, trocando de água periodicamente.

### 3.3.3. Liofilização

Após a dialise foi centrifugada novamente para eliminar o material insolúvel e o sobrenadante foi liofilizado no liofilizador da VIRTIS modelo nº 10 - 146 MR-BA.

### 3.4. Estudo de características enzimáticas da tirosinase semi-purificada

A enzima liofilizada foi moída e dissolvida em água deionizada e utilizada para o estudo de características enzimáticas, a concentração proteica da solução enzimática foi determinada pelo método de LOWRY et al (38).

#### 3.4.1. Efeito de pH na atividade enzimática

Para a determinação do efeito de pH na atividade enzimática o sistema de incubação foi constituído de 2ml de solução enzimática contendo 650 µg/ml de proteína, 1 ml de L-tirosina 10mM , 0,5 ml de ácido ascórbico 120mM e 0,5 ml de tampão citrato de pH 3,0 a 6,0 ou de tampão fosfato de pH 6,0 a 8,0 na concentração de 400mM. O pH do ácido ascórbico foi ajustado conforme o pH da reação efetuada. As misturas foram incubadas a 30°C por 30 minutos no banho maria da FANEM modelo 112. Após a incubação a formação de L-DOPA foi determinada pelo método de ARNOW citado no item 3.1.6.

#### 3.4.2. Efeito de pH na estabilidade da enzima

Para a determinação de efeito de pH na estabilidade enzimática, foi preparada de acordo com o item 3.4 uma solução enzimática contendo 2 mg/ml de proteína, 1 ml desta foi pré-incubada durante 16 horas a 30°C com 1 ml de tampão 0,1 M, utilizando tampão citrato de pH 3,0 a 6,0 e tampão fosfato de pH 6,0 a 8,0. Após o mesmo a solução enzimática foi diluída quatro vezes com água deionizada e submetida ao ensaio de atividade enzimática citado no item 3.6. A atividade residual foi expressa em termos de percentagem da atividade da reação controle, realizada com a enzima pré-incubada sem a presença do tampão.

### 3.4.3. Efeito de temperatura na atividade enzimática

Para a determinação do efeito de temperatura na atividade enzimática o sistema de incubação foi constituído de 2 ml de solução enzimática contendo 650 µg/ml de proteína, 1 ml de L-tirosina 10mM, 0,5 ml de tampão fosfato 400mM a pH 7,0 e 0,5 ml de ácido ascórbico 120mM a pH 7,0. A mistura foi incubada às diferentes temperaturas entre 10 a 60°C no banho maria por 30 minutos, e a formação de L-DOPA foi determinada pelo método de ARNOW.

### 3.4.4. Termoestabilidade da enzima

Para a determinação da termoestabilidade da enzima foram preparados vários tubos contendo 3 ml de solução enzimática com 650 µg/ml de proteína, os quais foram cobertos com uma película de acetato de butila e incubados às diferentes temperaturas entre 25 a 50°C. Periodicamente foram retirados um tubo de cada temperatura e a atividade residual de tirosinase medida de acordo com o item 3.6 e expressa em termos de percentagem da atividade inicial.

### 3.4.5. Efeito de sais minerais na atividade enzimática

Para a determinação do efeito de sais minerais na atividade enzimática, o sistema de incubação foi constituído de 2 ml de solução enzimática contendo 650 µg/ml de proteína, 1 ml de -

L-tirosina 10mM, 0,5 ml de tampão fosfato 400mM a pH 7,0 e 0,5 ml de ácido ascórbico 120mM a pH 7,0 contendo um dos seguintes sais  $Al_2(SO_4)_3$ ,  $CuSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $BaSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$  ou KCL na concentração de  $8 \times 10^{-3}M$ . O ensaio de atividade foi realizado de acordo com o item 3.7., e os resultados calculados em termos de percentagem da atividade de reação controle, sem a presença de sais.

#### 3.4.6. Efeito de inibidores na atividade enzimática

Para a determinação do efeito de inibidores na atividade enzimática, o sistema de incubação foi constituído de 2 ml de solução enzimática contendo 650  $\mu g/ml$  de proteína, 1 ml de L-tirosina 10mM, 0,5 ml de tampão fosfato 400mM a pH 7,0 e 0,5 ml de ácido ascórbico 120mM a pH 7,0 contendo um dos seguintes componentes KCN, dietilditiocarbamato de sódio, cisteína ou tiouréia na concentração de  $8 \times 10^{-3}M$  e  $8 \times 10^{-4}M$ . A determinação da atividade foi realizada de acordo com o item 3.6, sendo a atividade expressa em termos de percentagem da atividade da reação de controle sem a presença de inibidores.

#### 3.4.7. Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática

Para a determinação do efeito de concentração do substrato na reação enzimática, o sistema de incubação foi constituído de 2 ml de solução enzimática contendo 650  $\mu g/ml$  de proteína, 1

ml de L-tirosina com a concentração variável entre 0,4 a 16mM , 0,5 ml de tampão citrato 400mM a pH 5,5 e 0,5 ml de ácido ascórbico 120mM a pH 5,5. As misturas foram incubadas durante 30 minutos no banho maria a 30°C e a formação de L-DOPA determinada pelo método de ARNOW. A constante de Michaelis-Menten (Km) e a velocidade máxima (V<sub>máx</sub>) foram determinadas segundo o sistema gráfico de Lineweaver-Burk (39).

#### 3.4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A solução de tirosina semipurificada contendo 650 µg/ml de proteína preparada de acordo com o item 3.4. foi utilizada para a gel eletroforese.

A gel eletroforese foi desenvolvida modificando-se o método de DAVIS (40). O aparelho utilizado para a eletroforese consiste de uma fonte estabilizadora da FANEM modelo 1050; duas cubas de acrílico de 14x14 cm de base por 7 cm de altura cada qual com um eletrodo na posição central, a cuba superior apresenta oito perfurações ao redor do eletrodo para o encaixe de tubos para gel; rolhas de borracha; suporte para cubas e tubos para gel 0,5x8 cm.

O gel foi preparado com 5 g de Cyanogum (95% de poliacrilamida e 5% de N,N,N' - metilene bisacrilamida), 50 mg de persulfato de amonio e 20 µlitros de N,N',N'-tetrametilenediamina em 50 ml

de tampão 0,05M. A eletroforese foi efetuada a pH 3,0 e 4,0 em tampão glicina/ácido acético, a pH 5,0 e 6,0 em tampão citrato e a pH 7,0 e 8,0 em tampão fosfato preparados de acordo com GOMORI (41).

Foi aplicado 20  $\mu$ litros de preparação enzimática no topo do gel, misturando 50  $\mu$ litros de solução de sacarose 40% e 10  $\mu$ litros de azul de bromofenol 0,1%. A eletroforese foi desenvolvida pela aplicação de uma corrente de 5 mA por gel à temperatura ambiente por uma hora e meia. Após a corrida os geis foram removidos dos tubos colocados em 20 ml de soluções de substratos mono e o-difenois, em tampão fosfato pH 7,0, contendo 0,05% de p-fenilenediamina, por 30 minutos. Foram testados seguintes substratos L-tirosina 5mM, catecol 10mM, L-DOPA 5mM, ácido cafeico 10mM, pirogalol 5mM e d-catequina 5mM.

### 3.5. Enzima imobilizada natural

Foram realizados estudos sobre as características enzimáticas da tirosinase e transformação de L-tirosina para L-DOPA com a enzima na forma de células intactas ou seja na forma de enzima imobilizada natural (cell-bound enzyme), de acordo com os itens 3.5.1 e 3.5.2.

#### 3.5.1. Estudo de características da enzima imobilizada natural

Os estudos de características da enzima imobilizada natu

ral foi feito com o mesmo sistema de incubação utilizado para a enzima semipurificada substituindo-a pela suspensão de massa celular com  $28 \times 10^{-3}$  unidades de tirosinase por ml contendo 39 mg de massa celular. A reação foi realizada no incubador com gradiente de temperatura de Scientific Ind. N.Y. 11.501, com 20 agitações angulares por minuto. Com a enzima imobilizada natural foi feito estudos sobre efeito de pH na atividade enzimática, efeito de pH na estabilidade enzimática, efeito de temperatura na atividade enzimática, termoestabilidade, efeito de sais minerais na atividade enzimática, efeito de inibidores na atividade enzimática e efeito de concentração de substrato na atividade enzimática.

### 3.5.2. Transformação de L-tirosina para L-DOPA

A massa celular produzida de acordo com o item 3.2.3 foi lavada três vezes com água deionizada e ressuspendida em tampão-fosfato 0,1M a pH 7,0, ajustando a atividade para  $11 \times 10^{-4}$  unidades/ml e utilizada para a conversão de L-tirosina para L-DOPA.

A reação foi realizada em três concentrações diferentes de substratos, cada reação foi constituída de 50 ml de suspensão celular acima preparado e 50 ml de substrato contendo 50  $\mu$ moles, 90  $\mu$ moles ou 1200  $\mu$ moles de L-tirosina e 1500  $\mu$ moles de ácido ascórbico a pH 7,0. A mistura foi incubada no agitador rotatório a



30°C e 100 rpm de agitação, de 5 em 5 horas foi adicionado 1500 µmoles de ácido ascórbico para preservar a L-DOPA formada.

Periodicamente foi retirada amostras para a análise da formação do produto L-DOPA, como no item 3.1.6.

Ainda, as células intactas foram tratadas três minutos com o sistema solvente cloroformio:metanol:água (42) na proporção de 2:1:0,8 lavada três vezes com metanol 21% para retirar o solvente, ressuspensa no volume original com água deionizada e utilizadas como fonte de enzima imobilizada.

### 3.6. Atividade de tirosinase

A atividade de tirosinase semipurificada foi determinada incubando-se 2 ml de solução enzimática (3.4), 1 ml de L-tirosina 10mM, 0,5 ml de tampão fosfato 400mM a pH 7,0 e 0,5 ml de ácido ascórbico 120mM ajustado a pH 7,0. A reação foi incubada por 30 minutos no banho maria a 30°C e a formação de L-DOPA determinada pelo método de ARNOW citado no item 3.1.6.

Uma unidade de enzima semipurificada foi definida como 1 µmol de L-DOPA formada no sistema de incubação por minuto, por mg de proteína.

A atividade de tirosinase na forma de enzima imobilizada natural (cell-bound enzyme) foi determinada substituindo-se no sis-

tema anterior a enzima semipurificada pela enzima imobilizada - natural. A reação foi incubada a 30°C por 30 minutos no incubador com gradiente de temperatura, a 20 agitações angulares por minuto.

Uma unidade de enzima imobilizada natural foi definida como 1  $\mu\text{mol}$  de L-DOPA formada no sistema de incubação, por minuto, por mg de massa celular.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Seleção de microrganismos produtores de tirosinase

Após selecionar 249 linhagens de microrganismos conforme o item 3.1, foi encontrada 4 culturas de bactérias positivas - ao teste, dentre as quais escolheu-se a linhagem que produz maior atividade. Esta linhagem produz tirosinase intracelularmente e foi identificada pelo Professor Dr. J.Wolf da Universidade de Leeds como Bacillus subtilis.

Com o microrganismo em estudo foi produzido enzima na forma semi purificada e na forma de células intactas (enzima imobilizada - natural), as quais foram utilizadas para os estudos de características enzimáticas e transformação de L-tirosina para L-DOPA.

### 4.2. Produção de tirosinase microbiana

A tirosinase de B.subtilis foi produzida de acordo com as condições citadas no item 3.2.3 utilizando o meio 3. Depois de testar vários meios de cultura, o meio 3 foi escolhido por apresentar maior rendimento de enzima (3.1.3).

Durante o crescimento do microrganismo foram pesquisadas conforme o item 3.2.5, a produção de massa celular, a alteração do pH e a produção de enzima cujos resultados estão apresentados na -

## Figura 1.

A medida de crescimento do microrganismo pela leitura da absorção a 660 nm frente ao tempo de cultivo tem proporcionado uma curva típica de crescimento de organismos unicelulares com quatro (4) fases. A fase de aceleração de 0 a 8 horas, a fase logarítmica ou exponencial de 8 a 28 horas, a fase de retardamento de 28 a 40 horas e a fase estacionária de 40 a 79 horas.

O meio de cultura sofreu uma queda de pH entre 10 a 40 horas retornando ao normal após este período.

A produção de tirosinase começou na fase de retardamento e alcançou o máximo, a 48 horas de incubação, depois de terem atingido a fase estacionária, mantendo-a relativamente constante até 79 horas.

### 4.3. Estudo de características enzimáticas da tirosinase semipurificada

A enzima semipurificada utilizada para o estudo das características enzimáticas (item 3.3) contém  $17 \times 10^{-3}$  unidades por miligrama de proteína.

#### 4.3.1. Efeito de pH na atividade enzimática

O efeito de pH na hidroxilação de L-tirosina para L-DOPA pela enzima semipurificada foi determinado de acordo com o item

3.4.1. A Figura 2 mostra que a enzima em estudo apresenta maior atividade a pH 7,0, sofrendo uma queda de atividade quando a reação é efetuada na faixa ácida ou alcalina.

#### 4.3.2. Efeito de pH na estabilidade da enzima

O estudo referente à influência de pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 3.4.2. A Figura 3 ilustra a estabilidade enzimática, a enzima em estudo foi estável entre pH 6,0 e 7,5, mostrando uma perda de atividade quando a reação é efetuada nos valores de pH acima ou abaixo desta faixa.

#### 4.3.3. Efeito de temperatura na atividade enzimática

O efeito de temperatura na atividade da tirosinase foi determinada conforme o item 3.4.3. A Figura 4 apresenta os resultados, mostrando que a enzima em estudo apresenta maior atividade a 25°C.

#### 4.3.4. Termoestabilidade da enzima

O estudo referente à influência de temperatura na atividade enzimática, foi realizada de acordo com o item 3.4.4. A Figura 5 ilustra a resistência térmica, a enzima foi estável a 25°C, ocorrendo perda crescente de atividade na ordem crescente de temperatura 30°, 35°, 40°, 45° e 50°C.

#### 4.3.5. Efeito de sais minerais na atividade enzimática

O efeito de sais minerais na atividade de tirosinase foi verificado de acordo com o item 3.4.5. Os sais minerais na concentração de  $10^{-3}$ M não apresentaram nenhuma influência na atividade de tirosinase.

#### 4.3.6. Efeito de inibidores na atividade enzimática

O efeito de inibidores na atividade de tirosinase foi verificado de acordo com o item 3.4.6. A Tabela 2 apresenta os resultados, todos os inibidores testados apresentaram poder de inibição sobre a tirosinase.

#### 4.3.7. Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática

O efeito da concentração do substrato na atividade enzimática, determinado conforme o item 3.4.7, está demonstrado na Figura 6 nos gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk. A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) foi determinada conforme o sistema gráfico de Lineweaver-Burk - obtendo-se o valor de  $7,5 \times 10^{-4}$ M para o  $K_m$  aparente e o valor de  $13,5 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de L-DOPA por minuto, por mg de proteína para a  $V_{max}$ .

#### 4.3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese da tirosinase de B. subtilis semipurificada-

da foi realizada a diferentes valores de pH conforme indica o item 3.4.8. Como apresenta a Figura 7, a eletroforese desenvolvida a pH 4,0 na presença de substratos o-difenóis catecol, L-DOPA, ácido cafeico, pirogalol com exceção de d-catequina, revelou uma banda única que deslocou em direção ao catodo. Em presença do substrato monofenol L-tirosina foi observado a formação de uma banda leve avermelhada, com a mesma mobilidade da banda revelada pelos substratos o-difenóis, após várias horas de revelação.

#### 4.4. Estudo de características enzimáticas da tirosinase na forma de enzima imobilizada natural (Cell-bound enzyme)

Amostra de células intactas obtidas de acordo com o item 3.2.3 foram utilizadas para a caracterização de tirosinase na forma de enzima imobilizada natural, conforme cita o item 3.5.1. Foram realizados estudos sobre efeito de pH na atividade enzimática, efeito de pH na estabilidade enzimática, efeito de temperatura na atividade enzimática, termoestabilidade, efeito de sais minerais na atividade enzimática, efeito de inibidores na atividade enzimática e efeito da concentração do substrato na atividade enzimática. Os seus resultados revelaram um comportamento idêntico à enzima semipurificada, diferenciando apenas no comportamento cinético, o  $K_m$  aparente foi de  $90 \times 10^{-4}$  M e a  $V_{m\acute{a}x}$  de  $7.1 \times 10^{-4}$   $\mu$ moles de L-DOPA/min/mg de massa celular, os quais estão apresentados na Figura 8.

#### 4.5 Transformação de L-tirosina à L-DOPA

Este estudo foi realizado de acordo com o item 3.5.2, cujos resultados estão apresentados na Figura 9. Ao fim de 40 horas de incubação foi obtido 1,3 mg/ml de L-DOPA a partir de 2,17 mg/ml de L-tirosina, 0,09 mg/ml de L-DOPA a partir de 0,16 mg/ml de L-tirosina e 0,044mg/ml de L-DOPA a partir de 0,09 mg/ml de L-tirosina.

Quando a massa celular foi tratada três minutos com o solvente - cloroformio:metanol:água apresentaram um aumento de 2,75 vezes - no rendimento da produção de L-DOPA.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção de Microrganismo

Após o selecionamento (item 3.1) foi encontrado Bacillus Subtilis como melhor produtor de tirosinase. A Tabela III apresenta alguns dos microrganismos produtores de tirosinase descobertos por outros autores, tendo sido encontrado tanto microrganismos do Reino Procaryotae como do Reino Eucaryotae. Pode-se observar na Tabela III, que apesar da tirosinase ser conhecida há muito tempo (45, 46, 47) o seu estudo com o intuito de produzir L.DOPA é bastante recente e não se tem encontrado estudos feitos sobre a produção de L.DOPA com tirosinase de Bacillus subtilis tanto nas literaturas antigas como nas mais recentes.

### 5.2 Produção de Enzima

De acordo com o item 3.1 o meio de cultura líquido sofre uma queda de pH entre 10 e 40 horas. O pH decresce rapidamente durante a fase exponencial de crescimento alcançando o mínimo - no início da fase de retardamento, nesta fase o pH aumenta rapidamente até a um nível ligeiramente acima do que o pH inicial do meio, entrando então a fase estacionária. A queda de pH durante a fase exponencial se deve à fermentação de glicose pelos

microrganismos que a utilizam para o seu crescimento. Os ácidos, produtos da fermentação de glicose, são totalmente metabolizados durante a fase de retardamento em que ocorre a esporulação, sendo responsáveis pelo retorno do pH ao valor inicial, após este período (48).

O aparecimento da atividade tirosinase ocorre na fase de retardamento, coincidindo com o início da esporulação e atinge o máximo no começo da fase estacionária. Pelo estudo realizado por Nakada e Magasanik (49) a respeito do efeito metabólico de glicose, podemos dizer que a enzima intracelular não foi produzida durante a fase exponencial de crescimento devido à inibição de sistemas enzimáticos provocada pelo abaixamento de pH do meio pelos metabolitos da glicose.

A indução de uma nova enzima ou sistema enzimático durante o estado de transição entre a fase vegetativa e esporulação tem sido postulado por Nakata e Halvorson (50) devido à rápida utilização de acetatos, produtos de metabolização de glicose, que ocorre nesta fase. Anteriormente, Halvorson (51), Halvorson e Church (52), e Doi, Halvorson e Church (53) haviam detectado atividades de um número de enzimas no extrato de organismos esporulados, que oxidam glicose a piruvato via gluconato e 2-ceto gluconato.

De acordo com a Figura 1 podemos verificar que a atividade enzi

mática aparece justamente no estado de transição entre a fase vegetativa e esporulação, entre 24 e 40 horas, porém a atividade atinge o máximo 8 horas após o estado de transição.

Podemos sugerir que esta defasagem ocorre devido à fermentação não ser realizada com células sincronizadas, assim sendo à 48 horas de fermentação apesar de 100% das células estarem na forma esporulada nem todos os esporos apresentam o mesmo estágio da maturação.

### 5.3 Semipurificação

As enzimas intracelulares em geral são em pequenas quantidades, o que dificulta a sua purificação completa, por isso são poucos os trabalhos sobre a sua purificação completa. O extrato cru fracionado com sulfato de amônio e dializado em água deionizada aumentou 4,7 vezes de atividade, esta foi utilizada para o estudo de características enzimáticas. Comumente outros autores também tem realizado estudo de características enzimáticas com enzimas semipurificadas.

### 5.4 Efeito de pH na Atividade Enzimática

O valor de pH ótimo 7.0 apresentado no item 4.3.1 para a tirosinase de Bacillus subtilis, está próximo aos valores apresentados pelos organismos do Reino Procaryotae Pseudomonas me-

lanogenum (32), Streptomyces glaucens (25) e Pseudomonas mu - tante D 101 (28). A tirosinase produzida pelos organismos do Reino Eucaryotae apresentam pH ótimo na faixa ácida (21, 27 , 44).

#### 5.5 Efeito de pH na Estabilidade Enzimática

O comportamento da tirosinase semipurificada frente a diferentes valores de pH (item 4.3.2) foi semelhante ao organismo do Reino Procaryotae Streptomyces glaucens estudada por Lerch e Ettlínger (25), ambas apresentaram faixa de estabilidade relativamente curta entre pH 6,0 e 7,5.

#### 5.6 Efeito de Temperatura na Atividade Enzimática e Termoes - tabilidade da Enzima

O valor de temperatura ótima 25°C apresentado pela tirosi nase de Bacillus subtilis (item 4.3.3) foi próximo ao valor en - contrado por Yoshida et al ( 32) para o organismo do Reino Pro - caryotae Pseudomonas melanagenum, de 23°C. A tirosinase produzi da pelos organismos do Reino Eucaryotae tem a temperatura ótima situada entre 30° a 50°C (27,44).

De acordo com a Figura 4 podemos observar que a enzima é termo - lábil, às 5 horas de incubação, a 50°C a enzima perde 97% da sua atividade.

### 5.7 Efeito de Sais Minerais na Atividade Enzimática

Como cita o item 4.3.4. a tirosinase de Bacillus subtilis na forma semipurificada não apresentou nenhuma alteração no seu comportamento na presença de sais minerais testados. Singh et al (38), obtiveram 28,6% de aumento na síntese de L-DOPA a partir de L.tirosina com um mutante de Pseudomonas quando adicionaram  $\text{CuSO}_4$  no meio de reação. Talvez este aumento não devesse tanto ao efeito do ion  $\text{Cu}^{2+}$  na atividade de tirosinase, mas ao forte efeito de inibição que tem o  $\text{Cu}^{2+}$  sobre a dopa decarboxilase que está presente nesse microrganismo.

### 5.8 Efeito de Inibidores na Atividade Enzimática

A tirosinase semipurificada de Bacillus subtilis comportou-se como a tirosinase microbiana de outras fontes (32,44), na presença de agentes quelantes a sua atividade foi inibida (item 4.3.5).

### 5.9 Efeito da Concentração do Substrato na Atividade Enzimática

O valor de  $K_m$  aparente  $7.5 \times 10^{-4} \text{M}$  apresentado pela enzima em estudo (item 4.3.6) foi próximo ao valor apresentado por Yoshida et al (32) para a tirosinase de Pseudomonas melanogenum  $6.9 \times 10^{-4} \text{M}$ .

### 5.10 Eletroforese

A eletroforese da tirosinase semipurificada foi desenvolvida a vários valores de pH, sendo obtido resultado somente à pH 4.0, esta apresentou na revelação com os substratos o-difenóis uma banda que deslocou em direção ao catodo. Lerch e Ettliger - (25) desenvolveram a eletroforese da tirosinase de Streptomyces-glauscens a pH alcalino e obtiveram uma banda que deslocou em direção ao anodo. Ambas apresentaram uma única forma de enzima porém o comportamento molecular foi diferente.

Após várias horas de revelação, com o substrato monofenol L-tirosina, a eletroforese da tirosinase em estudo apresentou uma banda leve avermelhada com a mesma mobilidade da banda revelada com os substratos o-difenóis. Esta revelação requereu maior tempo provavelmente devido à etapa de conversão de monofenol para o-difenol ou seja da hidroxilação de L-tirosina à L-DOPA. O composto avermelhado conhecido como halocromo é o produto de oxidação da L-DOPA, intermediário da formação de melanina, citada pelo Mason (54). De acordo com a literatura a tirosinase produzida pelos organismos do Reino Eucaryotae apresentam múltiplas formas (55,56).

### 5.11 Estudo de Características Enzimáticas da Tirosinase na Forma de Enzima Imobilizada Natural

De acordo com o item 3.5.1 os resultados do estudo de características enzimáticas da tirosinase na forma de enzima imobi

lizada natural foram semelhantes aos da enzima semipurificada diferindo apenas nos valores de  $K_m$  e  $V_{max}$ . O valor de  $K_m$  para a enzima na forma solúvel foi menor que na forma de enzima imobilizada natural, indicando maior afinidade ao substrato.

Esta diferença provavelmente se deve ao problema de difusão, quando a enzima está na forma celular intacta é necessário que o substrato penetre na célula, que a enzima o transforme para produto e então saia para fóra da célula; enquanto que na forma semipurificada ou seja solúvel o contacto enzima e substrato é direto aumentando a sua afinidade para com o substrato.

#### 5.12 Transformação de L-tirosina para L-DOPA

De acordo com a Figura 8, nas concentrações de L-tirosina 0.5mM e 0.9mM, inferior e igual ao valor de  $K_m$ , a conversão atinge o máximo às 16:30 horas de reação. Na concentração de L-tirosina 12mM, superior ao valor de  $K_m$ , a conversão foi linear e crescente até 40 horas, tomando-se constante após este período. Ao final de 40 horas de incubação as proporções de conversão foram de 55,53 e 44% respectivamente para as concentrações de L-tirosina 12mM, 0.9mM e 0.5mM.

Ainda pelo comportamento da curva apresentada na Figura 8, podemos sugerir que o microrganismo em estudo não apresenta as enzimas descarboxilase (28) ou deaminase (19) muito comum nos microror

ganismos, os quais provocariam uma queda na síntese L-DOPA devido à metabolização do substrato e do produto formado.

O aumento de atividade enzimática verificado na massa celular - tratada com o sistema solvente cloroformio: metanol: água, sugere que estes removem os lipídeos da membrana lipoproteica da bactéria e aumentam a porosidade da membrana, o que consequentemente facilita a entrada e saída dos componentes da reação, promovendo um aumento na atividade enzimática.



## 6. CONCLUSÕES

- 6.1 Das 249 linhagens de microrganismos isolados do solo, 4 mostraram-se capazes de converter L-tirosina à L-DOPA , sendo escolhido Bacillus subtilis por apresentar melhor capacidade de conversão.
- 6.2 O microrganismo B.subtilis isolado do solo apresenta tirosinase intracelular. Esta é induzida durante o estado de transição entre a fase vegetativa e esporulação, atinge o máximo de produção no início da fase estacionária - com  $5.7 \times 10^{-2}$  unidades de tirosinase por mililitro de suspensão celular.
- 6.3 A tirosinase de B.subtilis na forma semipurificada ( solúvel ) e na forma de células intactas (imobilizada) apresentam características enzimáticas semelhantes, exceto no comportamento cinético.
- 6.3.1 Apresentam pH ótimo 7.0 e temperatura ótima 25°C.
- 6.3.2 São estáveis entre pH 6.0 e 7.5 e termolábeis.

- 6.3.3. As suas atividades não sofrem influências na presença dos sais  $Al_2(SO_4)_3$ ,  $CuSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $BaSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$  ou  $KCl$ .
- 6.3.4 As suas atividades são inibidas na presença dos agentes-quelantes  $KCN$ , dietilditiocarbamato de sódio, cisteína ou tiouréia.
- 6.3.5 A afinidade da tirosinase à L-tirosina na forma semipurificada é maior que na forma de células intactas, as constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) foram respectivamente de  $7.5 \times 10^{-4}M$  e  $9.0 \times 10^{-4}M$  e as velocidades máximas ( $V_{max}$ ) de  $13.5 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de L-DOPA/min/mg de proteína e  $7.1 \times 10^{-4}$   $\mu$ moles de L-DOPA/min/mg de massa celular.
- 6.4 A tirosinase de B.subtilis apresenta uma forma simples. A gel eletroforese em poliacrilamida realizada à pH 4,0, com a tirosinase semipurificada, quando revelada com substrato mono e o-difenóis apresenta apenas uma banda que se desloca em direção ao catodo.
- 6.5. A tirosinase em estudo apresenta afinidade para os substratos o-difenóis catecol, L-DOPA, ácido cafeico e pirogalol, a revelação da gel eletroforese em poliacrilamida da tirosinase semipurificada foi positiva a estes compostos.

6.6 A conversão de L-tirosina para L-DOPA com células intactas de B.subtilis é da ordem de 55%, 53% e 44% respectivamente para as concentrações de L-tirosina 12mM, 0.9mM e 0.5 mM.

FIGURA 1. PRODUÇÃO DE TIROSINASE POR B. SUBTILIS.

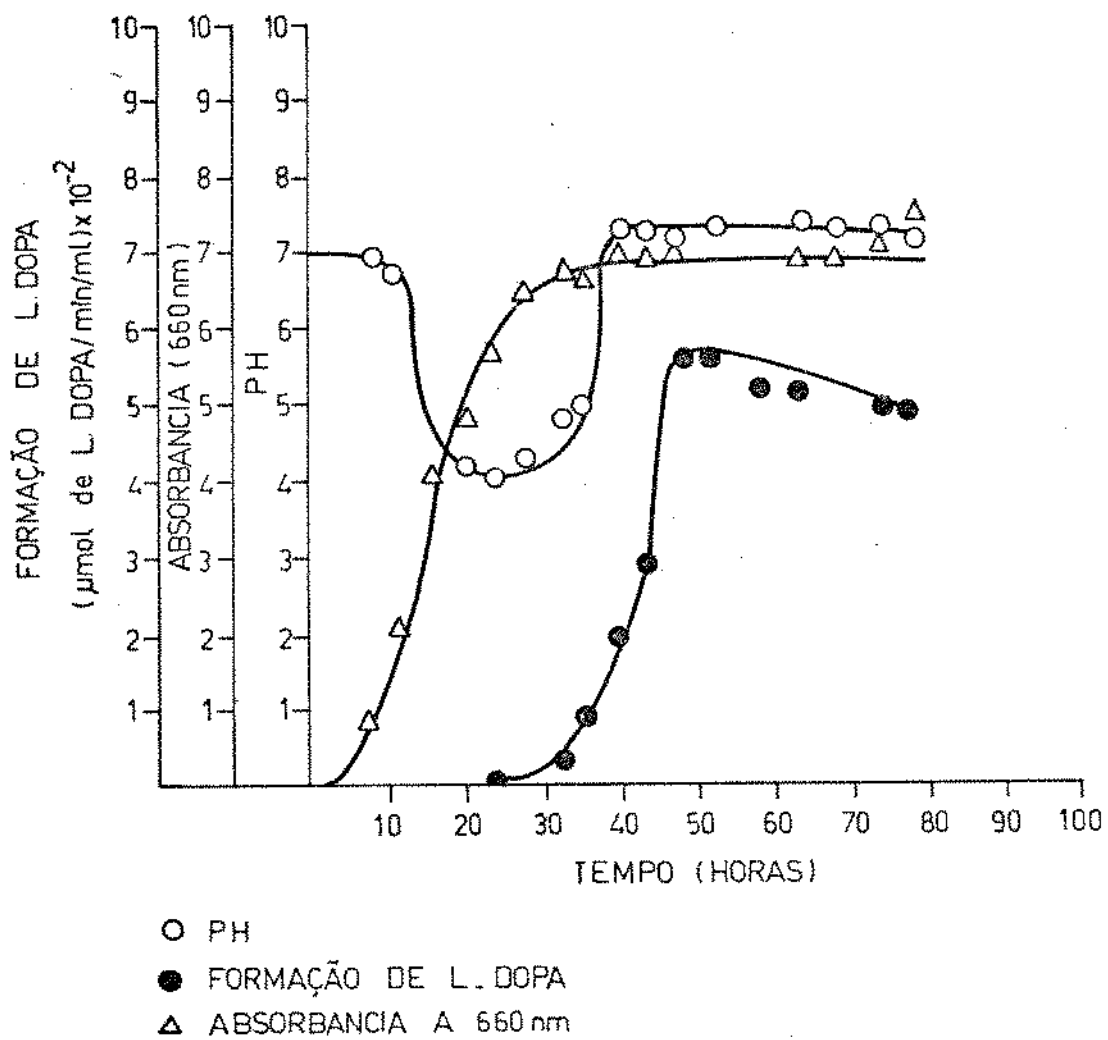


FIGURA 2. EFEITO DE pH NA TRANSFORMAÇÃO DE L-TIROSINA PARA L-DOPA.

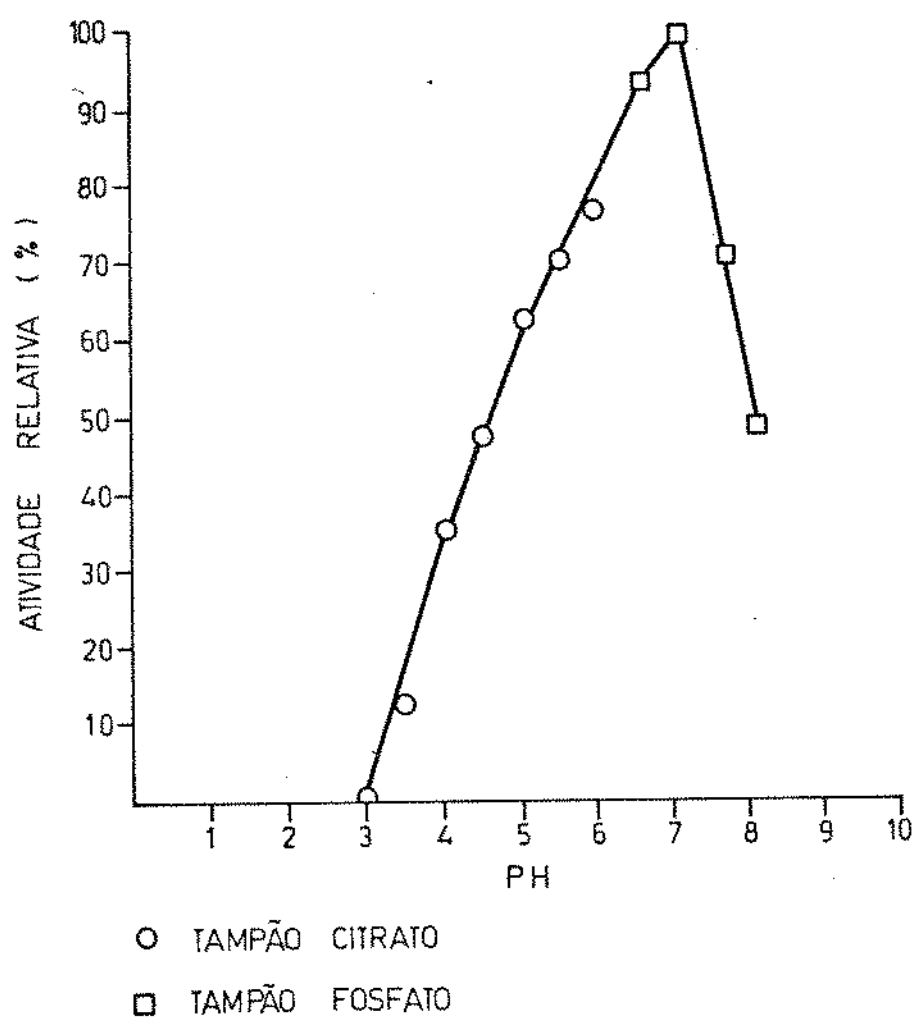


FIGURA 3. EFEITO DE pH NA ESTABILIDADE DA TIROSINASE.

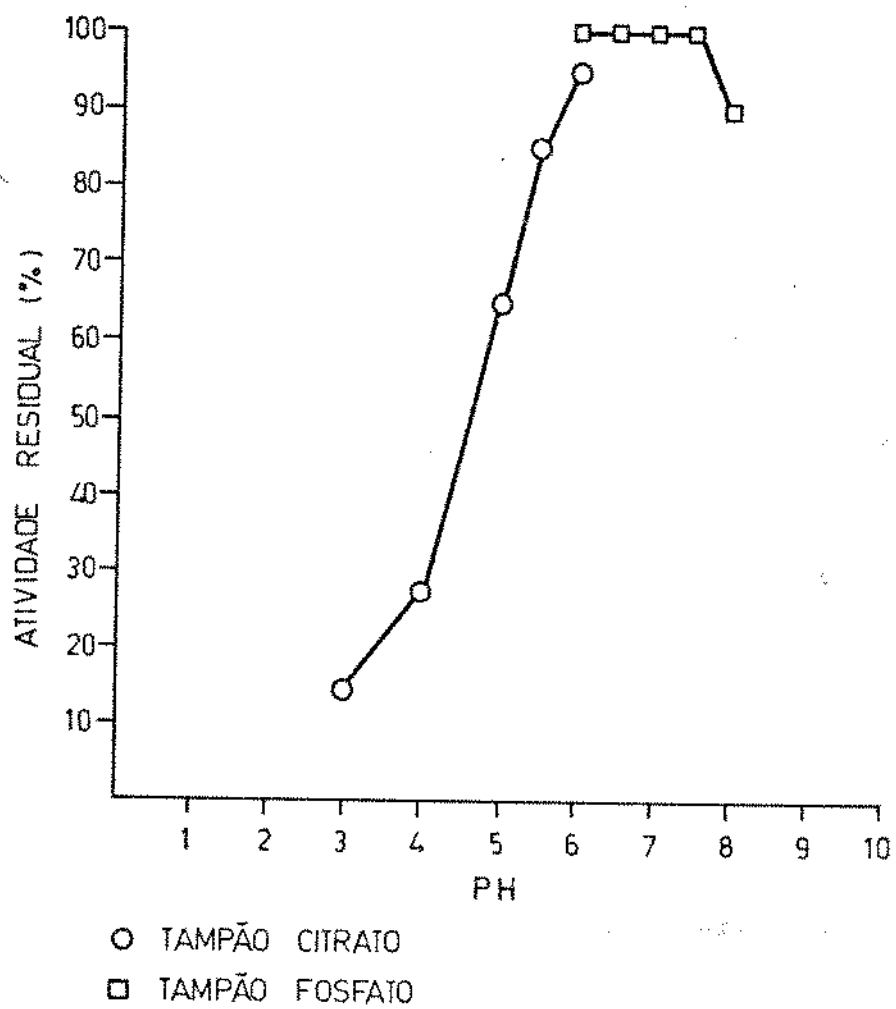


FIGURA 4. EFEITO DE TEMPERATURA NA TRANSFORMAÇÃO DE L-TIROSINA PARA L-DOPA.

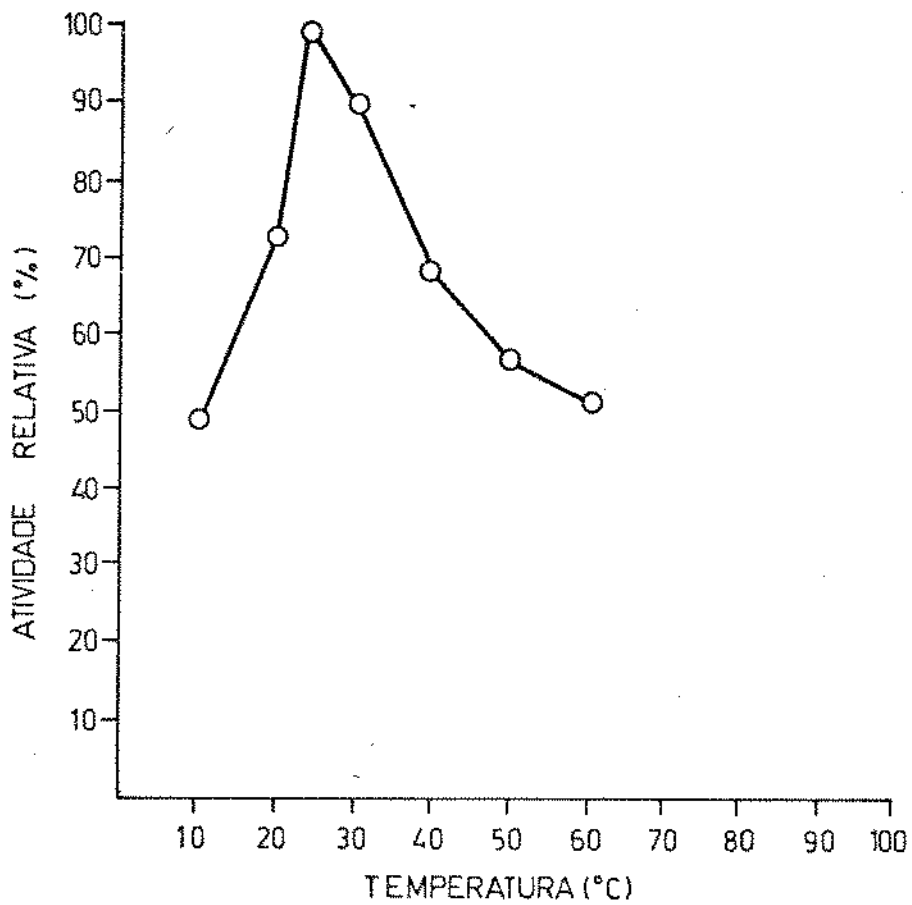


FIGURA 5. TERMOESTABILIDADE DA TIROSINASE.

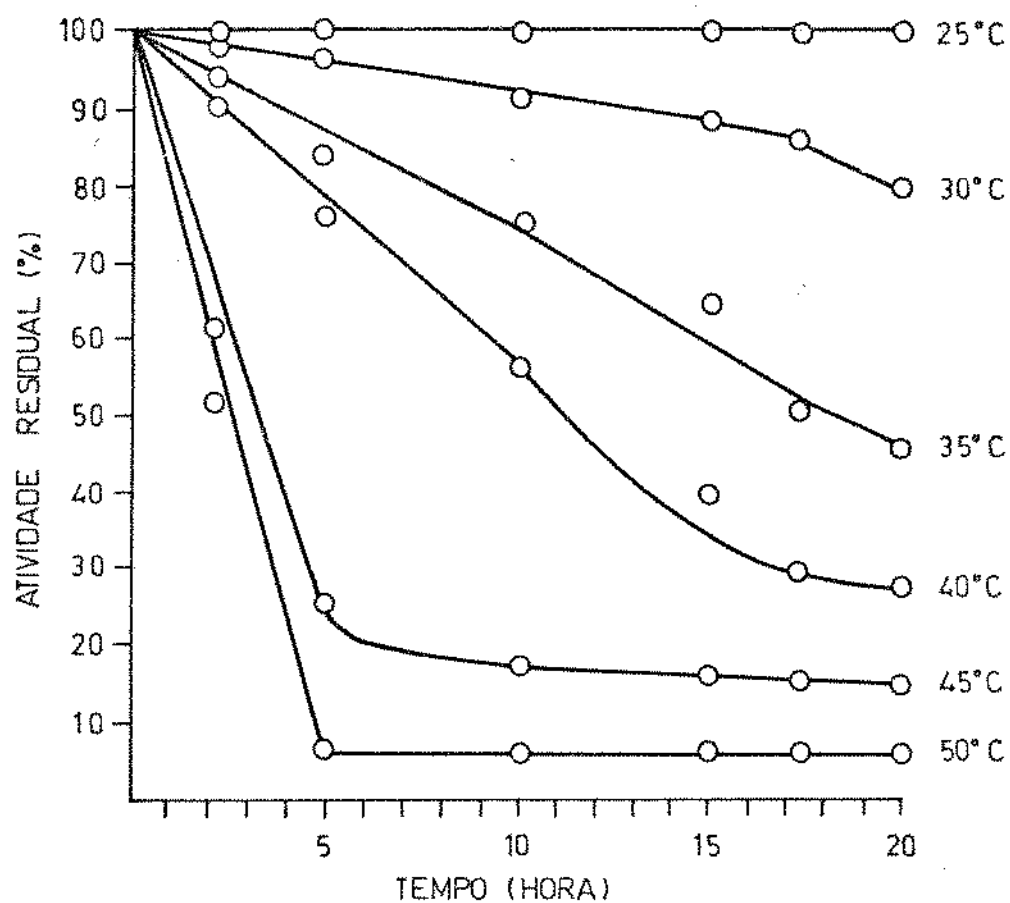
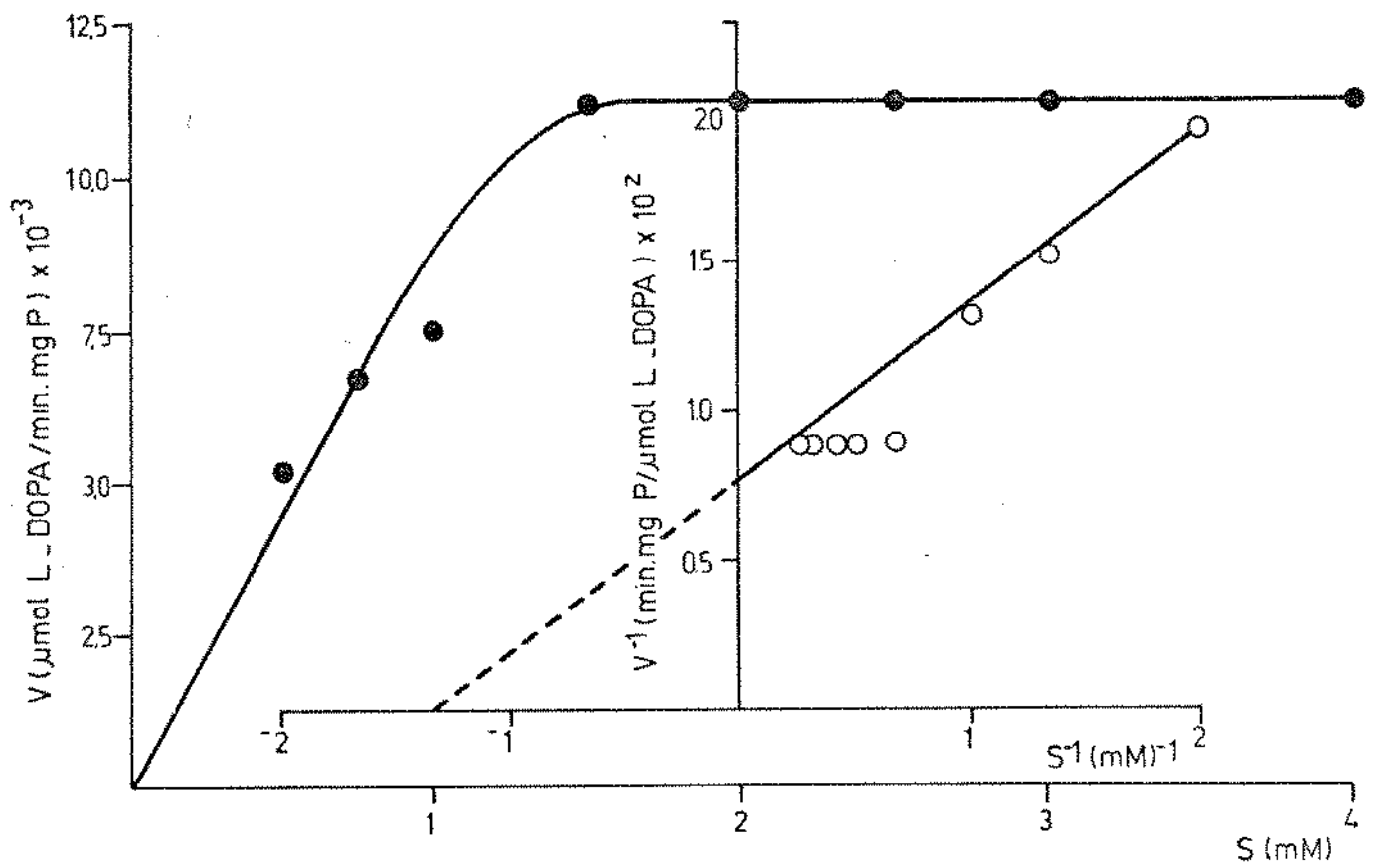




FIGURA 6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA TIROSINASE SEMIPURIFICADA.



- Seg. MICHAELIS - MENTEN
- Seg. LINEWEAVER - BURK

FIGURA 7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA TIROSINASE SEMIPURIFICADA.

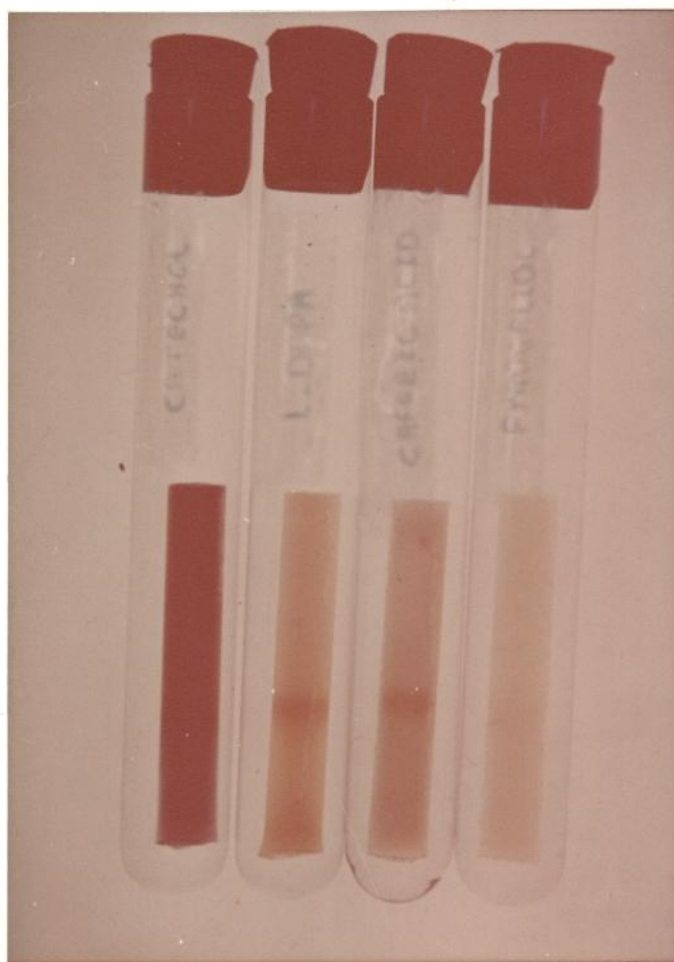


FIGURA 8. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE DE TIROSINASE NA FORMA DE ENZIMA IMOBILIZADA NATURAL ( Cell-bound enzyme).

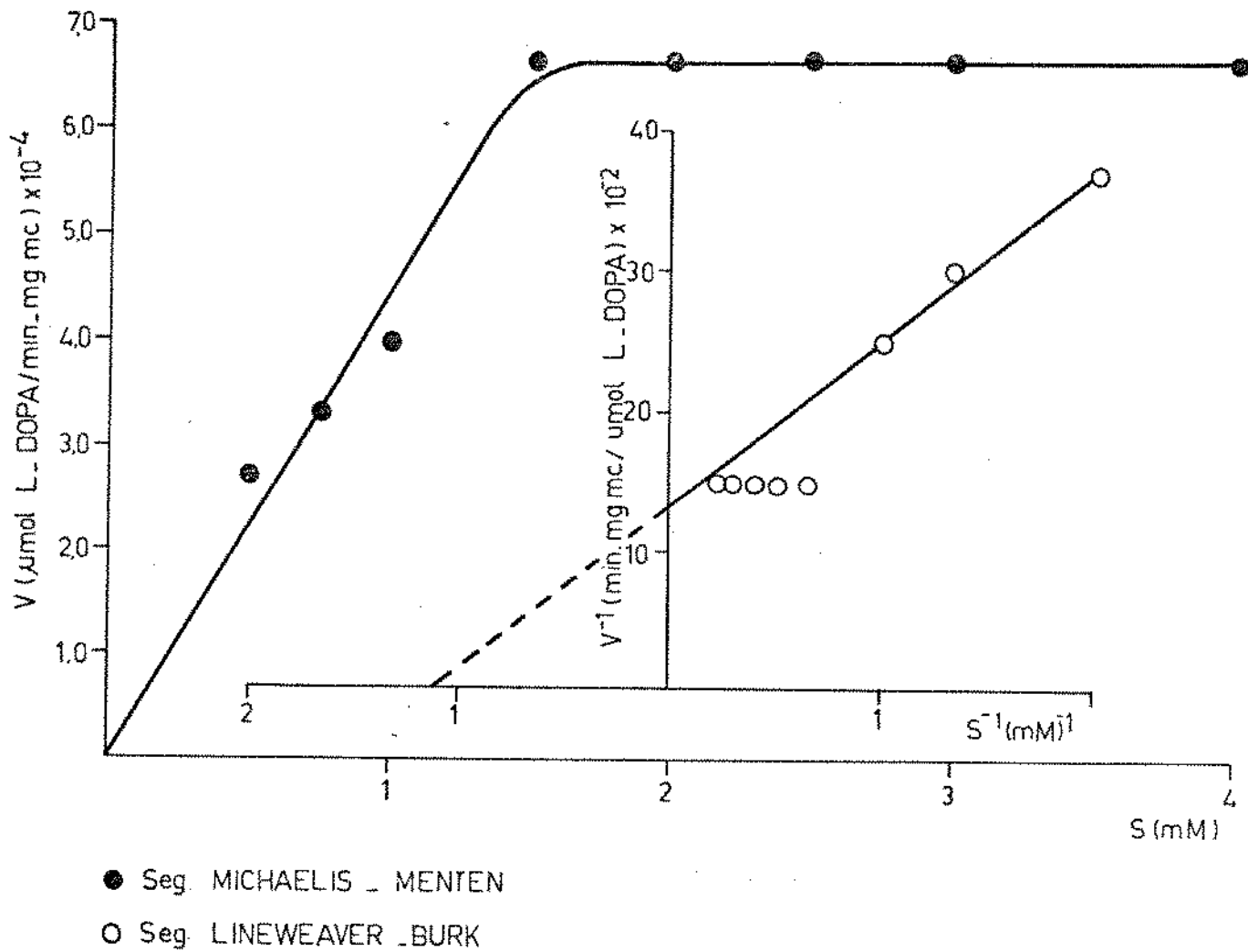
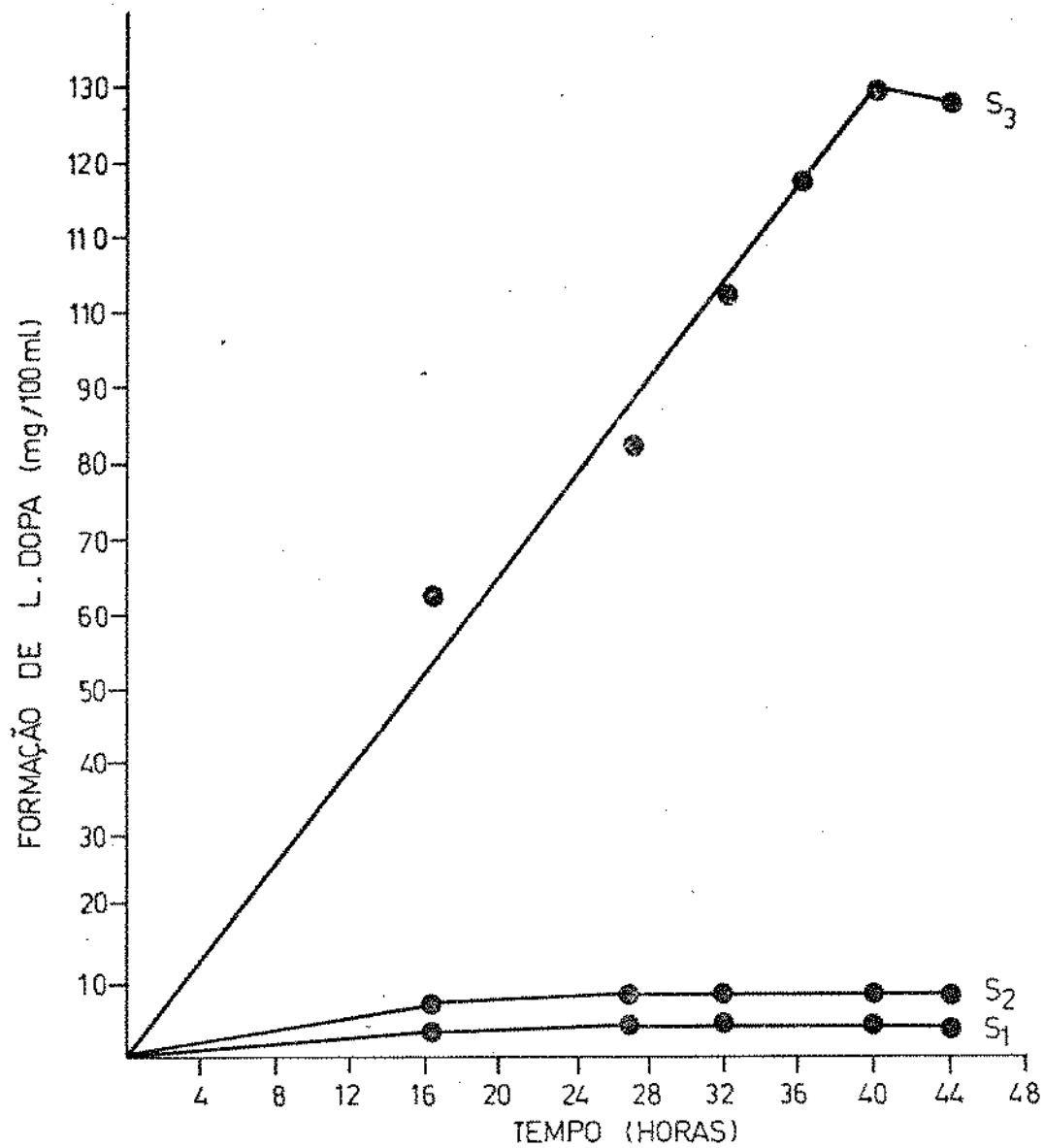


FIGURA 9. TRANSFORMAÇÃO DE L-TIROSINA À L-DOPA.



S<sub>1</sub> = L-TIROSINA 0,5mM

S<sub>2</sub> = L-TIROSINA 0,9mM

S<sub>3</sub> = L-TIROSINA 1,2mM

TABELA I

	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4
Glicose	1,12%	1,0%	2,0%	1,0%
Peptona		1,0%	1,0%	3,0%
Levedura		1,0%	1,0%	
NaCl				0,3%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,23%			
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,1%			0,15%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,56%			0,01%
$\text{CaCO}_3$	0,3%			
Água de Macera- ção de milho	2,0%			
pH	7,0	7,0	7,0	7,0

TABELA II

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO	INIBIÇÃO
KCN	$1 \times 10^{-3}M$	25%
	$1 \times 10^{-4}M$	13%
Dietilditiocarbamato de Sódio	$1 \times 10^{-3}M$	52%
	$1 \times 10^{-4}M$	28%
Cisteína	$1 \times 10^{-3}M$	45%
	$1 \times 10^{-4}M$	22%
Tiouréia	$1 \times 10^{-3}M$	30%
	$1 \times 10^{-4}M$	12%

TABELA III

REINO	ESPÉCIE	ANO
Procaryotae	<i>Pseudomonas melanogenum</i>	1974 <sup>31</sup>
	<i>Vibrio tyrosinaticus</i>	1973 <sup>26</sup>
	<i>Streptomyces glaucens</i>	1972 <sup>25</sup>
Eucaryotae	<i>Neurospora crassa</i>	1975 <sup>43</sup>
	<i>Aspergillus chevalieri</i>	1973 <sup>27</sup>
	<i>Alternaria kikuchiana</i>	1973 <sup>27</sup>
	<i>Fusarium moniliforme</i>	1973 <sup>27</sup>
	<i>Aspergillus oryzae</i>	1972 <sup>44</sup>

## 7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. FUNK, C. Synthesis of dl-3,4-dihydroxyphenylalanine. J.Chem. Soc. 99, 554-557, 1911.
2. GUGGENHEIM, M. Dioxypheylalanin, eine neue Aminosäure aus Vicia faba. Z. Physiol. Chem. 88, 276-284, 1913.
3. STEPHEN, H. e WEIZMANN, C. Synthesis of dl-tyrosine and dl-3,4-dihydroxyphenylalanine. J.Chem.Soc. 105, 1152-1155, 1914.
4. MILLER, E.R. Dihydroxyphenylalanine, a constant of the velvet bean. J.Biol.Chem. 44, 481, 1920.
5. HIRAI, K. Uber die synthesis des dl-3,4-dioxyphenylalanine. Biochem. Z. 114, 67-70, 1921.
6. ZENIN, C.T. e PARK, Y.K. Isoenzymes of polyphenol oxidase from high L-DOPA containing velvet bean. J.Food Science. 43 (2), 646-647, 1978.
7. MCGEER, P.L. e ZELDOWICZ, L.R. Administration of dihydroxyphenylalanine to Parkinsonian patientes. Canad. Med. Ass. J. 90, 463-466, 1964.
8. COTZIAS, G.C., VAN WOERT, M.H., SCHIFFER, L.M. Aromatic amino acids and modification of Parkinsonism. New Engl. J.Med. 276, 374-379, 1967.



9. COTZIAS, G., C.PAPVISILIOU, P.S., GELLENE, R. Modification of Parkinsonism chronic treatment with L-DOPA. New Engl. J.Med. 280, 337-345, 1969.
10. MACDOWELL, F.H., LEE, J.E., SWIFT, T., SWEET, R.D., OGSBURY, J.S., KESSLER, J.T. Treatment of Parkinson's syndrome with L-dihydroxyphenylalanine (levodopa). Ann. Intermed. Med. 72, 29-35, 1970.
11. OGATA K. YAMADA, H., ENEI, H., OKUMURA, S. Biological Method od producing phenolic amino acids (Ajinomoto Co Ind.) U.S. 3, 791, 924 (c1 195/29 c 12 d) 12 Feb. 1974, Japan, Appl. 68 88, 261 25 Nov. 1969 11pp).
12. SIH, C.J. L-DOPA from l-tyrosine and its derivatives (Wisconsin Alumni Research Foundation) U.S. 3, 671, 397 (c1 195/29; c 12 d ), 20 Jun. 1972 Appl. 826,003, 19 May 1969, 5 pp.
13. NAKAYAMA, K., TANAKA, Y., YOSHIDA, H. Fermentative production of - (3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.) Japan Kokai 74,100,200 (c1 36 (2) D32), 21 sep. 1974 Appl. 73 11, 923, 31 Jan. 1973, 4 pp.
14. NAGATSU, T., LEVITT, M., UDENFRIEND, S. Tyrosine hydroxylase J. Biol. Chem. 239, (9), 2910-2917, 1964.
15. IKEDA, M., LEVITT, M. e UDENFRIEND, S. Hydroxylation of phenylalanine by purified preparations of adrenal and brain tyrosine hydroxylase biochem. Biophys. Res. Commun. 18 (4), 482-488, 1965.

16. ARONSON, J.N. e VICKERS, R.S. Conversion o m-tyrosine to dihydroxyphenylalanine by a tyrosine hydroxylase from Bacillus cereus. Biochim. Biophys. Acta 110, 624-626, 1965.
17. KUMAGAI, H., MATSUI, H., OHGHISHI, H., OGATA, K. Synthesis of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine from L-tyrosine and pyrocatechol by crystalline  $\beta$ -tyrosinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34 (3), 266-270, 1969.
18. YAMADA, H., KUMAGAI, H., MATSUI, H., ORGISHI, H., OAGATA, K. Crystalization and properties of  $\beta$ -tyrosinase from Escherichia intermedia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36 (11), 10-14, 1968.
19. SIH, C.J., ROSAZZA, P.F.J., LEMBERGER, M. Microbiological synthesis of L-3,4-dihydroxyphenylalanine. J.Am. Chem. Soc. 91, 6204, 1969.
20. ENEI, H. MATSUI, H., YAMADA, H. Enzymatic preparation of L-tyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 (6), 1345-1349, 1971.
21. HANEDA, K., WATANABE, S., TAKEDA, I. Synthesis of L-3,4-dihydroxyphenylalanine from L-tyrosine by microorganisms. Appl. Microbiol. 22 (4), 721-722, 1971.
22. ENEI, H. NAKAZAWA, H., MATSUI, H., OKUMURA, S., YAMADA, H. Enzymatic preparation of L-tyrosine or 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine from pyruvate, ammonia and phenol or pyrocatechol. FEBS Lett. 21, 39-41, 1972.

23. ENEI, H., MATSUI, H., YAMASHITA, K., OKUMURA, S., YAMADA, H. Distribution on of tyrosine phenol lyase in microorganisms. *Agr. Biol. Chem.* 36 (11), 1861-1868, 1972.
24. YAMADA, H., KUMAGAI, H., MATSUI, H., OKUMURA, S. Microbiological synthesis of L-tyrosine and 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine. *Proc. IV IFS: Ferm. Technol. Today* 445-454, 1972.
25. LERCH, K. e ETTLINGER, L. Purification and characterization of a tyrosinase from Streptomyces glaucens. *Eur. J. Biochem.* 31, 427-437, 1972.
26. YOSHIDA, H., TANAKA, Y., NAKAYAMA, K. Production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) and its derivatives by Vibri on tyrosinaticus. *Agr. Biol. Chem.* 37, (9), 2121-2126, 1973.
27. HANEDA, K., WATANABE, S., TAKEDA, I. Production of 3,4-dihydroxyphenylalanine from L-tyrosine by microorganisms. *J. Ferm. Technol.* 51 (6), 398-407, 1973.
28. SINGH, D.V., MUKHERJEE, P.K. Microbial synthesis of L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) by *Pseudomonas* mutant D 101. *J.Ferm. Technol.* 51 (10), 713-718, 1973.
29. NAGASAKI, T., SUGITA, M., FUKAWA, H. Studies on dopa transamination of Alcaligenes faecalis . *Agr. Biol. Chem.* 37 (7), 1701-1706, 1973.
30. NAGASAKI, T., SUGITA, M., FUKAWA, H. Studies on the

- reaction conditions of DOPA production of Alcaligenes faecalis. Agr. Biol. Chem. 37 (12), 2841-2847, 1973.
31. YOSHIDA, H., TANAKA, Y., NAKAYAMA, K. Production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) by Pseudomonas melanogenum. Agr. Biol. Chem. 38 (3), 455-462, 1974.
  32. IBID. Properties of tyrosinases from Pseudomonas melanogenum. Agr. Biol. Chem. 38 (3), 627-632, 1974.
  33. IBID. Production of L-DOPA by mutant of Pseudomonas melanogenum. Agr. Biol. Chem. 38 (3), 633, 1974.
  34. ROSAZZA, J., BOSS, P., LEMBERGER, M., SIH, C.J. Microbiological synthesis of L-DOPA. J. Pharmacol. Sci. 63 (4), 544-547, 1974.
  35. SHIBATA, Y., TSURUMI, Y., SEINO, A., FUKIMBARA, T. Oxidation of N-formyl DOPA by Streptomyces roseochromogenes. J. Ferm. Technol. 52 (10), 720-729, 1974.
  36. NAGASAKI, T., SUGITA, M., FUKAWA, K., LIN, H.T. DOPA production with Enterobacter cloacae NB 320 by transamination reaction. Agr. Biol. Chem. 39 (2), 363-369, 1975.
  37. ARNOW, L. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. J. Biol. Chem. 118, 531-537, 1937.

38. LOWRY, O.M., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDAL, R.J.  
Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.  
Biol. Chem. 193, 265-271, 1951.
39. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme  
dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666,  
1934.
40. DAVIS, B.J. Disc eletrophoresis-2: Method and application  
to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:  
404-427, 1964.
41. GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme  
studies in COLOWICK, S.P. e KAPLAN, N.O. (ed.) .  
"Methods in enzymology", vol I, p.138-146. Academic  
Press. New York, 1955.
42. RADIN, N.S. Preparation of lipid extracts in COLOWICK  
S.P. & KAPLAN, N.O. (ed.). "Methods in enzymology".  
Vol. XIV, p.246. Academic Press. New York, 1969.
43. KATAN, T. & GALUN, E. A rapid and efficient method for  
the purification tyrosinase from Neurospora. Anal.  
Biochem. 67, 485-492, 1975.
44. OHBA, T., HARA, S., SUGAMA, S. & MURAKAMI, H. Studies  
on the browning rice-koji. J. Ferm. Technol. 50  
(10), 704-709, 1972.
45. GREGG, D.C. & NELSON, J.M. Further studies on the enzyme,  
tyrosinase. J.Am. Chem. Soc. 62, 2500-2505, 1940.

46. HOROWITZ, N.H. & SHEN, S.C. Neurospora tyrosinase. J. Biol. Chem. 197, 513-520, 1952.
47. MENCHER, J.R. & A.H.HEIM. Melanin byosynthesis by Streptomyces lavandulae. J.Gen. Microbiol. 28, 665-670, 1962.
48. HANSON, R.S., BLISCHARSKA & SZULMAJSTER, J. Relationship between tricarboxylic acid cycle enzymes and sporulation of B.subtilis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 17 (1), 1-7, 1964.
49. NAKADA, D. & MAGASANIK, B. The roles of inducer and catabolite repressor in the synthesis of  $\beta$ -galactosidase by Escherichia coli. J. Mol. Biol. 8, 105, 1964.
50. NAKATA, H.M. & HALVORSON, H.O. Biochemical changes occurring during growth and sporulation of Bacillus cereus. J. Bact. 80, 801-810, 1960.
51. HALVORSON, H.O. Oxidative enzymes of bacterial spores extracts. Spores. Edited by H.Orin Halvorson. Am. Inst. Biol. Sci., Symposium Series n° 5, p.144-160, 1957.
52. HALVORSON, H. & CHURCH, B.D. Intermediate metabolism of aerobic spores. II. The relationship between oxidative metabolism and germination. J.Appl. Bacteriol. 20, 359-372, 1957.

53. DOI, R., HALVORSON & CHURCH, B.D. Intermediate metabolism of aerobic spores. III. The mechanism of glucose and hexose phosphate oxidation in extracts of Bacillus cereus spores. J. Bacteriol. 77, 43-54, 1959.
54. MASON, H.S. The chemistry of melanin. II. The oxidation of dihydroxyphenylalanine by mammalian DOPA oxidase. J. Biol. Chem. 168, 433-438, 1947.
55. BOUCHILLOUX, S., MACMAHILL, P. & MASON, H.S. The multiple forms of mushroom tyrosinase. J. Biol. Chem. 238 (5), 1699-1707, 1963.
56. FLING, M., HOROWITZ, N.H. & HEINEMANN, S.F. The isolation and properties of crystalline tyrosinase from Neurospora. J. Biol. Chem. 238 (6), 2045-2053, 1963.