

TOMHIKO SEKINO

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA FOSFORILASE a DE  
LEVEDURA DE CERVEJEIRO (Saccharomyces cerevisiae).  
MECANISMO DE INTERCONVERSÃO ENTRE A FOSFORILASE a  
E FOSFORILASE b E COMPARAÇÃO COM OUTROS SISTEMAS  
DE FOSFORILASES

Tese de doutoramento apresen-  
tada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de  
Campinas.

Orientador:

Prof. Dr. ALDO FOCESI JÚNIOR

Co-Orientador:

Prof. Dr. QUIVO S. TAHIN

Campinas  
1974

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL

INSTITUTO DE BIOLOGIA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Aos meus pais

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Aldo Focesi Júnior, Orientador desta Tese que me guiou com segurança na realização deste trabalho, despertando um grande interesse pela pesquisa científica.

Ao Professor Doutor Quivo S. Tahin, Co-Orientador desta Tese, por ter aceitado a missão de me orientar após a ida do Professor Doutor Aldo Focesi Júnior, ao exterior e pelo incentivo e apoio durante a conclusão e redação final deste trabalho.

Ao Professor Doutor Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas e ao Professor Doutor Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia, pelo apoio às pesquisas realizadas neste Departamento.

Ao Professor Doutor Armando Gil de Almeida Neves, pelo espírito de colaboração, assessorando nas determinações das propriedades físico-químicas e permitindo a utilização da ultracentrífuga e do analisador de amino-ácidos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Professor Doutor Antonio Carlos Martins Camargo, pela colaboração na determinação da composição de amino-ácidos e utilização do analisador de amino-ácidos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica da UNICAMP e da U.F.M.G. que contribuíram de várias formas, durante a realização desta Tese.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica da UNICAMP, da U.F.M.G. e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao Sr. Pedro Gimenez pelo serviço fotográfico.

À Maria do Carmo Biajoni, pela dedicação na confecção dos gráficos, na datilografia e na montagem desta Tese.

# Í N D I C E

INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAL E MÉTODOS .....	11
1. <u>Preparação da fosforilase a de levedura de cervejeiro</u> .....	12
1.1. Preparação do extrato bruto .....	12
1.2. Precipitação com sulfato de protamina .....	12
1.3. Tratamento por gel de fosfato .....	13
1.4. Precipitação por diálise contra $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 55% de saturação .....	13
1.5. Segundo fracionamento com sulfato de amonio .....	13
1.6. Cromatografia em DEAE-celulose .....	14
2. <u>Ensaio da atividade da fosforilase a</u> .....	14
2.1. Princípio do método .....	14
2.2. Procedimento experimental .....	14
2.3. Unidade da fosforilase .....	15
3. <u>Dosagem de proteina</u> .....	15
3.1. Dosagem de proteina pela reação de biureto .....	15
3.2. Dosagem de proteina pelo reagente Folin-Ciocalteu, modificado por Lowry .....	15
3.3. Dosagem de proteina por espectrofotometria .....	16
4. <u>Determinação do coeficiente de sedimentação da fosforilase a de levedura de cervejeiro</u> .....	16
4.1. Procedimento experimental .....	17
4.2. Determinação do fator de ampliação e da posição do pico .....	17
4.3. Cálculo do coeficiente de sedimentação (S) .....	19
5. <u>Determinação do coeficiente de difusão</u> .....	20
5.1. Procedimento experimental .....	22
6. <u>Determinação da composição de amino-ácidos</u> .....	23
6.1. Hidrólise ácida com HCl 6N .....	24
6.2. Hidrólise ácida com ácido metanosulfônico .....	24
6.3. Determinação dos amino-ácidos sulfurados .....	24
6.3.1. Oxidação com ácido perfórmico .....	24
6.4. Determinação do triptofano por espectrofotometria ....	25
6.5. Determinação do triptofano em analisador de amino-ácidos .....	25
6.6. Cálculo da concentração dos amino-ácidos .....	26
7. <u>Determinação do volume parcial específico</u> .....	26
8. <u>Obtenção da fosforilase-fosfatase de levedura de cervejeiro</u> .....	26
9. <u>Ensaio da fosforilase-fosfatase</u> .....	27
10. <u>Ensaio da fosforilase b quinase de músculo esquelético de coelho sobre a fosforilase b de levedura de cervejeiro</u> ....	27
10.1. Ativação da fosforilase b quinase .....	27
10.2. Atividade da fosforilase b quinase sobre a fosforilase inativa de levedura .....	28
11. <u>Eletroforese em gel de poliacrilamida</u> .....	28

12. <u>Métodos estatísticos</u> .....	29
12.1. Método do quadrado mínimo .....	29
12.2. Cálculo do desvio padrão .....	30
RESULTADOS .....	31
1. <u>Propriedades físico-químicas da fosforilase <u>a</u> de levedura de     <u>cervejeiro (Saccharomyces cerevisiae)</u></u> .....	31
1.1. Determinação do coeficiente de sedimentação de fosfori- lase <u>a</u> de levedura .....	31
1.2. Determinação do coeficiente de difusão da fosforilase <u>a</u> de levedura .....	38
1.3. Determinação do volume parcial específico da fosforila- se <u>a</u> de levedura .....	44
1.4. Determinação do peso molecular da fosforilase <u>a</u> de levedura de levedura .....	44
1.5. Determinação da razão friccional da fosforilase <u>a</u> de levedura de levedura .....	46
1.6. Cálculo do raio de Stokes da fosforilase <u>a</u> de levedura de cervejeiro .....	48
1.7. Determinação do coeficiente de absorção $A_{280}^{1\%}$ de fosfori- lase <u>a</u> de levedura .....	48
2. <u>Determinação da composição de amino-ácidos da fosforilase <u>a</u>     de levedura de cervejeiro</u> .....	49
2.1. Hidrólise ácida com HCl 6N .....	49
2.2. Hidrólise ácida (HCl 6N) após oxidação com ácido perfór- mico .....	53
2.3. Hidrólise ácida com ácido metanosulfônico .....	53
2.4. Determinação do triptofano por espectrofotometria .....	53
3. <u>Evidências da existência de duas formas de fosforilase de levedura     de cervejeiro</u> .....	55
4. <u>Evidências de diferenças em peso molecular das formas ativa     e inativa de fosforilase de levedura de cervejeiro</u> .....	56
DISCUSSÃO .....	76
RESUMO .....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94

\*\*\*

## ABREVIATURAS

Pi = fosfato inorgânico

G-1-P = glicose-1-fosfato

PLP = pirodoxal 5'-fosfato

AMP = adenosina 5'-monofosfato

ATP = adenosina 5'-trifosfato

G-6-P = glicose-6-fosfato

DEAE = dietil-aminoetil

EDTA = etilenodiamino-tetra-acético

TCA = ácido tricloroacético

TEMED = N, N, N', N'-tetra-metil-1,2-diamino etano

F<sup>-</sup> = fluoreto

PMB = ácido para-mercuribenzóico

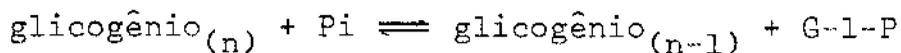
## INTRODUÇÃO

O estudo do metabolismo celular tem sido desde há muitos anos, objeto da curiosidade de inúmeros pesquisadores tais como Warburg, Meyerhoff, Krebs, Cori e muitos outros. A harmonia e a complexidade dos sistemas vitais certamente estimularam esse grande interesse. Desde as experiências iniciais de BÜCHNER, a levedura, dada a facilidade com que pode ser reproduzida e manuseada no laboratório, tem se mostrado um modelo especial para o estudo do metabolismo.

De fato, várias enzimas foram estudadas e inúmeros passos de vias metabólicas foram elucidados utilizando aquele organismo. No metabolismo de hidrato de carbono, por exemplo, várias enzimas foram descritas pela primeira vez utilizando-se leveduras. No entanto, um sistema importante na regulação do metabolismo de carboidratos, como é o das fosforilases, não é muito conhecido nas leveduras. Esse fato, talvez possa ser explicado devido a utilização usual da glicose pelas leveduras, como fonte de energia, ao invés do glicogênio.

O sistema de fosforilases inicialmente estudado, foi o de músculo esquelético de coelho, por CORI et al. (1943). Esse mesmo sistema tem sido descrito e estudado nas mais variadas espécies animais e desses estudos muito se pôde conhecer, não só a respeito da reação inicial da glicogenólise, como da natureza do catalisador da reação, isto é, da fosforilase.

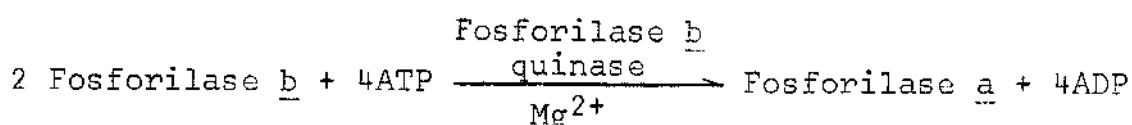
A fosforilase ( $\alpha$ -1,4-glucan:ortofosfato-glucosiltransferase, E.C.2.4.1.1), catalisa a seguinte reação da glicogenólise:



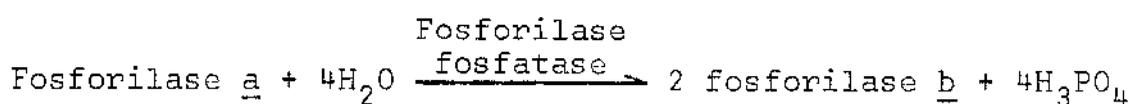
A fosforilase tem sido estudada como passo inicial controlador da via glicogenolítica, e foi descrita por CORI et al. (1943) como a primeira enzima existente numa forma ativa e numa outra inativa, respectivamente, fosforilase a e fosforilase b. Evidentemente a existência de duas formas de uma mesma enzima, sugeria fortemente

que ora a enzima ativa era necessária, ora não, num processo rápido reversível, e deste modo a interconversão das duas formas serviria como meio de regular uma reação química importante, para o desencadeamento de reações subsequentes.

Durante a interconversão das duas formas da enzima, KREBS & FISCHER (1956), verificaram que havia uma modificação química na proteína. Assim, a conversão da fosforilase b (inativa) em fosforilase a (ativa), é realizada por uma fosforilase b quinase com transferência de quatro grupos fosfatos do ATP para quatro resíduos de serina na molécula da fosforilase, tornando-a ativa.



A reação inversa é catalisada por uma fosforilase-fosfatase (CORI & CORI, 1945), que catalisa a conversão da fosforilase a em fosforilase b, com liberação dos grupos fosfatos da serina.



Outra característica fundamental encontrada que diferencia a fosforilase a da fosforilase b, é quanto ao número de monômeros que fazem parte da estrutura quaternária de cada proteína. Assim, CORI & CORI (1945), demonstraram que a fosforilase b era um dímero, enquanto que a fosforilase a era um tetrâmero, e MADSEN & CORI (1956), demonstraram a participação de grupos tiois na associação dos monômeros.

Além do mecanismo regulatório do sistema das fosforilases através da interconversão da forma ativa-inativa, foi ainda descrito um outro mecanismo através do qual a fosforilase b adquire atividade fosforilásica, devido a mudança de conformação da enzima na presença do AMP sem ligação direta com o centro ativo da proteína (MADSEN, 1964), portanto, a atividade fosforilásica seria também controlada por um mecanismo alostérico.

Um outro fator indispensável para a atividade enzimática da fosforilase é o grupo prostético piridoxal 5'-fosfato (PLP) e foi de-

monstrado por BARANOWISKY et al. (1957). Entretanto, o papel exato deste cofator (catalítico ou estrutural) não foi ainda bem estabelecido.

Pelo fato da fosforilase catalisar o passo inicial de uma fundamental via metabólica (utilização do glicogênio) a regulação de sua atividade, ocorre ainda por uma série de reações complexas e além disso, vários metais divalentes, nucleotídeos e hormônios es tão envolvidos.

Assim, a natureza complexa do sistema enzimático que controla a degradação do glicogênio, faz o sistema ideal para estudos relacionados com a evolução dos mecanismos regulatórios. A fosforólise do glicogênio ou do amido catalisada pelo sistema das fosforilases, está presente em todas as espécies conhecidas, desde organismos unicelulares até tecidos altamente complexos de vegetais e animais. Portanto, o estudo das fosforilases nas espécies mais simples como a levedura de cervejeiro, realizado neste presente trabalho, pode contribuir no sentido de explicar pormenores do mecanismo de regulação enzimática, bem como de que forma este mecanismo de controle evoluiu através das espécies. Nesse contexto geral discutiremos a seguir, os sistemas de fosforilases conhecidos e as diferenças fundamentais relacionadas principalmente com o processo de ativação e fenômeno de associação-dissociação da enzima.

A fosforilase de batata é uma das únicas obtidas de plantas superiores com grande rendimento e pureza (LEE, 1960). Essa enzima não possui sítio fosforilado (fosfato ligado ao resíduo de serina) e também não é ativada pelo AMP, portanto parece não ser regulada nem por modificações covalentes e nem por modificações alostéricas. A fosforilase de batata com um peso molecular de 207.000 daltons e um valor de  $S_{20w}$  igual a 7,9, não apresenta características de associação-dissociação da proteína e talvez por esta razão apresenta uma maior estabilidade na presença de agentes desnaturantes do que as outras fosforilases.

A fosforilase de E.coli também não é fosforilada, embora se tenha observado fraca ativação pelo AMP (CHEN & SEGEL, 1968). O peso molecular desta fosforilase determinado pelos autores acima, foi de

250.000 daltons e a enzima não apresentou fenômeno de associação da molécula.

FOSSET et al. (1971), purificaram duas formas de fosforilase de levedura de padeiro e por analogia com o sistema de músculo de mamíferos, a forma ativa foi chamada de fosforilase a e a inativa, de fosforilase b. As experiências de sedimentação indicaram que a fosforilase a existiria como um dímero levemente associado com um peso molecular de 250.000 daltons e um valor de  $S_{20W} = 9,65$ , enquanto que a fosforilase b existiria como um tetrâmero levemente dissociado com um peso molecular de 390.000 daltons e  $S_{20W} = 14,2$ . A transformação da fosforilase b em fosforilase a ocorreu através de fosforilação da enzima, mas nenhuma das formas da enzima era ativada pelo AMP.

Por outro lado, o sistema de fosforilases de fígado de cão, se apresenta como um tipo diferente nos seguintes aspectos: sua forma desfosforilada (fosforilase b) é pouco ativada pelo AMP (SUTHERLAND & WOSILAIT, 1956) e a conversão para a forma ativa ocorre pela fosforilação da enzima. Ambas as formas, fosforilada (fosforilase a) e desfosforilada (fosforilase b) possuem idênticos coeficientes de sedimentação ( $S_{20W} = 8,4$ ) com peso molecular igual a 237.000 daltons. A forma inativa da fosforilase de fígado possui ainda uma característica de ser ativada por  $Na_2SO_4$  0,7M.

No músculo cardíaco, segundo DAVIS et al. (1967), existem 3 isoenzimas da fosforilases b: fosforilase  $I^b$ ,  $II^b$  e  $III^b$ , que podem ser convertidas nas respectivas formas a na presença da fosforilase-quinase e ATP. As fosforilases  $II^a$  e  $III^a$  são tetrâmeros e possuem peso molecular maior que as respectivas fosforilases  $II^b$  e  $III^b$ , porém, tanto a isoenzima  $I^a$  como  $I^b$ , possuem o mesmo peso molecular, aproximadamente igual a 200.000 daltons. Portanto, a isoenzima I seria semelhante a fosforilase de fígado, já que ambas as formas fosforilada e não fosforilada, possuem coeficientes de sedimentação idênticos.

Do ponto de vista do fenômeno da associação-dissociação relacionado com a atividade enzimática, o sistema de fosforilase do músculo esquelético de coelho, foi o mais estudado. Assim, De VINCENZI & HEDRICK, (1967) e SEERY et al. (1967), estabeleceram ser

o peso molecular da fosforilase a (um tetrâmero) e da fosforilase b (um dímero) respectivamente de 360.000 daltons ( $S_{20w} = 13,5$ ) e 180.000 daltons ( $S_{20w} = 8,4$ ). Essas duas formas da enzima podem ainda ser dissociadas em sub-unidades menores (monômeros) por reagentes desnaturantes como uréia, guanidina-HCl, etc. Experiências de desnaturação da fosforilase em uréia 8M ou em baixas molaridades de guanidina-HCl, fornecem dados de peso molecular dessas sub-unidades, num intervalo de 70.000 a 100.000 daltons. A formação do monômero pode ocorrer também pela diluição da fosforilase b quando esta é previamente reduzida pelo  $\text{NaBH}_4$  ou pela adição de ATP (De VINCENZI & HEDRICK, 1970). Esses autores, após o estudo do fenômeno de agregação sob diferentes condições, concluíram que as forças responsáveis pelas ligações monômero-monômero e dímero-dímero, eram diferentes.

Durante a conversão da fosforilase a em fosforilase b pela fosforilase-fosfatase, GRAVES et al. (1960), verificaram que a liberação de fosfato da fosforilase a e a perda da atividade fosforilásica eram reações paralelas. FISCHER et al. (1969), demonstraram que este paralelismo realmente ocorria desde que a atividade fosforilásica fosse medida na presença de G-1-P 0,015M, porém a atividade fosforilásica na presença de G-1-P 0,05M, era muito maior, mesmo após a liberação de 50% do fosfato ligado à enzima, e na presença de G-6-P 0,002M, era menor. Portanto, na presença de G-1-P 0,05M ou G-6-P 0,002M, a reação de perda de atividade fosforilásica não era paralela com a da perda do fosfato. Esses resultados foram interpretados assumindo que os quatro grupos fosfatos ligados à fosforilase a seriam liberados com a formação de intermediários, possuindo sucessivamente 3, 2, 1 e finalmente zero grupos fosfatos e que a atividade enzimática desses intermediários fosforilados era bastante afetada por G-1-P e G-6-P. Assim, esses intermediários seriam enzimaticamente ativos quando medidos em alta concentração de G-1-P, mas menos ativos na presença de G-6-P.

Ainda de acordo com os autores acima, o coeficiente de sedimentação desses intermediários fosforilados é também afetado pela presença de G-1-P aumentando a proporção da espécie mais pesada (tetramérica), e pela presença de G-6-P, favorecendo a formação da forma dimérica. Esses mesmos autores lançaram ainda a hipótese de

que a fosforilase existiria sob duas conformações: uma ativa e outra inativa, em equilíbrio. Na fosforilase b este equilíbrio tenderia fortemente para a conformação inativa a menos que efetores, tais como AMP ou altas concentrações de Pi fossem adicionados. A forma fosforilada teria o equilíbrio deslocado em direção à conformação ativa e esta teria uma grande tendência a se agregar, daí fosforilase a ou fosforilase b na presença de AMP serem encontradas no estado tetramérico. Os híbridos parcialmente fosforilados, apresentariam o equilíbrio entre a conformação ativa e inativa muito sensível a efetores positivos ou negativos. Assim, a G-1-P favoreceria a conformação ativa, com o aparecimento de formas tetraméricas, e a G-6-P deslocaria o equilíbrio para o estado inativo, com formação de dímeros. Essas reações de fosforilação e desfosforilação com a formação desses intermediários fosforilados, constituiriam fator importante no mecanismo regulatório do metabolismo do glicogênio "in vivo". Portanto, as diferentes respostas às concentrações de G-1-P e G-6-P, fariam desses intermediários fosforilados, sensíveis controladores da utilização do glicogênio.

WANG & GRAVES (1964), verificaram que a fosforilase a tetramérica, quando incubada em soluções de força iônica alta, se dissociava reversivelmente em dímeros com um aumento da atividade enzimática. Verificaram também, que havia um aumento na atividade específica da fosforilase a durante a diluição da enzima. Esses autores estudaram o papel dessas moléculas da fosforilase no processo catalítico, e se o aparecimento da atividade que ocorre durante a conversão da fosforilase b em a estaria mais relacionado com a fosforilação ou com o processo de tetramerização da proteína. Concluíram que o processo de fosforilação da forma inativa da fosforilase era importante não só para a atividade da enzima, mas também proporcionava condições termodinâmicas para que os dímeros se associassem e formassem tetrâmeros. Portanto, o aparecimento da atividade enzimática estaria primeiramente relacionado com a fosforilação e a conseqüente tetramerização seria um efeito secundário.

Os resultados daqueles autores sugerem que a forma dimérica fosforilada seria mais ativa ainda que a própria forma tetramérica fosforilada, e que a fosforilase a do músculo esquelético poderia

ser encontrada como um dímero fosforilado e não um tetrâmero como se pensava.

WANG et al. (1965), estudando a influência de carboidratos sobre a estrutura e a atividade da fosforilase, chegaram a conclusão de que a ativação da fosforilase pela pré-incubação com o glicogênio estaria relacionada com a dissociação da enzima. Esse fato foi demonstrado incubando-se diferentes concentrações de fosforilase a na presença e ausência de glicogênio, baseando-se nos resultados de WANG & GRAVES (1964), de que a atividade da fosforilase estaria relacionada com o aumento da diluição da enzima, onde a forma tetramérica menos ativa se converteria em dímeros fosforilados mais ativos. Assim WANG et al. (1965), concluíram que o glicogênio induziria a dissociação da enzima, com aumento da atividade fosforilásica a partir de concentrações de fosforilase a que favoreciam a forma tetramérica e que na ausência do glicogênio, a medida que se aumentava a concentração da enzima, havia um decréscimo da atividade específica, que seria devido a formação de tetrâmeros.

METZGER et al. (1967), estudaram a ativação da fosforilase a causada pelo glicogênio usando amiloheptaose, que também é um ativador da fosforilase a e que pode ser utilizado nas experiências de sedimentação, devido ao seu baixo peso molecular. Na presença do oligossacarídeo, a fosforilase a apresentou um coeficiente de sedimentação igual a 7,1 e na ausência, um valor de  $S = 13,7$ . Na presença de um substrato semelhante, a amilopentaose, que não tem a capacidade de ativar a fosforilase a, não se verificou a dissociação da enzima. Esses autores confirmaram também a ativação da fosforilase a pela pré-incubação com o glicogênio, sugerindo que o tetrâmero não se ligaria ao glicogênio e que o dímero seria a única forma ativa da enzima, quando o glicogênio é o substrato.

Estudos com medidas de "light scattering" comprovaram também que o tetrâmero da fosforilase a se dissociava em espécie diméricas de maior atividade catalítica em soluções de baixa concentração de proteína (GRAVES et al., 1968).

O equilíbrio entre os vários estados de agregação (monômero, dímero e tetrâmero), pode ser afetado por muitos fatores, tais como

concentração da proteína, temperatura, pH e a presença de ativadores ou de substratos. O efeito do estado de agregação das subunidades da fosforilase a sobre sua atividade enzimática deverá ainda ser melhor elucidado.

De VINCENZI & HEDRICK (1970), usando filtração em gel, também demonstraram que sob condições usualmente utilizadas no ensaio da atividade fosforilásica, isto é, concentração diluída da enzima, a fosforilase a existia como um dímero cataliticamente ativo.

Portanto, a fosforilase tem sido isolada e estudada em grande número, das mais variadas fontes. As fosforilases poderiam ser classificadas em duas classes gerais: aquelas cujas atividades são reguladas por modificações covalentes (como a fosforilase de músculo esquelético de coelho) e aquelas nas quais não se encontrou a regulação por modificação covalente, (como fosforilase de bactéria e batata). Assim, todas as fosforilases inativas (fosforilase b), descritas em espécies animais, em contraste com as de plantas e certos microorganismos (Neurospora crassa e E.coli) parecem ser ativadas por fosforilação da proteína, originando a forma ativa (fosforilase a), com a participação de uma fosforilase quinase dependente de ATP e  $Mg^{2+}$ . A reação inversa sendo catalisada por uma fosforilase-fosfatase.

Quanto à ação do AMP (ativador alostérico) nem todas as enzimas são ativadas por esse nucleotídeo: novamente a maioria das fosforilases de animais apresentam uma maior ou menor ativação pelo AMP em contraste com as enzimas de vegetais, onde o AMP apresenta um efeito nulo.

A maioria das fosforilases a animais, tem a tendência de se apresentar na forma tetramérica, e as fosforilases b na dimérica. Contudo este fato não é verificado com as fosforilases de fígado ou com a isoenzima I de coração de coelho, pois tanto a fosforilase a e a b permanecem como dímero. Por outro lado, FOSSET et al. (1971) descrevem a fosforilase ativa da levedura de padeiro como um dímero e a inativa como um tetrâmero.

As leveduras de padeiro e de cervejeiro (raças de Saccharomyces cerevisiae) crescem em meios diferentes quanto ao conteúdo de  $O_2$ ,

isto é, a aeração é muito maior para o crescimento e multiplicação das leveduras de padeiro, do que para as leveduras de cervejeiro (HOUGH et al., 1971). CHESTER (1963), verificou uma ativação da biossíntese de glicogênio nas leveduras de cervejeiro quando crescidas em anaerobiose, e uma rápida degradação do polissacarídeo quando a levedura era colocada em aerobiose. Esse autor estudando o provável mecanismo do efeito do  $O_2$ , notou que a respiração celular não era a responsável por aquela maior degradação do glicogênio, visto que o mesmo efeito foi observado em mutantes deficientes de citocromo-oxidase. A velocidade do consumo de glicose por uma suspensão de levedura crescida em anaerobiose e depois colocada em aerobiose, foi a mesma quando mantida em anaerobiose. Portanto, observou-se um aumento da glicogenólise e não da glicólise, nas leveduras crescidas em anaerobiose e posteriormente colocadas em aerobiose. Este fato faz CHESTER sugerir que o efeito do  $O_2$  descrito acima seria anterior à formação de G-6-P.

Contudo, não se esclareceu até hoje, como o efeito do  $O_2$  sobre a degradação do glicogênio poderia estar relacionado com uma possível alteração no sistema das fosforilases.

Uma outra característica relevante é o fato da levedura de cervejeiro viver tanto em condições anaeróbicas como nas parcialmente aeróbicas. Contudo, essas leveduras mesmo na presença de  $O_2$  não perdem a capacidade de fermentar a glicose até etanol, assemelhando-se assim com células cancerosas que são capazes de produzir lactato em aerobiose e em anaerobiose. Essas características levam-nos a acreditar que as leveduras de cervejeiro possam servir como um excelente modelo biológico para estudos bioquímicos de tecidos que vivem em condições de menor aerobiose do que outros, e para contribuir na elucidação do efeito Pasteur.

Assim, foi de nosso interesse estudar o sistema de fosforilases da levedura de cervejeiro, com a finalidade de investigar prováveis diferenças que existiriam entre um sistema de fosforilase de um organismo que vivesse em maior anaerobiose (como é a levedura de cervejeiro), do que outros (como é a levedura de padeiro).

Um outro objetivo deste trabalho, foi o estudo evolutivo-comparativo entre as fosforilases de várias origens, já que as fosforila

ses do reino vegetal diferem bastante das do reino animal, e mesmo no reino animal ocorrem diferenças marcantes entre as fosforilases de diferentes tecidos. O estudo do sistema de fosforilases da levedura de cervejeiro (protista) pode contribuir no conhecimento sobre o desenvolvimento das fosforilases durante a evolução das espécies, e sobre o fenômeno da regulação enzimática desse sistema.

Na presente tese, apresentamos o estudo de propriedades físico-químicas e bioquímicas das fosforilases de levedura de cervejeiro. **Nesse sentido** determinamos o coeficiente de sedimentação, de difusão, a composição de amino-ácidos, volume parcial específico, peso molecular e mobilidade eletroforética da fosforilase ativa. Investigamos também, alterações de algumas dessas propriedades causadas pela inativação enzimática da fosforilase ativa de levedura de cervejeiro.

Desta forma, estudamos diferenças estruturais que existem entre as formas ativa e inativa da enzima, com a finalidade de relacionar o fenômeno da dissociação-associação proteica com a atividade enzimática, e comparar essas propriedades observadas na levedura de cervejeiro, com as de padeiro e as de outros sistemas de fosforilases de várias origens.

## MATERIAL E MÉTODOS

A levedura de cervejeiro, foi lavada, prensada e colocada para se car à temperatura ambiente. Essa levedura seca, foi usada para ob<sub>tenção</sub> da fosforilase a e fosforilase-fosfatase.

Extraiu-se e purificou-se o glicogênio de fígado de coelho, de acordo com o método de BELL & YOUNG (1934).

Alfa-D-glicose-1-fosfato foi de procedência comercial (SIGMA ou equivalente), ou foi preparada a partir de batata pelo método de McCREADY & HASSID (1955).

Gel de fosfato usado na purificação da fosforilase-fosfatase, foi preparado de acordo com KEILIN & HARTREE (1938).

A resina aniônica, DEAE-celulose, marca SIGMA, tinha a capacidade de 0,86 meq/ml, com "mesh" médio. Usou-se para a cromatografia de troca iônica, um coletor de fração BÜCHLER, e a absorvância (260 a 280 nm), detectada por um monitor UVISCAN III, GILFORD, foi visualizada por um registrador RECTI-RITER, Texas Instruments.

Espectrofotômetro BECKMANN DU, foi o utilizado na dosagem do trip<sub>tofano</sub> e nas leituras de absorvância para a determinação da concentração e atividade da enzima.

Para as medidas de viscosidade, usou-se o viscosímetro tipo CANNON-FENSKE, tamanho 50, com certificado de calibração da United States Testing Co. Inc.

Efetou-se a análise de amino-ácidos em analisador BECKMANN, modelo 120C, equipado com uma coluna longa contendo resina tipo AA-15, para análise dos amino-ácidos neutros e ácidos e uma curta com resina tipo PA-35, para a análise dos amino-ácidos básicos; ambas as resinas da marca BECKMANN.

Para a determinação do coeficiente de sedimentação e difusão, usou-se uma centrífuga analítica SPINCO, modelo E, equipado com

controle eletrônico de velocidade, diafragma "schlieren" com "phaseplate", sistema de controle e indicação da temperatura do rotor e sistemas óticos: schlieren, de interferência e de absorção no ultra-violeta.

Para as operações de preparação e purificação das enzimas, usou-se uma centrífuga SORVAL RC2-B.

Utilizou-se para a determinação do peso seco da fosforilase uma balança microanalítica METTLER, modelo M5.

As chapas metalográficas das experiências de sedimentação e difusão, foram reveladas com revelador KODAK tipo D-19 e as chapas ultra-violeta, com o tipo D-11. Ambas foram fixadas com fixador Kodafix.

A acrilamida, a bis-acrilamida e o TEMED usados para a eletroforese foram da marca BDH.

Os outros reagentes usados foram de marca SIGMA, MERCK, BAKER, ou equivalentes.

## MÉTODOS

1. PREPARAÇÃO DA FOSFORILASE DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO - A enzima foi preparada e purificada essencialmente segundo o método de AIROLDI (1973).

1.1. Preparação do Extrato Bruto - Uma determinada quantidade de levedura seca mais água (proporção de 1 g da levedura para 3 ml de água), foi autolisada a 37°C, durante 3:30 horas. Após autólise, deixou-se na câmara fria durante mais ou menos 12 horas para a total ativação da fosforilase. Depois o autolisado foi centrifugado a 6.000 g (rotor GS-3) durante 20 minutos, obtendo-se o sobrenadante, que foi denominado de extrato bruto. Nesta etapa e nas subsequentes a temperatura foi mantida de 0 a 4°C.

1.2. Precipitação com sulfato de Protamina - Para cada 10 ml do extrato bruto adicionou-se lentamente, 1 ml de solução de sulfato

de protamina 2,5%. Após a adição agitou-se por mais 20 minutos e centrifugou-se a 12.000 g (rotor SS-34), durante 20 minutos.

A fosforilase foi extraída suspendendo-se o precipitado com 1 ml de tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5 para cada 10 ml do extrato bruto original. Essa suspensão ficava sob agitação durante 20 minutos e em seguida centrifugava-se a 12.000 g (rotor SS-34) durante 15 minutos. Essa extração foi repetida mais uma vez. Os dois sobrenadantes foram reunidos e utilizados na etapa seguinte.

1.3. Tratamento por gel de fosfato - O gel de fosfato foi preparado na própria solução da proteína de acordo com CANNATA & STOPPANI (1964), da seguinte maneira: adicionava-se tampão fosfato de potássio 0,5M pH 7,2 e acetato de cálcio 1M simultaneamente sobre a solução da proteína em agitação na proporção de 5 ml do tampão e 2,5 ml do acetato de cálcio para 100 mg de proteína. Após completa adição dos reagentes, mantinha-se a agitação durante mais uma hora em banho de gelo. Em seguida centrifugava-se a 27.000 g (rotor SS-34) durante 20 minutos.

1.4. Precipitação por diálise contra  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  55% de saturação - O sobrenadante do tratamento pelo gel de fosfato foi colocado para diálise contra tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM, pH 6,5 contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  55% de saturação, durante 12 horas na câmara fria. O precipitado obtido por uma centrifugação a 27.000 g (rotor SS-34) durante 20 minutos, foi dissolvido com tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM, pH 6,5. Dialisava-se essa solução contra o mesmo tampão, durante mais ou menos 12 horas, antes do segundo fracionamento com sulfato de amônio.

1.5. Segundo fracionamento com Sulfato de Amônio - Após o primeiro fracionamento que teve como finalidade concentrar a proteína, o segundo foi efetuado com solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  100% de saturação, pH 6,5. A adição foi efetuada lentamente (durante mais ou menos 3 horas), até o aparecimento de ligeira turvação (50% de saturação de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). A concentração de proteína para essa precipitação deve ser em torno de 5 mg/ml para melhor rendimento e purificação. Após repouso de uma hora em banho de gelo, centrifugou-se e o sobrenadante foi levado a 60% de saturação, nas mesmas condições da precipitação anterior, deixando-se em repouso

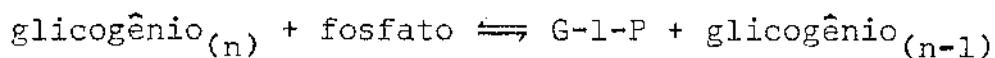
por mais 12 horas. A solução foi em seguida centrifugada a 27.000 g (rotor SS-34) durante 15 minutos, e o precipitado dissolvido em tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5.

1.6. Cromatografia em DEAE-celulose - Antes de ser submetida à cromatografia a solução de proteína obtida da precipitação a 60% de saturação de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi dialisada durante 3 a 4 horas contra tampão citrato 0,01M - EDTA 1 mM pH 6,5.

A fosforilase foi separada através de passagens sucessivas de soluções tampões de citrato, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1 e 0,5M contendo EDTA 1 mM pH 6,5 em uma coluna de DEAE-celulose de 180 mm de altura e 15 mm de diâmetro. Um volume de 1 ml era recolhido em cada tubo do coletor que já continha 1 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  100% de saturação pH 6,5. A fosforilase foi eluída da coluna com o tampão citrato 0,5M - EDTA 1 mM pH 6,5 e em seguida precipitada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido.

## 2. ENSAIO DA ATIVIDADE DA FOSFORILASE

2.1. Princípio - A atividade da fosforilase foi determinada pela quantidade de fosfato liberada a partir de glicose-1-fosfato (G-1-P) de acordo com CORI et al. (1955).



A reação acima, na qual foi baseada o ensaio da fosforilase, está deslocada "in vitro" para o sentido da síntese de glicogênio, isto é, para a esquerda. Determinou-se a quantidade de fosfato liberado pelo método de LOHMANN & JENDRASSIK (1926), onde o fosfomolibdato de amônio é reduzido pelo ácido amino-naftolsulfônico, resultando uma coloração, cuja leitura da absorbância foi efetuada a 660 nm.

2.2. Procedimento - A enzima convenientemente diluída foi incubada com o mesmo volume de uma solução tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5, contendo glicose-1-fosfato 0,03M e glicogênio 2%. Após 5 minutos de reação à temperatura ambiente, uma alíquota de

0,2 ml foi retirada e adicionada a 1 ml de TCA 10%. O precipitado obtido foi removido por centrifugação e 0,6 ml do sobrenadante foi adicionado a 5,0 ml de água. Efetuou-se a reação corada com a adição de 1,0 ml de molibdato de amônio 2,5% em  $H_2SO_4$  5N e 0,4 ml de ácido aminonaftolsulfônico. Após 7 minutos de reação a 37°C a absorbância foi determinada a 660 nm.

2.3. Unidade de fosforilase - Uma unidade de fosforilase foi determinada como a quantidade da enzima necessária para a formação de um micromol de fosfato, a partir de G-1-P, por minuto, nas condições descritas acima.

3. DOSAGEM DE PROTEINA - Foram utilizados tres métodos de dosagem de proteína, dependendo da quantidade nas preparações ou de presença de substâncias que interferiam em um determinado método.

3.1. Dosagem de proteína pela reação de biureto - O método de WEICHSELBAUM (1946), modificado por DITTERBRANDT (1948), é baseado na cor azul do complexo formado pelos ions  $Cu^{2+}$  com ligações peptídicas em meio alcalino.

Um volume de 1 ml da solução de proteína contendo de 20 a 400 ug de nitrogênio foi adicionado a 1,5 ml do reagente de biureto. Mantinha-se esta mistura a 37°C durante 30 minutos. A leitura da absorbância foi feita a 555 nm.

3.2. Dosagem de proteína pelo reagente de FOLIN-CIOCALTEAU (1927) modificado por LOWRY et al (1951) - Essa dosagem baseia-se na reação da proteína com ions de  $Cu^{2+}$  em meio alcalino e na redução do reagente fosfomolibdico - fosfotúngstico, pela tirosina e triptofano presentes na proteína tratada pelos reagentes anteriores, com consequente aparecimento da cor violeta, cuja absorbância é lida a 700 nm.

A 0,25 ml de uma solução de proteína (20 a 40 ug) foi adicionado 2,5 ml de uma mistura assim preparada: para cada 100 ml de uma solução contendo 52,7 g de  $Na_2CO_3 \cdot 10 H_2O$  e 0,4 g de NaOH, adicionava-se 1 ml de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,2% e 1,0 ml de tartarato de sódio e potássio 5%. Incubava-se a solução da proteína com a mistura acima

por 10 minutos à temperatura ambiente e depois adicionava-se 0,25 ml do reagente de fenol. Após 10 minutos de reação, fazia-se a leitura da absorbância a 700 nm.

3.3. Dosagem de Proteína por espectrofotometria - A concentração da proteína foi determinada neste método pelas leituras de absorbância em 280 nm e 260 nm e usando-se a equação de KALCKAR (1947).

$$\text{concentração de proteína (mg/ml)} = (1,55 \times A_{280m}) - (0,76 \times A_{260m})$$

4. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE SEDIMENTAÇÃO DA FOSFORILASE a DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO - A determinação do coeficiente de sedimentação da enzima foi realizado segundo métodos descritos por SHACHMAN (1957) e ALMEIDA (1973). A velocidade de sedimentação  $dr/dt$  de uma partícula em um campo gravitacional é função de seu peso, sua forma e da intensidade de campo exercida sobre ela.

$$\frac{dr}{dt} = sw^2 r \quad (\text{equação 1})$$

onde:

w = velocidade angular em radianos por segundo =  $\frac{2\pi \text{rpm}}{60}$

r = distância em centímetros do ápice do pico ao centro de rotação

s = coeficiente de sedimentação em segundos

t = tempo

Integrando-se a equação 1 e assumindo s constante para pequenas distâncias "dr", temos:

$$\int_{r_0}^r \frac{dr}{r} = sw^2 \int_0^t dt$$

portanto:

$$\log r = \log r_0 + \frac{w^2 \cdot s \cdot t}{2,303} \quad (\text{equação 2})$$

$r_0$  - é a posição do ápice do pico no tempo zero, que por convenção é a posição atingida quando o rotor atinge 2/3 da velocidade escolhida para a corrida.

De acordo com a equação 2 locando-se  $\log r$  contra  $t$ , obtem-se uma reta, cujo coeficiente angular  $\hat{e} = \frac{w^2 s}{2,303}$ , onde se pode calcular  $s$  a partir do valor conhecido de  $w$ .

4.1. Procedimento experimental - Fosforilase foi dialisada contra tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5 durante 24 horas. Amostras de diferentes concentrações de proteínas foram colocadas em células de alumínio ou de epon, de setor simples ou duplo, usando-se rotor tipo AN-D. A velocidade de rotação foi de 60.000 rpm e a temperatura de 10°C.

Usou-se sistema ótico "schlieren" para concentrações superiores a 1 mg/ml e o sistema de absorção no ultra-violeta para concentrações abaixo de 1 mg/ml da proteína.

As medidas dos deslocamentos dos picos foram efetuadas nas fotografias ampliadas de 5 a 15 vezes com um ampliador fotográfico.

4.2. Determinação do Fator de Ampliação e da Posição do Pico - A chapa fotográfica que se obtinha já era uma imagem ampliada pelo sistema ótico da ultracentrífuga. Para visualizar melhor o pico, isto é, para diminuir o erro na medida das distâncias dos deslocamentos dos picos, ampliava-se a imagem através de um ampliador fotográfico. Assim, as distâncias medidas eram afetadas por estes dois fatores de ampliação.

Tomando-se como referência a Figura 1, que é uma imagem típica de uma sedimentação, visualizada através do sistema ótico "schlieren" temos:

a) Determinação do fator de ampliação (F) - A distância real entre a linha de referência interna ( $R_1$ ) e a externa ( $R_2$ ), linhas essas obtidas pelo contrapeso, é de 1,60 cm. Portanto, o fator de ampliação (F) será a distância medida em centímetros entre as duas linhas da fotografia ampliada dividida por 1,60 cm.

b) Determinação da posição do pico - Sendo,

$R_1P$  = distância em centímetros entre a linha interna de referência ao ápice do pico;

$R_1R_2$  = distância entre a linha de referência interna e externa;

F = fator de ampliação e igual a  $\frac{R_1R_2}{1,60}$ ;

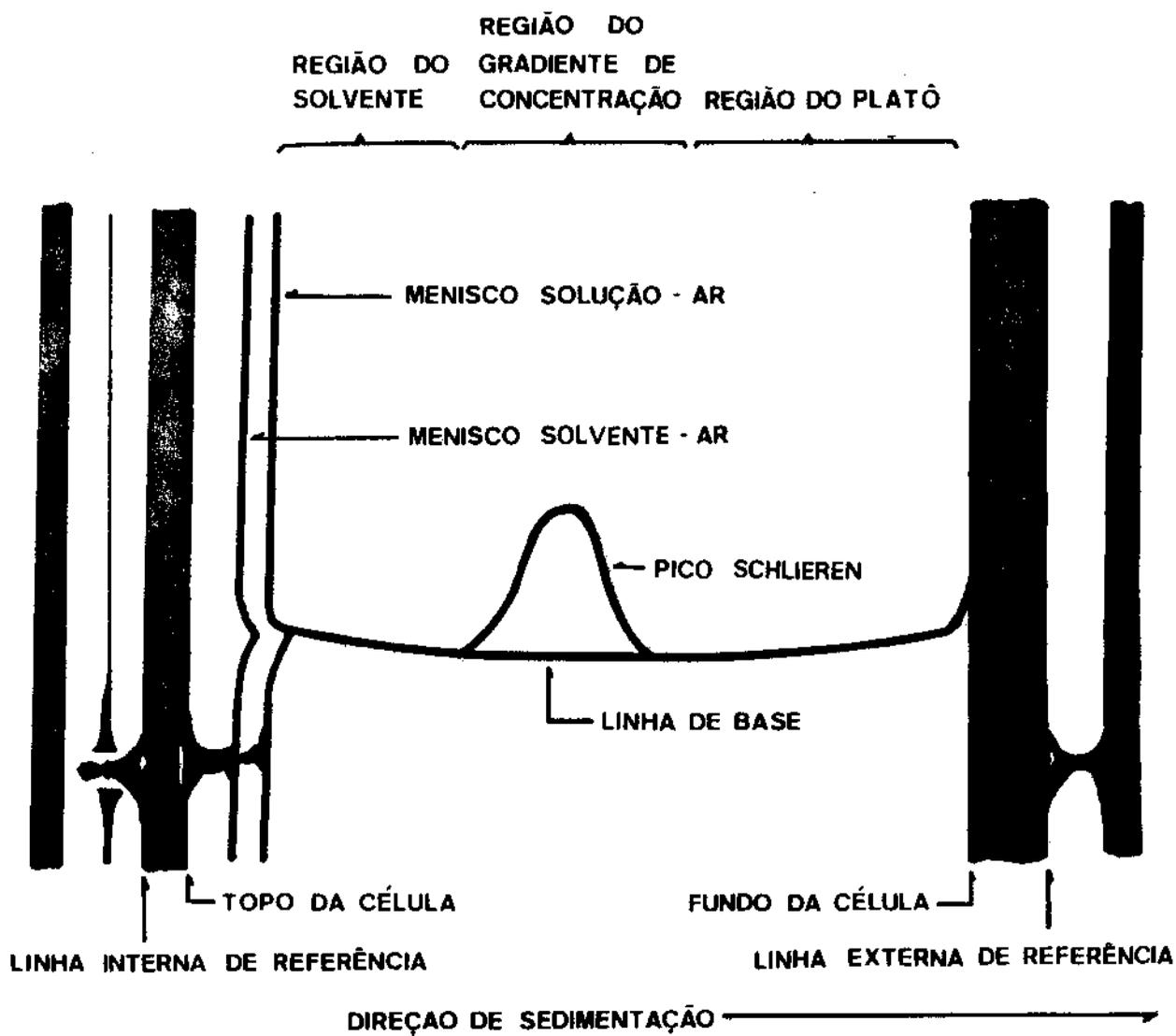


Fig. 1 - Imagem obtida com o sistema ótico "schlieren" em uma ultracentrífuga analítica.

r = distância real do ápice do pico ao centro de rotação.

Para a determinação da distância real do pico à linha interna de referência, a distância  $R_{1P}$  deve ser dividida pelo fator de ampliação (F), ou seja,  $\frac{R_{1P}}{F}$ .

A posição do pico deve ser dada em relação ao centro de rotação. A distância entre o centro de rotação e a linha interna de referência é de 5,70 cm, mas devido à elongação do rotor por ação da força centrífuga, esta distância deve ser acrescida de 0,02 cm. Dessa forma calculamos a distância real do pico ao centro de rotação (r):

$$r = \frac{R_{1P}}{F} + 5,72$$

4.3. Cálculo do coeficiente de sedimentação (s) - O logaritmo decimal das distâncias do pico ao centro de rotação foram locados contra o tempo. A inclinação da reta obtida foi calculada através da expressão:

$$b = \frac{n \cdot \Sigma x (t \cdot \log r) - \Sigma t \cdot \Sigma \log r}{n \Sigma t^2 - (\Sigma t)^2} \quad (\text{equação 3})$$

sendo:

b = inclinação da reta

n = número de pontos

t = tempo em minutos

O coeficiente de sedimentação foi calculado pela expressão abaixo proveniente da equação 2.

$$s = \frac{2,303}{60w^2} \times b \quad (\text{equação 4})$$

Os valores de  $\frac{2,303}{60w^2}$  são encontrados em tabelas de acordo com a velocidade usada na experiência.

Os coeficientes de sedimentação obtidos para as diferentes concentrações de proteína, foram corrigidos para a condição padrão de temperatura 20°C e para o solvente água, através da expressão:

$$S_{20w} = S_{obs} \left( \frac{\eta_t}{\eta_{20}} \right) \left( \frac{\eta_{sol}}{\eta_w} \right) \left( \frac{1 - \bar{V} \rho_{20w}}{1 - \bar{V} \rho_t} \right) \quad (\text{equação 5})$$

onde:

$S_{obs}$  = coeficiente de sedimentação obtido na experiência

$\frac{\eta_{sol}}{\eta_w}$  = viscosidade relativa do tampão de diálise da proteína em relação a água, na temperatura da experiência.

$\frac{\eta_t}{\eta_{20}}$  = viscosidade relativa da água na temperatura da experiência em relação a 20°C.

$\bar{V}$  = volume parcial específico da proteína.

$\rho_{20w}$  = densidade da água a 20°C.

$\rho_t$  = densidade do tampão de diálise da proteína na temperatura da experiência.

O coeficiente de sedimentação real ( $S_{20w}^0$ ) foi obtido colocando-se os valores de  $S_{20w}$  contra as concentrações de proteína e extrapolando-se a reta para a concentração zero. O ponto onde a reta se encontra com o eixo das ordenadas ( $S_{20w}^0$ ) foi calculado pelo método do Quadrado Mínimo.

5. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO - O método utilizado foi o da difusão livre, baseado na segunda lei de FICK.

$$\left( \frac{dc}{dt} \right)_x = D \left( \frac{d^2c}{dx^2} \right)_t$$

onde:

$\frac{dc}{dx}$  = gradiente de concentração

$c$  = concentração da proteína

$t$  = tempo de difusão

$D$  = coeficiente de difusão

$x$  = distância da difusão

A Figura 2 mostra o processo de difusão com o tempo, processo

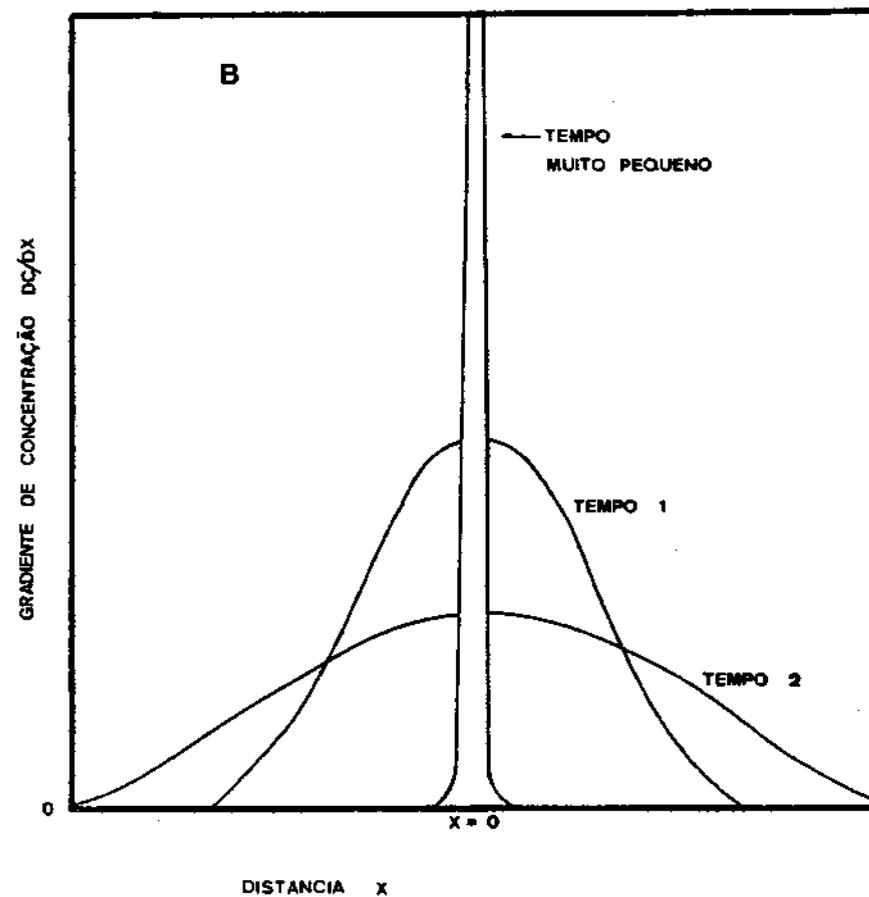
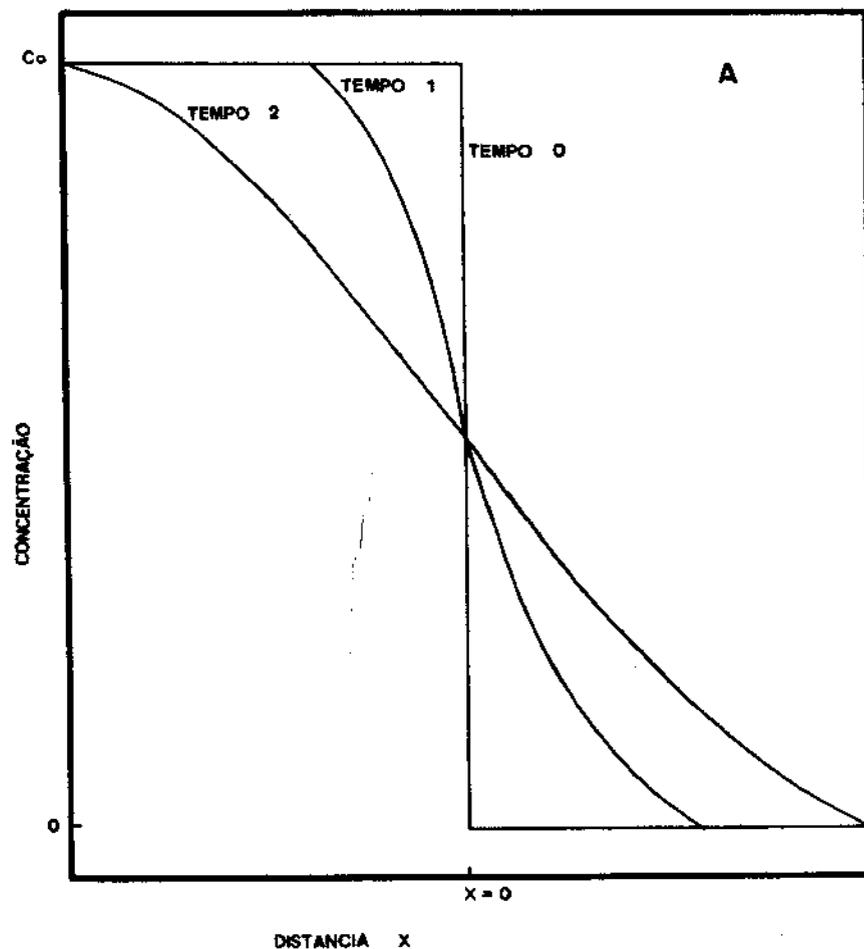


Fig. 2 - Esquema do processo de difusão de uma proteína na ultracentrífuga em função do tempo  
 A = distribuição da concentração de proteína em função da distância percorrida em tempos diferentes.  
 B = distribuição da concentração de proteína em função das distâncias em tempos diferentes, observada pelo sistema ótico "schlieren".

esse que foi medido pelo gradiente de refração. O gradiente do índice de refração é proporcional a  $\frac{dc}{dx}$  pelo sistema ótico "schlieren". Portanto, utilizou-se para o cálculo do coeficiente de difusão, o tratamento matemático de WERNIER da segunda lei de Fick (GUEDES, 1949).

$$\left(\frac{dc}{dx}\right)_t = -\frac{c}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad (\text{equação 6})$$

Como mostra a Figura 2,  $\frac{dc}{dx}$  atinge o seu valor máximo quando  $x = 0$  e a equação acima fica igual a

$$\left(\frac{dc}{dx}\right)_t = \frac{c}{\sqrt{4\pi Dt}}$$

Sabendo-se que o valor máximo de  $\frac{dc}{dx}$  corresponde à altura máxima e que a área do pico "schlieren" é proporcional a  $c$ , e portanto substituindo-se  $\frac{dc}{dx}$  e  $c$  respectivamente por  $H_{\max}$  (altura máxima) e  $A_{\text{schl}}$  (área do pico "schlieren"), temos da equação 6.

$$\left(\frac{A_{\text{schl}}}{H_{\max}}\right)^2 = D \cdot 4\pi t \quad (\text{equação 7})$$

Locando-se  $\left(\frac{A_{\text{schl}}}{H_{\max}}\right)$  contra o tempo, obtém-se uma reta cuja inclinação dividida por  $4\pi$ , fornece o coeficiente de difusão aparente (D).

5.1. Procedimento experimental - A célula da ultracentrífuga utilizada para a determinação do coeficiente de difusão foi do tipo capilar "synthetic boundary", de setor duplo e o rotor foi o AN-D. Fez-se a corrida a 6.000 rpm, na temperatura de 10,8°C e a difusão foi acompanhada pelo sistema ótico "schlieren".

As fotografias tiradas em tempos determinados foram ampliadas e os picos copiados em papel milimetrado para posterior determinação das áreas por integração gráfica, pelo método dos retângulos.

Os dados obtidos foram colocados numa tabela como segue:.

Somatória das alturas (h) dos retângulos	Fator de ampliação horizontal (F)	Altura máxima ( $H_{max}$ ) em cm	Área em $cm^2$ ( $A_{schl}$ )	$(\frac{A_{schl}}{H_{max}})^2 = y$	Tempo em segundos (t)
--	-----------------------------------	-----------------------------------	-------------------------------	------------------------------------	-----------------------

Desta forma, calculando-se a somatória das alturas (h) dos retângulos, o fator de ampliação horizontal (F) já descrito na página 17 e  $H_{max}$  dos picos, pode-se determinar  $A_{schl}$ , e desses dados obtem-se em seguida

$$y = \left(\frac{A_{schl}}{H_{max}}\right)^2$$

De acordo com a equação 7 obtem-se o coeficiente de difusão (D), utilizando-se os dados da tabela acima.

O coeficiente de difusão aparente (D) foi corrigido para as condições padrões (água a 20°C) de acordo com a expressão:

$$D_{20w} = D \left(\frac{293}{273+t}\right) \left(\frac{\eta_{solv}}{\eta_w}\right) \left(\frac{\eta_{tw}}{\eta_{20w}}\right) \quad (\text{equação 8})$$

onde

D = coeficiente de difusão aparente

t = temperatura na qual a experiência foi efetuada (°C)

$\frac{\eta_{solv}}{\eta_w}$  = viscosidade relativa do solvente para a água na temperatura da experiência

$\eta_{tw}$  = viscosidade da água na temperatura da experiência

$\eta_{20w}$  = viscosidade da água a 20°C.

6. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMINO-ÁCIDOS - Determinou-se a composição de amino-ácidos, realizando-se hidrólises ácidas com HCl 6N e ácido metanosulfônico (LIU, 1972) e para determinação dos amino-ácidos sulfurados, utilizou-se o método de oxidação com ácido perfórmico (HIRS, 1967). Os resíduos foram determinados pelo analisador automático (conforme descrito em Material e Métodos).

Para dosagem do triptofano usou-se o método espectrofotométrico de acordo com SPANDE & WITKOP (1967) e o método pelo analisador

de amino-ácidos após hidrólise com ácido metanosulfônico.

6.1. Hidrólise ácida com HCl 6N - Amostras contendo aproximadamente 0,5 a 1,0 mg de fosforilase foram colocadas num tubo de ensaio "pyrex" previamente estrangulado no terço superior, juntamente com 2 a 3 ml de HCl 6N. O tubo foi resfriado no gelo; borbulhou-se nitrogênio para a eliminação do ar e após vácuo, foi selado e colocado a  $110^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 20, 40 e 70 horas.

Após o tempo de hidrólise, a amostra foi secada sob pressão reduzida e o resíduo dissolvido em 0,5 ml de tampão citrato 0,2M pH 2,2. Essa solução foi em seguida colocada no analisador automático de amino-ácidos.

6.2. Hidrólise ácida com ácido metanosulfônico - Aproximadamente 2 mg de fosforilase, após diálise contra a  $\text{H}_2\text{O}$  foi liofilizada no próprio tubo de hidrólise.

A esse tubo adicionou-se 1 ml de ácido metanosulfônico 4N contendo 0,2% de 3, (2-aminoetil) indol - HCl e após 5  $\mu$  de pressão interna foi selado e colocado a  $110^{\circ}\text{C}$  durante 22 horas. Após esse tempo de hidrólise adicionou-se 1 ml de NaOH 3,5N e completou-se o volume para 5 ml com tampão citrato de sódio pH 2,2 contendo 30% de polietileno glicol. Um volume de 1 ml foi usado para a coluna curta e o mesmo volume para a coluna longa do analisador de amino ácidos.

6.3. Determinação dos amino-ácidos sulfurados - A fosforilase foi oxidada pelo ácido perfórmico segundo a técnica de HIRS (1967) e após hidrólise ácida (HCl 6N) de 22 horas a cisteína e cistina foram determinadas como ácido cisteico e a metionina como metionina sulfona, pelo analisador de amino-ácidos.

6.3.1. Oxidação com ácido perfórmico - O ácido perfórmico foi preparado tomando-se 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30%, mais 9 ml de ácido fórmico 88%. Agitava-se e deixava-se à temperatura ambiente por uma hora.

Aproximadamente 2,0 mg de fosforilase foi dissolvida em 1 ml de ácido perfórmico preparado recentemente. O tempo de oxidação foi de 4 horas em banho de gelo, depois adicionou-se 0,15 ml de ácido

bromídrico 48% a 0°C para a eliminação do excesso do oxidante.

Em seguida o tubo foi conectado e um evaporador rotatório evaporando-se o solvente a 40°C.

O material seco, foi submetido a uma hidrólise ácida adicionando-se 0,5 ml de HCl 6N a 110°C durante 22 horas.

6.4. Determinação do triptofano por espectrofotometria. Método de SPANDE & WITKOP (1967) - Pequenas alíquotas de N-bromosuccinimida 0,01M foram adicionadas num volume conhecido de solução de fosforilase dissolvida em uréia 8M pH 3,8. Após cada adição, agitava-se suavemente, deixava-se em repouso pelo menos durante 10 minutos e lia-se absorvância a 280 nm. O reagente oxida o triptofano a um produto denominado oxindol, causando uma diminuição da absorvância e portanto, encerrava-se a adição do reagente quando se notava um aumento de absorvância devido ao excesso de N-bromosuccinimida que provocava a adição de bromo no oxindol. Para cálculo do número de resíduos de triptofano usou-se a seguinte expressão:

$$n = \frac{\Delta A_{280} \times 1,31 \times P.M. \times V}{p \times 5500} \quad (\text{equação } 9)$$

onde

n = número de resíduos de triptofano por mol da proteína

$\Delta A_{280}$  = diferença entre absorvância inicial da solução e a mínima obtida após adição de N-bromosuccinimida. Essa diferença é corrigida da diluição sofrida em consequência da adição de N-bromosuccinimida.

V = volume inicial da solução titulada

p = peso seco da proteína titulada (mg)

P.M. = peso molecular da proteína

5500 = coeficiente de extinção molar do triptofano a 280 nm

1,31 = fator empírico necessário para corrigir o valor de  $A_{280}$  nm devido ao fato de que também o oxindol formado absorve luz a 280 nm.

6.5. Determinação do triptofano em Analisador de amino-ácidos - A determinação de resíduos de triptofano foi realizada também por hidrólise ácida com ácido metanosulfônico tal como descrito em 6.2.

6.6. Cálculo da concentração dos amino-ácidos - Através dos cromatogramas obtidos da análise dos amino-ácidos, a concentração dos mesmos foi calculada usando-se a seguinte equação:

$$\mu\text{moles} = \frac{H.W}{C_{H.W}} \quad (\text{equação 10})$$

onde

H = altura líquida de cada pico

W = número de pontos na metade superior do pico

$C_{H.W}$  = constante característica de cada amino-ácido, calculado de um cromatograma padrão (quantidades conhecidas de cada amino-ácido).

7. DETERMINAÇÃO DO VOLUME PARCIAL ESPECÍFICO - O volume parcial específico da fosforilase foi calculado a partir da composição de amino-ácidos, considerando o volume parcial específico de cada resíduo, de acordo com o método de COHN & EDSALL (1943).

$$\bar{V} = \frac{(W_i \times V_i)}{W_i} \quad (\text{equação 11})$$

onde

$\bar{V}$  = volume parcial específico da proteína

$V_i$  = volume parcial específico de cada resíduo de amino-ácido

$W_i$  = porcentagem em peso do amino-ácido  $i$  na proteína.

8. OBTENÇÃO DA FOSFORILASE-FOSFATASE DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO (de acordo com STREHLAU et al., 1973) - A levedura seca usada neste processo foi obtida, conforme descrito na página 11, e foi homogenizada com água (na proporção de uma grama para 3 ml de água) e colocada para autolisar durante 3 horas e meia, num banho-maria a 37°C.

O autolisado foi centrifugado a 27.000 g (rotor SS-34) durante 15 minutos e ao sobrenadante (extrato bruto) após diálise contra água, durante 20 horas, adicionou-se lentamente uma solução de sulfato de protamina 2,5% na proporção de 1:10 (v/v com o sobrenadante). Centrifugou-se a 27.000 g (rotor SS-34) durante 15 minu-

tos e o precipitado foi eluido duas vezes com o tampão citrato 0,1M EDTA 10 mM pH 6,5. O volume do tampão usado para cada eluição foi 1/10 do volume do extrato bruto.

O eluato foi tratado em seguida com gel de fosfato envelhecido, na proporção de 1 ml do gel (0,043 mg/ml) para 1 mg de proteína, após ter acertado o pH do eluato para 6,0 com ácido acético. Essa precipitação se prolongava por mais uma hora, com agitação e em banho de gelo.

Em seguida centrifugava-se a 27.000 g (rotor SS-34) durante 30 minutos e o sobrenadante foi concentrado por uma diálise à vácuo a 4°C. A solução obtida foi dialisada contra EDTA 1 mM pH 7,5, durante 12 horas.

9. ENSAIO DA FOSFORILASE-FOSFATASE - Usualmente incubava-se nos ensaios para medir atividade da fosforilase-fosfatase, ou para obtenção da fosforilase inativa, 1 mg de fosforilase de levedura (100 a 500 unidades) com 0,05 mg de fosforilase-fosfatase de levedura, em uma solução de concentração final de Tris 0,05M - pH 7,5 (ajustado com HCl) - EDTA 5 mM, a 30°C.

A atividade da fosforilase-fosfatase era efetuada determinando-se a atividade fosforilásica do substrato, em alíquotas retiradas da incubação após diferentes tempos. Ao mesmo tempo fazia-se uma incubação nas mesmas condições, porém na ausência da enzima.

Após a inativação total da fosforilase obtinha-se a fosforilase inativa por precipitação, pela adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido até saturação 100%.

10. ENSAIO DA FOSFORILASE b QUINASE DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO SOBRE FOSFORILASE b DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO (KREBS & FISCHER 1952)

10.1. Ativação da fosforilase b quinase - 10  $\mu$ l de fosforilase b quinase (6,0 mg/ml) era incubada com 10  $\mu$ l de uma solução contendo ATP 0,018M,  $\text{Mg}^{2+}$  0,06M pH 7,0 e 10  $\mu$ l de uma solução tampão

de  $\beta$ -glicero-fosfato - Tris 0,125M pH 8,6, durante 30 minutos a 37°C.

Após esse tempo a reação era interrompida com a adição de 1 ml de  $\beta$ -mercapto-etanol 0,015M pH 8,6.

10.2. Atividade da fosforilase b quinase sobre a fosforilase inativa de levedura - A reação da ativação da fosforilase inativa de levedura de cervejeiro foi realizada incubando-se volumes iguais de: fosforilase-quinase ativada, fosforilase inativa, solução de ATP 0,018M,  $Mg^{2+}$  0,06M pH 8,5. A ativação foi acompanhada pela dosagem da atividade fosforilásica.

11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA - A acrilamida foi polimerizada de acordo com o método de ORNSTEIN & DAVIS (1963), modificado por DAVIS et al. (1967) em tubos de vidro de dimensões 6x80 mm.

O gel de poro pequeno continha acrilamida 5%, N,N' - metilenobisacrilamida 0,2% em tampão TRIS-HCl 0,006M, pH 7,9 (algumas vezes a quantidade de cloreto na forma de NaCl foi aumentada 10 vezes), e polimerizava-se com 0,2 ml de persulfato de amônio (120 mg/ml) e 0,1 ml de N,N,N',N' - tetra-metil-1,2-diamino-etano (TEMED) diluído 10 vezes para cada 10 ml da solução acima.

O gel de poro grande, constituído de acrilamida 3%, N,N'-metileno bisacrilamida 0,75% em tampão imidazol - HCl 0,006M (quando se desejava bandas bem estreitas, aumentava-se 10 vezes a quantidade de ions  $Cl^{-}$ ) pH 5,8, foi polimerizado misturando-se a essa solução, persulfato de amônio e TEMED nas mesmas condições acima.

O gel de poro grande polimerizava-se sobre o gel de poro pequeno, numa altura correspondente a 1/10 da altura do gel de poro pequeno.

A proteína num volume de 10 a 20  $\mu$ l (20-30  $\mu$ g) foi diluída em 50  $\mu$ l de tampão imidazol - HCl 0,06M pH 5,8 contendo glicerol 25% e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,015M e colocada sobre o gel de poro grande. Tampão TRIS-asparagina 0,035M pH 8,0 foi utilizado nas cubas de eletroforese, e a migração foi visualizada pela adição de azul de

bromo-fenol 0,00004% na cuba de polo negativo. Para cada tubo passava-se uma corrente constante de 2 mA até que o indicador migrasse pelo menos 60 mm no gel de poro pequeno.

Os geles foram removidos dos tubos e tratados com ácido tricloroacético 10% por 30 minutos e depois a proteína foi corada com solução de ácido acético 7% contendo negro de amido a 0,5%, durante 10 a 20 minutos. O excesso do corante foi removido por lavagens com ácido acético 7%. Para a determinação da atividade fosforilásica, os geles foram incubados a 30°C numa solução contendo glicose-1-fosfato 0,03M,  $\text{CaCl}_2$  0,2M, dextrina 5% e maleato de sódio 0,05M, pH 6,5. Em seguida os geles foram mergulhados numa solução contendo TRIS-Maleato 0,08M e  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  0,003M, pH 7,0 durante uma hora à temperatura ambiente, para depois serem lavados com água destilada, durante mais ou menos 20 horas. A atividade da fosforilase foi detectada pelo aparecimento de bandas de cor preta (PbS), quando os geles foram colocados em solução de sulfeto de amônio 5%, durante 5 minutos.

Foram realizadas eletroforeses em diferentes concentrações de gel de poli(acrilamida), segundo o método de HEDRICK & SMITH (1968), para o estudo do comportamento molecular da fosforilase tratada e não tratada por fosforilase-fosfatase de levedura.

Para a formação de gel de poro pequeno de concentração de 10% foram adicionados 1,0 g de acrilamida e 0,04 g de bisacrilamida, para 10 ml de tampão TRIS-HCl 0,006M pH 7,9. As outras concentrações de gel de poro pequeno (4, 5, 6 e 7%) foram obtidas por diluição dessa solução de 10% de gel. Cada polimerização era feita na presença de persulfato de amônio e TEMED conforme descrito para os geles a 5% de acrilamida.

## 12. Métodos estatísticos

12.1. O Método do Quadrado Mínimo - O método utilizado para o cálculo da inclinação da reta, tanto para as experiências de determinação do coeficiente de sedimentação e difusão como para a determinação aproximada do peso molecular nas experiências de eletroforese em gel de poli(acrilamida), foi o do Quadrado Mínimo.

Usou-se a seguinte expressão:

$$b = \frac{n \Sigma(x \cdot y) - \Sigma x \cdot \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} \quad (\text{equação 12})$$

onde

b = inclinação da reta

n = número de pontos

x = valores das abcissas

y = valores das ordenadas

12.2. Cálculo do desvio padrão - Para o cálculo do Desvio Padrão foi utilizada a seguinte equação:

$$\sigma_a = \sqrt{\frac{1}{n-1} \Sigma(a_i - \bar{a})^2} \quad (\text{equação 13})$$

onde

$\sigma_a$  = desvio médio do valor a

n = número de pontos

$a_i$  = diferentes valores de a

$\bar{a}$  = valor médio de a

## RESULTADOS

### 1. Propriedades físico-químicas da fosforilase $\alpha$ de levedura de cervejeiro (*Saccharomyces cerevisiae*)

A fosforilase  $\alpha$  purificada extensivamente pelo método descrito no capítulo Material e Métodos, foi submetida a uma série de experiências com a finalidade de se estabelecer suas propriedades físico-químicas. Essas propriedades possibilitaram não só o estabelecimento de constantes físico-químicas e peso molecular, como também contribuíram como critério de pureza da enzima.

#### 1.1. Determinação do coeficiente de sedimentação de fosforilase $\alpha$ de levedura

Essas determinações foram feitas utilizando-se solução de fosforilase exaustivamente dialisada contra tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5. A partir de uma solução de concentração 1,43 mg/ml (peso seco), a solução foi diluída convenientemente para se determinar o coeficiente de sedimentação em diferentes concentrações da proteína. Em todas essas experiências, a ultracentrífuga Spinco modelo E, foi adicionada a uma velocidade de 56.000 rpm, mantendo-se o rotor à temperatura de 10°C. A solução de fosforilase foi colocada num dos setores de uma célula de duplo setor e o tampão de diálise no outro.

Quando o rotor atingia 2/3 da velocidade máxima (56.000 rpm), esse tempo foi considerado o tempo zero. Utilizando o sistema ótico "schlieren", fotografias foram batidas em intervalos regulares a partir do tempo zero.

A Figura 3 representa o perfil de ultracentrifugação da solução de fosforilase de concentração 1,43 mg/ml, batendo-se fotografias em intervalos regulares.

Através das fotografias ampliadas obteve-se os dados da Tabela I, que permitiram calcular as distâncias dos picos "schlieren" da proteína ao eixo de rotação, conforme descrito em Material e Méto

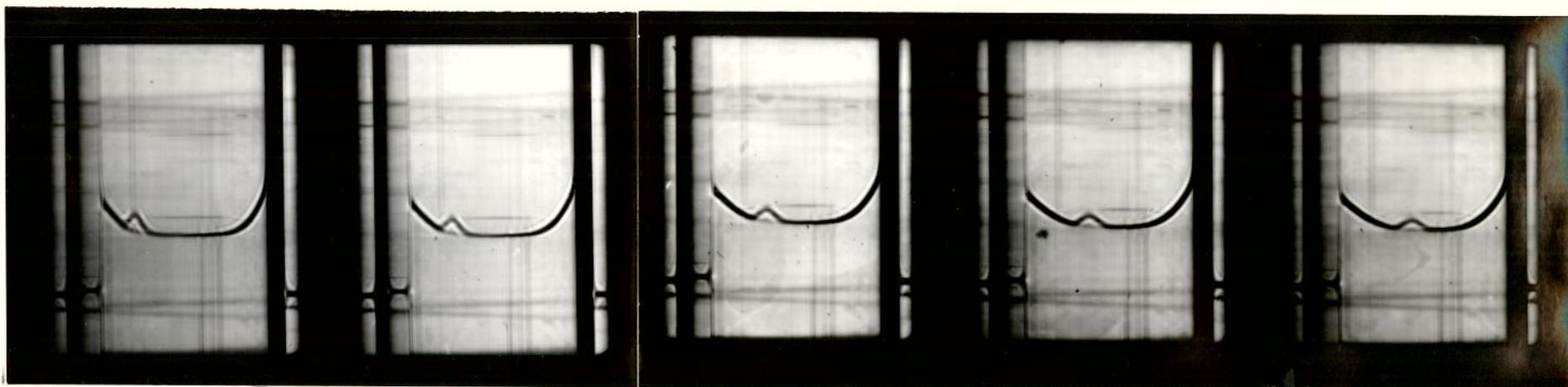


Fig. 3 - Processo de sedimentação de fosforilase a de levedura de cervejeiro (1,43 mg/ml). As chapas fotográficas representam os diagramas "schlieren" obtidos em diferentes tempos de centrifugação. Corrida feita a 56.000 rpm, a 10°C. As regiões em branco da fotografia acima correspondem às regiões em preto da chapa metalográfica. A direção da sedimentação é da esquerda para a direita.

TABELA I

Dados para o cálculo do coeficiente de sedimentação da fosforilase a de levedura de cervejeiro em tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5. Concentração de proteína: 1,43 mg/ml. A corrida de ultracentrifugação foi realizada a 56.000 rpm. na temperatura de 10°C.

Foto nº	R <sub>1</sub> P	R <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub> P/F	$\frac{R_1P}{F} + 5,72$ (r)	log r	Tempo em min. (t)	t <sup>2</sup>	t x log r
1	4,6	23,1	0,320	6,040	0,7810	7	49	5,4670
2	5,4	23,0	0,376	6,096	0,7850	15	225	11,7750
3	6,4	23,0	0,445	6,165	0,7899	23	529	18,1677
4	7,3	23,0	0,508	6,228	0,7944	31	961	24,6264
5	8,2	23,0	0,570	6,290	0,7986	39	1521	31,1454
6	9,3	23,0	0,647	6,367	0,8039	50	2500	40,1950
7	10,3	23,0	0,716	6,436	0,8086	58	3364	46,8988
8	11,2	23,0	0,779	6,499	0,8128	66	4356	53,6448
9	12,2	23,0	0,849	6,549	0,8175	74	5476	60,4950
10	13,1	23,0	0,911	6,631	0,8216	82	6724	67,3712
Soma					8,0133	445	25705	359,7863

Obs.: o significado dos dados dessa tabela encontra-se em Material e Métodos.

dos.

A partir do logarítmo das distâncias do pico "schlieren" ao centro de rotação ( $\log r$ ) e dos tempos em que as fotografias foram batidas, construiu-se um sistema de coordenadas cartesianas como mostra a Figura 4, onde se locou em ordenadas o  $\log r$  e em abcissas o tempo ( $t$ ).

Da reta obtida, calculou-se a inclinação da mesma, aplicando-se o método do Quadrado Mínimo, de acordo com a equação 12.

Substituindo-se os valores da Tabela I temos:

$$b = \frac{10 \times 359,7863 - 445 \times 8,0133}{10 \times 25705 - 445 \times 198025} = 5,412 \times 10^{-4}$$

Foi achado assim, o valor de  $5,412 \times 10^{-4}$  para a inclinação da reta. O produto do valor da inclinação da reta pelo fator  $\frac{2,303}{60w^2}$  (que como explicado anteriormente, e tem um valor de  $1,116 \times 10^{-9}$ ) representa o valor de  $S$  para a concentração de fosforilase de 1,43 mg/ml e é igual a  $6,04 \times 10^{-13}$  seg.

Esse valor foi corrigido para as condições padrões, isto é, para o solvente água e temperatura de 20°C, aplicando-se os valores da Tabela II à equação 5. Esta tabela representa os tempos de escoamento das soluções tampão obtidas nas temperaturas das experiências. Considerando-se o valor da densidade da solução tampão igual ao da água obtém-se:

$$S_{20w} = 6,04 \times 10^{-13} \left( \frac{338,1}{262,0} \times \frac{355,0}{338,1} \right) = 8,15 \times 10^{-13} \text{ seg}$$

De modo análogo, também foram calculados os valores de  $S_{20w}$  para as outras concentrações de proteína usadas.

A Tabela III, representa os valores de  $S_{20w}$  encontrados para as diferentes concentrações de fosforilase de levedura.

A Figura 5, representa os valores de  $S_{20w}$  locados num sistema de coordenadas cartesianas em relação à concentração da proteína ( $c$ )

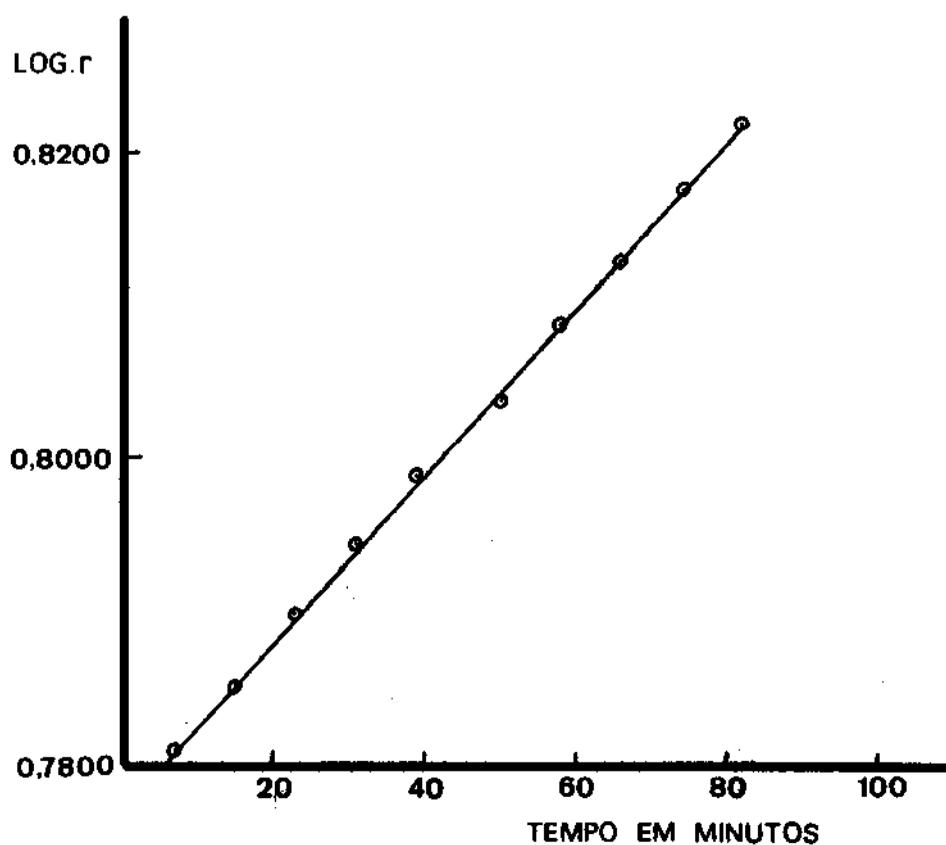


Fig. 4 - Variação do logaritmo da distância dos picos ao eixo de rotação ( $\log r$ ) em função do tempo ( $t$ ). Concentração de proteína utilizada: 1,43 mg/ml. Velocidade de sedimentação igual a 56.000 rpm à temperatura de 10°C.

TABELA II

Tempos de escoamento da água e das soluções tampão, medidos com o viscosímetro tipo Cannon-Fenske nas temperaturas das experiências de velocidade de sedimentação e difusão.

Temperatura	Solvente		
	Água	Tampão 1	Tampão 2
10,0°C	338,1 seg	-	355,0 seg
10,8°C	333,0 seg	353,6 seg	-
20,0°C	262,0 seg	-	-

Tampão 1 - tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5 de diálise do material, utilizado na determinação do coeficiente de difusão.

Tampão 2 - tampão de diálise (citrato 0,1M - EDTA  $10^{-3}$  pH 6,5) da proteína, utilizado na determinação da velocidade de sedimentação.

TABELA III

Coefficiente de sedimentação ( $S_{20w}$ ) obtido para diferentes concentrações de fosforilase e os valores da intersecção ( $a_i$ ) da reta ( $S_{20w}$  em função de cada concentração de proteína).

Concentração de fosforilase (mg/ml)	$S_{20w}$	Intercepto ( $a_i$ )
0,29	8,46	8,59
0,43	8,64	8,84
0,57	8,50	8,76
0,73	8,33	8,66
1,43	8,15	8,80

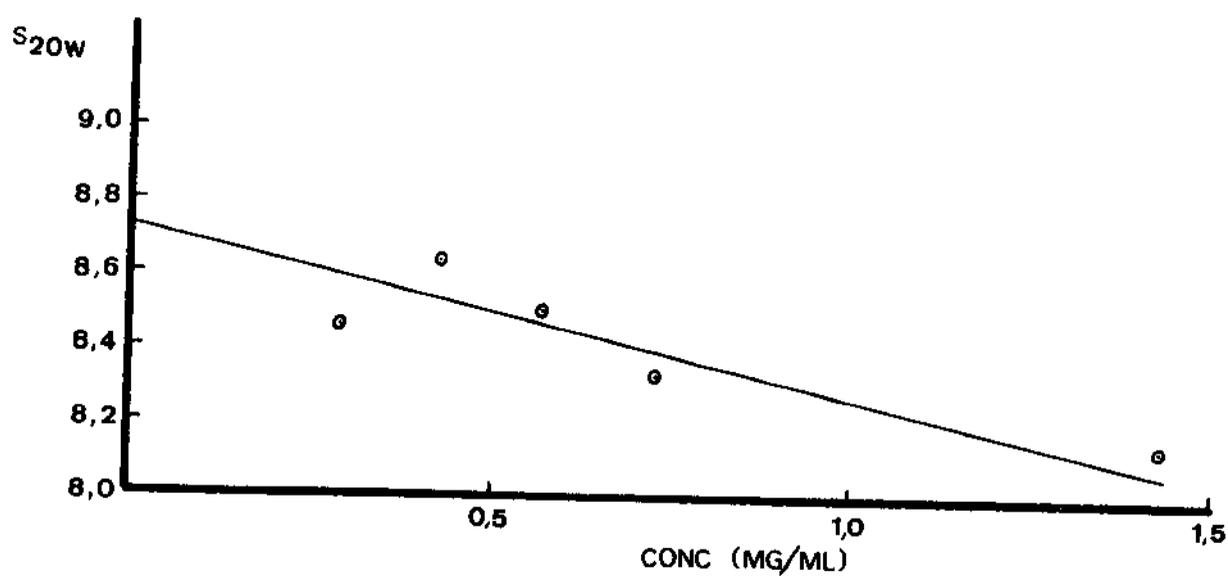


Fig. 5 - Determinação de  $S_{20w}^0$  da fosforilase a de levedura de cervejeiro a partir da variação de  $S_{20w}$  em função da concentração de proteína (c).

e a reta obtida pelo método do Quadrado Mínimo como descrito em Material e Métodos.

Calculado o valor da inclinação da reta, obteve-se a partir de cada par de valores ( $S_{20w}$  x c), um ponto de intersecção  $\bar{a}$ , no eixo das ordenadas, a partir da equação da reta  $a = y - bx$ .

O valor médio dos pontos de intersecção obtidos de cada par de valores ( $S_{20w}$  e c) foi achado:  $\bar{a} = 8,73 \times 10^{-13}$  seg.

A Tabela III também mostra os valores dos pontos de intersecção  $\bar{a}$  para as diferentes concentrações de proteína.

Desta forma obteve-se o valor de  $S_{20w}^0 = 8,73 \times 10^{-13}$  seg ou 8,73 svedbergs.

O desvio padrão da média, isto é, do valor de  $S_{20w}^0$ , foi obtido a partir da equação 13.

Assim, o valor de  $S_{20w}^0$  encontrado para a fosforilase  $\bar{a}$  de levedura, foi  $S_{20w}^0 = 8,73 \pm 0,10$  svedbergs.

## 1.2. Determinação do Coeficiente de Difusão da fosforilase $\bar{a}$ de levedura

Para se determinar o coeficiente de difusão, a enzima foi exaustivamente dialisada (54 horas) contra tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5.

A solução da enzima numa concentração de 2,16 mg/ml (peso seco), foi colocada numa célula especial tipo capilar "synthetic boundary" de duplo setor, que foi colocada no rotor previamente esfriado.

Uma velocidade de cerca de 6.000 rpm foi imprimida à centrífuga e a temperatura se mantinha a 10,8°C durante a experiência. Depois de mais ou menos 5 minutos houve a formação da fronteira proteína-solvente e uma primeira chapa foi batida.

No decorrer do processo de difusão, fotografias foram batidas em intervalos regulares de tempo.

A Figura 6, mostra uma série de chapas fotográficas reveladas, do processo de difusão, em diferentes tempos.

A partir das fotografias ampliadas como já descrito, as áreas dos picos do diagrama "schlieren" foram determinadas por integração gráfica, como mostra a Figura 7.

Com os dados obtidos das ampliações fotográficas foi construída a Tabela IV, que permitiu o cálculo das áreas e alturas máximas dos picos nos diferentes tempos. Locando-se num sistema de coordenadas cartesianas, o tempo em abcissas e  $(\frac{A}{H_{\max}})^2$  nas ordenadas obtém-se uma linha reta (Fig. 8) cuja inclinação foi determinada pelo método do Quadrado Mínimo.

Substituindo-se os dados apresentados na equação 12, obtém-se:

$$b = \frac{(4 \times 63,495) - (6360 \times 0,0307)}{(4 \times 13,51 \times 10^{16}) - 40,45 \times 10^6} = 4,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$$

O valor da inclinação da reta ( $4,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$ ) foi substituído na equação 7, obtendo-se:

$$D = \frac{4,32 \times 10^{-6}}{12,566} = 3,44 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg}$$

Portanto, obtivemos o coeficiente de difusão aparente da fosforilase  $\underline{a}$  igual a  $3,44 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg}$ .

Este número foi corrigido para as condições padrão (solvente=água e temperatura=20°C) levando-se em consideração a viscosidade da água e das soluções tampão expressas na Tabela II.

Nessas condições o  $D_{20w}$  da fosforilase  $\underline{a}$  de levedura pode ser calculado a partir da equação 8:

$$D_{20w} = 3,44 \times 10^{-7} \times \left(\frac{293,0}{293,8}\right) \times \left(\frac{353,6}{333,0}\right) \times \left(\frac{333,0}{262,0}\right) = 4,77 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg}$$

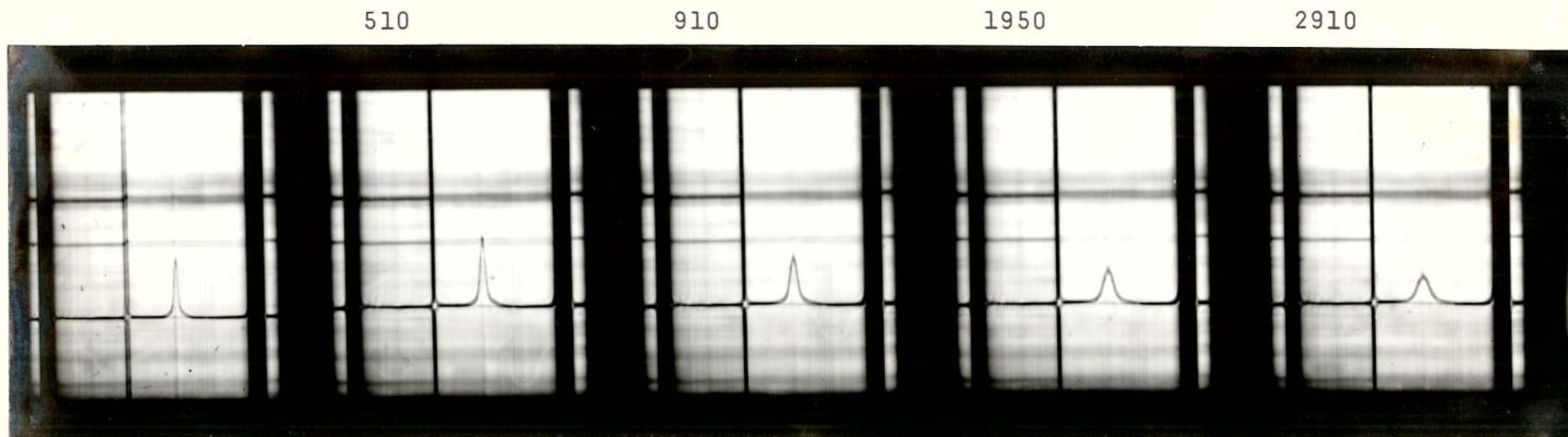


Fig. 6 - Difusão da fosforilase a de levedura de cervejeiro. As chapas fotográficas foram batidas nos tempos em segundos indicados acima.

A concentração de proteína foi de 2,16 mg/ml. Velocidade de rotação igual a 6.000 rpm e a Temperatura foi de 10,8°C.

DIFUSÃO DA FOSFORILASE DE LEVEDURA

FOTO N°5

$$\Sigma h = 37,40$$

$$F = \frac{29,70 \text{ cm}}{1,6} = 18,56$$

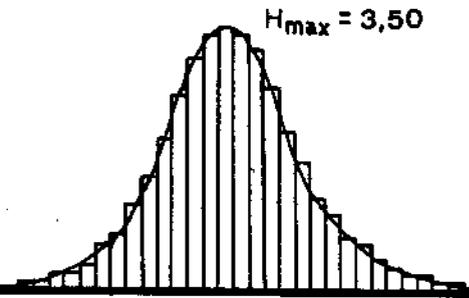


Fig. 7 - Integração gráfica do pico "schlieren" para a determinação da área pelo método dos retângulos, onde cada retângulo tem 0,20 cm de largura.

TABELA IV

Cálculo de dados necessários para determinação do coeficiente de difusão da fosforilase a de le vedura de cervejeiro em tampão citrato 0,1M EDTA 1 mM, pH 6,5.

Foto nº	Somatória das alturas(h) dos retângulos ( $\Sigma h$ )	Fator de ampliação horizontal (F)	Área (cm <sup>2</sup> ) $A = \Sigma h \times \frac{0,2}{F}$	Altura máxima: $H_{\max}$ (cm)	$(\frac{A}{H_{\max}})^2 \times 10^3 = y$	Tempo: t (seg)	t. y.
2	44,45	18,7188	0,4749	9,0	2,784	510	1,420
3	43,15	18,7500	0,4603	6,3	5,338	990	5,285
4	39,80	18,7188	0,4252	4,4	9,338	1950	18,209
5	37,40	18,5625	0,4030	3,5	13,258	2910	38,581
Soma					30,718	6360	63,495

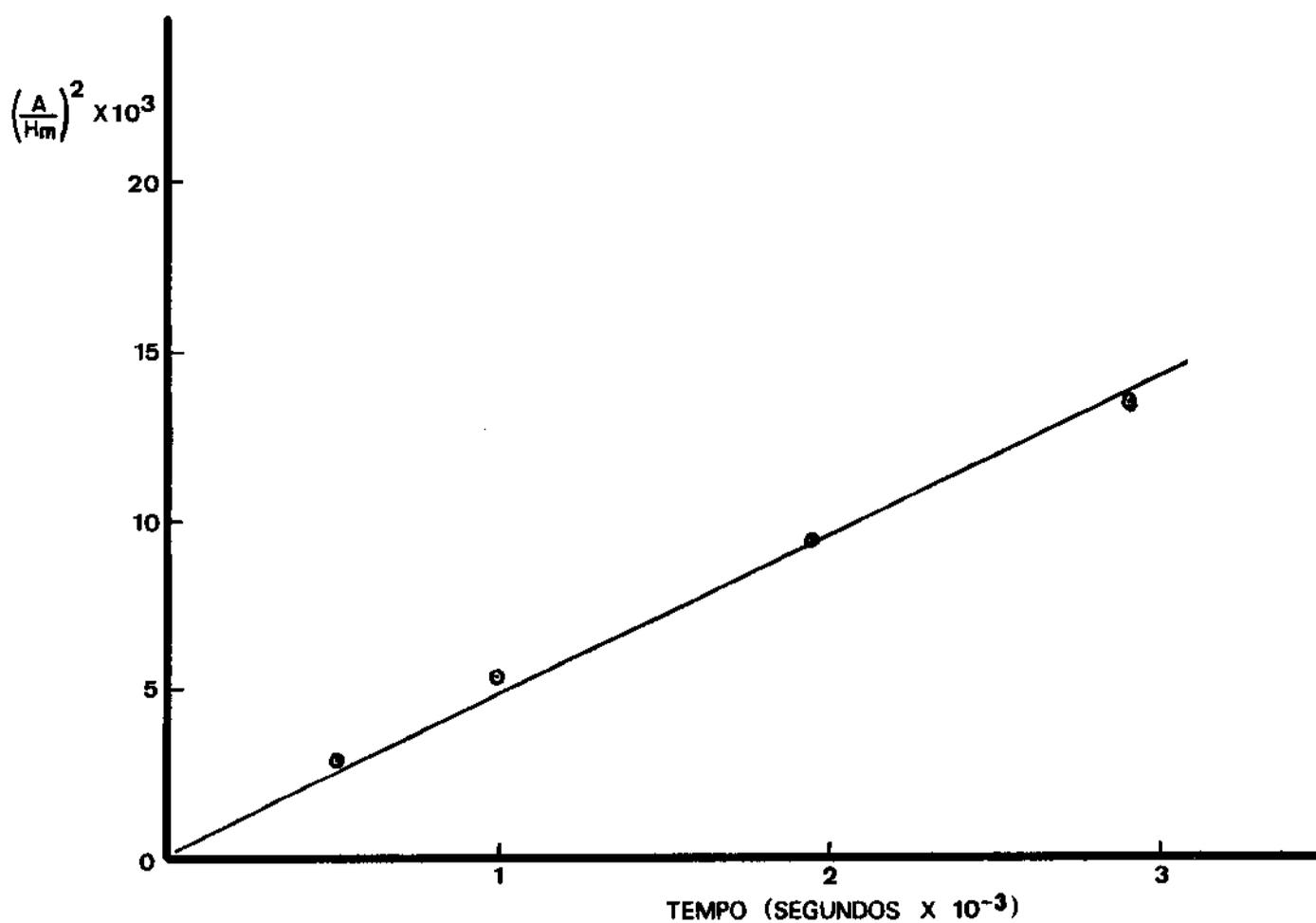


Fig. 8 - Variação de  $\left(\frac{A}{H_{\max}}\right)^2$  dos picos "schlieren" do processo de difusão da fosforilase a de levedura de cervejeiro, em função do tempo. Concentração de proteína igual a 2,16 mg/ml em tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5.

### 1.3. Determinação do volume Parcial Específico da fosforilase a de levedura

O volume parcial específico foi calculado a partir da composição de amino ácidos da proteína (cf. pág. 49).

A Tabela V mostra como foi calculado o volume parcial específico da fosforilase a, de acordo com o valor do volume parcial específico de cada amino ácido descrito por COHN & EDSALL (1943).

Substituindo-se na equação 11 os valores da tabela V obtem-se:

$$v = \frac{(W_i \times V_i)}{W_i}$$

$$\bar{V} = \frac{73,03}{100,08} = 0,73 \text{ cm}^3/\text{g}$$

### 1.4. Determinação do peso molecular da fosforilase a de levedura

O peso molecular (M) da enzima foi calculado de acordo com a equação de SVEDBERG:

$$M = \frac{RT \cdot S_{20w}^0}{D_{20w} (1 - \bar{V}\rho)} \quad (\text{equação 14})$$

Sabendo-se que:

$$S_{20w}^0 = 8,73 \times 10^{-13} \text{ seg}$$

$$D_{20w} = 4,77 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg}$$

$$\bar{V} \text{ (volume parcial específico) } = 0,73 \text{ cm}^3/\text{g}$$

$$R \text{ (constante dos gases) } = 8,314 \times 10^7 \text{ erg} \cdot \text{grau}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$T \text{ (temperatura) } = 293^\circ\text{K}$$

$$\rho \text{ (densidade da água a } 20^\circ\text{C) } = 0,9982 \text{ g/cm}^3$$

Temos,

$$M = \frac{8,314 \times 10^7 \times 293,2 \times 8,73 \times 10^{-13}}{4,77 \times 10^{-7} (1 - 0,73 \times 0,9982)} = 164.970$$

Portanto o peso molecular da fosforilase a de levedura de cervejeiro achado foi de 164.970 daltons.

TABELA V

Cálculo de dados necessários para determinação do volume parcial específico da fosforilase a de levedura, baseado na composição de amino-ácidos.

Amino-ácido	nº máximo de resíduos (A)	Peso Molecular dos resíduos (B)	A x B	W <sub>i</sub> (% em peso do resíduo)	V <sub>i</sub> <sup>*</sup> (volume específico do resíduo)	W <sub>i</sub> x V <sub>i</sub>
Lisina	3,7	128,2	474,3	6,356	0,82	5,212
Histidina	1,0	137,2	137,2	1,838	0,67	1,232
Arginina	2,4	156,2	374,9	5,024	0,70	3,517
Ác. Aspártico	9,7	115,1	1116,5	14,961	0,60	8,977
Treonina	2,2	101,1	222,4	2,980	0,70	2,086
Serina	4,1	87,1	357,1	4,785	0,63	3,015
Ác. Glutâmico	9,2	129,1	1187,1	15,915	0,66	10,504
Prolina	3,6	97,1	349,6	4,685	0,76	3,561
Glicina	4,2	57,1	239,8	3,213	0,64	2,056
Alanina	4,8	71,1	341,3	4,573	0,74	3,384
Cisteína	0,4	103,0	42,0	0,565	0,63	0,356
Valina	3,9	99,2	386,9	5,184	0,86	4,458
Metionina	0,8	131,3	105,0	1,056	0,75	0,792
Isoleucina	3,4	113,2	384,9	5,158	0,90	4,642
Leucina	6,8	113,2	769,8	10,315	0,90	9,284
Tirosina	2,7	163,2	440,6	5,904	0,71	4,192
Fenilalanina	2,7	147,2	397,4	5,325	0,77	4,100
Triptofano	0,9	186,0	167,4	2,243	0,74	1,660
Total			7485,0	100,082		73,026

(\*) Valores obtidos de COHN & EDSALL (1943).

### 1.5. Determinação da razão friccional da fosforilase a de levedura

O valor do coeficiente de fricção (f) foi calculado, utilizando a seguinte equação:

$$f = \frac{KT}{D_{20w}} \quad (\text{equação 15})$$

onde: K é a constante de Boltzman ( $1,38 \times 10^{-16}$  erg.grau<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>); T é a temperatura absoluta (293°K); N é o número de avogadro ( $6,023 \times 10^{23}$  mol<sup>-1</sup>) e  $D_{20w} = 4,77 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/seg.

Substituindo-se esses valores na equação 15, temos:

$$f = \frac{1,38 \times 10^{-16} \times 293}{4,77 \times 10^{-7}} = 84,77 \times 10^{-9}$$

O valor do coeficiente friccional mínimo ( $f_{\min}$ ), que é o coeficiente friccional que a proteína apresentaria se possuísse uma forma esférica, porem conservando o seu volume real, foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$f_{\min} = 6\pi \eta \left( \frac{3.M.\bar{V}}{4.N} \right) \quad (\text{equação 16})$$

onde:  $\eta$  é a viscosidade da água a 20°C (0,01 poise); M é o peso molecular (165.000 daltons);  $\bar{V}$  é o volume parcial específico (0,73 cm<sup>3</sup>/g)

Portanto:

$$f_{\min} = 63,1416 \times 0,01 \left( \frac{3 \times 165.000 \times 0,73}{4 \times 6,023 \times 10^{23}} \right) = 68,43 \times 10^{-9}$$

A relação entre o coeficiente de fricção (f) e o coeficiente de fricção mínimo ( $f_{\min}$ ), que indica o quanto a partícula se afasta da forma esférica, pode então ser calculado:

$$\frac{f}{f_{\min}} = \frac{84,77 \times 10^{-9}}{68,43 \times 10^{-9}} = 1,24$$

Dessa maneira, pode-se prever que a forma da molécula da fosforilase possua uma forma algo distante da esférica. Tal afastamento da forma esférica seria causado pelo grau de solvatação e/ou/ pela assimetria molecular. A influência do grau de solvatação e da assimetria sobre a forma da fosforilase pode ser avaliada a partir da equação abaixo:

$$\frac{f}{f_{\min}} = \frac{f}{f_0} \left( \frac{\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1}{\bar{V}_2} \right) \quad (\text{equação 17})$$

$\frac{f}{f_0}$  é a relação dos coeficientes friccionais considerando as moléculas completamente anidras, e representa uma medida da assimetria molecular;  $\bar{V}_2$  é o volume parcial específico da proteína e  $\bar{V}_1$  é do solvente e  $\delta_1$  é a quantidade de água de solvatação expressa por grama de proteína.

Os dados obtidos até o presente momento não nos permitiram calcular diretamente o grau de solvatação  $\delta_1$ , da proteína, portanto, foi calculado o grau de solvatação máximo de uma situação extrema da molécula, isto é, a molécula tendo uma forma completamente esférica.

Desta forma, se a molécula da fosforilase a fosse completamente esférica  $f/f_0$  seria igual a 1 e neste caso o valor de  $f/f_{\min}$  (=1,24), seria causado exclusivamente pelo grau de solvatação, que pode ser calculado pela equação abaixo:

$$f/f_{\min} = \left( \frac{\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1}{\bar{V}_2} \right)$$

o que nos permitiria calcular indiretamente  $\delta_1$ ,

$$(1,24)^3 = \frac{0,73 + \delta_1 \cdot 1,001}{0,73}$$

$$\delta_1 = 0,66 \text{ g/g}$$

Portanto, 0,66 g de água é a maior quantidade capaz de solvatar 1 grama de fosforilase.

Uma vez conhecido o grau de solvatação máximo, e, partindo-se do

princípio de que as proteínas não são totalmente solvatadas e nem altamente assimétricas, pode-se calcular a relação  $f/f_0$ , admitindo-se que a partícula em solução contenha a metade do seu valor máximo de solvatação, isto é, está somente 50% solvatada.

$$\text{No nosso caso } f/f_0 = 1,24 \times \left( \frac{0,73 + 0,33 \times 1,001}{0,73} \right)^{1/3} = 1,1$$

Considerando-se a forma de uma proteína como um elipsóide de revolução (prolato ou oblato),  $f/f_0$  é diretamente proporcional à relação entre o raio maior e menor do elipsóide ( $a/b$ ). Esse valor para cada proteína pode ser encontrado por interpolação gráfica, onde  $f/f_0$  está locada contra a relação axial ( $a/b$ ). Se a hipótese acima for próxima da realidade, a fosforilase corresponde a um oblato ou prolato com a relação axial = 2,8 (TANFORD, 1967).

#### 1.6. Cálculo do raio de Stokes da Fosforilase a de levedura de cervejeiro

O raio de Stokes da fosforilase foi calculado usando a expressão:

$$R_e = f/6\eta \quad (\text{equação 18})$$

$f$  = coeficiente de fricção

$\eta$  = viscosidade do solvente

Substituindo os valores já conhecidos na equação 18, obtem-se:

$$R_e = \frac{84,77 \times 10^{-9}}{6 \times 3,1416 \times 0,01} = 0,045 \times 10^{-5} \text{ cm} = 45 \text{ \AA}$$

Assim, o raio de Stokes calculado para a fosforilase a de levedura de cervejeiro foi de 45 Å.

#### 1.7. Determinação do coeficiente de absorção $A_{280}^{1\%}$ de fosforilase a de levedura de cervejeiro

Para se determinar o valor de  $A_{280}^{1\%}$ , uma solução de fosforilase foi extensivamente dialisada, contra água destilada durante cinco

dias com várias trocas de água da diálise.

A absorvância da solução foi determinada no espectrofotômetro modelo Beckman DU-2 a 280 nm de comprimento de onda. Tal solução revelou uma absorvância de 0,530. Uma alíquota da solução dialisada foi colocada em estufa a 110°C e várias pesagens foram executadas até obtenção de peso constante.

Por cálculo conveniente encontrou-se que uma solução de fosforilase com 0,41 mg/ml de proteína (peso seco) apresentava a absorvância de 0,530.

Dessa forma o valor resultante de  $A_{280}^{1\%}$  foi de 12,9.

## 2. Determinação da Composição de Amino-Ácidos de Fosforilase a de levedura de cervejeiro

### 2.1. Hidrólise ácida com HCl 6N

O produto de hidrólise ácida (HCl 6N) foi cromatografado utilizando-se analisador automático de amino-ácidos.

A Figura 9 representa uma cromatografia de 40 horas onde se usou o hidrolisado ácido (HCl 6N) de 0,5 mg de fosforilase.

A Tabela VI foi composta a partir do cromatograma. O número de  $\mu$ moles de cada amino-ácido foi calculado a partir da equação 10, e o número provável de resíduos de amino-ácidos foi calculado considerando a histidina, o amino-ácido em menor quantidade como referência e igual a um resíduo.

O número máximo de resíduos de amino-ácidos da fosforilase foi calculado em tempos diferentes de hidrólise (20, 40 e 70 horas), para avaliação do peso molecular mínimo que foi de 7180. A Tabela VII, mostra esses resultados, mas não estão incluídos nesta tabela, os resultados de resíduos de cisteína, metionina e triptofano.

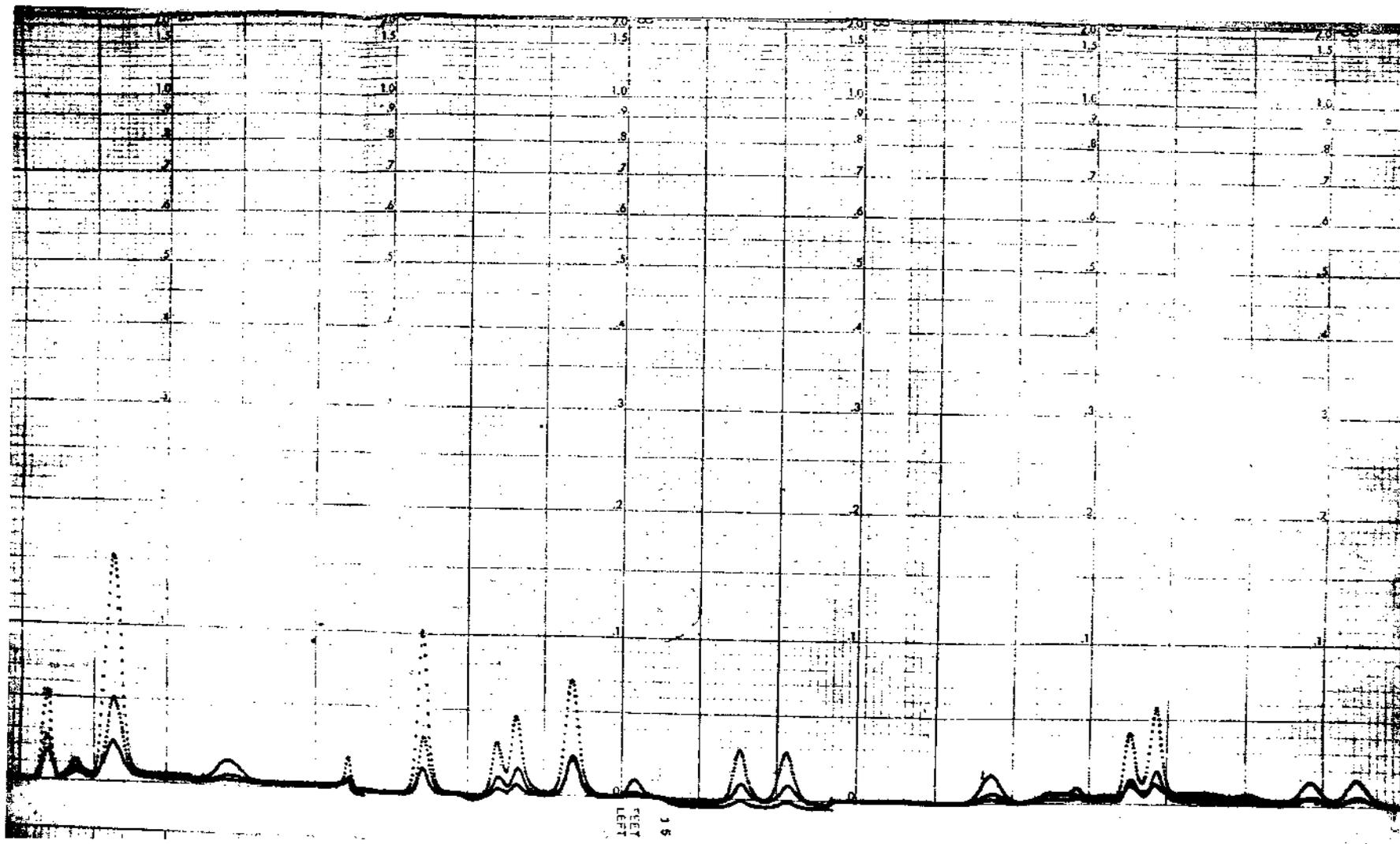


Fig. 9 - Cromatografia da hidrólise ácida (HCl 6N) da fosforilase a de levedura de cervejeiro. Tempo de hidrólise foi de 40 horas à temperatura de 110°C.

TABELA VI

Número de  $\mu$ moles de cada amino-ácido e o número provável de resíduos calculados tomando como referência unitária a histidina. Hidrólise ácida (HCl 6N) de 40 horas a  $110 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Amino-ácido	Linha de Base	Altura	Meia altura	Altura líquida (H)	Número de pontos (W)	H x W	$\frac{\mu\text{moles}}{C_{HxW}}$	$C_{HxW}$	número provável de resíduos
Lisina	0,001	0,053	0,027	0,052	14,3	0,744	40,5	0,018	4,0
Histidina	0,002	0,011	0,006	0,009	21,0	0,189	35,9	0,005	1,0
Amonia	0,004	0,153	0,078	0,149	23,2	3,457	34,3	0,101	20,0
Arginina	0,003	0,014	0,009	0,011	33,0	0,363	33,7	0,011	11,0
Aspártico	0,001	0,102	0,051	0,101	14,6	1,475	30,6	0,048	10,0
Treonina	0,005	0,030	0,017	0,025	15,0	0,375	33,8	0,011	2,0
Serina	0,007	0,047	0,027	0,040	14,5	0,580	28,5	0,203	4,0
Ác. Glutâmico	0,001	0,070	0,035	0,069	19,3	1,332	28,9	0,460	9,0
Prolina	0,000	0,010	0,005	0,010	20,0	0,200	12,0	0,166	3,0
Glicina	-0,002	0,028	0,013	0,030	19,3	0,579	30,3	0,019	4,0
Alanina	-0,002	0,027	0,012	0,029	23,0	0,661	29,3	0,023	5,0
Valina	0,000	0,017	0,008	0,017	28,0	0,476	27,7	0,017	3,0
Isoleucina	0,008	0,042	0,025	0,034	15,4	0,524	32,1	0,016	3,0
Leucina	0,008	0,058	0,033	0,050	16,5	0,825	30,1	0,027	5,0
Tirosina	0,002	0,014	0,008	0,012	26,0	0,312	27,8	0,011	2,0
Fenilalanina	0,002	0,015	0,008	0,013	28,0	0,364	28,9	0,012	2,0

TABELA VII

Determinação do peso molecular mínimo da fosforilase a de levedura de cervejeiro, através dos números máximos de resíduos, obtidos em diferentes tempos de hidrólise ácida (HCl 6N) a 110°C.

Amino-ácidos	número de moles			número calculado de resíduos			nº máximo de resíduos (A)	P. molecular dos resíduos (B)	A x B
	20 h	40 h	70 h	20 h	40 h	70 h			
Lisina	-	0,018	0,026	-	3,6	3,7	3,7	128,0	474,3
Histidina	-	0,005	0,002	-	1,0	1,0	1,0	137,2	137,2
Amonia	-	0,101	0,099	-	20,0	14,1	20,0	-	-
Arginina	-	0,011	0,017	-	2,2	2,4	2,4	156,2	374,9
Ác. Aspártico	0,057	0,048	0,057	9,7	9,6	8,1	9,7	115,1	1116,6
Treonina	0,012	0,011	0,012	2,0	2,2	1,7	2,2	101,1	222,4
Serina	0,024	0,020	0,021	4,1	4,0	3,0	4,1	87,1	357,1
Ác. Glutâmico	0,053	0,046	0,053	9,0	9,2	7,6	9,2	129,1	1187,7
Prolina	0,024	0,017	0,025	3,5	3,2	3,6	3,6	97,1	349,6
Glicina	0,025	0,019	0,025	4,2	3,8	3,6	4,2	57,1	239,8
Alanina	0,028	0,023	0,027	4,8	4,6	3,9	4,8	71,1	341,3
Valina	0,023	0,017	0,025	3,9	3,4	3,6	3,9	99,2	386,9
Isoleucina	0,020	0,016	0,021	3,4	3,2	2,0	3,4	113,2	384,9
Leucina	0,040	0,027	0,037	6,8	5,0	5,3	6,8	113,2	769,8
Tirosina	0,016	0,011	0,016	2,7	2,0	2,3	2,7	163,2	440,6
Fenilalanina	0,017	0,012	0,017	2,7	2,0	2,4	2,7	147,2	397,4
Soma	-	-	-	-	-	-	-	-	7180,0

## 2.2. Hidrólise ácida (HCl 6N) após oxidação com ácido perfórmico

A proteína oxidada pelo ácido perfórmico e depois hidrolisada na presença de HCl 6N apresentou os amino-ácidos sulfurados (cisteína, cistina e metionina) na forma de ácido cisteico e metionina sulfona, cujos números de resíduos por 100.000 g de proteína, estão na Tabela VIII.

TABELA VIII

Número de resíduos de amino-ácidos sulfurados\* e de triptofano\*\* por 100.000 g da fosforilase a de levedura de cervejeiro.

Amino-ácidos	nº de $\mu$ moles	nº provável de resíduos por 100.000 g
Cisteína	0,013	6,0
Metionina	0,018	11,0
Triptofano	0,021	13,0

\* Amino-ácidos obtidos por oxidação da proteína, com ácido perfórmico e após hidrólise pelo HCl 6N durante 22 horas a 110°C.

\*\* Amino-ácido obtido pela hidrólise com ácido metanosulfônico, durante 22 horas a 110°C.

## 2.3. Hidrólise ácida com ácido metanosulfônico

A determinação de resíduos de amino-ácidos da fosforilase a de levedura foi realizada também pela hidrólise na presença de ácido metanosulfônico, obtendo-se inclusive os resíduos de triptofano, já que durante a hidrólise ácida pelo HCl 6N, há destruição daquele amino-ácido. Os resíduos de triptofano obtidos estão na tabela VIII.

A Tabela IX mostra os resultados da hidrólise ácida pelo ácido metanosulfônico, após hidrólise de 22 horas a 110°C.

## 2.4. Determinação do triptofano por espectrofotometria

As leituras espectrofotométricas da solução de fosforilase a em uréia 8M pH 3,9 após adição de aliquotas de N-bromo-succinimida

TABELA IX

Hidrólise ácida da fosforilase a de levedura de cervejeiro com ácido metano-sulfônico durante 22 horas a 110°C. Cálculo do número provável de amino-ácidos por 100.000 g da proteína.

Amino-ácidos	Número de $\mu$ moles	Número de resíduos* (A)	P.M. dos resíduos (B)	A x B	Número provável de resíduos/100.000g
Lisina	0,077	4,0	128,2	512,8	68
Histidina	0,019	1,0	137,2	137,2	17
Arginina	0,045	2,4	156,2	374,9	40
Ác. aspártico	0,139	7,3	115,1	840,2	123
Treonina	0,038	2,0	101,1	202,2	34
Serina	0,067	3,5	87,1	304,8	59
Ác. Glutâmico	0,131	6,9	129,1	890,8	117
Prolina	0,050	2,6	97,1	252,5	44
Glicina	0,065	3,4	57,1	194,1	57
Alanina	0,074	3,9	71,1	277,3	66
Valina	0,059	3,1	99,2	307,5	52
Isoleucina	0,051	2,7	113,2	305,5	46
Leucina	0,105	5,5	113,2	622,6	93
Tirosina	0,039	2,0	163,2	326,4	34
Fenilalanina	0,049	2,6	147,2	384,7	44
Soma				5931,6	

\* O número de resíduos foi calculado, tomando como referência unitária a histidina.

0,01 M estão na Tabela X.

TABELA X

Variação de absorção a 280 nm da fosforilase a de levedura em uréia 8M pH 3,9 após reação com concentrações crescentes de N-bromo-succinimida.

$A_{280}$	$\mu\text{l}$ de N-bromo-succinimida 0,01M	Fator de diluição (f)	f x $A_{280}$	$\Delta A_{280}$
0,620	-	-	-	-
0,610	10	1,003	0,612	0,008
0,610	20	1,007	0,614	0,006
0,590	30	1,010	0,596	0,021
0,560	40	1,013	0,567	0,053
0,520	50	1,017	0,529	0,091
0,480	60	1,020	0,490	0,130
0,485	70	1,023	0,496	0,124
0,490	80	1,027	0,503	0,117
0,500	90	1,030	0,515	0,105
0,540	100	1,033	0,558	0,062

O volume inicial da solução de fosforilase foi de 3,0 ml, contendo 1,43 mg de proteína (peso-seco) e o número de resíduos de triptofano foi calculado para 100.000 g, de acordo com a equação 9

$$n = \frac{\Delta A_{280} \times 1,31 \times \text{P.M.} \times V}{p \times 5500}$$

onde

$$n = \frac{0,13 \times 1,31 \times 100.000 \times 3,0}{1,43 \times 5500} = 6,5$$

### 3. Evidências da existência de duas formas de fosforilase de levedura de cervejeiro

Estudos preliminares, em nosso laboratório, sugeriam a existência de duas formas de fosforilase. Desde os primeiros passos da purificação da fosforilase de levedura de cervejeiro acumulamos dados nesse sentido. Assim, no extrato bruto autolisado incubado a 0°C

verificou-se uma ativação da enzima, como mostra a Figura 10.

Na Figura 11 mostramos a ativação da enzima mais purificada conseguida na temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ , na presença de glicerol. Outra experiência que atesta o processo de ativação da enzima é mostrado na Figura 12, quando a solução da enzima foi dialisada contra tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5, contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  55% de saturação.

Por outro lado, verificamos que no precipitado resultante da centrifugação a 20.000 g do extrato bruto, existe um sistema catalisador da ativação da fosforilase ("enzima ativante"), ativado pelo ATP, sugerindo ser uma proteína quinase, como demonstramos na Figura 13.

Consideramos esses dados, embora preliminares, evidências importantes na comprovação da existência de duas formas de fosforilase na levedura de cervejeiro.

#### 4. Evidências de Diferenças em peso molecular das formas ativa e inativa de fosforilase de levedura de cervejeiro

Os achados de STREHLAU & FOCSI (1973), vieram contribuir significativamente nos estudos das formas de fosforilases de levedura de cervejeiro. Esses autores encontraram em extratos de levedura, a enzima fosforilase-fosfatase, capaz de catalisar a conversão da forma ativa (fosforilase a) em forma inativa (fosforilase b). A enzima promovia a remoção de fosfato inorgânico da fosforilase a. Essa enzima foi demonstrada ser inespecífica, tendo ação sobre a fosforilase a de músculo esquelético de coelho, contudo, não age sobre esteres fosfóricos de baixo peso molecular, como glicose-6-fosfato, alfa-glicero-fosfato, etc.

A Figura 14 mostra o processo de inativação e desfosforilação de fosforilase a de levedura e de músculo esquelético de coelho.

Baseado nos estudos acima descritos, obtivemos também as duas formas de fosforilase de levedura de cervejeiro, isto é, fosforilase a (ativa) e fosforilase b (inativa). A Tabela XI mostra a varia

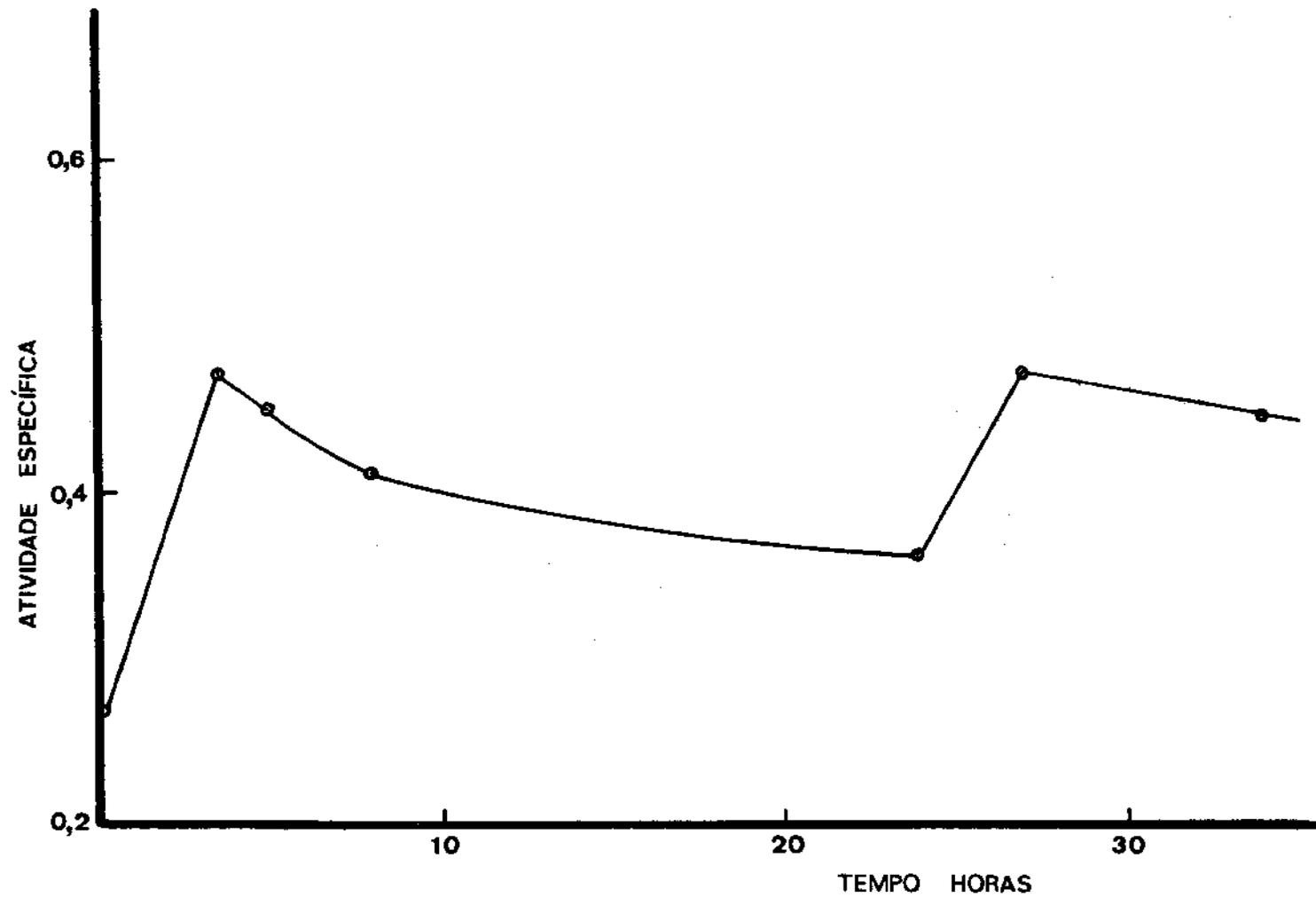


Fig. 10 - Ativação (nos intervalos de tempos 0 a 3:30 horas e 24 a 27 horas), da fosforilase no extrato bruto autolisado em função do tempo. Temperatura de 0°C.

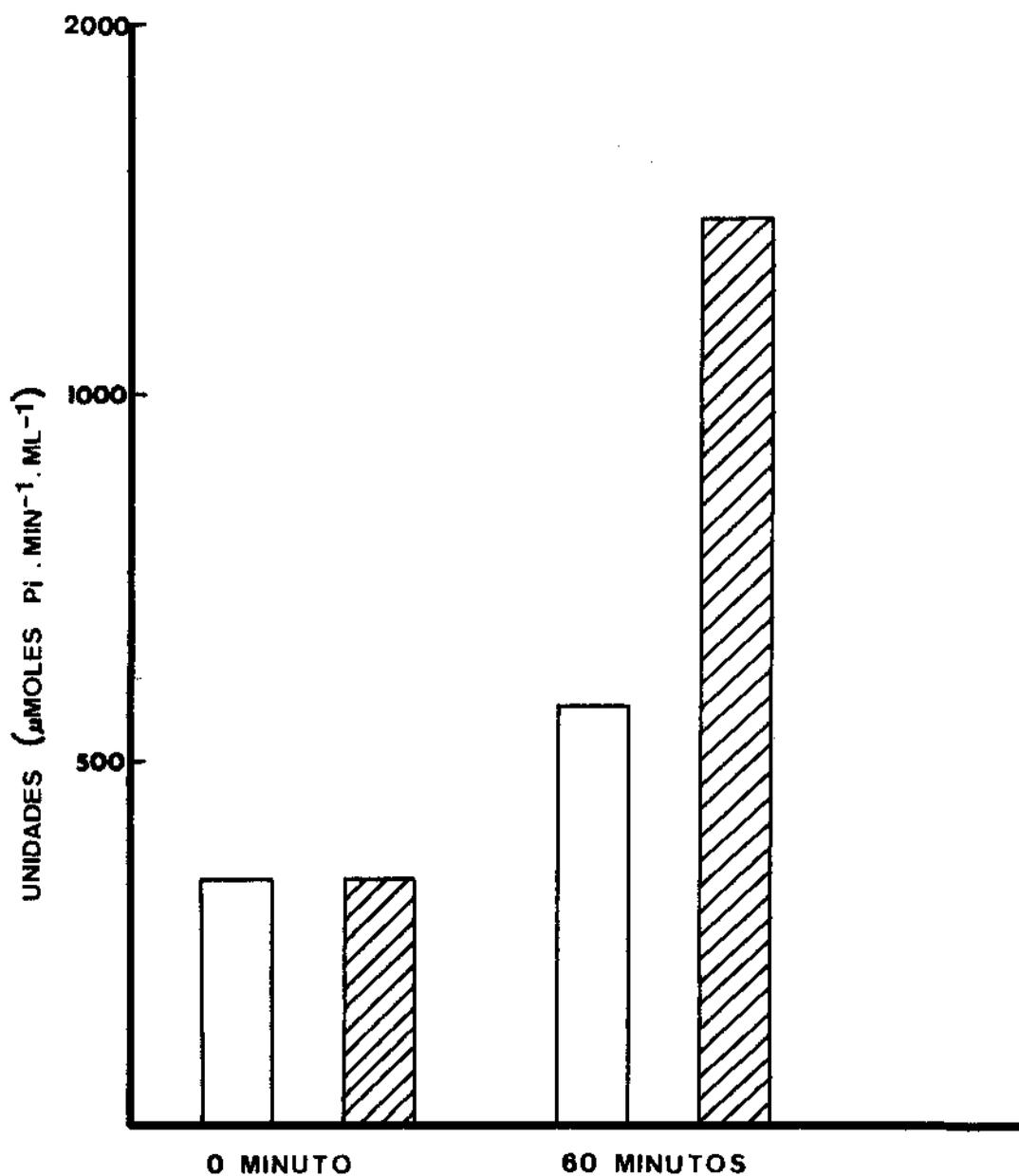


Fig. 11 - Influência da temperatura sobre a fosforilase a de leve dura, parcialmente purificada nos tempos 0 e 60 minutos.

▨ representa ativação a -10°C  
□ representa ativação a 0°C

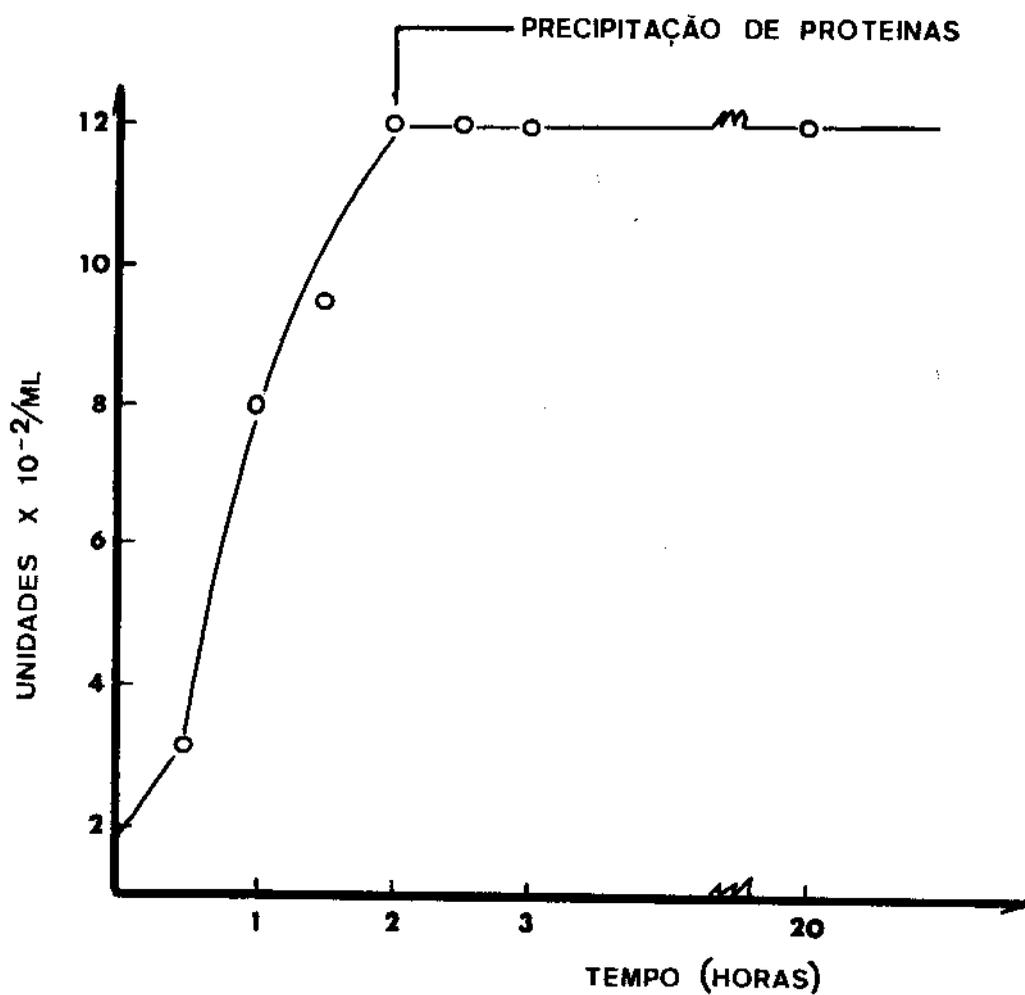


Fig. 12 - Ativação da fosforilase de levedura de cervejeiro durante a diálise contra tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5 contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  55% de saturação. Temperatura de 4°C.

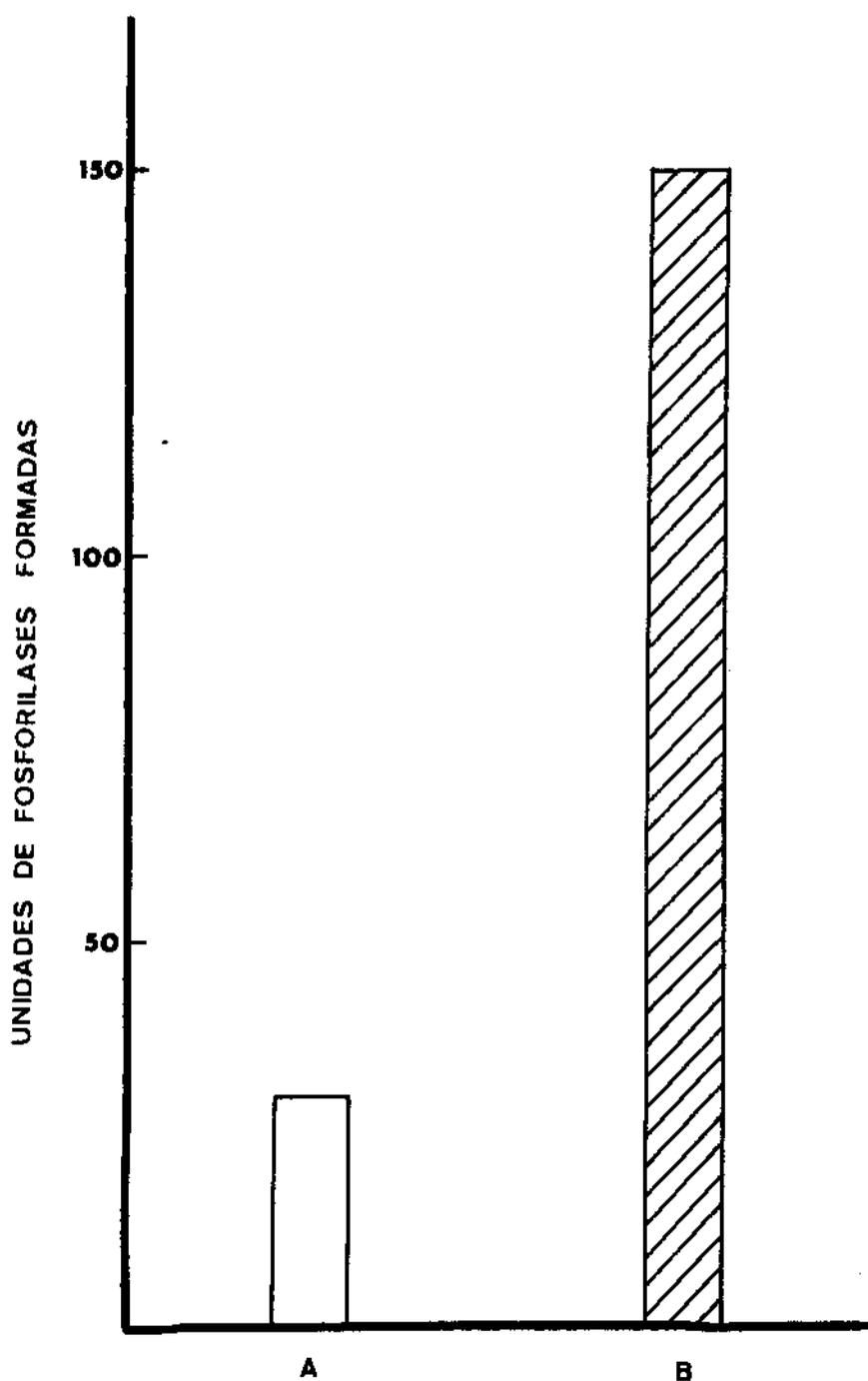


Fig. 13 - Influência do ATP na ativação da fosforilase de levedura de cervejeiro. Sistema de reação:  $Mg^{++}$  0,04M,  $F^-$  0,1M, EDTA 10 mM, tampão citrato 0,1M pH 6,5, fosforilase de levedura e a "enzima ativante". A coluna A representa a ativação da fosforilase no sistema de reação. A coluna B representa a ativação da fosforilase no sistema de reação + ATP 2 mM. Tempo: 5 minutos; Temperatura: 25°C.

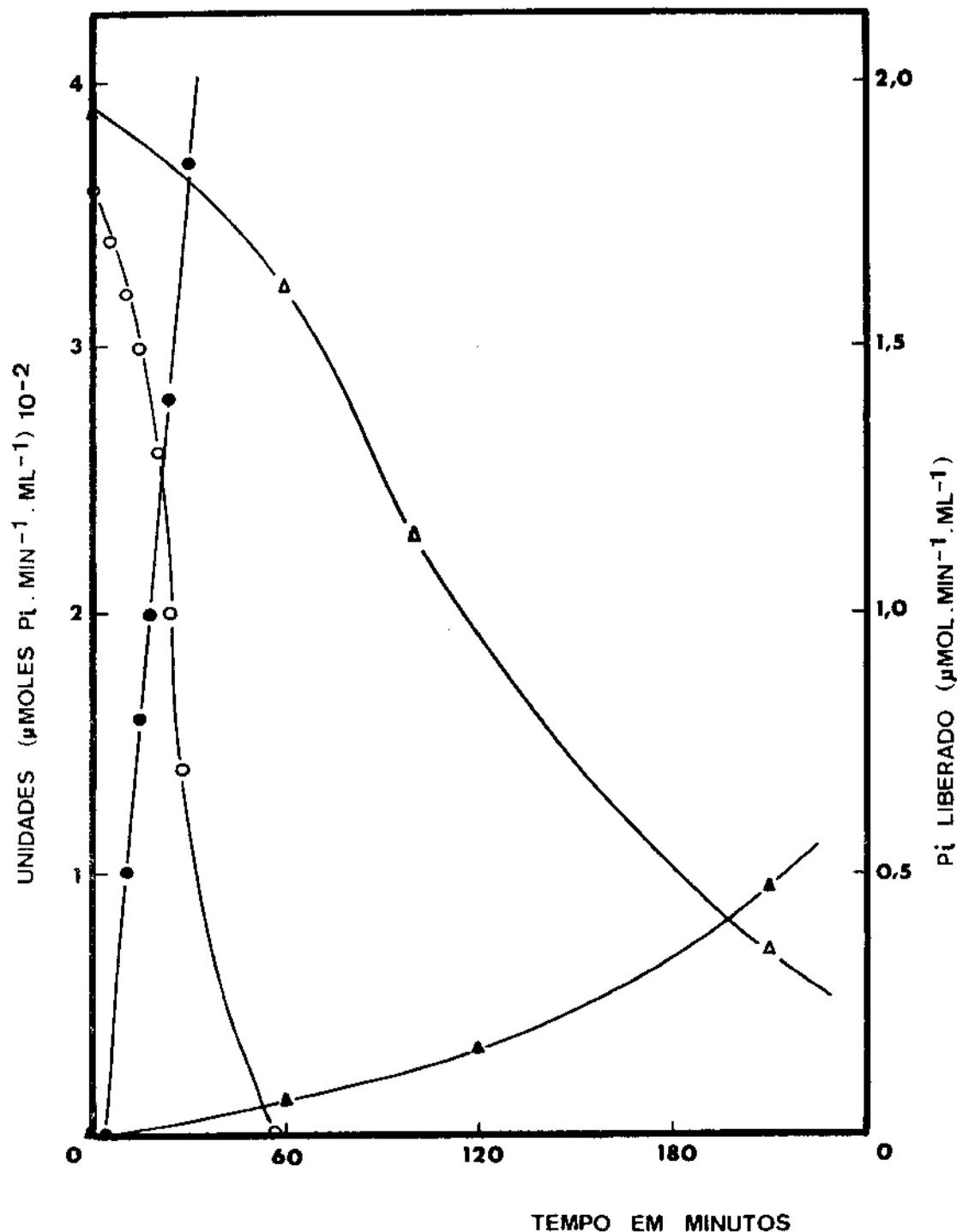


Fig. 14 - Atividade da fosforilase a de levedura de cervejeiro (o) e de músculo esquelético de coelho (Δ) e liberação de fosfato inorgânico de fosforilase a de levedura (●) e de músculo esquelético de coelho (▲), sob a ação de fosforilase-fosfatase da levedura de cervejeiro.

TABELA XI

Ação da fosforilase-fosfatase de levedura sobre a fosforilase ativa de levedura.

Tempo de reação (minutos)	0	60	120
Unidades de atividade da fosforilase ( $\mu\text{M Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	125,0	39,0	0,0

ção de atividade fosforilásica durante o processo de inativação pela fosforilase-fosfatase de levedura e a Tabela XII os dados da subsequente ativação pela fosforilase-quinase de músculo esquelético de coelho com as quais efetuou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, como descrito em Material e Métodos.

TABELA XII

Ação da fosforilase-quinase de músculo esquelético de coelho sobre a fosforilase inativa de levedura de cervejeiro.

Tempo de reação (minutos)	0	20	60	90
Unidades de atividade da fosforilase ( $\mu\text{M Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	0,0	25,0	90,0	90,0

A Figura 15 mostra as fosforilases inativa e ativa, submetidas a um campo elétrico e uniforme em suporte de gel de poliacrilamida, como já descrito. As bandas de proteínas correspondentes às fosforilases inativa (Fig. 15-B) e ativa (Fig. 15-C) foram reveladas com negro de amido. O teste de atividade fosforilásica realizado diretamente em gel, conforme descrito em Material e Métodos, é mostrado na Fig. 15-D, após a migração eletroforética da mistura das duas formas da enzima. Demonstrou-se dessa forma que apenas a

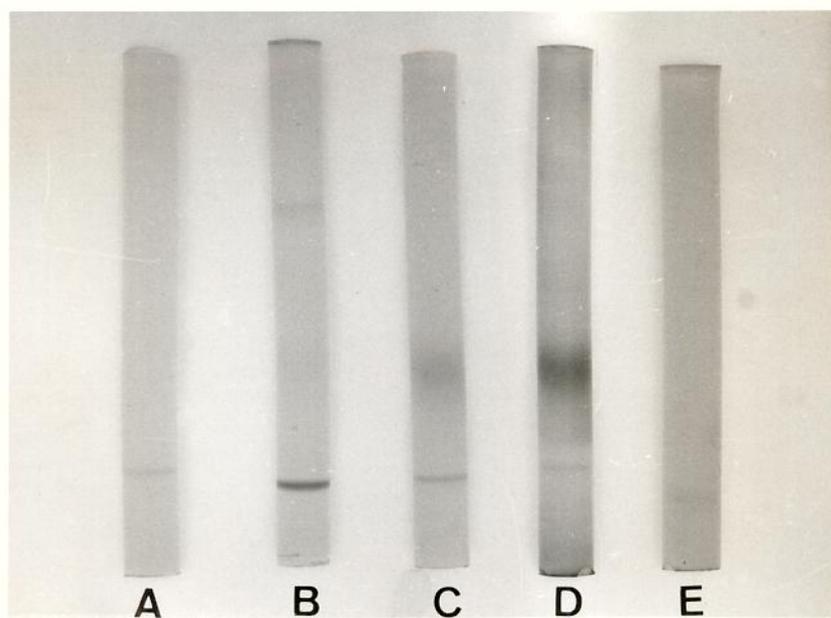


Fig. 15 - Eletroforese em gel 5% de poliacrilamida, da fosforilase ativa e inativa. As proteínas foram reveladas com negro de amido: 15-A, controle (sem proteína); 15-B, fosforilase inativa; 15-C, fosforilase ativa; 15-D, representa a atividade fosforilásica realizada diretamente em gel, conforme descrito em Material e Métodos, de uma mistura das duas formas da enzima, após a eletroforese; 15-E, representa o controle do teste de atividade enzimática.

banda correspondente à do gel 15-C é a fosforilase ativa, uma vez que a correspondente do gel 15-B, não apresentou atividade.

Evidências a respeito da variação dos pesos moleculares das duas formas de fosforilases foram realizadas através de eletroforese utilizando geles de poliacrilamida em diferentes concentrações (5,6 e 7%), como descrito em Material e Métodos, segundo HEDRICK & SMITH (1968). Neste método, proteínas isômeras de tamanho e isômeras de cargas, também podem ser analisadas por eletroforese de gel em disco. Locando-se o logaritmo das mobilidades relativas da proteína contra as diferentes concentrações de gel de poliacrilamida as proteínas isômeras de tamanho dão retas não paralelas, interceptando-se em um ponto comum perto da concentração 0% de gel; as proteínas isômeras de carga dão retas paralelas e as proteínas que diferem tanto em carga como no tamanho dão retas não paralelas, interceptando-se em concentrações de gel distantes de 0%.

Aqueles autores verificaram que havia uma relação entre peso molecular e inclinação das retas obtidas acima, isto é, quanto maior o valor absoluto da inclinação da reta, maior o peso molecular da proteína.

A Figura 16 mostra o comportamento eletroforético das duas formas da enzima em geles de poliacrilamida de concentração de 5, 6 e 7%. As bandas de proteína reveladas com negro de amido, da fosforilase ativa (16-A) apresentaram migrações eletroforéticas maiores que as da fosforilase inativa (16-B). A Figura 16-C representa a atividade fosforilásica realizada diretamente em gel, após a migração eletroforética de uma mistura das duas formas da enzima demonstrando-se que as bandas correspondentes às da Figura 16-A são ativas.

Os valores das mobilidades relativas ( $R_m$ ) das bandas das proteínas e dos logaritmos dessas mobilidades, nas diferentes concentrações de gel, se encontram na Tabela XIII.

A variação da expressão  $100 \log (R_m \times 100)$  em função da porcentagem de concentração de gel de poliacrilamida, está representada na Figura 17. Pelas retas obtidas calculou-se a inclinação das mesmas, obtendo-se para a fosforilase ativa o valor de -7,0 e pa-

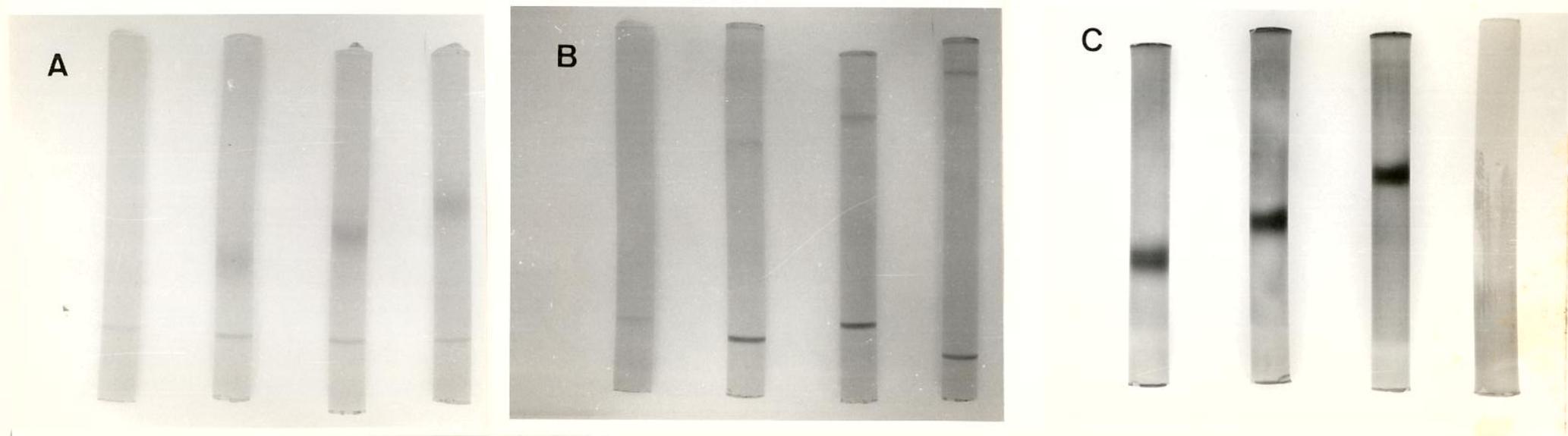


Fig. 16 - Eletroforese de fosforilase ativa e inativa em gel de poliacrilamida de concentraçãõ 5, 6 e 7%. 16-A, bandas de fosforilase a reveladas com negro de amigo; 16-B, bandas de fosforilase b reveladas com negro de amido; 16-C, atividade fosforilásica das duas proteínas, após a eletroforese.

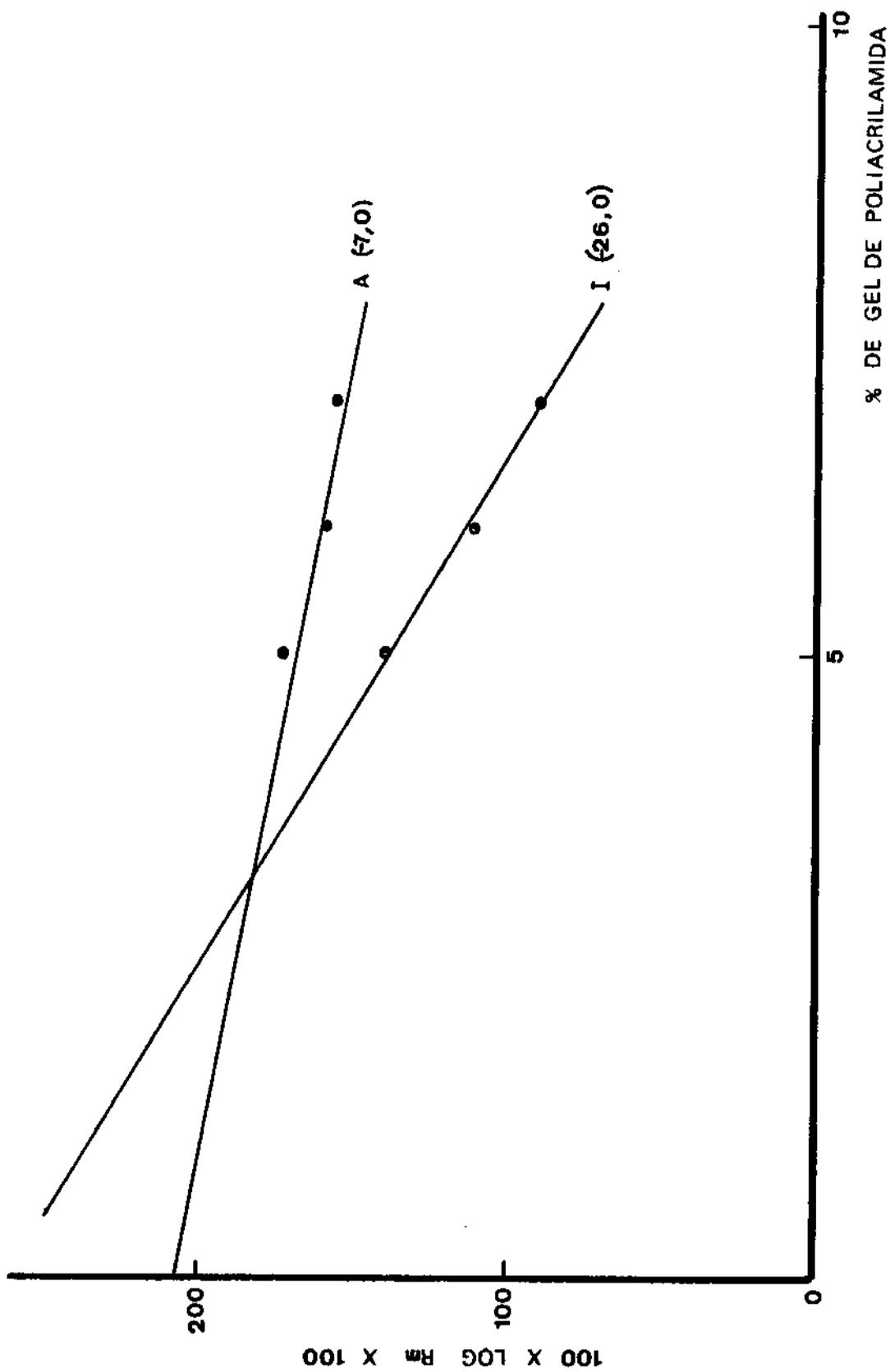


Fig. 17 - Variação dos valores de  $100 \times \log (R_m \times 100)$  da fosforilase ativa e inativa em função de concentrações de gel. Fosforilase ativa (A); fosforilase inativa (I). Os números entre parênteses representam os valores das inclinações das retas obtidos para a fosforilase ativa e inativa.

TABELA XIII

Valores das mobilidades relativas ( $R_m$ ) da fosforilase va (a) e inativa (I), nas concentrações de 5, 6 e 7% de gel de poliacrilamida.

Fosforilase	Concentração de gel (%)	Mobilidade relativa ( $R_m$ )	$100 \times \log(R_m \times 100)$
A	5	0,51	171
A	6	0,40	160
A	7	0,37	157
I	5	0,25	140
I	6	0,13	111
I	7	0,08	90

ra a fosforilase inativa -26,0.

Uma outra preparação de fosforilase de levedura também foi tratada pela fosforilase-fosfatase e as duas formas da enzima foram submetidas a ultracentrifugação para se avaliar os respectivos coeficientes de sedimentação. A Figura 18 mostra as fotografias tiradas da corrida de sedimentação das duas formas da fosforilase, numa célula bissetorial, onde em um dos setores foi colocada a solução de fosforilase a e no outro, a enzima tratada previamente por fosforilase-fosfatase. A análise dessa figura, revela que tanto a fosforilase ativa (imagem inferior) como a inativa (imagem superior) apresentam tres componentes, e que os da fosforilase inativa seriam mais pesados que os da ativa.

Pela Figura 19 que é um esquema ampliado da Figura 18-B, e pelos dados dos valores de  $S_{20w}$  de cada componente das duas formas da enzima mostrados na Tabela XIV observa-se que os componentes ( $I_1$ ,  $I_2$  e  $I_3$ ) da fosforilase inativa possuem respectivamente valores de  $S_{20w}$  maiores que os da fosforilase ativa ( $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$ ). Esses dados sugerem um possível fenômeno de associação-dissociação das moléculas com formação de espécies de maior peso molecular, durante o processo de inativação.

O valor da porcentagem relativa de cada pico foi calculado, rela-

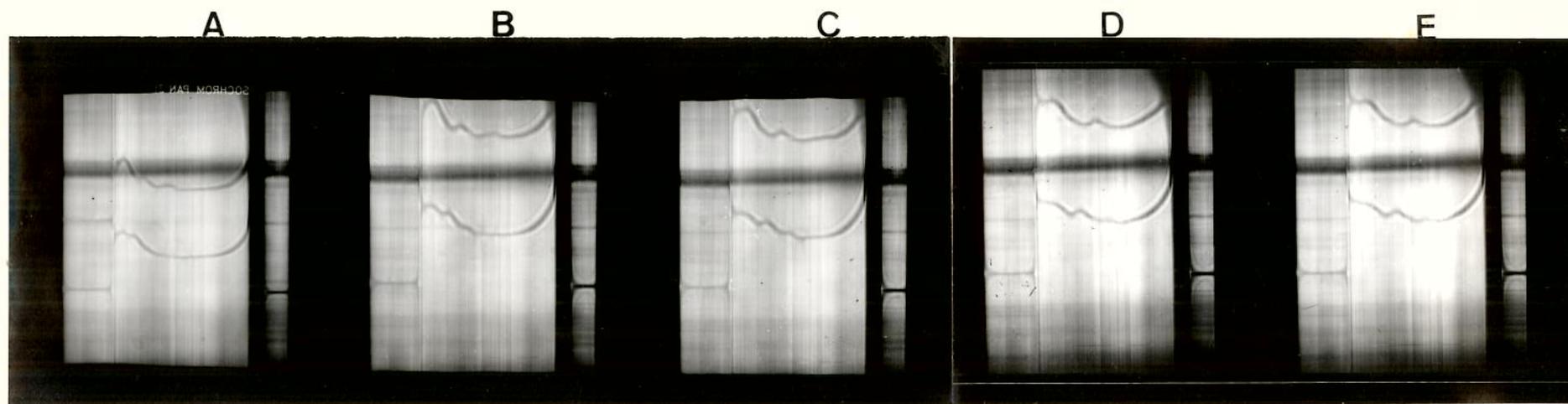


Fig. 18 - Processo de sedimentação de fosforilase ativa de levedura (imagem inferior) e fosforilase inativada pela fosforilase-fosfatase de levedura de cervejeiro (imagem superior). Velocidade de sedimentação de 60.000 rpm a temperatura de 10°C. A, B, C, D e E representa as fotos obtidas em diferentes tempos.

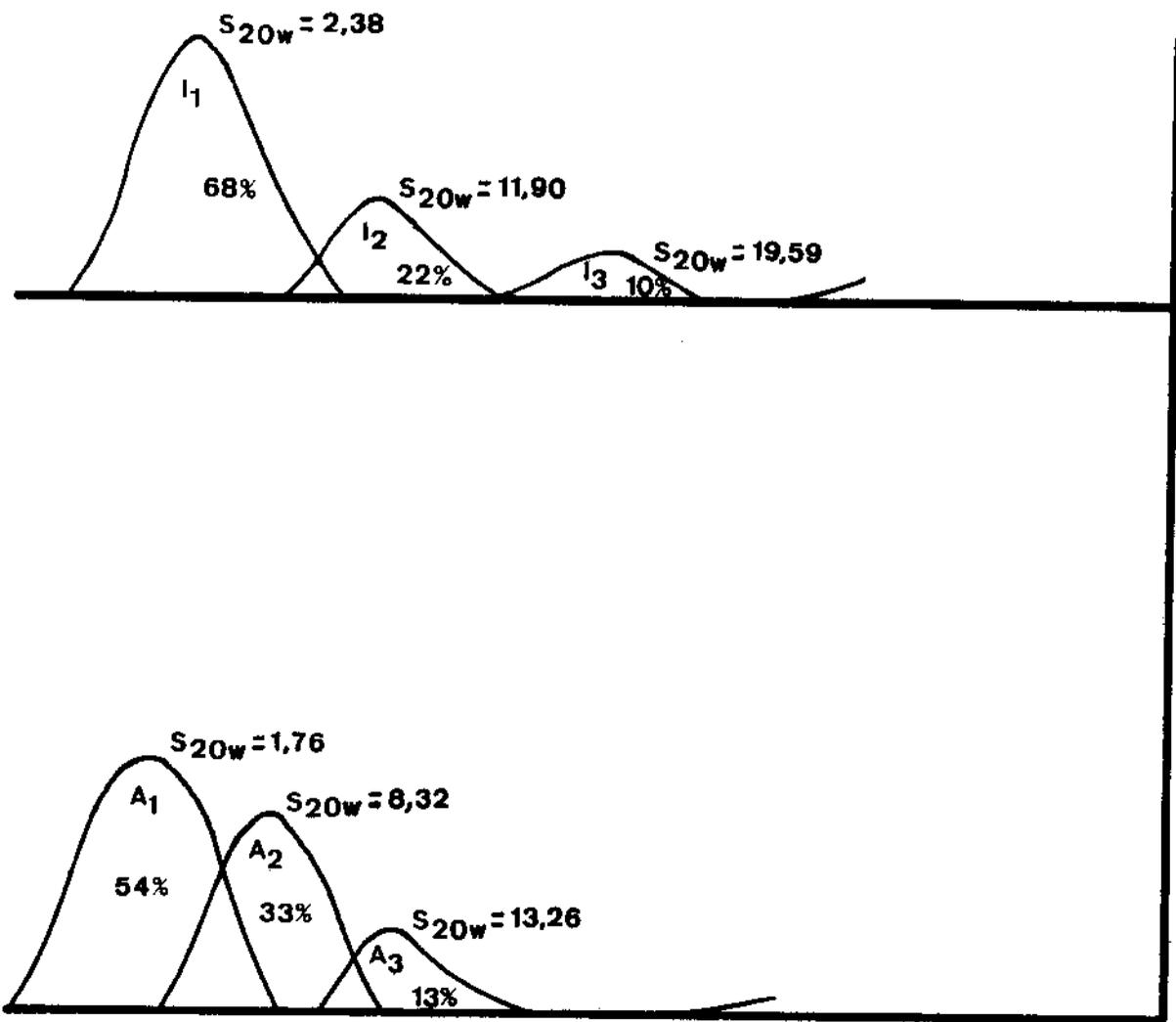


Fig. 19 - Esquema da sedimentação da fosforilase inativa (imagem superior) e da fosforilase ativa (imagem inferior), a partir da Fig. 18-B, com os valores de S<sub>20w</sub> dos diferentes componentes e respectivas porcentagens.

TABELA XIV

Valores de  $S_{20w}$  dos componentes de uma preparação de fosforilase ativa ( $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$ ) e dos da mesma preparação, tratada com a fosforilase fosfatase ( $I_1$ ,  $I_2$  e  $I_3$ ).

Componentes	$S_{20w}$	Componentes	$S_{20w}$
$A_1$	1,76	$I_1$	2,38
$A_2$	8,32	$I_2$	11,90
$A_3$	13,26	$I_3$	19,59

acionando os valores das áreas dos picos, calculados por integração gráfica, pelo método dos retângulos. Assim, encontrou-se para cada componente da fosforilase ativa,  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$ , os valores respectivos de 54%, 33% e 12% e para os da inativa,  $I_1$ ,  $I_2$  e  $I_3$ , os valores respectivos de 68%, 22% e 10%. Portanto, pôde-se determinar a proporção entre os valores das porcentagens de  $A_1:A_2:A_3$  de 5,4:3,3:1,2 e para  $I_1:I_2:I_3$  de 6,8:2,2:1,0.

Com a finalidade de se obter outras informações estudou-se o comportamento eletroforético dos componentes dessas preparações de fosforilases.

A Figura 20 mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida 5% da fosforilase ativa, onde a revelação com o negro de amido mostrou tres bandas distintas (Fig. 20-A). A atividade fosforilásica, determinada diretamente em gel é mostrada na Figura 20-B. Dessa forma demonstrou-se que a banda de proteína, de maior concentração e de maior mobilidade eletroforética, é o único componente que possui atividade fosforilásica detectável nestas condições.

A Figura 21 mostra a migração eletroforética em gel de poliacrilamida 5% das duas preparações de fosforilase, uma tratada e outra não tratada por fosfatase. A Figura 21-A, representa a eletroforese da fosforilase ativa tratada por fosfatase, 21-B representa a da fosforilase ativa não tratada pela fosfatase e 21-C representa o teste da atividade da fosforilase, da mistura das duas prepara-

ções.

Observou-se que, os componentes da fosforilase tratada pela fosfatase apresentaram um perfil eletroforético diferente dos da fosforilase não tratada pela fosfatase. No perfil da fosforilase tratada pela fosfatase, notou-se a ausência do componente que apresentou atividade fosforilásica, na preparação não tratada pela fosfatase, e o aparecimento de um componente com migração eletroforética diferente da dos componentes da fosforilase ativa.

A Figura 22 comprova os resultados acima, onde o gel 22-A representa a eletroforese da preparação não tratada por fosfatase, o gel 22-C representa a preparação tratada por fosfatase nas mesmas condições e o gel 22-B a mistura das duas preparações. Os cálculos dos valores das mobilidades relativas ( $R_m$ ) estão representados na Tabela XV. A fim de verificar o comportamento molecular desses componentes das duas formas de fosforilases, repetiu-se as experiências em diferentes concentrações de gel de poliacrilamida segundo o método de HEDRICK & SMITH. A Figura 23 mostra o comportamento eletroforético da proteína ativa em geles de concentrações de 7, 6 e 5% (A, B e C respectivamente). A Figura 24, mostra o comportamento eletroforético da proteína inativa, também em geles de concentração 7, 6 e 5% (A, B e C respectivamente).

Na Tabela XVI temos os valores das mobilidades relativas de cada banda e dos logaritmos dessas mobilidades. A partir dos dados dessa tabela foi calculado para cada componente, o valor das inclinações da reta  $100 \times \log (R_m \times 100)$  em função da concentração de gel, cujos resultados estão na Tabela XVII.

A discussão detalhada sobre hipóteses relacionadas com o aparecimento dos tres componentes nas preparações das duas formas de fosforilase, bem como alteração de peso molecular e de mobilidades eletroforéticas observadas, será apresentada no capítulo "Discussão".

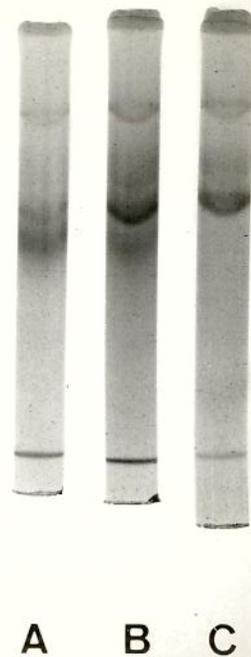
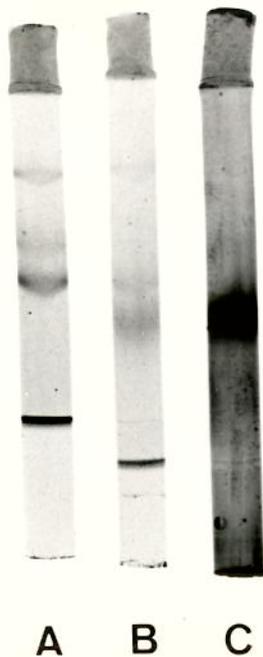
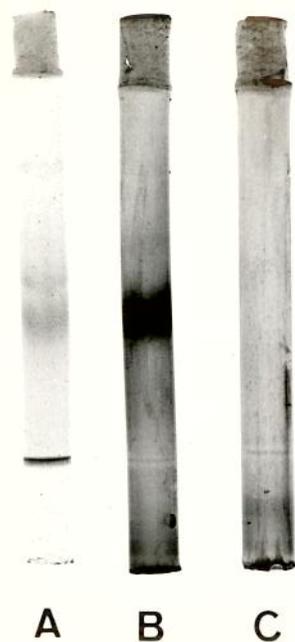


Fig. 20 - Eletroforese de fosforilase a de levedura de cervejeiro em gel de poliacrilamida 5%. Proteínas reveladas com negro de amido 0,5% (20-A); atividade fosforilásica (20-B); controle da atividade enzimática (20-C).

Fig. 21 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, da fosforilase tratada (21-A) e não tratada por fosfatase (21-B), reveladas pelo negro de amido; 21-C representa a atividade fosforilásica.

Fig. 22 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, de fosforilase não tratada (22-A) e da tratada pela fosfatase (22-C) e a mistura das duas (22-B). Todos os 3 geles foram revelados com negro de amido 0,5%

TABELA XV

Valores das mobilidades relativas (R<sub>m</sub>) em eletroforese de gel de poliacrilamida da fosforilase tratada (I<sub>I</sub>, I<sub>II</sub>, I<sub>III</sub>) e não tratada (A<sub>I</sub>, A<sub>II</sub>, A<sub>III</sub>) por fosforilase-fosfatase.

Componentes	Valores das Mobilidades Relativas (R <sub>m</sub> )	
	Teste de Proteína**	Teste de atividade***
A <sub>I</sub> *	0,26	-
A <sub>II</sub>	0,57	-
A <sub>III</sub>	0,65	0,64
I <sub>I</sub>	0,26	-
I <sub>II</sub>	0,49	-
I <sub>III</sub>	0,58	-

\* A numeração I, II e III corresponde aos componentes de menor média e maior migração eletroforética, respectivamente.

\*\* Proteínas reveladas com negro de amido 0,5%

\*\*\* Determinação da atividade fosforilásica no próprio gel como descrito em Material e Métodos.

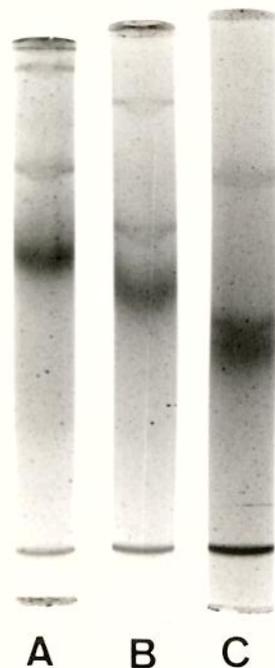


Fig. 23 - Eletroforese da fosforilase ativa da levedura de cervejeiro em gel de poliacrilamida nas concentrações de 7% (23-A), 6% (23-B) e 5% (23-C). As proteínas foram reveladas por negro de amido 0,5%



Fig. 24 - Eletroforese da fosforilase de levedura de cervejeiro inativada pela fosfatase de levedura de cervejeiro em gel de poliacrilamida nas concentrações de 7% (24-A), 6% (24-B) e 5% (24-C). As proteínas foram reveladas por negro de amido 0,5%.

TABELA XVI

Valores das mobilidades Relativas ( $R_m$ ) dos componentes da fosforilase ativa ( $A_I$ ,  $A_{II}$  e  $A_{III}$ ) e dos da inativa ( $I_I$ ,  $I_{II}$  e  $I_{III}$ ) e valores de  $100 \times \log (R_m \times 100)$ .

Componentes	5% de gel		6% de gel		7% de gel	
	$R_m$	$100 \times \log (R_m \times 100)$	$R_m$	$100 \times \log (R_m \times 100)$	$R_m$	$100 \times \log (R_m \times 100)$
$I_I^*$	0,31	149	0,15	118	0,05	70
$I_{II}$	0,50	170	0,30	148	0,17	123
$I_{III}$	0,58	176	0,39	159	0,25	140
$A_I$	0,30	148	0,14	115	0,06	78
$A_{II}$	0,57	176	0,39	159	0,25	140
$A_{III}$	0,60	179	0,51	171	0,42	162

\* A numeração I, II e III corresponde aos componentes de menor média e maior migração eletroforética respectivamente.

TABELA XVII

Componentes da fosforilase ativa ( $A_I$ ,  $A_{II}$  e  $A_{III}$ ) e da fosforilase inativa ( $I_I$ ,  $I_{II}$  e  $I_{III}$ ) e valores das inclinações das retas  $100 \times \log (R_m \times 100)$  em função de porcentagem de gel de poliacrilamida.

Componentes	Inclinação da reta	Componentes	Inclinação da reta
$A_I$	-35,0	$I_I$	-39,5
$A_{II}$	-18,0	$I_{II}$	-23,0
$A_{III}$	-8,0	$I_{III}$	-18,0

## DISCUSSÃO

Por analogia com o sistema de fosforilase de músculo esquelético de coelho, no sistema de fosforilases de levedura de cervejeiro, as formas ativa e inativa foram também chamadas, respectivamente, de fosforilase a e fosforilase b.

O coeficiente de sedimentação ( $S_{20w}$ ) determinado para a fosforilase a de levedura de cervejeiro, igual a  $8,15 \times 10^{-13}$  seg, assim como o valor do coeficiente de difusão ( $D_{20w}$ ), igual a  $4,77 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/seg, são mais ou menos semelhantes aos valores encontrados para fosforilase b de músculo esquelético de coelho, isto é,  $S_{20w} = 8,42 \times 10^{-13}$  seg e  $D_{20w} = 4,14 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/seg, porém, diferem dos da levedura de padeiro, determinados por FOSSET et al. (1971), onde o valor de  $S_{20w}$  foi de 9,65 para a fosforilase a (com um peso molecular = 250.000 daltons). Devido ao fato do peso molecular encontrado para o monômero ser de 103.000 daltons, FOSSET et al. (1971), consideraram a fosforilase a de levedura de padeiro, como um dímero parcialmente associado.

Com os dados de  $S_{20w}$ ,  $D_{20w}$  e do volume parcial específico, o peso molecular de acordo com SVEDBERG, pôde ser determinado para a fosforilase a de levedura de cervejeiro e encontramos o valor de 165.000 daltons. Embora não tenha sido determinado no presente trabalho, o peso molecular do monômero, pelos valores conhecidos de peso molecular de outras fosforilases, podemos prever que a fosforilase a de levedura de cervejeiro seja um dímero.

O volume parcial específico da fosforilase a de levedura de cervejeiro ( $0,73$  cm<sup>3</sup>/g), determinado pela composição de amino-ácidos é igual ao da fosforilase de levedura de padeiro e semelhante aos de outras fosforilases, como de músculo esquelético de coelho ( $0,737$  cm<sup>3</sup>/g) e de "dog-fisch" ( $0,746$  cm<sup>3</sup>/g).

Algumas propriedades físico-químicas das fosforilases a e b de levedura de cervejeiro determinadas neste trabalho, estão descritas e comparadas com as das outras fosforilases de diferentes origens na Tabela XVIII.

TABELA XVIII

Algumas propriedades físico-químicas de fosforilases

Fontes da enzima	Peso Molecular	$S_{20}^{0w}$ ( $\times 10^{-13}$ seg)	$D_{20}^{0w}$ ( $10^{-7}$ cm <sup>2</sup> .seg <sup>-1</sup> )	$\bar{V}_{ap}$	$A_{280nm}^{1\%}$	f/fo	Raio de Stokes (Å)
Fosf. a de músculo de coelho (1)	370.000	13,5	3,3	0,737	11,9	1,35	63,0
Fosf. b de músculo de coelho (1)	185.000	8,4	4,1	0,737	11,9	1,35	49,3
Fosf. a de fígado de coelho (2)	185.000	8,4	-	-	-	-	-
Fosf. b de fígado de coelho (2)	185.000	8,4	-	-	-	-	-
Fosf. a de "dog fish" (3)	203.000	10,0	-	-	-	-	-
Fosf. b de "dog fish" (3)	194.000	8,8	-	0,746	12,9	-	-
Fosf. a de levedura de padeiro (4)	250.000	9,6	-	-	14,9	-	-
Fosf. b de levedura de padeiro (4)	390.000	14,2	-	-	14,9	-	-
Fosf. a de levedura de cervejeiro	165.000	8,7	4,7	0,730	12,9	1,10	45,0
Fosf. b de levedura de cervejeiro	>165.000	>8,7	-	-	-	-	-
Fosf. a de batata (5)	207.000	7,9	3,7	-	-	-	-

(1) Dados de APPLEMAN et al. (1966); (2) Dados de SEERY et al. (1967); (3) Dados de COHEN et al. (1971); (4) Dados de FOSSET et al. (1971); (5) Dados de YA-PIN LEE (1960).

A determinação do volume parcial específico, assim como a determinação do peso molecular mínimo da proteína, foram realizadas a partir da composição de amino-ácidos, levando-se em consideração o número máximo de resíduos, obtidos entre os resultados dos cromatogramas em vários tempos de hidrólise, visto que certos amino-ácidos, são destruídos durante uma hidrólise mais prolongada, enquanto que outros amino-ácidos requerem um tempo bem maior para a sua liberação.

Na determinação de amino-ácidos sulfurados, segunda a técnica de HIRS (1967), a conversão da cistina em ácido cisteico se dá com um rendimento de 85-90%, enquanto a oxidação da metionina à metionina-sulfona é bastante quantitativa. O número de resíduos sulfurados encontrados para a fosforilase de levedura de cervejeiro em relação aos de outras fosforilases, descritos na literatura, estão na Tabela XIX .

Quanto a determinação do número de resíduos de triptofano na fosforilase a de levedura, o método espectrofotométrico segundo SPANDE & WITKOP (1967), usando uréia 8M como agente desnaturante, nos deu o resultado de 6,5 resíduos de triptofano por 100.000 g da fosforilase de levedura de cervejeiro. Esse dado é bastante inferior aos encontrados nas outras fosforilases, inclusive na de padeiro.

SPANDE & WITKOP (1967), demonstraram que o tratamento da proteína pela uréia 8M é importante, visto que titularam com N-bromo-succinimida, apenas 4 dos 8 resíduos de triptofano da hemoglobina na ausência de uréia. Devido ao fato da fosforilase de levedura de cervejeiro apresentar um número de resíduos de triptofano inferior aos de outras fosforilases, decidimos expor a proteína à ação da uréia 8M durante 20 horas, porém o resultado foi o mesmo, isto é, 6,5 resíduos por 100.000 g da enzima. No entanto, através do método pela hidrólise com ácido metano-sulfônico, encontramos um número de resíduos de triptofano igual a 13 por 100.000 gramas de fosforilase a de levedura de cervejeiro. Embora, aparentemente, o método de SPANDE & WITHKOP, seja muito sensível não podemos até o presente, justificar a disparidade dos resultados encontrados.

TABELA XIX

Composição de amino-ácido por 100.000 g de fosforilase de várias fontes

Amino-ácidos	Levedura cervejeiro (1)	Levedura cervejeiro (2)	Levedura padeiro (3)	Músculo coelho (4)	Fígado coelho (5)	Batata (6)
Lisina	52	68	55	46	53	68
Histidina	14	17	16	21	24	16
Arginina	34	40	37	63	48	40
Ác. Aspártico	136	123	115	99	101	92
Treonina	31	34	42	34	36	45
Serina	57	59	52	30	43	47
Ác. Glutâmico	129	117	103	103	91	113
Prolina	50	44	39	42	38	37
Glicina	59	57	49	51	53	62
Alanina	67	66	55	65	67	76
Valina	55	52	58	61	62	57
Isoleucina	48	46	57	48	53	55
Leucina	95	93	84	82	86	68
Tirosina	38	34	34	38	26	31
Fenilalanina	38	44	40	38	43	39
Ác. Cisteico	-	6	5	8	12	-
Metionina	-	11	15	21	24	13
Triptofano	6,5	13	18	13	12	21

- (1) Hidrólise com HCl 6N a 110°C. Valores máximos das hidrólises de 20, 40 e 70 horas. O número de resíduos de triptofano foi obtido por espectrofotometria de acordo com SPANDE & WITKOP (1967).
- (2) Hidrólise com ácido metanosulfônico 4N e 3, (2 aminoetil) indol - HCl durante 22 horas a 110°C.
- (3) Hidrólise ácida (HCl 6N). Valor médio de 24 e 48 horas de hidrólise. Dados de FOSSET *et al.* (1971).
- (4) Dados recalculados de SEVILHA & FISCHER (1969).
- (5) Dados recalculados de WOLF *et al.* (1970).
- (6) Dados de KAMOGAWA *et al.* (1968).

A composição de amino-ácidos da fosforilase a de levedura de cervejeiro está descrita e comparada com a de outras fosforilases, na Tabela XIX. A composição de amino-ácidos da fosforilase a de levedura de cervejeiro foi comparada com as outras de diferentes fontes através do fator de divergência, segundo HARRIS et al. (1969) onde a enzima da levedura pareceu ser distante da fosforilase de músculo esquelético de coelho (0,055) e uma menor divergência foi verificada com a fosforilase de fígado (0,048) e com a fosforilase de batata (0,047). O fator de divergência da fosforilase de levedura de cervejeiro em relação a de padeiro foi menor ainda (0,032). O fator de divergência de HARRIS, entre fosforilases de músculo dos vertebrados é em torno de 0,027 (FOSSET et al., 1971). Esses dados indicam maior ou menor semelhança química entre proteína, servindo de comparação entre fosforilases de diferentes origens e no estudo da evolução das fosforilases através das espécies.

Quanto ao processo de ativação da fosforilase de levedura de cervejeiro, o seu controle parece estar mais relacionado à fosforilação da enzima, desde que foi encontrada uma fosforilase-fosfatase que provoca a desfosforilação da fosforilase a com consequente inativação da enzima e indícios da existência de uma fosforilase-quinase, conforme já descrito anteriormente no capítulo Resultados.

Fazendo um retrospecto, as fosforilases de plantas superiores, como a de batata, parecem não ser reguladas nem por modificações alostéricas e nem por modificações covalentes (KAMOGAWA et al. 1968), e portanto, não apresentariam um sítio fosforilado e nem seria estimulada pelo AMP. Segundo esses autores, nas experiências de sedimentação, o efeito do p-cloromercuribenzoato sobre a fosforilase de batata, não mostrou evidência de dissociação em sub-unidades, contudo, a presença de uréia 4M causa o aparecimento de um simples pico de  $S_{20w} = 5,5$  enquanto que o  $S_{20w}$  na ausência de uréia foi de 6,5.

A fosforilase de bactérias, como por exemplo a de E.coli, também não é fosforilada, embora uma fraca ativação pelo AMP tenha sido encontrada (CHEN & SEGEL, 1968).

No sistema de fosforilase de fígado de coelho, a forma desfosforilada continua inativa mesmo na presença de AMP e a ativação ocorre durante a fosforilação da proteína.

Por outro lado, no sistema de fosforilases de músculo esquelético de coelho, existe o processo de ativação da fosforilase b (desfosforilada) por alosterismo pelo AMP, além do processo de ativação por fosforilação da proteína.

As enzimas responsáveis pela interconversão das duas formas de fosforilase, fosfatase e quinase de animais apresentam um baixo grau de especificidade. Por exemplo, a fosforilase b quinase e a fosforilase-fosfatase de músculo esquelético de coelho, são capazes de catalisar as interconversões das fosforilases b em a, e vice-versa, respectivamente, de outros animais. Também foi demonstrado que a fosforilase b quinase de músculo esquelético de coelho, é capaz de catalisar a ativação da fosforilase b de levedura de cervejeiro, conforme já descrito neste trabalho. Além disso a fosforilase-fosfatase encontrada na levedura de cervejeiro mostrou-se também ser inespecífica agindo sobre a fosforilase a de músculo esquelético de coelho, com consequente liberação de fosfato inorgânico, como mostra a Figura 14. Contudo, essa baixa especificidade observada para as enzimas que catalisam a interconversão das fosforilases, não ocorre no sistema de fosforilases de padeiro, isto porque FOSSET et al. (1971), demonstraram que tanto a fosforilase b quinase, quanto a fosforilase-fosfatase de músculo esquelético de coelho, não tem ação sobre as fosforilases de levedura de padeiro. Esse fato pode ser relevante como um dos critérios de comparação entre o sistema de fosforilase de levedura de cervejeiro em relação ao de padeiro.

A fosforilase b de levedura de cervejeiro, obtida após ação da fosforilase-fosfatase sobre a fosforilase a apresentou-se com um peso molecular maior do que o da fosforilase a, pelo critério de eletroforese em diferentes concentrações de geles, como demonstramos em Resultados.

Pelo critério de sedimentação, também pudemos observar que provavelmente a fosforilase b de levedura de cervejeiro tem um peso molecular maior que o da fosforilase a. Neste aspecto o sistema de

fosforilases de levedura de cervejeiro se assemelha com o de padeiro, visto que neste último sistema, FOSSET et al. (1971), demonstraram que a fosforilase b (inativa e desfosforilada) tem um peso molecular maior do que o da fosforilase a (ativa e fosforilada). Estes autores apresentam a fosforilase a como um dímero associado, de peso molecular de 250.000 daltons e a fosforilase b como um tetrâmero parcialmente dissociado de peso molecular de 390.000 daltons.

O peso molecular e outras propriedades físico-químicas que encontramos para a fosforilase a de levedura de cervejeiro, sugerem que a enzima esteja numa forma de dímero fosforilado, semelhante ao que ocorre com a fosforilase a de músculo esquelético do coelho, embora esta última tenha uma grande tendência a tetramerização, fenômeno este não verificado com a fosforilase a de levedura de cervejeiro.

Observação feita por COHEN et al. (1971), sugere uma correlação entre a tetramerização e a cristalização a baixas temperaturas. Assim, somente fosforilase a de músculo esquelético de coelho, humano e de rato, associam-se quase que completamente quando cristalizam-se a 0°C, enquanto as fosforilases de "dog-fish" e lagosta, bem como isoenzima I do músculo cardíaco de coelho e a fosforilase de fígado, que não apresentam a tendência de formação de tetrâmeros, não se cristalizam. O mesmo fato parece ocorrer com as fosforilases b na presença de AMP. As enzimas que tetramerizam após a adição do nucleotídeo, como a do músculo esquelético de coelho (KENT et al., 1958) e a do rato, cristalizam-se a 0°C, enquanto que fosforilase b de músculo de "dog-fish" e de fígado de rato, cujo tamanho parece inalterável após a adição do nucleotídeo, não cristalizam a 0°C. No caso da fosforilase a de levedura de cervejeiro, bem como para a fosforilase a de levedura de padeiro, onde não foram verificados os fenômenos de tetramerização das formas a tivas, também não se conseguiu a cristalização das enzimas.

Em experiências de eletroforese em diferentes concentrações de gel HEDRICK et al. (1969), observaram que a fosforilase a e b de músculo esquelético de coelho comportavam-se como isômeros de cargas elétricas diferentes e com o mesmo peso molecular (170.000-180.000 daltons), possuindo a fosforilase a uma maior carga negativa. A

eletroforese foi realizada em pH 8,5 a 33°C e nessas condições a fosforilase a apresentou um valor  $S_{20w} = 8,5$  e a fosforilase b,  $S_{20w} = 8,8$ . Mas, esses autores mostraram ainda que a fosforilase a na temperatura de 4°C e pH 6,5 apresentava um valor  $S_{20w} = 14,7$  porém, o valor de  $S_{20w}$  da fosforilase a tendia ao valor de  $S_{20w}$  da fosforilase b quando aumentava-se novamente o pH e a temperatura.

Para a fosforilase a de levedura de cervejeiro, a determinação do coeficiente de sedimentação foi realizada a 10°C e pH 6,5 e o valor encontrado foi de 8,15 S, enquanto que o valor de  $S_{20w}$  da fosforilase a de músculo de coelho, nessas condições é aproximadamente, igual a 14,0. Portanto, essa evidência também favorece a hipótese de que a fosforilase a de levedura de cervejeiro não apresentaria o fenômeno da tetramerização. As experiências de eletroforese em diferentes concentrações de gel, segundo HEDRICK et al. (1969), foram realizadas a 4°C e o pH foi de 8,0 e a fosforilase a de levedura de cervejeiro comportou-se com um peso molecular menor que a fosforilase b inativa. Nessas condições de temperatura e pH, a fosforilase a do músculo esquelético de coelho, tem um valor de  $S_{20w} = 17,1$  e a fosforilase b, um valor de  $S_{20w}$  aproximadamente igual a 8,0, o que comprova, mais uma vez, que a fosforilase a de levedura de cervejeiro não tende a formar tetrâmeros, mesmo nas condições de pH e temperatura que favorecem a tetramerização da fosforilase a de músculo esquelético. Além disso, em outras condições, verificamos que a fosforilase b de levedura de cervejeiro, sempre apresentou um peso molecular maior do que a forma ativa.

Pelo fato do sistema de fosforilases de levedura de cervejeiro, ser ativado por fosforilação, este sistema assemelha-se mais aos do reino animal do que aos do reino vegetal, embora haja diferenças entre o sistema de fosforilase de levedura com os de animais. Assim, enquanto que a fosforilase a de músculo esquelético tende a se tetramerizar e se cristalizar, a fosforilase a de levedura não apresenta essas propriedades e nesse último sistema parece haver um fenômeno de associação após a inativação por desfosforilação da enzima. Contudo, a fosforilase a de levedura se apresenta como um dímero fosforilado, tal como a fosforilase a de músculo esquelético.

Em relação ao sistema de fosforilase de fígado, a diferença está em que a transformação da fosforilase a em b de fígado não causa fenômeno de associação nem aumento de peso molecular da proteína, fenômenos estes que ocorrem no sistema de fosforilases da levedura de cervejeiro.

A presença ou a ausência do processo de ativação por fosforilação de fosforilases b de várias origens, e a possibilidade de tetramerização, estão correlacionadas na Tabela XX. Analisando os dados apresentados nesta tabela, parece ser evidente que o processo de ativação da fosforilase b em a, por fosforilação ocorra preferencialmente nos sistemas de fosforilases do reino animal e nos de levedura, não sendo observado nos de bactérias, fungos e vegetais. Por outro lado, a possibilidade de tetramerização da fosforilase após fosforilação, parece ser exclusiva de apenas alguns tecidos animais, como o muscular.

Não se tem informação de como a fosforilação da fosforilase b acarretaria uma mudança conformacional, que resultaria no aparecimento da atividade, nem como a atividade fosforilásica seria explicada no caso das fosforilases que não são reguladas pelo mecanismo de fosforilação-desfosforilação.

Sabe-se que entre os vários sítios catalíticos da fosforilase, existem os grupos envolvidos com a agregação das moléculas, sendo pelo menos dois responsáveis pela formação do dímero e do tetrâmero, e que parecem ser diferentes, segundo trabalhos de De VINCENZI & HEDRICK (1970), onde estudaram nas fosforilases de músculo esquelético de coelho a ação de vários fatores sobre as ligações monômero-monômero e dímero-dímero. Assim, AMP, ATP, temperatura e substratos tem efeitos diferentes sobre os dois tipos de ligação. O AMP promoveria a dissociação da forma tetramérica de fosforilase a enquanto favoreceria a associação do dímero não fosforilado da fosforilase b, com a formação de tetrâmeros. O efeito do ATP no estado de agregação, causa a dissociação do dímero da fosforilase b em monômero, não tendo nenhuma ação sobre a fosforilase a. Pouco se sabe entretanto, sobre os grupos envolvidos na agregação das sub-unidades. Um dos sítios responsáveis, seria o seril-fosfato, que está relacionado com a ação da quinase. Assim, em pH ácido e baixas concentrações de proteína, o dímero fosforilado da

TABELA XX

Propriedades comparativas de fosforilases b de várias origens.

Fontes da enzima	Peso Molecular	Ativação por fosforilação	Tetramerização após fosforilação
Plaquetas humanas (1)	177.000	+	+
Músculo de coelho (2)	185.000	+	+
Músculo de rato (3)	185.000	+	+
Músculo de sapo (4)	188.000	+	+
Músculo de "dog fish" (5)	200.000	+	-
Fígado de coelho (6)	185.000	+	-
Levedura de padeiro (7)	200.000	+	-
Levedura de cervejeiro	165.000	+	-
Neurospora (8)	320.000	-	-
<u>E. coli</u> (9)	250.000	-	-
Batata (10)	207.000	-	-

- (1) Dados de KARPATKIN & LANGER (1969)  
 (2) Dados de APPLEMAN et al. (1966)  
 (3) Dados de SEVILHA & FISCHER (1969)  
 (4) Dados de METZGER et al. (1968)  
 (5) Dados de COHEN et al. (1970)  
 (6) Dados de SEERY et al. (1967)  
 (7) Dados de FOSSET et al. (1971)  
 (8) Dados de SHEPHERD & SEGEL (1969)  
 (9) Dados de CHEN & SEGEL (1968)  
 (10) Dados de YA-PIN LEM (1960)

fosforilase a tende a se dissociar em monômeros, enquanto que o dímero não fosforilado da fosforilase b não apresenta esta tendência naquelas condições.

O sítio de fosforilação da fosforilase b parece ser realmente diferente do da ativação alostérica pelo AMP. NOLAN et al. (1964) demonstraram que a fosforilase b de músculo esquelético de coelho continua com a possibilidade de ser ativada alostericamente pelo AMP mesmo após a remoção triptica de um hexapeptídeo contendo o resíduo serina, transformando a enzima em fosforilase b'.

Durante o estudo da cinética da ação da fosfatase de músculo esquelético de coelho, FISCHER et al. (1967), lançaram a seguinte hipótese envolvida no fenômeno da regulação do sistema das fosforilases: a) a fosforilase a existiria como um tetrâmero contendo um resíduo de seril-fosfato para cada unidade monomérica; b) cada uma das quatro ligações seril-fosfato seria hidrolisada na mesma velocidade; c) durante a reação da fosfatase, haveria formação de híbridos fosforilado-desfosforilados, que estariam em um estado de equilíbrio entre duas conformações possíveis (tetrâmeros ou dímeros). Para espécies totalmente fosforiladas o equilíbrio favoreceria a formação de tetrâmeros, enquanto para as espécies totalmente desfosforiladas, favoreceria a formação de dímeros; d) aquele equilíbrio é afetado por efetores como G-1-P ou AMP que promovem a tetramerização, enquanto que G-6-P ou glicose favorecem a formação de espécies diméricas.

Portanto, segundo a hipótese de FISCHER et al. (1967) a atividade enzimática desses híbridos dependeriam da presença de efetores como G-1-P que aumentaria a atividade fosforilásica favorecendo a formação dos tetrâmeros, enquanto que G-6-P favorecendo as espécies diméricas, tornariam os híbridos menos ativos.

Aqueles autores separaram esses intermediários fosforilados através de uma coluna de TEAE-celulose, com gradiente de NaCl. A primeira fração a ser eluída da coluna foi a forma completamente desfosforilada seguida de outras duas de crescentes quantidades de resíduos de serina fosforilados. Esses intermediários fosforilados poderiam estar relacionados com os tres componentes que obtivemos em algumas preparações de fosforilase de levedura de cerve-

jeiro. Nessas nossas preparações, esses tres componentes foram eluidos da coluna de DEAE-celulose num mesmo pico que possuia atividade fosforilásica, eluido por uma força iônica menor (tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM pH 6,5) do que a usual (tampão citrato 0,5M - EDTA 1 mM pH 6,5).

Aqueles tres componentes da fosforilase de levedura de cervejeiro apresentaram coeficientes de sedimentação bastante distintos, conforme mostramos em Resultados. Além disso, parece que todos os tres componentes são substratos da fosforilase-fosfatase, visto que, encontramos valores de  $S_{20w}$  maiores do que os correspondentes da preparação não tratada pela fosfatase.

Esse relacionamento dos componentes da fosforilase de levedura de cervejeiro que observamos, com os intermediários fosforilados de músculo esquelético de coelho, carece de mais dados, tais como o do conteudo de seril-fosfato e a atividade enzimática de cada componente, que serão objetos de estudos próximos. A ação da fosfatase, diminuindo o número de fosfato ligado a serina de cada um dos tres componentes talvez condicionaria a formação de outros tipos de associação com formação de outros componentes, com valores de  $S_{20w}$  diferentes. De acordo com o trabalho de CHIGNELL et al. (1968), haveriam outros tipos de interações entre as sub-unidades além das que mantem os dímeros ou as que mantem os tetrâmeros. Esses autores realizando experiências com fosforilase a de músculo esquelético de coelho, tratada com ácido para-mercuribenzóico (PMB), encontraram outros tipos de agregados. Nas experiências em gel de poliacrilamida quando se adicionou PMB a fosforilase a, observaram uma série de bandas além do monômero, dímero e tetrâmero e uma intermediária entre o dímero e o tetrâmero, que eventualmente seria o trímero. Através de ultracentrifugação, sob as mesmas condições, somente quatro componentes foram resolvidos. O coeficiente de sedimentação do primeiro pico foi de 5,9S que representaria o monômero; o segundo pico sedimentou a 8,2S que corresponderia ao dímero; o terceiro (11,5S) e o quarto (13,2S), corresponderia ao tetrâmero como na fosforilase a nativa (KELLER & CORI, 1953).

CHIGNELL et al. (1968), utilizando os valores dos coeficientes friccionais, e dados de microscopia eletrônica do dímero e tetrâ-

mero, obtiveram coeficientes de sedimentação calculados e propuseram modelos de configuração, os quais resumimos na Tabela XXI, relacionados com os observados para a fosforilase de levedura de cervejeiro.

TABELA XXI

Modelos de configurações possíveis para polímeros de fosforilases propostos por CHIGNELL et al. (1968), relacionados com os coeficientes de sedimentação.

Configuração	Fosforilase de músculo esquelético de coelho		Fosforilase de levedura de cervejeiro
	S <sub>calculado</sub> (1)	S <sub>observado</sub> (2)	S <sub>observado</sub> (3)
		5,6	
	8,4	8,2	8,3
	10,3		
	11,2	11,5 -	
	11,7		11,9
	13,3	13,2 -	13,3
	20,0	20,0	19,6

- (1) Valores de S calculados através de dados de coeficiente friccionais e de microscopia eletrônica (CHIGNELL et al., 1968).
- (2) Valores de S obtidos de agregados de fosforilase a quando tratada com PMB (CHIGNELL et al., 1968).
- (3) Valores de S obtidos de uma preparação de fosforilase a e fosforilase b de levedura de cervejeiro.

Os dados do coeficiente de sedimentação obtidos para os agregados de CHIGNELL et al. (1968), estão bastante próximos aos valores teoricamente calculados, bem como com os valores que obtivemos para os componentes da fosforilase ativa e inativa da levedura de cervejeiro. Mas como foi frisado por aqueles autores, esses valores, apesar de mostrar grande semelhança, podem ser produto de casualidade.

É de nosso interesse futuro, a separação desses componentes de fosforilase obtidos da levedura de cervejeiro e o estudo químico e cinético para maior avaliação da hipótese de que o número de fosfato ligado à proteína, condiciona diferentes tipos de agregados.

Uma diferença que parece ser significativa entre o sistema de fosforilase de levedura de padeiro e o de cervejeiro, é o fato de que o grupo do Prof. Fischer conseguiu isolar parcialmente uma proteína quinase de levedura de padeiro, responsável pela fosforilação da fosforilase b, mas não conseguiu isolar a fosforilase-fosfatase. Por outro lado, o grupo do Prof. Focesi, isolou parcialmente purificada a fosfatase de levedura de cervejeiro, mas não conseguiu isolar uma quinase. Essas contradições provavelmente estariam relacionadas com o fato de que a fosforilase de levedura de padeiro encontra-se preferencialmente no seu estado ativo, sugerindo uma maior presença da fosforilase-quinase, enquanto que a de cervejeiro, encontra-se preferencialmente no estado inativo, sugerindo maior presença da fosforilase-fosfatase. Essas hipóteses poderiam explicar o mais fácil isolamento da quinase no primeiro caso e da fosforilase-fosfatase no segundo caso. Essas diferenças poderiam estar condicionadas pela maior ou menor presença de  $O_2$  no meio de cultura de cada uma daquelas raças de Saccharomyces cerevisiae. Essa hipótese pode estar relacionada com os achados de CHESTER (1963), embora este autor não tenha relacionado a diminuição da concentração de glicogênio, observado nas leveduras anaeróbicas, com alguma possível alteração do sistema de fosforilase, quando as leveduras eram colocadas na presença de maior quantidade de  $O_2$ . O possível efeito do  $O_2$  sobre o sistema de fosforilase de levedura de cervejeiro, poderia de alguma forma contribuir no esclarecimento do efeito Pasteur nas leveduras, ao nível do sistema das fosforilases.

Como já foi descrito acima, a fosforilase na levedura de cervejeiro, foi encontrada inicialmente no seu estado mais inativo, só se verificando uma ativação depois de um período de incubação a 0°C, talvez condicionada à presença do O<sub>2</sub>. Outra ativação verificada foi durante a diálise de uma preparação parcialmente purificada de fosforilase de levedura de cervejeiro, contra tampão citrato 0,1M - EDTA 1 mM, pH 6,5 contendo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 55% de saturação. Essa ativação poderia estar relacionada com a verificada com a fosforilase b de fígado de coelho, que se ativa na presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,7M.

Parece-nos portanto que também a fosforilase de levedura de cervejeiro é ativada por um complexo mecanismo regulatório o que permite de fato que o seu sistema seja um fator importante na regulação do metabolismo dos carboidratos. Assim, a fosforilase de levedura de cervejeiro, semelhantemente com outras fosforilases de origem animal seria ativada por fosforilação, contudo, quanto ao processo de dissociação-associação, mostrou-se diferente em relação àquelas fosforilases, como já discutimos anteriormente.

Segundo CHIGNELL et al. (1968), o sistema das fosforilases, constitui um exemplo de como a atividade enzimática está relacionada com a alteração do estado de agregação da proteína, tal como ocorre em alguns outros sistemas regulatórios.

A complexidade da regulação dos sistemas de fosforilases de animais é confirmada também pela presença de vários sítios na molécula da enzima, que são responsáveis pela atividade catalítica, assim temos, o sítio seril-fosfato, o sítio do PLP, o sítio do AMP e os sítios responsáveis pela agregação da proteína, etc. Isso ocorre principalmente nas fosforilases de músculo esquelético, embora outros sistemas de fosforilases animais pareçam apresentar quase todos esses sítios, o mesmo acontecendo com as leveduras. Por outro lado, as fosforilases de plantas superiores e bactérias parecem não possuir um mecanismo regulatório muito complexo, não apresentando o sítio seril-fosfato, nem o fenômeno de agregação da proteína, e nem a ativação por alosterismo, e são comumente encontradas no seu estado ativo.

A complexidade da fosforilase de músculo esquelético, possuindo

tantos sitios importantes para a atividade enzimática, talvez seja a justificativa do elevado peso molecular encontrado para o monômero da enzima (70.000-100.000 daltons segundo SEERY et al., 1970) ao questionarem por que o monômero da fosforilase teria um peso molecular tão elevado em relação aos monômeros de outras proteínas. Entretanto, essa justificativa não explicaria a razão das fosforilases de vegetais e de bactérias, que não possuem aqueles referidos sitios, apresentarem um peso molecular elevado.

Essencialmente, pouco se conhece sobre os grupos que formam o sitio catalítico das fosforilases e a sua conformação espacial e estudos ainda devem ser realizados no sentido de contribuir para o melhor conhecimento do mecanismo regulatório do sistema de fosforilases e do metabolismo do glicogênio, principalmente "in vivo".

Acreditamos que o estudo do sistema das fosforilases de levedura de cervejeiro, poderá contribuir para o estudo de vários aspectos do mecanismo regulatório da atividade fosforilásica, e que os resultados apresentados neste trabalho possam ajudar em um maior esclarecimento dos diferentes mecanismos de regulação da ativação-inativação de fosforilases de várias origens.

## RESUMO

Foram determinados os valores das propriedades físico-químicas para a fosforilase a de levedura de cervejeiro:

- a) Coeficiente de Sedimentação ( $S_{20w}^0$ ) =  $8,7 \times 10^{-13}$  seg
- b) Coeficiente de Difusão ( $D_{20w}$ ) =  $4,77 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/seg
- c) Volume Parcial Específico = 0,73 cm<sup>3</sup>/g
- d) Peso Molecular = 165.000 daltons
- e) Razão Friccional = 1,1 e Raio de Stokes = 45 Å

Foi discutida a possibilidade da fosforilase a de levedura de cervejeiro estar sob uma forma dimérica e fosforilada, devido ao fato de apresentar peso molecular igual a 165.000 e ser inativada por desfosforilação, catalisada por uma fosforilase-fosfatase encontrada na levedura de cervejeiro. Essa levedura e a levedura de padeiro são raças de Saccharomyces cerevisiae, que crescem em uma menor ou maior aeração, respectivamente. Os sistemas de fosforilases dessas leveduras apresentam várias diferenças observadas neste trabalho e por outros autores:

- a) presença e purificação da fosforilase-fosfatase na levedura de cervejeiro e não na levedura de padeiro;
- b) presença e purificação da fosforilase-quinase na levedura de padeiro, e presença provável mas não isolamento da enzima, na levedura de cervejeiro;
- c) presença da fosforilase, já no seu estado ativo na levedura de padeiro e no estado inativo na levedura de cervejeiro;
- d) a fosforilase-quinase de levedura de padeiro, não ativa a interconversão da fosforilase b em a de músculo esquelético de coelho, enquanto que a fosforilase-fosfatase de levedura de cervejeiro catalisa a conversão da fosforilase a em b do músculo esquelético de coelho;
- e) a fosforilase-quinase de músculo esquelético de coelho ativa a

conversão da fosforilase b em a da levedura de cervejeiro, enquanto que não tem ação sobre a fosforilase de levedura de padeiro.

Foram descritas experiências mostrando que a fosforilase b de levedura de cervejeiro possui peso molecular maior que da fosforilase a, devido provavelmente a um processo de associação. As fosforilases de levedura de cervejeiro apresentam fenômeno de associação-dissociação proteica, durante o processo de interconversão das duas formas da enzima, semelhante ao das fosforilases de levedura de padeiro, porém diferente das fosforilases de fígado e de músculo esquelético. O fenômeno da interação proteína-proteína, importante no mecanismo de regulação enzimática, e a existência de uma forma ativa (fosforilada) e inativa (desfosforilada), coloca o sistema de fosforilases da levedura de cervejeiro mais próximo aos de animais do que aos de vegetais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIROLDI, L.P.S. (1973). Purificação e propriedades de fosforilase de levedura de cervejeiro. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- ALMEIDA, A.P. (1973). Hemoglobina de Biomphalaria glabrata: Algumas propriedades químicas e físico-químicas. Tese de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.
- APPLEMAN, M.M.; KREBS, E.G. and FISCHER, E.H. (1966). Purification and properties of inactive liver phosphorylase. Biochemistry, 6:2101.
- BARANOWISKY, T.; ILLINGWORTH, B.; BROW, D.H. and CORI, C.F. (1957). The isolation of pyridoxal-5'-phosphate. Biochim. Biophys. Acta, 25:16.
- BELL, D.J. & YOUNG, F.G. (1934). Observations on the chemistry of liver glicogen. Biochem. J., 28:882.
- CANNATTA, J.J.B. & STOPPANI, A.O.M. (1964). Phosphopyruvate Carboxilase from baker's yeast. J. Biol. Chem., 238:1196.
- CHEN, G.S. & SEGEL, I.H. (1968). Purification and properties of glycogen phosphorylase from Escherichia coli. Arch. Biochem. Biophys., 127:175.
- CHESTER, V.E. (1963). The dissimulation of the carbohydrate reserves of a strain of Saccharomyces cerevisiae. Biochem. J., 86:153.
- CHIGNELL, D.A.; GRATZER, W.B. and VALENTINE, R.C. (1968). Subunit interaction in native and modified muscle phosphorylases. Biochemistry, 7:1082.
- COHEN, P.; DUEWER, T. and FISCHER, E.H. (1971). Phosphorylase from dog fish skeletal muscle. Purification and a comparison of its properties to those of rabbit muscle phosphorylase. Biochemistry, 10:2683.

- COHN , E.J. & EDSALL, J.T. (1943). In: Proteins, amino acids and peptides, p. 370. Ed. by Reinhold. New York.
- CORI, C.F.; CORI, G.T. and GREEN, A.A. (1943). Crystalline muscle phosphorylase. III Kinetics. J.Biol.Chem., 151:39.
- CORI, G.T. & CORI, C.F. (1945). The enzymatic conversion of phosphorylase a to b. J.Biol.Chem., 158:321.
- CORI, G.T.; ILLINGWORTH, B. and KELLER, P.J. (1955). Muscle Phosphorylase. In: Methods in Enzymology, vol. I, p. 200. Ed. by S.P.Colowick and N.O.Kaplan. Academic Press, New York.
- DAVIS, C.H.; SCHLISELFELD, L.H.; WOLF, D.P.; LEAVITT, C.A. and KREBS, E.G. (1967). Interrelationships among glycogen phosphorylase isoenzymes. J.Biol.Chem., 242:4824.
- De VINCENZI, D.L. & HEDRICK, J.L. (1967). Reevaluation of the Molecular Weights of Glycogen Phosphorylase a and b using Sephadex Filtration. Biochemistry, 6:3489.
- De VINCENZI, D.L. & HEDRICK, J.L. (1970). Gel filtration, aggregation and the enzymatic activity of glycogen phosphorylase. Biochemistry, 9:2048.
- DITTERBRANDT, M. (1948). Application of the Weichselbaum biuret reagent to the determination of spinal fluid protein. Am.J. Clin.Path., 18:439.
- FISCHER, E.H.; HURD, S.S.; KOH, P. and TELLER, D.C. (1967). The activation and inactivation of muscle Phosphorylase. National Cancer Institute Monograph, 27:47.
- FISCHER, E.H.; POCKER, A. and SAARI, J.C. (1970). The structure function and control of glycogen phosphorylase. In: Essays in Biochemistry, vol. 6, p. 23. Ed. by P.N.Campbell and F. Dickens.
- FOLIN, O. & CIOCALTEAU, U. (1927). On tyrosine and triptophan determinations in proteins. J.Biol.Chem., 73:627.

- FOSSET, M.; MUIR, L.W.; NIELSEN, L.D. and FISCHER, E.H. (1971). Purification and properties of yeast glycogen phosphorylase a and b. Biochemistry, 10:4105.
- GRAVES, D.J.; FISCHER, E.H. and KREBS, E.G. (1960). Specificity studies on muscle phosphorylase-phosphatase. J.Biol.Chem., 235:805.
- GRAVES, D.J.; HUANG, C.Y. and MANN, S.A. (1968). Catalytic activity and subunit assembly of rabbit muscle glycogen phosphorylase. In: Control of glycogen metabolism, p. 35. Academic Press, New York.
- GUEDES, A.L. (1949). Determination of diffusivity. In: Physical methods, p. 551. Ed. by A.Weissberger. Interscience, New York.
- HARRIS, C.E.; KOBES, R.D.; TELLER, D.C. and RUTTER, W.J. (1949). The molecular characteristics of yeast aldolase. Biochemistry 8:2442.
- HEDRICK, J.L. and SMITH, A.J. (1968). Size and charge isomers separation and estimation of molecular weights of proteins by disc electrophoresis. Arch.Biochem.Biophys., 126:155.
- HEDRICK, J.L.; SMITH, A.J. and BRUENING, G.E. (1969). Characterization of the aggregated states of glycogen phosphorylases by gel electrophoresis. Biochemistry, 8:4012.
- HIRS, C.H.W. (1967). Performic acid oxidation. In: Methods in Enzymology, vol II, p. 197. Ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. Academic Press, New York.
- HOUGH, J.S.; BRIGGS, D.E. and STEVENS, R. (1971). In: Malting and Brewing Science, p. 490.
- KALCKAR, H.M. (1941). Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. III Studies of the enzymes of purine metabolism. J.Biol.Chem., 167:461.

- KAMOGAWA, A.; FUKUI, T.; NIKUNI, Z. (1968). Potato  $\alpha$ -glucan phosphorylase: crystallization, amino-acid composition and enzymatic reaction in the absence of added primer. J.Biochem. 63:361.
- KARPATKIN, S. & LANGER, R.M. (1969). Human platelet phosphorylase. Biochim.Biophys.Acta, 185:350.
- KEILIN, D. & HARTREE, E.F. (1938). On the mechanism of the decomposition of hydrogen peroxide by catalase. Proc.Royal Soc. of London, 124:397.
- KELLER, P.J. & CORI, C.F. (1953). Enzymatic conversion of phosphorylase a to phosphorylase b. Biochim.Biophys.Acta, 12:235.
- KENT, A.B.; KREBS, E.G. and FISCHER, E.H. (1958). Properties of crystalline phosphorylase b. J.Biol.Chem., 232:549.
- KREBS, E.G. & FISCHER, E.H. (1956). The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. Biochim.Biophys. Acta, 20:150.
- KREBS, E.G. and FISCHER, E.H. (1962). Phosphorylase b quinase from rabbit skeletal muscle. In: Methods in Enzymology, vol. V, p. 373. Ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. Academic Press, New York.
- LEE, Y.P. (1960). Potato phosphorylase. I. Purification physicochemical properties and catalic activity. Biochim.Biophys. Acta, 43:18.
- LIU, T.Y. (1972). Amino acid analysis and related procedures. In: Methods in Enzymology, vol. XXV, p. 44. Ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. Academic Press, New York.
- LOHMANN, K. & JENDRASSIK, L. (1926). Kolorimetrische phosphorsäurebestimmungen in muskelextract. Biochem.Z., 178:419.

- LOWRY, O.H.; SCHULTZ, D.W. and PASSONEAU, J.V. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. J.Biol.Chem., 193: 265.
- MADSEN, N.B. (1964). Allosteric properties of phosphorylase b. Biochem.Biophys.Res.Comm., 15:390.
- MADSEN, N.B. & CORI, C.F. (1956). The interaction of muscle phosphorylase with p-chloromercuribenzoate. I. Inhibition of activity and effect on the molecular weight. J.Biol.Chem., 223:1055.
- McCREADY, M. & HASSID, W.Z. (1955).  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate. In: Biochemical preparations, vol. 4, p. 63. Ed. by John Wiley & Sons.Inc., New York.
- METZGER, B.E.; GLASER, L. and HELMREICH, E. (1968). Purification and properties of frog skeletal muscle phosphorylase. Biochemistry, 7:2021.
- METZGER, B.; HELMREICH, E. and GLASER, L. (1967). The mechanism of activation of skeletal muscle phosphorylase by glycogen. Proc.Natl.Acad.Sci.US., 57:994.
- ORNSTEIN, L. & DAVIS, H.J. (1963). Disc electrophoresis. Des-tillation products industries. Rochester, New York.
- SCIACHMAN, H.K. (1957). Ultracentrifugation, diffusion and Viscometry. In: Methods in Enzymology, vol IV, p. 32. Ed. by S.P.Colowick and N.O. Kaplan. Academic Press, New York.
- SEERY, V.L.; FISCHER, E.H. e TELLER, D.C. (1967). A reinvesti-gation of the molecular weight of glycogen phosphorylase. Biochemistry, 6:3315.
- SEVILHA, C.L. & FISCHER, E.H. (1969). The purification and properties of rat muscle phosphorylase. Biochemistry, 8:2161.
- SHEPHERD, D. & SEGEL, I.H. (1969). Glycogen phosphorylase of Neurospora crassa. Arch.Biochem.Biophys., 131:609.

- SPANDE, T.F. & WITKOP, B. (1967). Determination of the Tryptophan content of proteins with N-bromosuccinimide. In: Methods in Enzymology, vol. XI, p. 498. Ed. by S.P.Colowick and N.O.Kaplan. Academic Press, New York.
- STREHLAU, F.; AIROLDI, L.P.S. and FOCESI JR., A. (1973). Polysaccharide phosphorylase of brewer's yeast. II. Specificity of the phosphorylase-phosphatase. International Research Communications System, (73-10) 3-7-23.
- SUTHERLAND, E.W.; WOSILAIT, W.D. (1956). The relationship of the epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. I. Liver phosphorylase; preparation and properties. J.Biol.Chem. 218: 459.
- TANFORD, C. (1967). In: Physical chemistry of macromolecules. Ed. by J.Wiley and Sons. New York.
- WANG, J.H. & GRAVES, D.J. (1964). The relationship of the dissociation to the catalytic activity of glycogen phosphorylase a. Biochemistry, 3:1437.
- WANG, J.H.; SHONKA, M.L. and GRAVES, D.J. (1965). Influence of carbohydrates on phosphorylase structure and activity. I. Activation by pre-incubation with glycogen. Biochemistry, 4: 2296.
- WEICHSELBAUM, T.E. (1946). An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. Am.J.Clin.Path., 16, Tech.Bull., 10:40.
- WOLF, D.P.; E.H.FISCHER and E.G.KREBS (1970). Amino acid sequence of the phosphorylated site in rabbit liver glycogen phosphorylase. Biochemistry, 9:1923.