

GILVAN WOSIACKI

ENZIMAS PECTINOLÍTIICAS

FUSARIUM OXYSPORUM SCHLECHT. EX FR.

ISOLADO DE FRUTOS DE CAFÉ.

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos.

Orientador

Dr. Y.K.PARK, livre docente

CAMPINAS

-1977-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À Meiri

Agradecimentos

Ao Dr. Yong K. Park, orientador do presente trabalho;

Ao Dr. André Tosello, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas;

Ao Dr. Fumio Yokoya, Coordenador da Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Londrina;

pelas possibilidades oferecidas para que esta tese fosse desenvolvida.

À Dra. Shirley N. Smith, do Departamento de Patologia Vegetal da Universidade da Califórnia, em Berkeley, CL, USA ;

Ao Dr. G.A. de Vries, do "Centraalbureau voor Schimmelcultures" de Baarn, Holanda;

pela tipificação do microrganismo selecionado.

Ao Dr. Luiz A. Veiga, Diretor do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná;

Ao Dr. João B.C. Correa, pesquisador do mesmo Departamento; pela permissão de utilizar os laboratórios do Departamento e pelos bons conselhos recebidos.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Química;

pela licença concedida.

Aos amigos e colegas;

por todo estímulo e colaboração recebido.

CONTEÚDO

- SUMÁRIO
- SUMMARY
- Capítulo 1 Introdução
- Capítulo 2 Revisão Bibliográfica
- Introdução
- Substâncias pécticas
- Enzimas pectinolíticas
- Capítulo 3 Materiais e métodos
- Microorganismo
- Substâncias pécticas
- Enzimas
- Estudo do sistema pectinolítico
- Capítulo 4 Resultados
- Produção de enzimas pectinolíticas
- Caracterização das atividades pectinolíticas no extrato bruto
- Outras atividades hidrolíticas no extrato bruto
- Purificação da atividade pectinolítica
- Capítulo 5 Discussão
- Capítulo 6 Conclusões
- Revisão bibliográfica

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 01 - Produção de enzimas pectinolíticas por Fusarium oxysporum Schlecht.ex Fr.
- Figura 02 - Efeito do pH na atividade pectinolítica.
- Figura 03 - Efeito da temperatura na atividade pectinolítica.
- Figura 04 - Curva de progresso da hidrólise de substâncias pecticas isoladas de limão e de café.
- Figura 05 - Efeito do pH na hidrólise enzimática do amido pelo extrato bruto.
- Figura 06 - Efeito do pH na hidrólise enzimática de carboxime tilcelulose pelo extrato bruto.
- Figura 07 - Efeito do pH na hidrólise enzimática do xilano pelo extrato bruto.
- Figura 08 - Efeito do pH na hidrólise enzimática do arabano - pelo extrato bruto.
- Figura 09 - Comportamento cromatográfico do extrato bruto frente a CM-celulose.
- Figura 10 - Comportamento cromatográfico do extrato bruto frente a DEAE-celulose.
- Figura 11 - Fracionamento do sistema pectinolítico em CM-celulose.
- Figura 12 - Fracionamento do sistema pectinolítico em DEAE-celulose.
- Figura 13 - Filtração em Sephadex G-200
- Figura 14 - Efeito do pH na hidrólise enzimática do ácido pectico pela fração CM.
- Figura 15 - Efeito da variação da concentração do ácido pectico na atividade enzimática da fração CM.
- Figura 16 - Efeito do pH na hidrólise enzimática do ácido pectico pela fração DE-1.

Figura 17 - Efeito do pH na hidrólise enzimática do ácido pectico pela fração DE-2.

Figura 18 - Efeito da concentração do substrato na hidrólise enzimática do ácido pectico pela fração DE-1.

Figura 19 - Efeito da concentração do substrato na hidrólise enzimática do ácido pectico pela fração DE-2.

INDICE DE TABELAS

- Tabela 1 - Análise cromatográfica dos produtos da hidrólise enzimática de ácido pectico de limão e de café, pelo extra_{to} bruto.
- Tabela 2 - Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise enzimática de amido, CM-celulose, xilano e arabano.
- Tabela 3 - Purificação da fração CM.
- Tabela 4 - Purificação da fração DE.
- Tabela 5 - Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise enzimática de ácido pectico pela fração CM.
- Tabela 6 - Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise enzimática de ácido pectico pela fração DE.
- Tabela 7 - Efeito de cátions na hidrólise enzimática de ácido pectico.
- Tabela 8 - Efeito de inibidores de enzimas.

INDICE DE CROMATOGRAMAS

- Cromatograma 1 - Ilustração da tabela 1.
- Cromatograma 2 - Ilustração da tabela 2.
- Cromatograma 3 - Ilustração da tabela 5.
- Cromatograma 4 - Ilustração da tabela 6.

SUMÁRIO

Microrganismos isolados de frutos de café cereja foram testados no que diz respeito a sua capacidade pectinolítica e maceração de tecidos vegetais. Fusarium oxysporum Schlecht.ex Fr., crescido em meio constituído de farelo úmido, demonstrou produzir enzimas extracelulares capazes de despolimerizar rapidamente polissacarídios vegetais, como celulose, amido, xilano e arabano, além de substâncias pécnicas. O sistema pectinolítico foi fracionado por técnicas de troca iônica e filtração em gel, demonstrando ser constituído de três endo-poligalacturonases, com atividade ótima em torno de pH 6,0. Não foram constatadas as atividades pectinesterase nem pectina transeliminase. As enzimas pectinolíticas purificadas demonstraram Km 0,12%, 0,022% e 0,019% e como produto de hidrólise foram constatados oligossacarídios ácidos em todos os casos. A hidrólise de ácido pécnico foi inibida pela presença de cátions divalentes no meio de reação e agentes quelantes de metais foram eficientes em proporcionar melhores condições para a atividade enzimática. Tanto enzimas purificadas quanto a preparação bruta foram capazes de hidrolisar substâncias pécnicas isoladas de limão e de frutos de café.

SUMMARY

The pectinolytic and cell-dissolving ability of microorganisms isolated from coffee cherries was studied. The fungus Fusarium oxysporum Schlecht.ex Fr., when grown on moistened bran, developed enzymes capable of rapidly depolymerizing such vegetable polysaccharides as cellulose, starch, xylan and araban besides pectic substances. This pectinolytic enzyme system was fractionated by ion exchange chromatography and gel filtration into three polygalacturonases with optimal activity at a pH around 6,0. No pectinesterase and pectintranseliminase activity were detected. Michaelis-Menten constants (K_m) measured for the three enzymes were 0,12 , 0,022 e 0,019% while acid oligosaccharides were the end products in all cases. Pectic acid hydrolysis was inhibited by the presence of divalent cations in the reaction mixture while chelating agents were effective adjuvants, sometimes accelerating the reaction. The crude extract as well as the purified enzymes obtained from this fungus were effective in hydrolysis of pectic substances isolated from lemon and coffee fruits

CAPÍTULO 1

Introdução

A flora microbiana de regiões cafeeiras tem sido frequentemente estudada em vista da importância econômica da cultura e das notáveis implicações que certos microrganismos podem acarretar à comercialização do produto. Colletotrichum sp., Rhizopus sp., Cladosporium sp., Penicillium sp., Aspergillus sp. e Fusarium sp. podem ser citados como constituintes da micoflora do café em culturas brasileiras.

Os processos mais importantes onde os fungos podem estar envolvidos incluem os eventos fitopatológicos em culturas de café e a fermentação natural durante o processamento dos frutos.

Pesquisas realizadas tendo em vista aspectos patológicos em diferentes tipos de vegetais têm demonstrado que o caráter fitopatogênico de certos microrganismos está frequentemente associado à capacidade de degradar polissacarídeos estruturais ou de reserva presentes nas folhas e nos frutos. Atividades enzimáticas capazes de degradar parcialmente certos polissacarídeos como celulosas, hemicelulosas e substâncias pécticas têm sido correlacionadas com o carácter fitopatogênico de alguns fungos em diferentes culturas de interesse econômico. Apesar da resistência normalmente apresentada pelo vegetal, quer como im-

permeabilidade da parede celular, quer pela produção de anti-metabólitos específicos, o crescimento do microrganismo fitopatogênico é facilitado pela liberação enzimática de açúcares de baixo peso molecular e a infecção pode ser posteriormente difundida no tecido hospedeiro. Como resultado mais frequente, pode ser observada a diminuição da produtividade do vegetal, acarretada pela baixa produção ou pela destruição dos frutos verdes e maduros.

A fermentação natural dos carboidratos presentes na polpa de café parece ser um processo de grande influência no sabor da bebida, com grande prejuízo para a qualidade do produto. O processo fermentativo, que naturalmente ocorre nos frutos em regiões cafeeiras, é desenvolvido por microrganismos que têm capacidade de utilizar os açúcares do epimesocarpo como fonte de carbono e energia. A degradação dos polissacarídeos presentes na polpa do café, parcialmente efetuada pelo equipamento enzimático do próprio fruto, parece constituir a primeira etapa da implantação do processo fermentativo, que acarreta a decomposição da camada mucilaginosa do café. A biodegradação desta camada é empregada durante o processamento que visa a obtenção de grãos de café, devendo ser interrompida antes que a ação microbiana se torne prejudicial à qualidade da bebida. A eficiência do processo está, portanto, correlacionada à atividade pectinolítica produzida pelos microrganismos presentes na região.

O estudo de enzimas pectinolíticas produzidas por fungos adaptados à região cafeeira parece ser particularmente interessante, tendo em vista os importantes processos nos quais podem participar. O presente trabalho tem como objetivo a caracterização do sistema pectinolítico de Fusarium oxysporum Schlecht. ex Fr., microrganismo pertencente a um gênero particularmente abundante em cafezais, e verificar a ação do equipamento enzimático frente a polissacarídeos isolados de frutos de café.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Introdução

O estudo das enzimas pectinolíticas tem demonstrado estar intimamente relacionado ao conhecimento de substâncias pécticas, tendo sofrido influências marcantes das diferentes teorias a respeito da composição e estrutura deste grupo de polissacarídeos. O elevado grau de interesse e complexidade do assunto tem motivado o aparecimento de publicações esporádicas, tanto no que diz - respeito às substâncias pécticas quanto à decomposição enzimática de seus componentes (23,24,33,35,43,46,47,48,51,56,79,80).

Inicialmente, nomes muito diferentes foram dados às substâncias pécticas e enzimas pectinolíticas, dificultando sensiivelmente o desenvolvimento de pesquisas e intercâmbio de novas - descobertas, razão pela qual, em 1926, reuniu-se uma comissão instituída pela "American Chemical Society" para definir e padronizar a nomenclatura nesta área. Em 1944, uma nova comissão revisou e atualizou a nomenclatura proposta, sendo o resultado sumarizado a seguir (56):

"Substâncias pécticas é uma designação de grupo para aqueles derivados complexos de carboidratos, coloidais, - que ocorrem em, ou são preparados a partir de plantas

e contém uma grande proporção de unidades de ácido monogalacturônico, os quais acredita-se existir em uma combinação em forma de cadeia. Os grupamentos carboxílicos de ácidos poligalacturônicos podem estar parcialmente esterificados por grupamentos metílicos e parcial ou totalmente neutralizados por uma ou mais bases.

Protopectina é aplicado às substâncias pécticas insolúveis em água, que ocorrem em plantas e que após restrita hidrólise originam pectina ou ácidos pectínicos.

Ácidos pectínicos é usado para designar ácidos poligalacturônicos coloidais contendo mais do que uma porção negligível de grupos ésteres metílicos. Ácidos pectínicos, sob condições adequadas, são capazes de formar géis com açúcar e ácido, e se adequadamente baixo for o conteúdo metoxílico, com certos íons. Os sais de ácidos pectínicos são tanto pectinatos neutros quanto ácidos.

Pectina ou pectinas designam aqueles ácidos pectínicos hidrossolúveis de conteúdo variável de ésteres metílicos e grau de neutralização, que são capazes de formar géis com açúcares e ácidos, sob condições adequadas.

Ácido péctico é aplicado à substâncias pécticas compostas em sua maioria de ácidos poligalacturônicos coloidais, e essencialmente livres de grupamentos ésteres metílicos. Os sais de ácido péctico são tanto neutros quanto ácidos."

Em 1961, uma classificação sistemática de enzimas pectinolíticas foi proposta pela "Commission on Enzymes" da "International Union of Biochemistry"(I.U.B.) descrevendo dois tipos principais de atividades enzimáticas: as despolimerizantes e as desesterificantes (69). As enzimas despolimerizantes que rompem as ligações alfa (1-4) de substâncias pécticas foram designadas de poligalacturonases e classificadas como poligalacturonídeo -

glicano-hidrolase (E.C.3.2.1.15). Outro tipo de enzimas que rompe a mesma ligação como catalizadoras de beta-eliminação são as transeliminases, denominadas pectina-liases (E.C.4.2.99). As enzimas que hidrolisam as ligações ésteres de pectinas e ácidos pectínicos foram comumente designadas de pectinesterases e denominadas pectina pectil-hidrolase (E.C.3.1.1.11). Posteriormente, esta sugestão foi ampliada a fim de classificar também aquelas - enzimas que demonstram especificidade por substratos esterificados ou não, e ação endo ou exo-enzimática (27). A partir de então, as publicações referem-se às enzimas da maneira acima mencionada.

Substâncias pécticas

A descoberta de substâncias pécticas é atribuída a Vauquelin, que, em 1790, isolou de suco de plantas um material hidrossolúvel e gelatinoso (56). As pesquisas posteriores, principalmente de Payen, em 1824, de Braconnot, em 1825, e de Frémy, em 1847, reconhecendo a substância coloidal ácida responsável pela gelificação que ocorre quando frutas são cozidas com açúcares, evidenciam a posição pioneira da pectina na história da química moderna (46,58).

Entretanto, devido ao carácter essencialmente doméstico da aplicação das substâncias pécticas existentes em frutas, - os esforços no sentido de utilizar diretamente o princípio gelificante são notados apenas no início deste século, avolumando-se a partir de 1910 (58). Com o desenvolvimento de métodos de extração mais adequados e a exploração de novas modalidades de

aplicação, as substâncias pécticas passaram a ser alvo de atenção de maior número de pesquisadores interessados em elucidar sua estrutura química.

A constatação da presença de ésteres metílicos em preparações de natureza péctica por von Fellenberg, em 1913, e a verificação da existência de ácidos urônicos por Suarez, em 1917, posteriormente identificados por Ehrlich como ácido galacturônico parecem constituir as descobertas iniciais que favoreceram a elucidação da estrutura das substâncias pécticas (46). O desenvolvimento das pesquisas que culminaram na identificação das estruturas presentes nas substâncias pécticas sofreu marcadamente a influência de um consenso geral que aceitava a idéia da existência de uma estrutura de peso molecular relativamente pequeno e constante.

Estudos realizados por HIRST et al (34,36,37,38) e por BEAVEN et al (09,10) em materiais pécticos de várias fontes levaram à conclusão de que D-galactose e L-arabinose encontram-se sob a forma de homopolissacarídeos bem definidos, que acompanham o ácido péctico no processo de extração. Numerosos trabalhos relacionam açúcares neutros como arabinose, galactose, rhamnose e xilose como produtos de hidrólise de substâncias pécticas exaustivamente purificadas. Muito provavelmente estes açúcares não estão presentes como impurezas, mas como cadeias laterais ou mesmo constituintes da cadeia principal do polissacarídeo ácido (56). WHISTLER & SMART (79) observaram que as substâncias pécticas devem ser consideradas como uma tríade de polissacarídeos encontrada na parede vegetal e camadas intercelulares de todos os tecidos vegetais. Sugeriram que este conjunto seja constituído de galacturona

no, arabano e galactano, dos quais o primeiro é o componente principal.

Estudos quanto à composição e estrutura química de galacturonanos tem sido o assunto de muitos relatos, sendo que em apenas alguns casos apresentaram-se isentos de açúcares neutros (56). Quimicamente, os galacturonanos são constituídos de longas cadeias lineares de ácido D-galacturônico, que se encontra sob a forma piranosídica. As ligações glicosídicas são do tipo alfa (1-4) e o peso molecular pode se estender de 20.000 a 400.000.

As substâncias pécticas estão universalmente presentes nas paredes celulares de plantas superiores, podendo apresentar-se em grandes quantidades, representando até 30% do peso de certas frutas, ou quantidades mínimas, como em tecidos lenhosos. A localização da pectina em plantas indica que são constituintes predominantemente estruturais, conferindo aos tecidos suculentos sua firmeza típica (47). O conteúdo péctico de diferentes frutos e tecidos vegetais tem sido motivo de estudo por parte de muitos pesquisadores, tendo KERTESZ (46,47) reunido grande número de informações a respeito.

Com relação ao conteúdo péctico de frutos de café, KERTESZ (46) cita os resultados de Carvalho, que em 1936 reportou um teor de 2,8% de substâncias pécticas facilmente extraíveis com água. Os dados com relação ao teor de substâncias pécticas do café são discordantes, provavelmente pela diferente metodologia empregada, sendo que os valores citados variam de 5,8 até 38% (63). RAO (68), em 1976, argumentou que o teor de pectina existente na mucilagem do café é compatível com a sua industria-

lização como sub-produto da indústria cafeeira, tendo em vista os dados abaixo:

Frutos	Pectina (%)	
	peso seco	peso úmido
café (robusta)	1,85	29,74
café (arábica)	0,56	
ameixa	1,17	
maçã, res.	0,75	
cereja	0,24	
pomelo		33,33
limão		26,20

Dentre as substâncias pécticas isoladas de café, podem ser citadas aquela descrita por COLEMAN et al (17), que obtiveram um polissacarídeo ácido com propriedades semelhantes às do ácido péctico de limão, e aquelas estudadas por CORREA et al, que caracterizaram o heteropolissacarídeo ácido (20), composto de um galacturonano (18) e um galactoarabano neutro (19) com proporções aproximadamente equimoleculares de galactose e arabinose.

A presença destas substâncias pécticas na mucilagem do café cereja dificulta sensivelmente o processo de secagem e favorece a fermentação natural por microrganismos (29). Para a retirada da pectina existente na mucilagem, JOHNSTON & FOOTE (42) propuzeram um método utilizando enzimas pectinolíticas, enquanto PEREIRA (64) estabeleceu as condições de um processo semelhante, -ativando as enzimas existentes nos frutos, seguindo o pensamento já anteriormente descrito por PERRIER (66), em 1932. FRANCO (28), entretanto, comprovou que a eliminação da substância péctica do café despulpado é causada por microrganismos, com o que concordam outros autores (63).

Tendo em vista a presença de substâncias pécticas nos frutos de café cereja, a presença de microrganismos capazes de produzir enzimas pectinolíticas é acentuadamente benéfica para o processo de biodegradação da camada mucilaginosa.

Enzimas pectinolíticas

A hidrólise das ligações glicosídicas presentes na molécula do ácido péctico parece ter sido descrita pela primeira vez na cevada em germinação, por Bourquelot e Herissey, tendo sido denominada pectinase, nome atualmente designado para preparações brutas de enzimas pectinolíticas (24,51). Segundo HIRST & JONES (35), Ehrlich foi o primeiro a demonstrar em 1917, que o ácido galacturônico é liberado na hidrólise do ácido péctico pelas enzimas produzidas por Penicillium ehrlichii.

Em 1939, WASKMAN & ALLEN (77) verificaram que Fusarium sp., Penicillium sp., Aspergillus sp., Trichoderma sp. isolados do solo, eram capazes de degradar poliuronídeos, liberando ácido monogalacturônico no meio de crescimento.

Muitos casos anteriores já haviam demonstrado o carácter indutivo de enzimas pectinolíticas de outros fungos, e WAGOONER & DIMOND (75), pesquisando as enzimas produzidas por Fusarium oxysporum f.lycopersici verificaram que a exo-poligalacturonase tem um carácter adaptativo, sendo produzida quando pectina estiver presente no meio de crescimento. A pectinesterase, entretanto, era produzida constitutivamente.

EL-AROSI (25) estudou o sistema pectinolítico extracelular de Rhizopus solani Kuhn e Fusarium oxysporum Snyder and Hansen, constatando que ambos possuem capacidade de degradar tecido vegetal e que a ação conjunta das duas preparações era muito mais eficiente do que isoladamente. A atividade hidrolítica produzida por F.oxysporum foi identificada como endo-poligalacturonase, que apresentou melhor atividade em pH 6,5 a 8,3.

Em 1961, PAGE (61) verificou a atividade enzimática liberada no meio de cultura por alguns fungos aplicando técnicas de cromatografia em papel. Dentre as culturas examinadas, Fusarium sp. apresentou uma poligalacturonase que era ativa em pH 3,7 e degradava ácido péctico liberando ácido monogalacturônico no meio de reação.

As atividades endo e exo-poligalacturonase podem ser produzidas por um mesmo microrganismo, e Young, em sua tese de doutorado, em 1963, demonstrou que Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici (Sacc.) Snyder and Hansen produz seis enzimas aparentemente distintas, tendo constatado as atividades exo e endo-poligalacturonases, conforme citação de HARMAN & CORDEN (32).

Em 1965, FISHER (26) estudou cepas virulentas de Fusarium sp., constatando a capacidade de produção de enzimas poligalacturonase, pectinesterase e celulase. O sistema pectinolítico demonstrou ser indutivo e indiferente ao teor de metoxila do substrato. HORST (39), entretanto, não correlacionou a patogenicidade de Fusarium oxysporum f.callestephi com a produção deste tipo de enzimas. O estudo de diferentes cepas levou à observa-

ção de que ocorre uma especialização fisiológica entre fungos - pertencentes ao gênero Fusarium, diferindo consideravelmente entre si culturas obtidas de cinco regiões geográficas distintas.

BATEMAN (06) estudou as atividades despolimerizantes - produzidas por Fusarium solani f. phaseoli, constatando a presença de duas hidrolases, sendo que uma era mais ativa frente ao ácido péctico, com pH ótimo de 6,0 e outra mais ativa frente a pectina, em pH 5,0. Não foi detectada a presença de pectinesterase e as enzimas pectinolíticas demonstraram ser indutivas. A atividade transeliminase demonstrou ótima atividade em pH 8,8.

SWINBURNE & CORDEN (71) relataram a existência de duas atividades pectinolíticas, produzidas por Fusarium oxysporum v. lycopersici, que foram separadas por técnicas de troca iônica. - Nessa mesma época, PATIL & DIMOND (62) verificaram que a síntese de enzimas pectinolíticas de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici é fortemente reprimida em meio contendo pectina e monossacarídeos. A síntese foi reprimida por glucose, ácido galacturônico e sorbitol em concentrações 0,05M e mesmo por 2-desoxiglucose a 0,006M. A endo-poligalacturonase demonstrou capacidade de hidrolisar tanto pectina como pectato de sódio.

Em 1970, MUSSEL & GREEN (59) correlacionaram a ação fitopatogênica de Verticillium albo-atrum e Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici com a atividade poligalacturonase, observando também que a permanência desses fungos em tecidos sadios, sem produção de enzimas, suporta a idéia de que o tecido hospedeiro resistente tem condições de regular a síntese das enzimas pectinolíticas.

cas nesses fungos.

PERLEY & PAGE (65) detectaram atividade poligalacturonase em culturas de Fusarium roseum (LK) emend. Snyder and Hansen e verificaram que a produção foi induzida pela presença de ácido múcido ou ácido péctico, em pH 6,5, e por pectina, em pH 3,4. A enzima induzida apresentou maior atividade frente ao ácido péctico, não liberando ácido monogalacturônico no meio de reação. BIEHN & DIMOND (11) observaram o efeito repressivo de galactose na produção de poligalacturonases por Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici e caracterizaram a enzima como exo-poligalacturonase. ALBERSHEIM & ANDERSON (1) verificaram que frações proteicas extraídas da parede celular de alguns tecidos vegetais foram capazes de inibir a atividade poligalacturonase de Colletotrichum lindemuthianum, Fusarium oxysporum e Sclerotium rolfsii. Os autores constataram também que Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici secreta enzimas capazes de degradar ácido poligalacturônico juntamente com outras capazes de degradar parede celular de tecidos vegetais.

Em 1972, HARMAN & CORDEN (31) purificaram o sistema de poligalacturonases produzidos por Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici, cujas enzimas demonstraram diferente comportamento frente a celulose trocadora de íons. Verificaram que as enzimas aparentemente formam complexos com substâncias pécticas, apresentando portanto carga negativa sob certas condições. Nas preparações purificadas foram encontradas apenas atividade poligalacturonase.

A inspeção do meio de crescimento de quatro microrganismos isolados de frutos de café, entre os quais uma cultura -

não tipificada de Fusarium, revelou a presença de atividade exo poligalacturonase com melhor atividade em condições medianamente ácidas (82). As enzimas produzidas pelos fungos demonstraram capacidade de hidrolisar até 33% do ácido pécico, sendo em sua maioria de carácter adaptativo.

Em 1974, ZAUBERMANN & SCHIFMANN-NADEL (83) evidenciaram a presença de pectinesterase e poligalacturonase em abacates infestados por Fusarium sp., o que conduziu a um mais rápido amolecimento do fruto.

SZAJER & BOUSQUET (72), em 1975, estudaram a produção de endo-poligalacturonase e pectinesterase de Botrytis cinerea, Fusarium moniliforme, Pestalozia sp. e Phoma exigua var. exigua, verificando que são enzimas produzidas adaptativamente e apenas no primeiro caso houve uma produção de carácter constitutivo. Os agentes indutores são substâncias pécicas, esterificadas ou não, enquanto que ácidos algínicos e galacturônico não foram efetivos na indução, apesar de nitidamente correlatos. Pectinesterase - foi induzida gratuitamente por ácido pécico, substrato não esterificado.

Em 1976, CARUSO et al (15) correlacionaram as enzimas pectinolíticas produzidas por Fusarium e a infestação de tomateiros, estabelecendo a metodologia para constatar a doença antes mesmo do aparecimento dos sintomas.

Portanto, as enzimas pectinolíticas produzidas por fungos, em especial aquelas produzidas por Fusarium demonstram ser produzidas de forma constitutiva ou indutiva, tendo sido consta-

tada a presença de poligalacturonases, pectinesterases e transeli
minases. Embora um grande número de relatos vise o conhecimento
da fisiologia do microrganismo tendo em vista sua ação patogênica,
nem todos os casos correlacionam as enzimas pectinolíticas com
esse carácter. De uma forma geral, pode ser notado que as ativi
dades pectinolíticas ocorrem em fungos pertencentes ao gênero, -
embora demonstrem certa variação em termos de adaptação ao local
de onde foram coletadas as amostras.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismo

Amostras de café cereja de diferentes cafezais de Londrina, PR, foram coletados asseticamente em KCl 0,154M. Após o desenvolvimento dos microrganismos em caldo nutritivo, foram inoculadas placas contendo meio de cultura sabouraud-glucose-agar esterilizado, que a seguir foram incubadas a 28°C por 72 - horas. As colonias isoladas foram usadas para inocular meio de cultura sabouraud-pectina-agar com a finalidade de selecionar - os fungos capazes de utilizar pectina de café como única fonte de carbono e energia.

Os fungos pectinolíticos foram crescidos em meio congtituído de mistura de farelo de trigo e arroz (1:9), umidecida - com 40% de água destilada. Após o crescimento, as enzimas extracelulares foram extraídas do meio de cultura com água destilada, a uma proporção de 10 ml/g, por duas horas, a temperatura ambiente. O filtrado, clarificado com terra diatomácea, foi centrifugado a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C e testado no que diz respeito à capacidade de degradar pectina comercial em pH 4,8 e a 40°C. A atividade enzimática foi determinada pela

dosagem dos açúcares redutores liberados no sistema de reação, - pelo método iodométrico (41). Dentre os fungos capazes de degradar pectina, foi selecionada uma cepa que apresentou maior atividade. Esta cepa, bem como todos os demais fungos pectinolíticos, foi mantida em agar-batata a baixa temperatura, tendo sido repicada periodicamente.

Semelhantemente, foram pesquisadas 42 cepas de Fusarium sp. coletadas na região de Ribeirão Preto, SP, cedidas pelo Departamento de Fitopatologia do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo.

O fungo escolhido para os estudos seguintes foi tipificado como sendo Fusarium oxysporum Schlecht.ex Fr.

Substâncias pecticas

Frutos de café cereja (Coffea arabica L., var. Mundo Novo) foram colhidos manualmente e mantidos à baixa temperatura em frascos Dewar. A polpa foi triturada com etanol a 60%, após o que foi exaustivamente lavada com etanol a 60%, a 95%, acetona, clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) e butanol saturado com água.

Pectina de café foi obtida através do procedimento descrito por MCCREADY (55). Pectina comercial havia sido obtida industrialmente por extração aquosa de casca de limão seguida de uma precipitação dos polissacarídeos ácidos com hidróxido de alumínio a pH 4,0. O excesso de sais foi removido com HCl etanólico e a remoção dos cloretos foi efetuada por exaustivo tratamento com etanol a 60%. As diferentes preparações de pectinas fo

ram purificadas segundo o procedimento descrito por KOHN & FURDA (49). Ácidos pectínicos de diferentes teores de metoxilação foram obtidos por hidrólise parcial com HCl 1,4 N em isopropanol a 60% (12), a 30°C. O ácido péctico foi obtido por saponificação do ácido pectínico de menor teor de metoxilação, em pH 12 e a temperatura ambiente. Os polissacarídios foram sempre tratados com etanol a 60%, a 95%, acetona, éter etílico e finalmente secos ao ar.

As substâncias pécticas foram caracterizadas quanto ao teor de ácido anidrogacturônico (AUA%), metoxilas (MeO%), cinzas e umidade de acordo com as técnicas citadas por MCCREADY(56). O grau de esterificação foi calculado tendo em vista os valores encontrados de AUA% e MeO%. Os açúcares urônicos totais foram determinados pelo método colorimétrico do carbazol, descrito por DAVIDSON (21), enquanto que os açúcares urônicos redutores foram dosados especificamente pelo procedimento de AVIGAD (03). Os resultados referentes à caracterização das substâncias pécticas obtidas são sumarizados a seguir:

Substância péctica	AUA%	MeO%	Esterificação
Pectina purificada	81,2	9,8	69,0
Ác.pectínico limão	89,8	2,7	17,0
Ác.péctico limão	93,3	0	0
Pectina café	82,8	4,1	28,0
Ác.péctico café	92,8	0	0

Obs.: os dados acima referem-se aos polissacarídios isentos de umidade e cinzas.

A caracterização dos monossacarídeos presentes em cada preparação pectica foi efetuada por cromatografia ascendente em papel Whatman nº 01, após hidrólise com ácido trifluoracético 1 N a 100°C. Foram usados os solventes ácido (acetato de etila, 18 vol.; ácido fórmico, 3 vol.; ácido acético, 8 vol.; água, 9 - vol.) para açúcares urônicos (40) e alcalino (n-butanol, 6 vol.; piridina, 4 vol.; água, 3 vol.) para monossacarídeos neutros (44). Os açúcares foram revelados com azul de bromofenol (53) ou pelo procedimento de Trevelyan et al (74), dependendo de suas características ácida ou neutra.

Enzimas

A atividade poligalacturonase foi medida pela dosagem dos açúcares redutores liberados no meio de reação, quando era usado ácido pectico como substrato. O sistema típico de incubação foi constituído de 0,1 ml de preparação de enzima adequadamente diluída, 0,1 ml de tampão acetato 0,2M e 0,3 ml de substrato a 0,5%. Após 0, 5, 10 e 20 minutos de reação, os açúcares redutores foram medidos pelo método de Somogyi adaptado por NELSON (60) e a curva de progresso da reação foi usada para o cálculo da velocidade inicial. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade necessária para liberar um umol de produto, calculado com ácido D-galacturônico, por minuto, sob condições ótimas de pH e temperatura. A atividade específica foi calculada como a razão entre a concentração de enzima (U/ml) e o teor de proteínas (mg/ml), determinado pela técnica de LOWRY et al (52) modificada por HARTREE (32), tendo sido usada albumi

na de soro bovino como padrão proteico.

A atividade pectinesterase foi pesquisada pelo método titulométrico (56). O meio de reação continha 1 ml de solução - contendo enzima adequadamente diluída, 5 ml de pectina a 1%, 1 ml de NaCl 1 M, tendo sido ajustado ao pH desejado antes de ser completado o volume de 10 ml. Os grupamentos carboxílicos liberados durante a incubação a 40°C foram titulados automaticamente com NaOH 0,02N. A enzima foi pesquisada também usando o sistema descrito por KOOIMAN (50), com diferentes indicadores de pH.

A atividade transeliminase foi medida pelo método espectrofotométrico de ALBERSHEIM & KILLIAS (02), usando pectina ou ácido pectico como substratos. O sistema de reação foi constituído de 0,5 ml de solução contendo enzima, 1 ml de substrato a 1% e 1 ml de tampão acetato 0,2M. O aumento da absorbância a 235 nm foi medido, sendo definido como unidade de enzima a quantidade necessária para causar um acréscimo de 1,0 na escala de absorbância, por minuto.

As atividades enzimáticas capazes de hidrolisar polisacarídeos foram determinadas pela dosagem dos açúcares redutores liberados no meio de reação, constituído de 0,1 ml de preparação contendo enzimas, 0,1 ml de tampão 0,2M e 0,3 ml de substrato. Como substratos foram usados Amido solúvel (Merck), a 1%, CM-celulose (Merck), a 0,625%, Xilano (Nutr. Biochem.), a 1% e Arabano (Sigma), a 1%, sem prévia purificação. Para cálculo de concentrações foram usados D-glucose, D-xilose e L-arabinose - como padrões, respectivamente para amido e CM-celulose, xilano e arabano.

Enzimas capazes de hidrolisar maltose e celobiose foram pesquisadas pela determinação cromatográfica dos produtos de reação, em diferentes valores de pH. 50 ul do meio de reação foram aplicados em papel WHATMAN nº 01, e após desenvolvimento da cromatografia no solvente anteriormente citado (44), os açúcares foram revelados com nitrato de prata (74).

As enzimas proteolíticas foram determinadas pela dosagem dos resíduos fenólicos solúveis em ácido tricloroacético após a precipitação da caseína não digerida. O sistema de reação foi constituído de 0,1 ml de preparação enzimática, 0,1 ml de tampão acetato 0,2M e 0,3 ml de caseína a 1%. Após a incubação, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 10%, e o filtrado foi pesquisado quanto ao teor de resíduos tenólicos, pelo método de Lowry et al (52) modificado (32), tendo sido usado como padrão o amino ácido alfa-L-tirosina.

A atividade de maceração de tecidos vegetais foi medida pela determinação do percentual dissolvido de um pequeno cubo de batata, conforme descrito por KAWAI & ABE (45). O tecido vegetal (aprox. 1 cm³) foi incubado com 1 ml de enzima, 1 ml de tampão 0,2M pH 5,5 e 3,0 ml de água destilada a 40°C por um período de quatro horas, sob agitação constante. As amostras foram incubadas em triplicata, assim como os tubos controle, nos quais havia sido substituída a enzima por igual volume de água destilada.

Estudo do sistema pectinolítico

Após a extração aquosa do meio de cultivo, as macromo

lécúlas foram precipitadas com dois volumes de acetona gelada, a -20°C . O precipitado, recolhido por filtração após sedimentação durante a noite, à baixa temperatura, foi exaustivamente lavado com acetona gelada e posteriormente liofilizado. O pó cetônico foi moído em almofariz de porcelana e mantido em dessecador, a baixa temperatura.

As enzimas foram extraídas do pó cetônico com tampão acetato $0,2\text{M}$ pH $6,5-7,0$ durante 60 minutos. Após filtração em placa porosa, o resíduo foi lavado com o mesmo tampão, sendo recolhidos os filtrados para os estudos seguintes.

A dessalinização das preparações contendo enzimas foi feita por filtração em gel, numa coluna com $2,2$ cm de diâmetro e 45 cm de altura. O volume de vazão (V_0) foi calculado pela percolação de uma pequena amostra de Blue Dextran 2.000 , macromolécula completamente excluída do gel. Foi utilizado Bio Gel P6, equilibrado com água e mantido sempre à baixa temperatura. A amostra a ser liofilizada foi sempre inferior a 30% do volume total da coluna, e após filtração foi usualmente observada uma diluição de $1:1,5$.

As preparações enzimáticas foram percoladas em coluna com $2,2$ cm de diâmetro e 22 cm de altura contendo CMcelulose ou DEAE-celulose, previamente tratada com $\text{HCl } 0,2\text{N}$ e $\text{NaOH } 0,2\text{N}$, - conforme recomendado por PETERSON (67), e equilibrada com tampão acetato pH $5,5$ $0,05\text{M}$. As proteínas adsorvidas foram eluídas com um gradiente salino e 0 a 1 M, cuja linearidade foi confirmada por espectrofotometria de emissão (KCl) ou por dosagem argentimétrica de cloretos (NaCl). A eluição de proteínas foi acompa-

nhada pela medida da absorbância a 280 nm de cada fração de 5 ml obtida. Em todas as cromatografias foi mantido um fluxo constante de 10 ml por hora.

Após dessalinização e liofilização, as amostras foram percoladas em Sephadex G-200, previamente entumescido com água - durante tres dias e então equilibrado com tampão acetato pH 5,5 e 0,05M. A coluna foi caracterizada quanto ao volume de vazão - através do uso de Blue Dextran 2.000.

As atividades enzimáticas foram caracterizadas quanto ao efeito do pH na reação de hidrólise de diferentes substratos, dentro da faixa 2,0 até 10,4. Os diferentes sistemas tampões, - preparados segundo DAWSON et al (22), foram usados dentro dos limites de sua ação tamponante : glicina/HCl, acetato de sódio/ác. acético, TRIS/HCl, glicina/NaOH. O pH ótimo foi determinado pe la incubação do sistema de reação em diferentes valores de pH, - sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação. A resistência da estrutura proteica da atividade enzimática fren te a diferentes valores de pH foi verificada através da pré-incu bação da preparação enzimática com tampão 0,05M a diferentes valores de pH, durante 60 minutos a 4°C. A atividade enzimática - residual foi então medida sob condições ótimas de temperatura e pH.

O efeito da variação térmica na reação de hidrólise do ácido péctico foi verificado, dentro da faixa de 0 a 78°C. Foi medida a velocidade da reação a diferentes temperaturas, e para a determinação da temperatura ótima como um parâmetro operacional foi utilizado o tempo de 30 minutos da curva de progresso da rea ção. A resistência térmica da estrutura proteica da atividade en

zimática foi verificada pela pré-incubação da preparação contendo enzimas a diferentes temperaturas por curtos períodos de tempo, após o que a atividade residual foi medida sob condições ótimas de pH e temperatura. A pré-incubação foi efetuada no pH ótimo da atividade enzimática.

O efeito da concentração do substrato foi verificado por incubação do sistema sob condições ótimas de temperatura e de pH. O substrato foi ácido péctico e a determinação da constante de Michaelis foi efetuada pelo sistema gráfico de Lineweaver-Burk.

O efeito de cátions mono e divalentes foi verificado dentro da faixa de concentração onde não havia interferência com o método de dosagem do açúcar redutor, sendo o sistema de reação constituído de 0,1 ml de preparação de enzimas convenientemente diluída, 0,1 ml de solução contendo cátion, e 0,3 ml de ácido péctico tamponado a pH 6,0, com uma concentração final do sistema tampão de 0,04M. Foi determinada graficamente a concentração de cátions necessária para causar um decréscimo de 50% na velocidade da reação de hidrólise.

O efeito de agentes quelantes de metais, redutores e oxidantes foi pesquisado semelhantemente ao efeito de cátions. Foram usados os compostos ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 8 - hidroxiquinolina (pHQ); ácido dietilcarbâmico (DIECA), cianeto de potássio (KCN), p - hidroximercuriobenzoato de sódio (pHMB), ácido monoiodoacético e amida correspondentes (IAA), cisteína (Cys) e n - bromosuccinimida (nBSI) dentro da faixa de concentração onde não havia interferência com o método de dosagem do açúcar redutor.

Os produtos da degradação enzimática do ácido pécico, bem como de pectina e outros polissacarídios, foram caracterizados por cromatografia em papel, tendo sido usados os dois sistemas de solventes anteriormente descritos (pg.20). Os sistema de reação era incubado da forma usual e 50 ul do meio de reação foram aplicados em papel Whatman nº 01. Após desenvolvimento dos cromatogramas, os açúcares ácidos foram revelados com azul de bromofenol e depois de ter sido marcada a posição dos mesmos, os cromatogramas foram revelados pelo procedimento de TREVELIAN et al (74). Os cromatogramas que visavam a caracterização cromatográfica de produtos de reação de hidrólise dos polissacarídios neutros foram simplesmente revelados por esse último procedimento. Como padrões para as cromatografias foi sempre utilizado o monossacarídeo considerado como principal constituinte da macromolécula, e no caso de ácido pécico, foi usado também um hidrolisado parcial de ácido pectico com ácido trifluoracético 1N à 100°C, por 7 horas. Para efeito de comparação, foram calculados os valores de R_f para todas as manchas referentes a açúcares, e a percentagem de migração em relação ao monossacarídeo considerado como padrão, expressa como R_{mono} .

O grau de hidrólise alcançado pelas diferentes preparações enzimáticas frente à ácido pécico foi calculado pela dosagem de açúcares redutores pelo método de AVIGAD (03) após diferentes tempos de reação. O teor de açúcar total foi comparado com o teor de açúcares redutores após hidrólise, resultando o percentual de hidrólise alcançado.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Produção de enzimas pectinolíticas

A produção de enzimas pectinolíticas foi pesquisada durante o crescimento do microrganismo em meio semi-sólido. A degradação de pectina pelas atividades enzimáticas presentes no extrato aquoso do meio de cultura foi verificada em diferentes tempos de crescimento, tendo sido observado o máximo de atividade em torno do 6º dia. Foi observado também, que a pós a produção, as atividades enzimáticas mantiveram-se num nível relativamente constante, entre o 5º e 8º dia de crescimento. A capacidade de maceração de tecido vegetal foi medida simultaneamente, tendo sido constatado um máximo de atividade no 4º dia de crescimento do microrganismo. Estes resultados encontram-se ilustrados na figura 01.

Caracterização da atividade pectinolítica no extrato bruto

A atividade galacturonosidásica foi caracterizada quanto ao efeito do pH, tendo sido determinado o pH ótimo de 6,0 e uma sensibilidade bastante acentuada frente a pH inferiores a 5,0 (figura 02). Os estudos referentes à influência da

temperatura revelaram um sistema pectinolítico relativamente termolábil na ausência do substrato, com uma meia-vida de 10 minutos a 31°C. Em presença do substrato, a temperatura ótima foi de 50°C, mesmo para tempos prolongados de reação. Os resultados com relação à temperatura ótima para a hidrólise enzimática do ácido pécico e à resistência térmica da estrutura proteica da atividade enzimática acham-se ilustrados na figura 03.

Apesar de apresentar uma velocidade inicial bastante semelhante, após alguns minutos de reação a hidrólise do ácido pécico se torna mais acentuada do que a de pectina de ambas as fontes, limão e café. A curva de progresso da hidrólise de substâncias pécicas acha-se expressa na figura 04, demonstrando nitidamente o efeito da esterificação do substrato na velocidade da reação. A análise cromatográfica dos produtos indica ácidos mono e oligogalacturônicos, de conformidade com os resultados apresentados na tabela 01 e ilustrados no cromatograma 01.

A atividade pectinesterase, embora tenha sido pesquisada sob diferentes condições e metodologia, não foi encontrada no meio de crescimento. O mesmo ocorreu com a atividade transeliminase, que foi pesquisada em diferentes valores de pH e com diferentes substratos, como pectina, ácidos pectínicos e ácido pécico.

Outras atividades hidrolíticas no extrato bruto

No extrato bruto foi constatada a presença de ativi

dades capazes de degradar amido, CM-celulose, xilano e arabano. O pH ótimo para cada reação enzimática foi definido, conforme - ilustram as figuras 05,06,07 e 08 e a curva de progresso da reação de hidrólise foi seguida. Os produtos de hidrólise foram caracterizados cromatograficamente, estando os resultados expres sos na tabela 02 e ilustrados no cromatograma 02.

A hidrólise enzimática de maltose e celobiose foi cons tatada cromatograficamente em diferentes valores de pH, tendo - ocorrido numa ampla faixa de pH, de 4 a 9.

A atividade proteolítica foi determinada em diferentes valores de pH, sendo que o máximo ocorreu a pH 7,0 e as atividades relativas a pH 4,0 e 9,0 foram 35% e 70%, respectivamente.

Purificação da atividade pectinolítica

a) Comportamento frente a trocadores de íons

A preparação enzimática, dessalinizada, foi percolada em coluna contendo celulose trocadora de íons, tendo sido fra - cionada em dois tipos: aquela atividade enzimática que é adsor - vida em CM-celulose (designada CM) e aquela adsorvida em DEAE - celulose (designada DE). O comportamento cromatográfico da pre paração bruta frente a ambos os tipos de celulose acha-se ilus trado nas figuras 09 e 10. A figura 11 ilustra o fracionamento obtido após eluição das proteínas adsorvidas em CM-celulose, - com um gradiente de NaCl, indicando a presença de uma enzima capaz de degradar ácido pécico. A figura 12 ilustra o fraciona

mento das proteínas adsorvidas em DEAE-celulose, após idêntico tratamento. Foram separadas duas atividades enzimáticas capazes de degradar ácido pécico, uma eluída com 0,13 M de NaCl e outra com 0,24M.

b) Comportamento cromatográfico em Sephadex G-200

Após dessalinização e liofilização, as frações obtidas anteriormente foram dissolvidas em volume mínimo e aplicadas separadamente em coluna contendo Sephadex G-200 equilibrado com - tampão acetato 0,05M pH 5,5. A filtração em gel é ilustrada na figura 13, evidenciando uma diferença de tamanho molecular entre os dois tipos de enzimas separados por técnicas de troca iônica: a atividade (CM) é menor, apresentando um volume de exclusão da ordem de 2,12 enquanto que ambas as atividades (DE) são muito - grandes, com volumes de exclusão de aproximadamente 1,2 e 1,3.-

c) Purificação e propriedades

A purificação das diferentes atividades enzimáticas constatadas é sumarizada nas tabelas 03 e 04. A purificação da atividade enzimática (CM) foi feita a partir do extrato bruto tratado com DEAE-celulose pH 5,5 e 0,05M, enquanto que a da atividade enzimática (DE) foi feita a partir de extrato bruto tratado semelhantemente como CM-celulose. As frações purificadas - demonstraram estar isentas de atividades enzimáticas anterior - mente constatadas no extrato bruto, nas condições descritas. A purificação foi de 54x para a atividade (CM) e da ordem de 30x para as atividades (DE).

Atividade enzimática CM

As condições de pH e efeito da concentração do ácido péctico na velocidade da reação foram pesquisados. A figura 14 ilustra os resultados com relação ao pH ótimo para a fração CM e a figura 15 apresenta os resultados com relação ao efeito da concentração do substrato, sob a forma dos convencionais gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk. O Km encontrado foi 0,12% nas condições descritas.

A atividade enzimática CM demonstrou maior atividade frente ao ácido péctico do que a pectina, hidrolisando-o até monômeros, dímeros e trímeros. Quando pectina era o substrato, a presença de tetrâmeros e oligogalacturonídeos maiores se fez notar no meio de reação, conforme indica a tabela 05 cujos dados são ilustrados na cromatografia 03. A atividade enzimática conseguiu despolimerizar rapidamente ácido péctico e pectina isolados de café.

Atividade enzimática DE

O efeito do pH na hidrólise do ácido péctico pelas duas enzimas fracionadas em DEAE-celulose foi pesquisado, e as figuras 16 e 17 ilustram os resultados obtidos. A enzima DE-1 apresenta um pH ótimo entre 6,0 e 6,5 enquanto que a enzima DE-2 apresenta um pH ótimo de 6,0. Os valores são muito semelhantes entre si e comparados com a atividade enzimática CM, também. As figuras 18 e 19 indicam o efeito da concentração do substrato na velocidade da reação, com resultado bastante

semelhantes, tanto no que diz respeito à inibição da atividade enzimática por excesso de substrato, quanto aos valores encontrados do Km, 0,019% e 0,022%, respectivamente para as enzimas DE-1 e DE-2.

A atividade enzimática DE demonstrou atividade frente ao ácido pécico e pectina, sem preferência significativa, hidrolisando ambos os tipos de substratos com a liberação de oligossacarídeos, conforme indica a tabela 06 cujos dados são ilustrados no cromatograma 04. Os dados referem-se às duas enzimas DE, cujos resultados foram semelhantes. A atividade enzimática DE conseguiu despolimerizar também os substratos isolados de frutos de café.

A tabela 07 e 08 indicam o efeito de cátions e alguns inibidores de enzimas na hidrólise do ácido pécico a pH 6,0 para as três enzimas fracionadas.

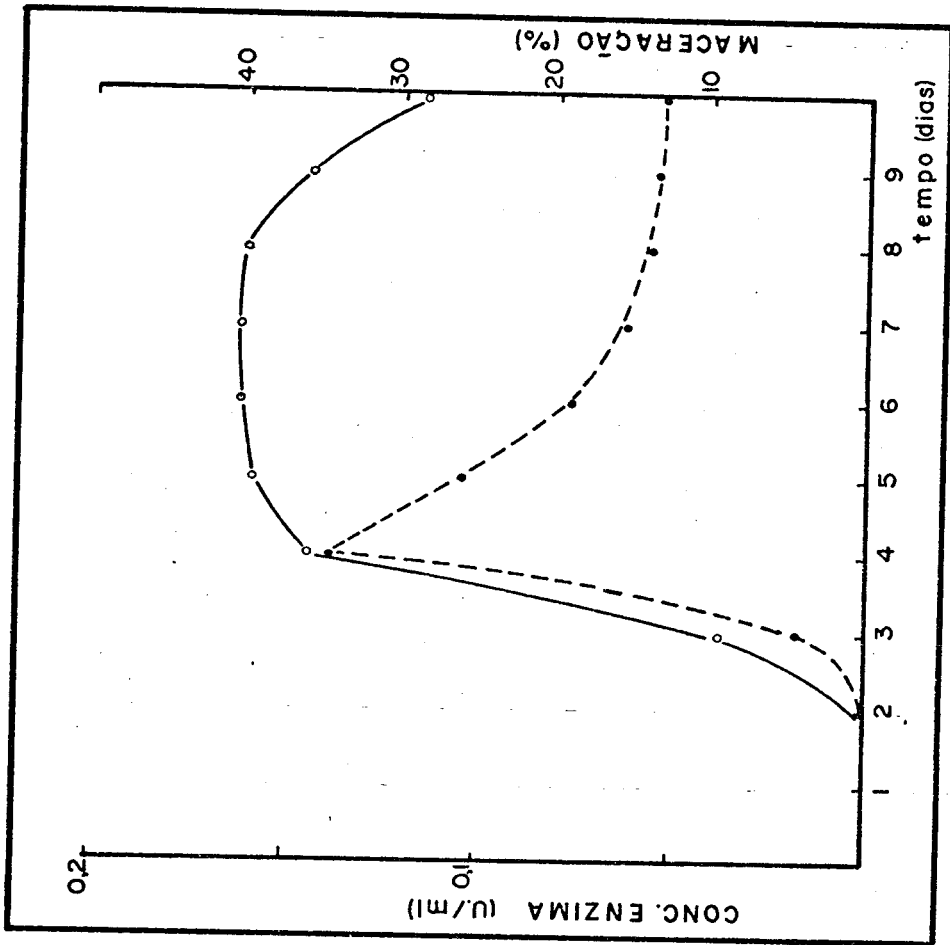


FIGURA 01 Produção de enzimas pectinolíticas por *Fusarium oxysporum* Schlecht ex. Fr.
 ○—○, atividade pectinolítica; ●—●, maceração de tecido vegetal.

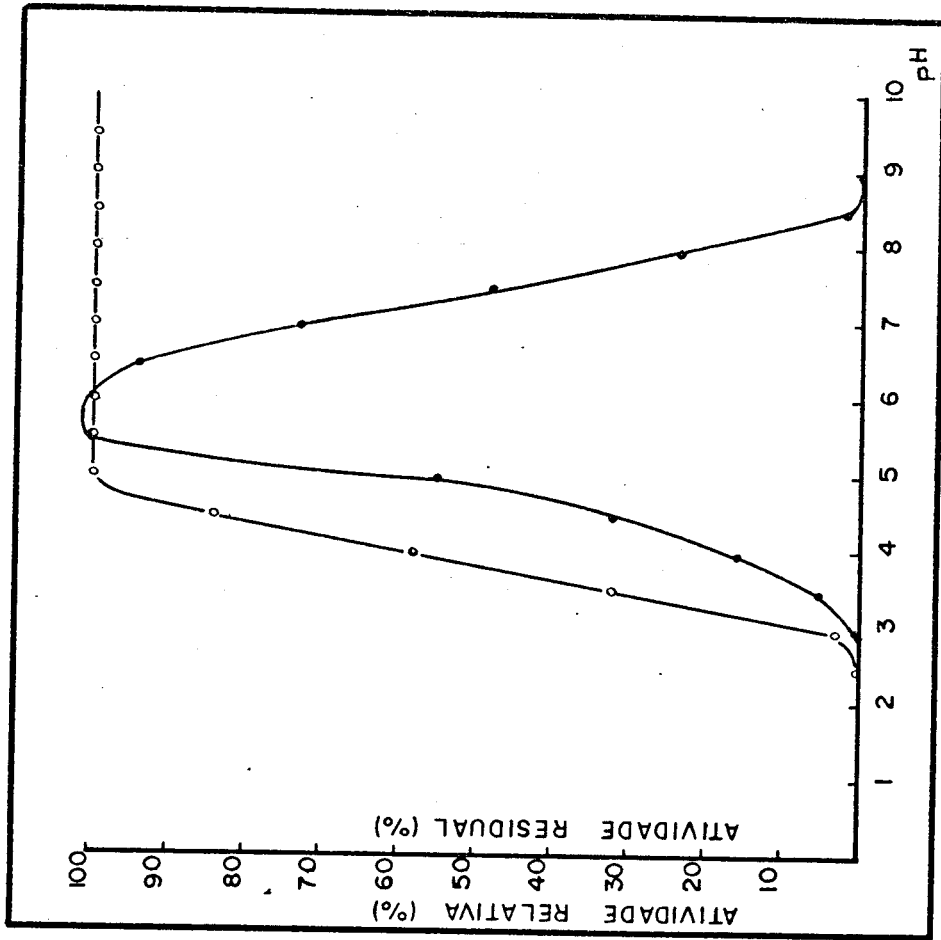


FIGURA 02 Efeito do pH na hidrólise enzimática do ácido pectico pelo extrato bruto.
●, atividade relativa; ○, atividade residual.

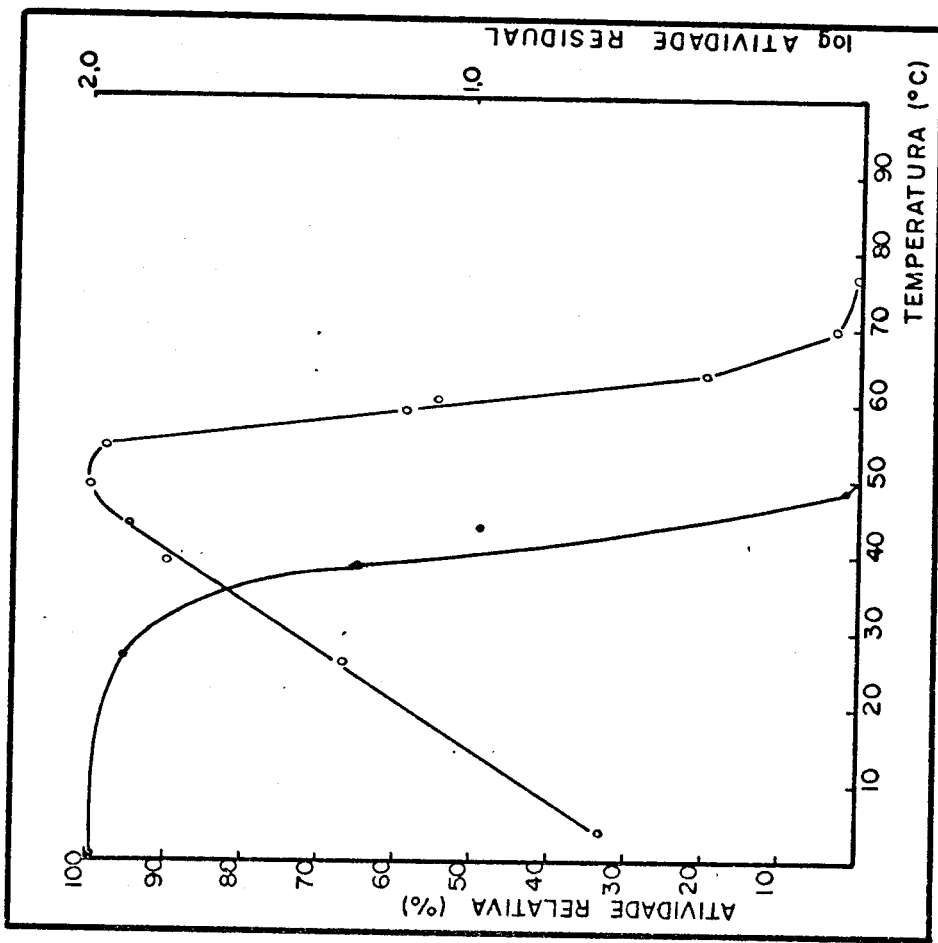


FIGURA 03 Efeito da temperatura na hidrólise enzimática do ácido pectico pelo extrato bruto.
○, atividade relativa; ●, atividade residual.

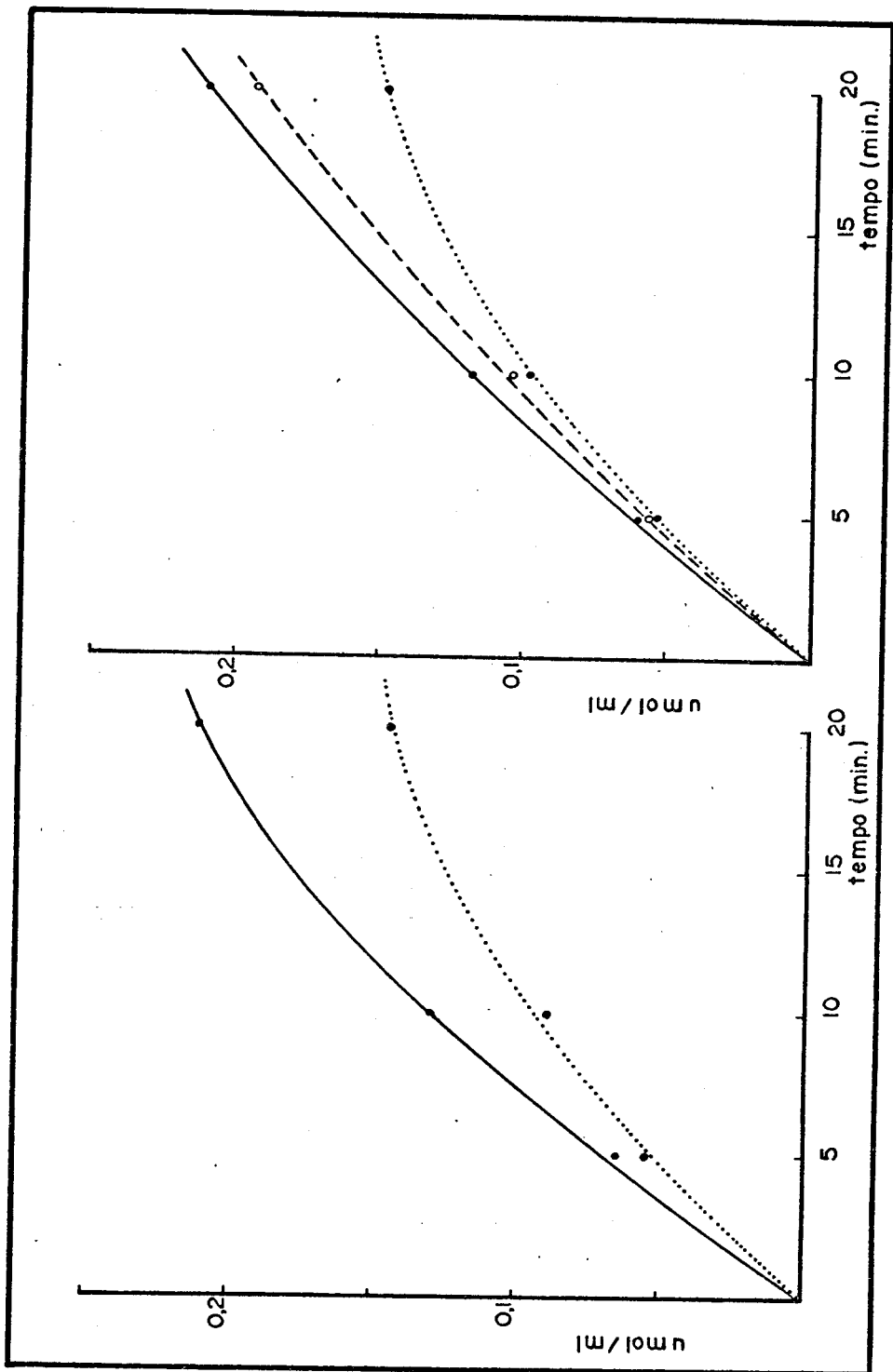


FIGURA 04 Curva de progresso da reação de hidrólise de substâncias pectícas de café (A) e de limão (B) pelo extrato bruto. ●—●, ácido pectínico; ○—○, ácido pectínico; ●.....●, pectina.

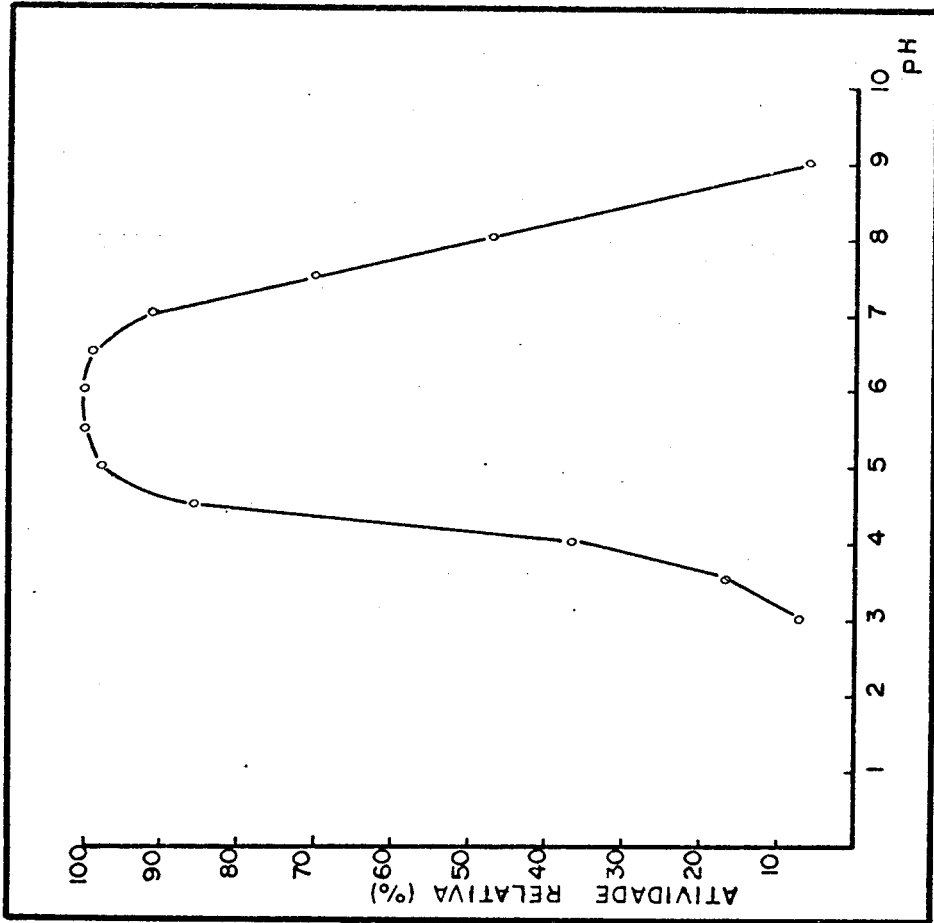


FIGURA 05 Efeito do pH na hidrólise enzimática do amido pelo extrato bruto.

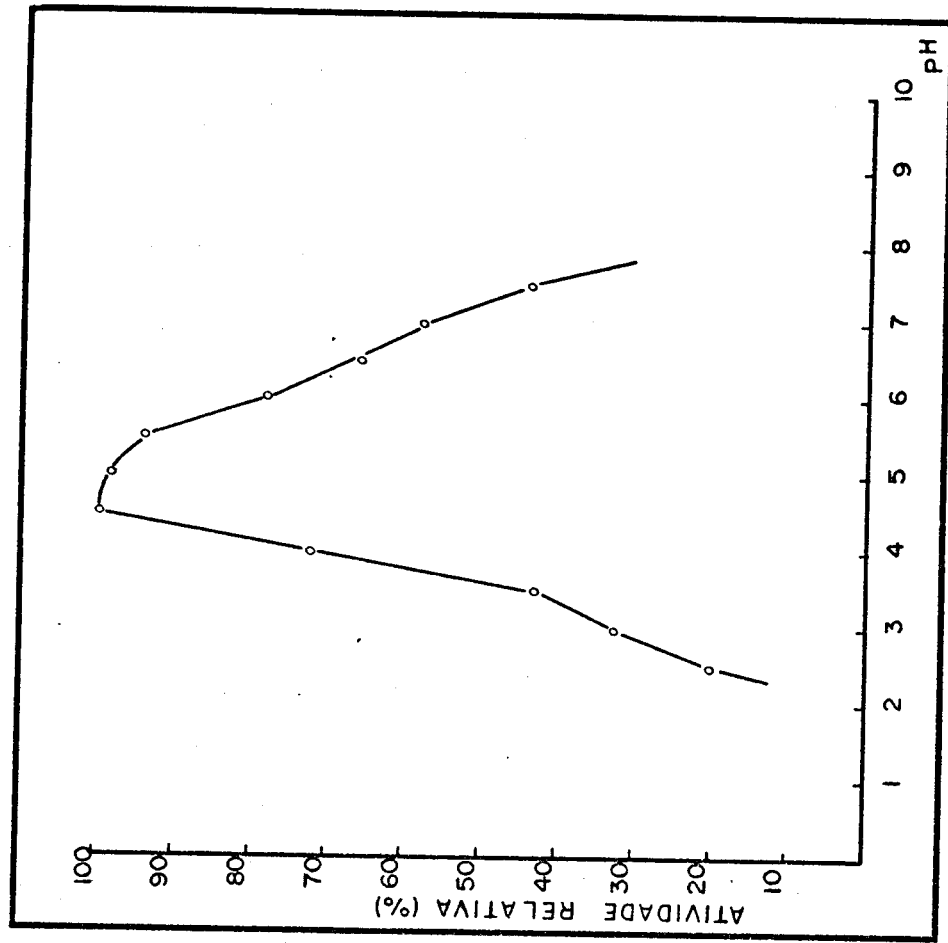


FIGURA 06 Efeito do pH na hidrólise enzimática de CM-celulose pelo extrato bruto.

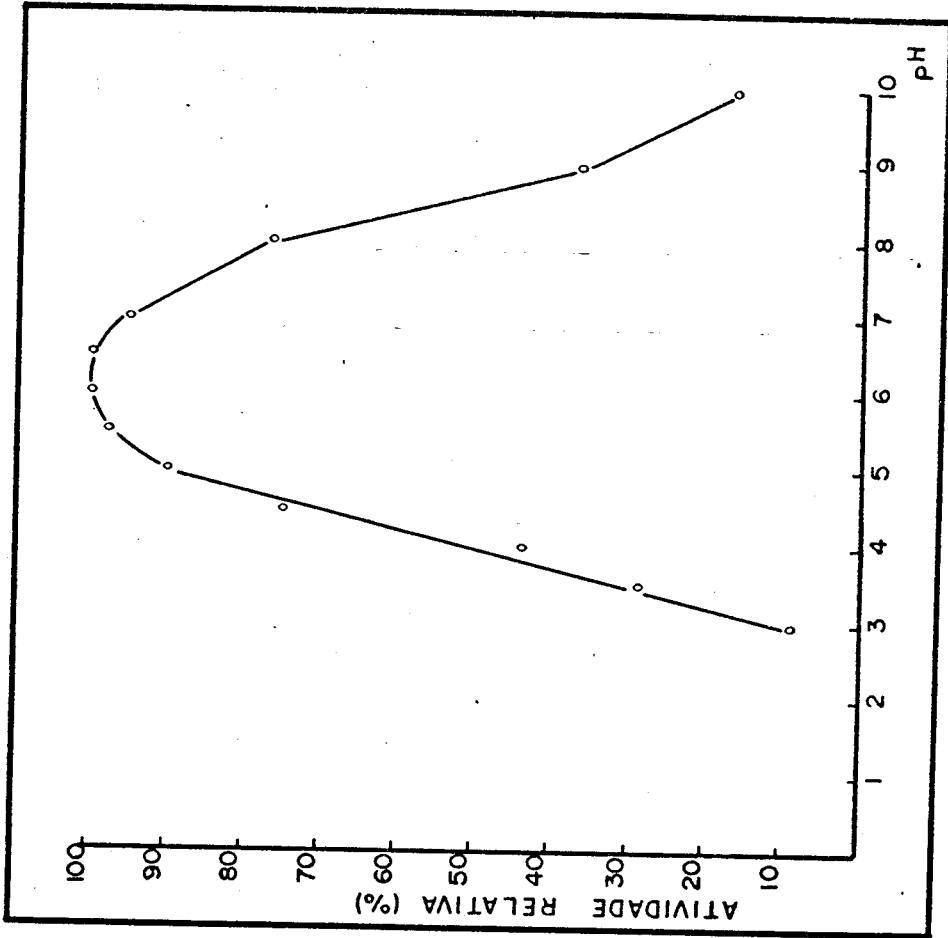


FIGURA 07 Efeito do pH na hidrólise enzimática do caseína pelo extrato bruto.

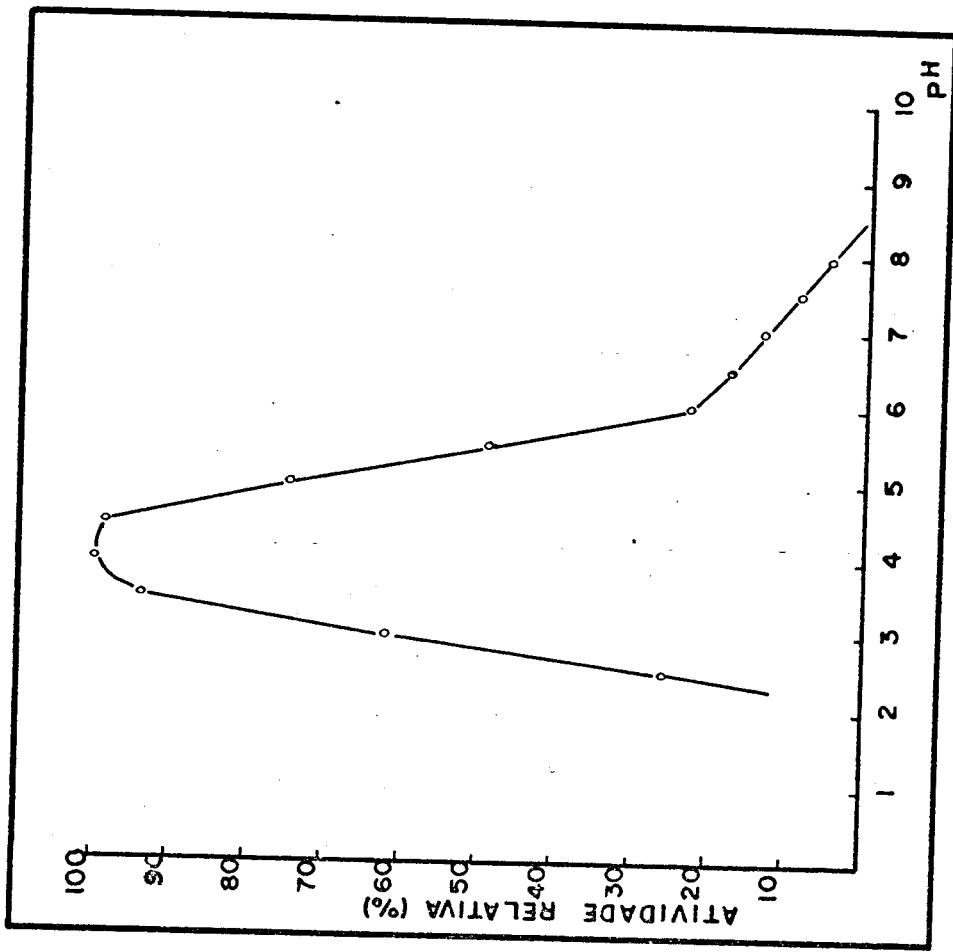


FIGURA 08 Efeito do pH na hidrólise enzimática do arabinose pelo extrato bruto.

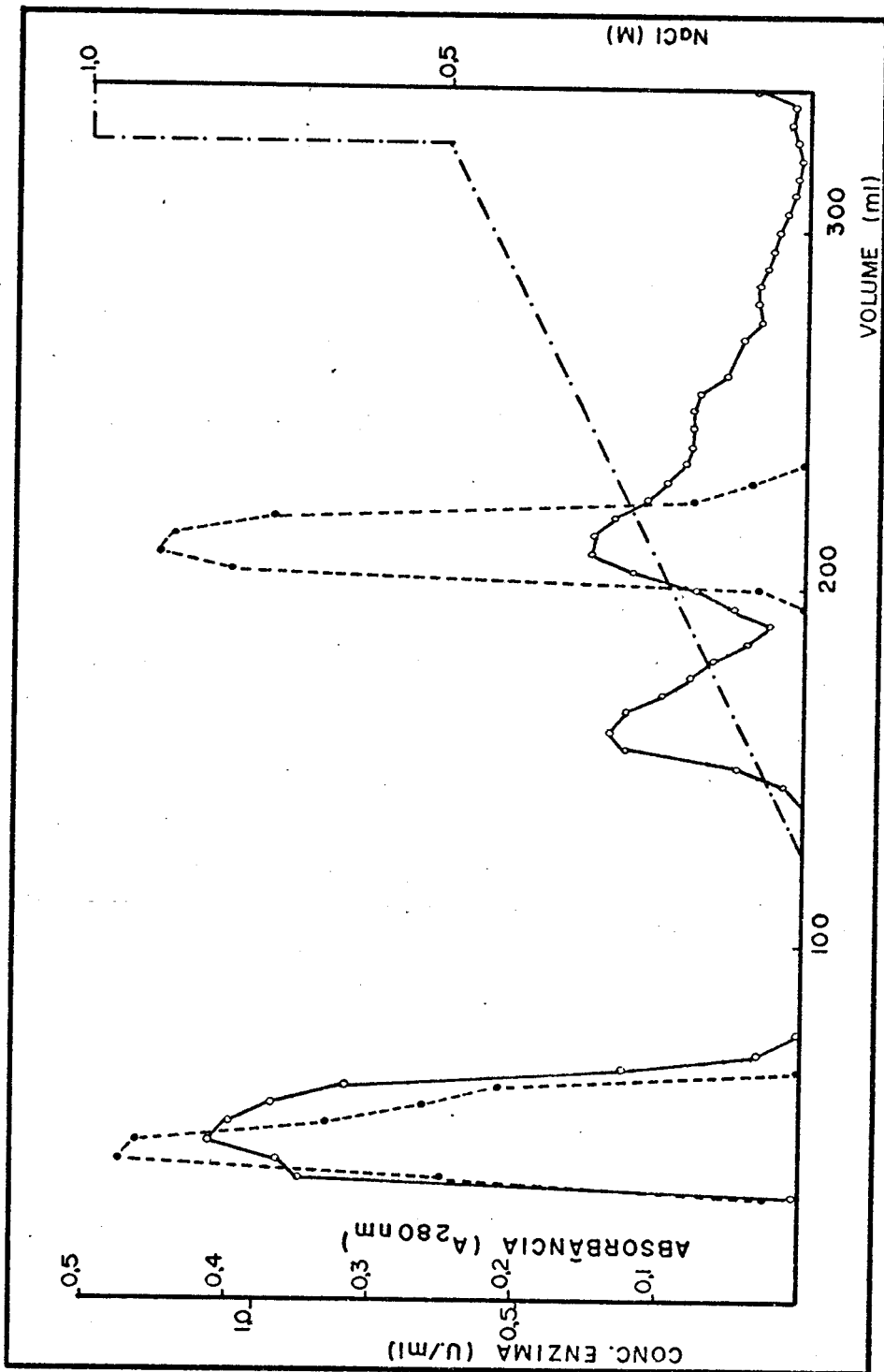


FIGURA 69 Comportamento cromatográfico da atividade poligalacturonase em C₁₂-celulose em 5,5 0,05% . **●—●**, atividade enzimática; **○—○**, absorbância a 280 nm, **- · - · -**, NaCl.

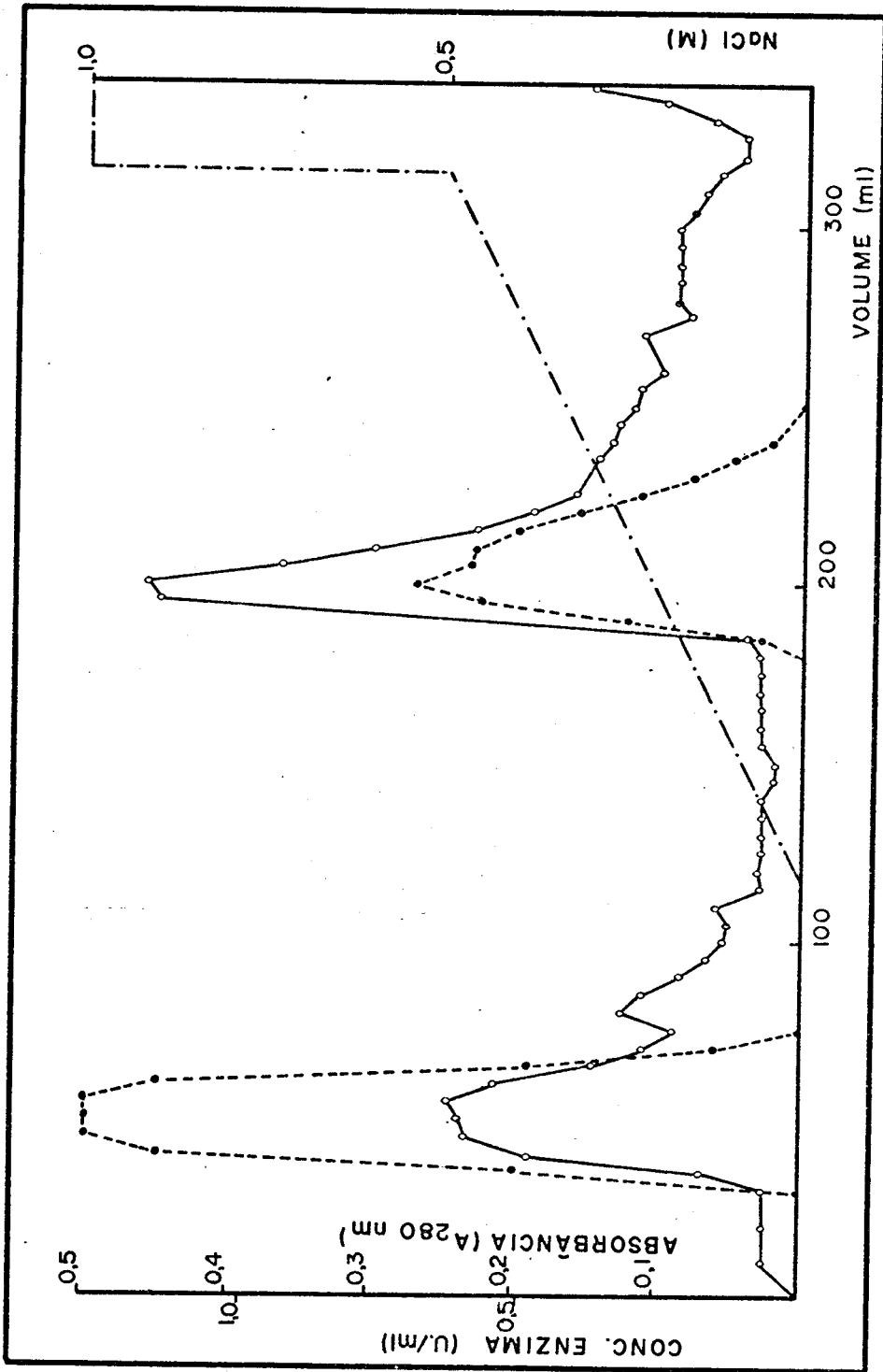


FIGURA 10 Comportamento cromatográfico da atividade poliglacturonase em DM7-celulose pH 5,5 0,05%. ●---●, atividade enzimática: ○---○, absorvância a 280 nm, ---, NaCl.

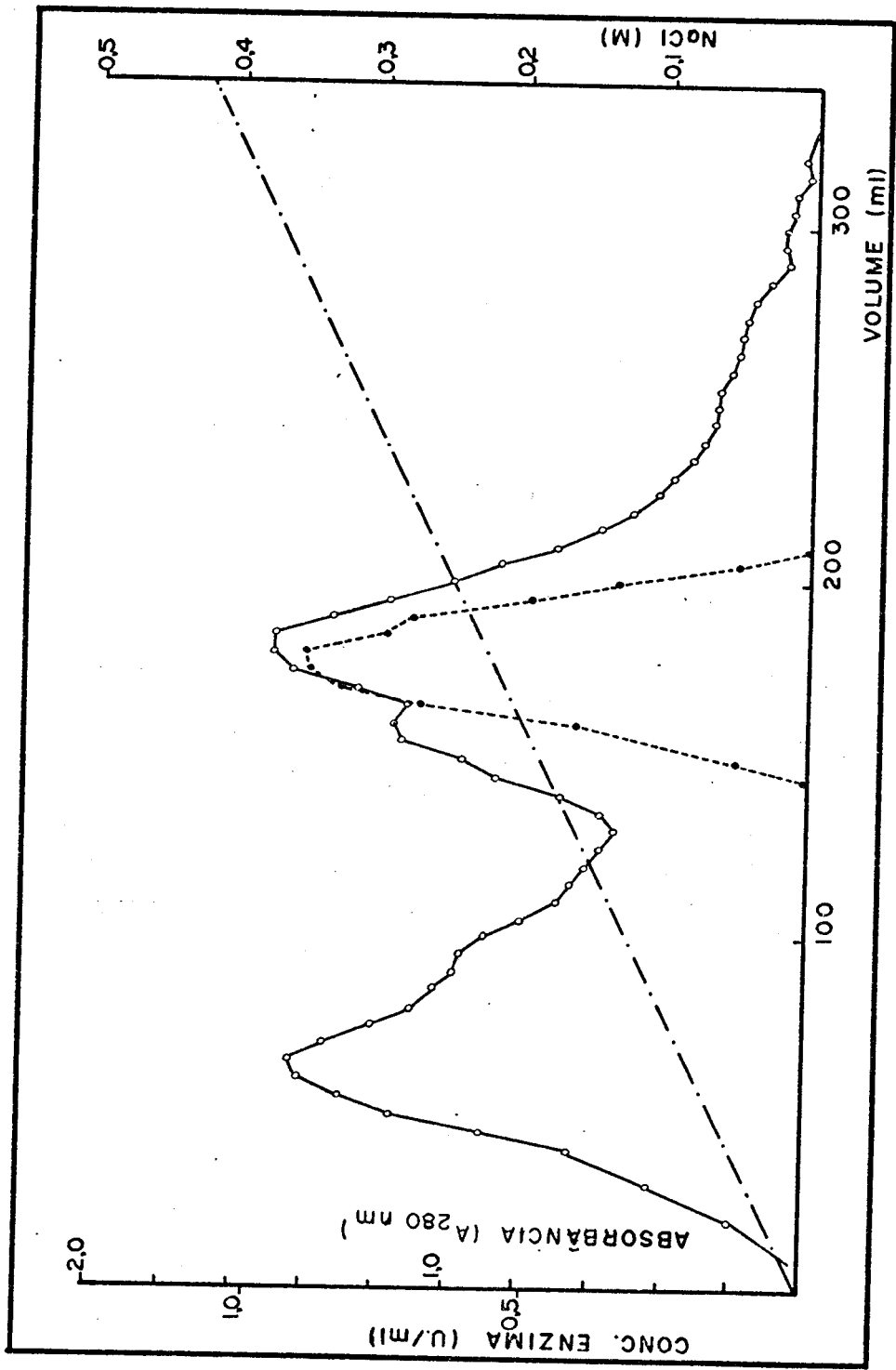


FIGURA 11 Cromatografia em CM-celulose de 5,5' 0,05%
 ●---●; atividade polilacturonase. ○---○, absorvância a 280nm,
 -.-.-, NaCl.

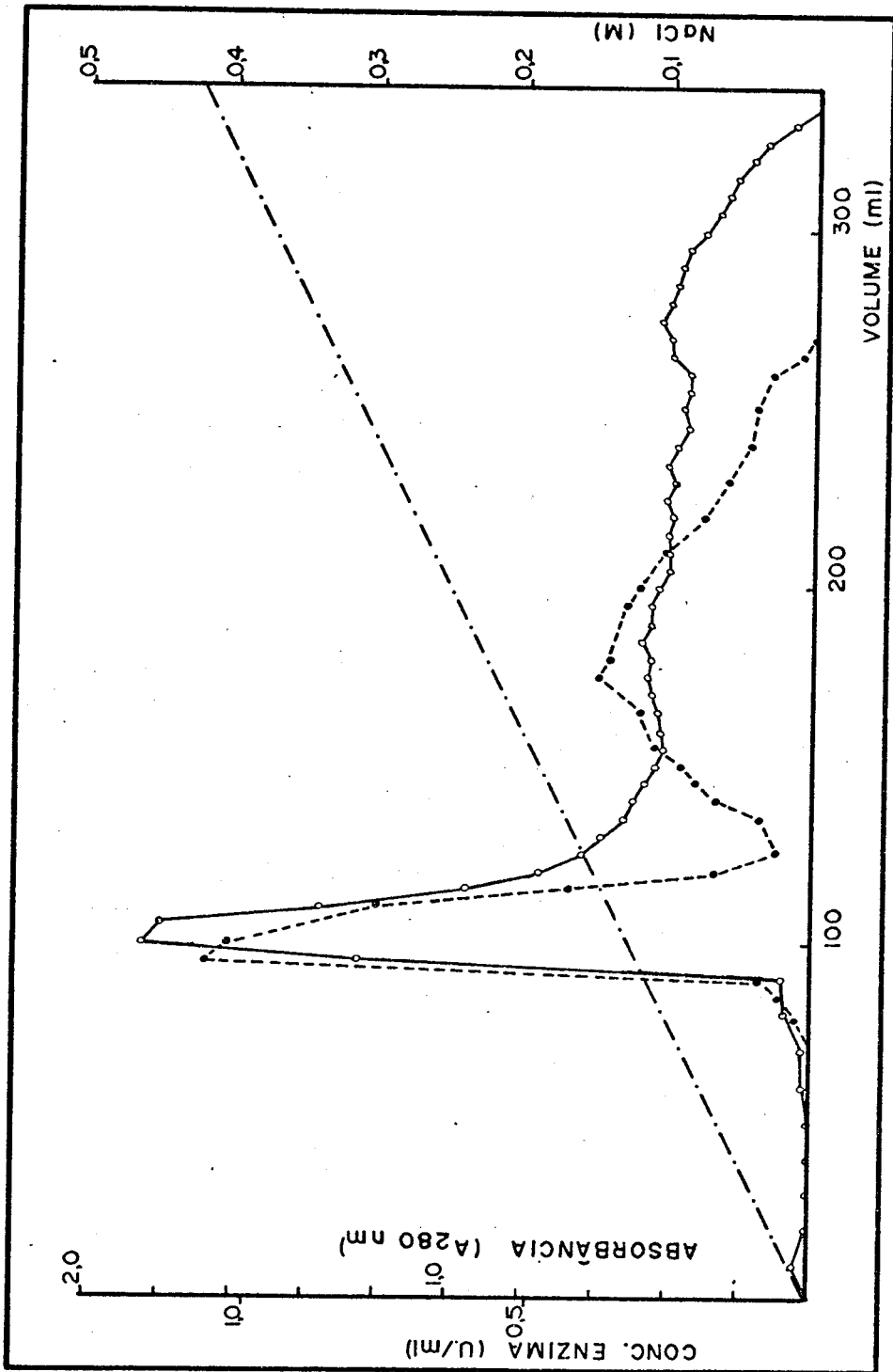


FIGURA 12 Cromatografia em DAPF-celulose pH 5,5, 0,05M.
 ●—●, atividade polielctromonase; ○—○, absorbância a 280nm,
 —, NaCl.

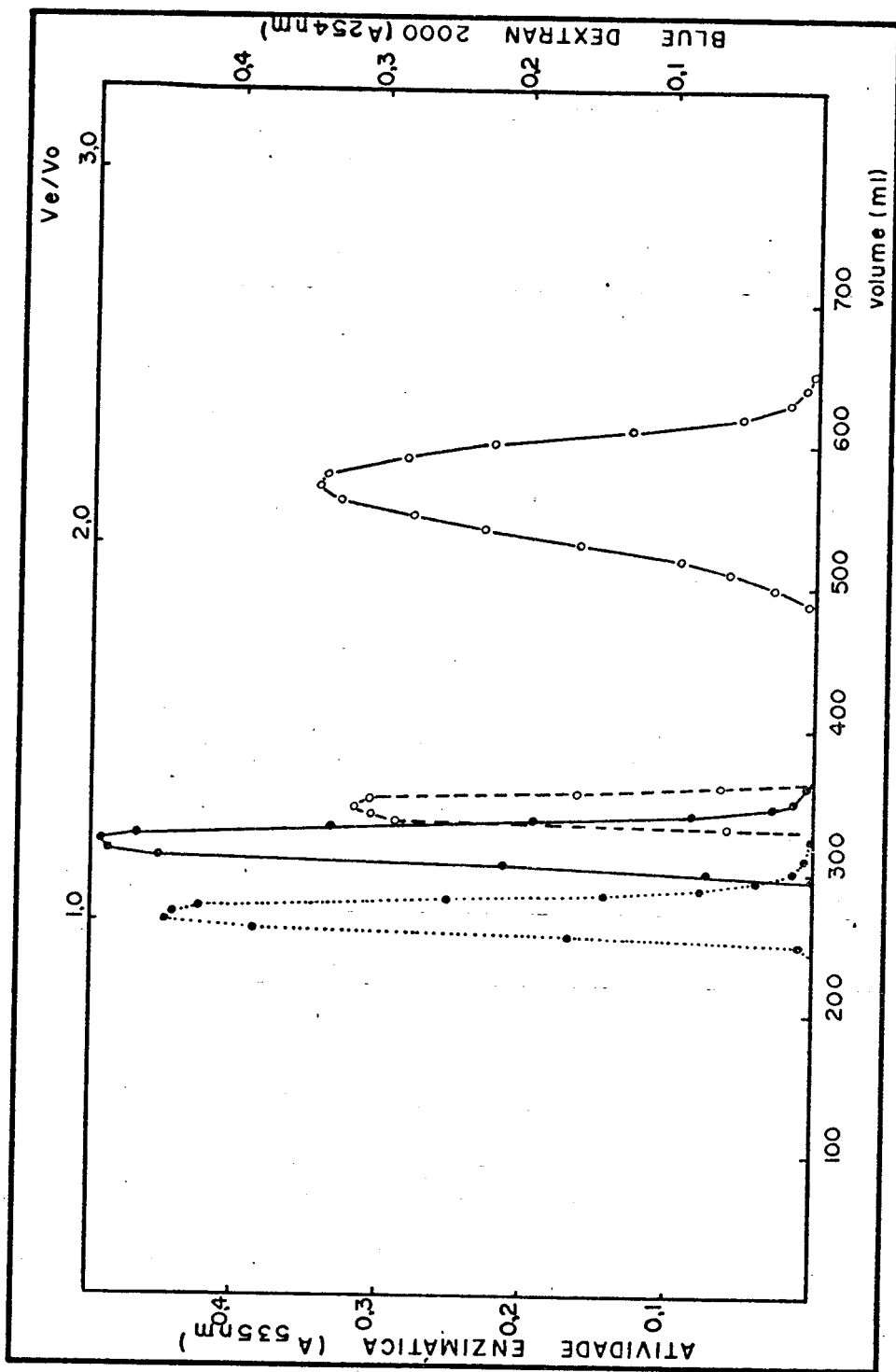


FIGURA 13. Eluição em Sephadex G-200 pH 5,5 0,0M, Polielcturonase (DL); ○---○, Polielcturonase (DL-1); ●—●, Polielcturonase (DL-2); ●.....●, Blue Dextran 2.000.

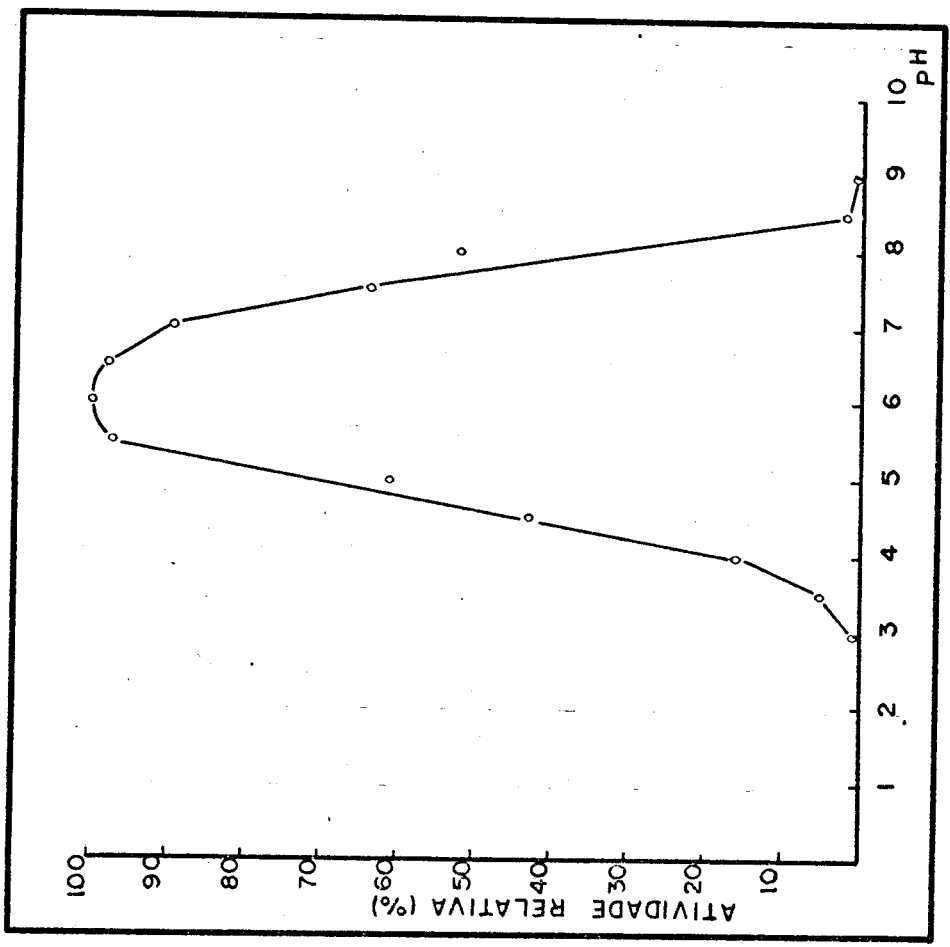


FIGURA 14 - Efeito do pH na hidrólise enzimática do ácido láctico pela fração (CIV).

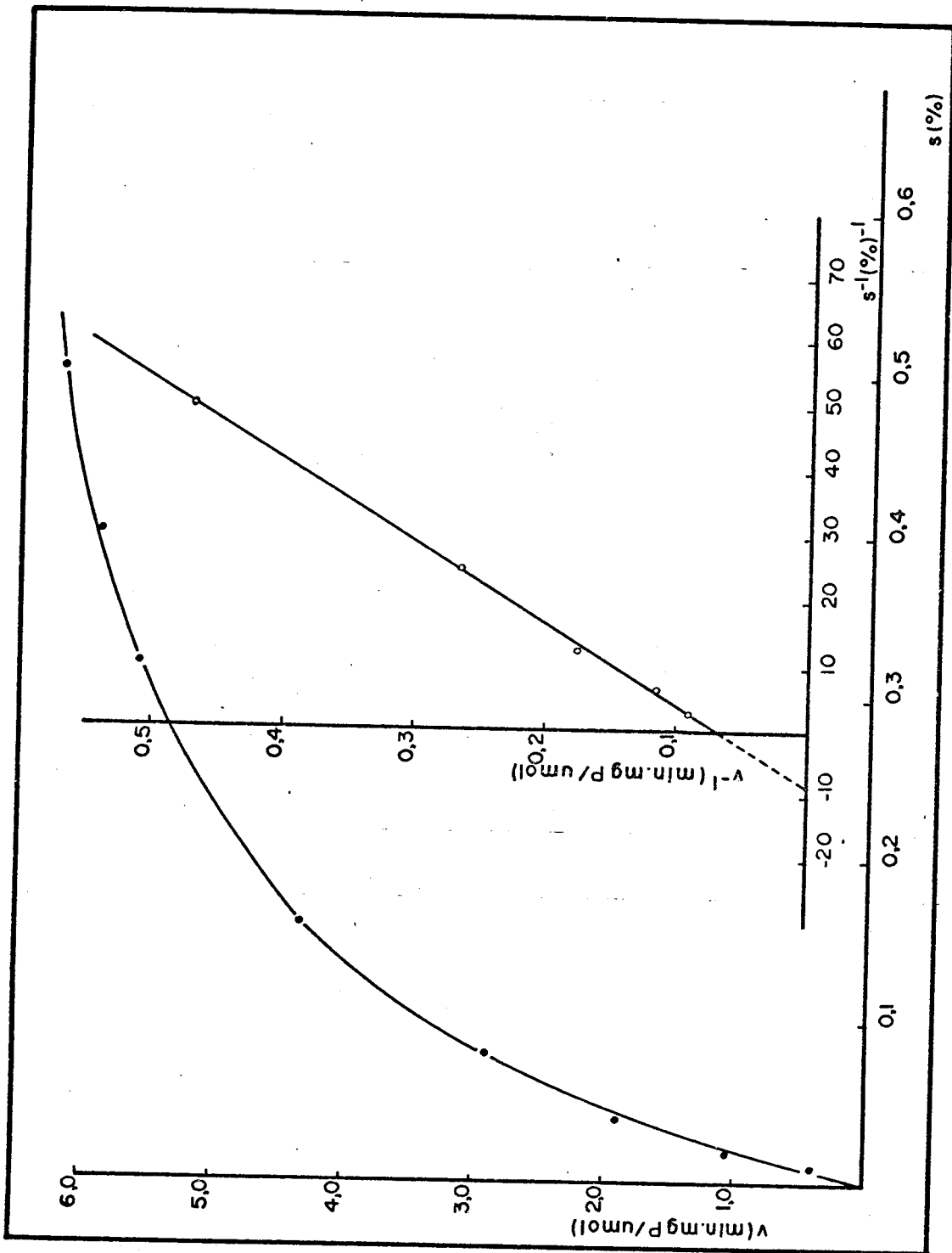


Figura 15 Efeito da concentração do substrato na hidrólise enzimática do ácido láctico pela fração (a). ●—●, sec. Michellis-Menten, ○—○, sec. Lineweaver-Burk.

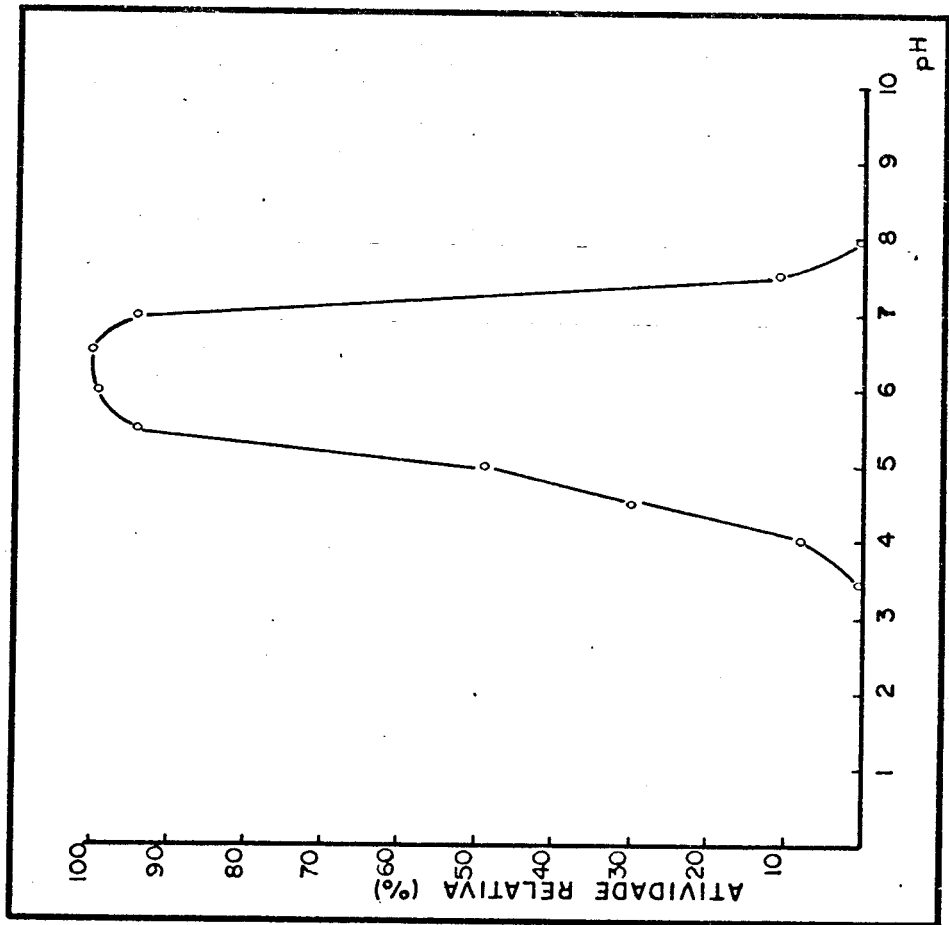


FIGURA 16 Efeito do pH na hidrólise enzimática do ácido láctico pela fração (DF-1).

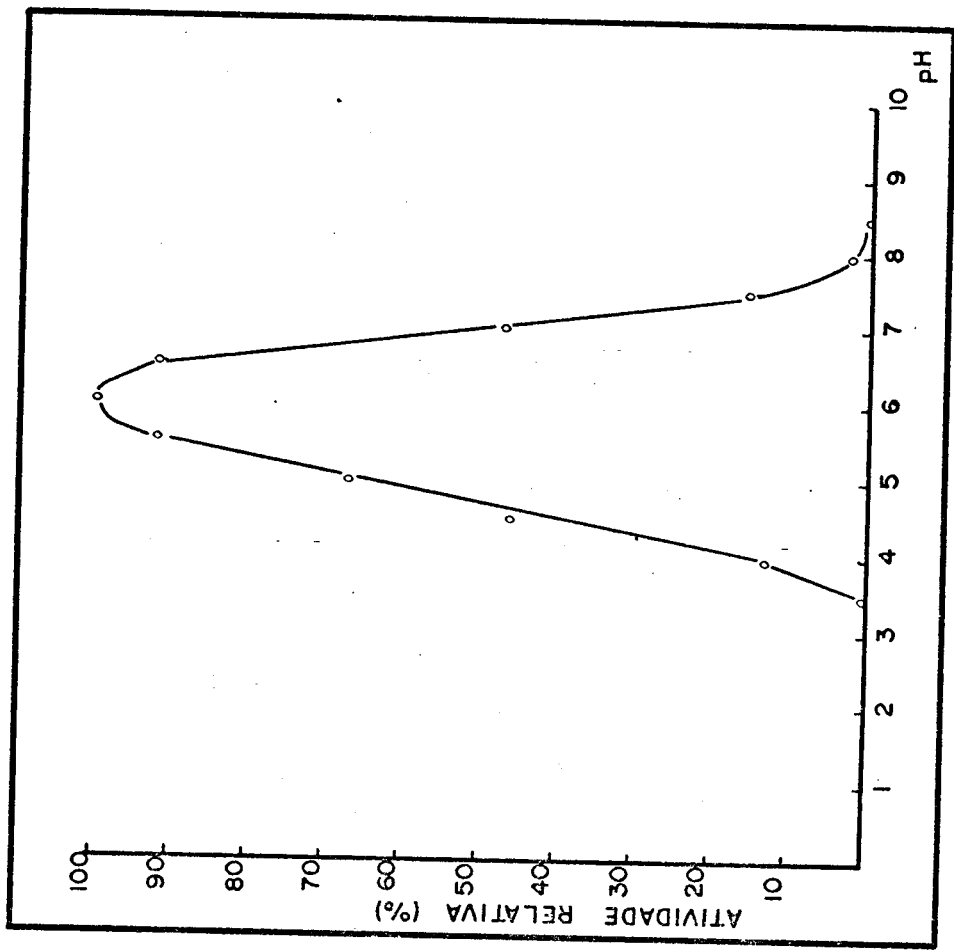


FIGURA 17 Efeito do pH na hidrólise enzimática do ácido láctico pela fração (DF-2).

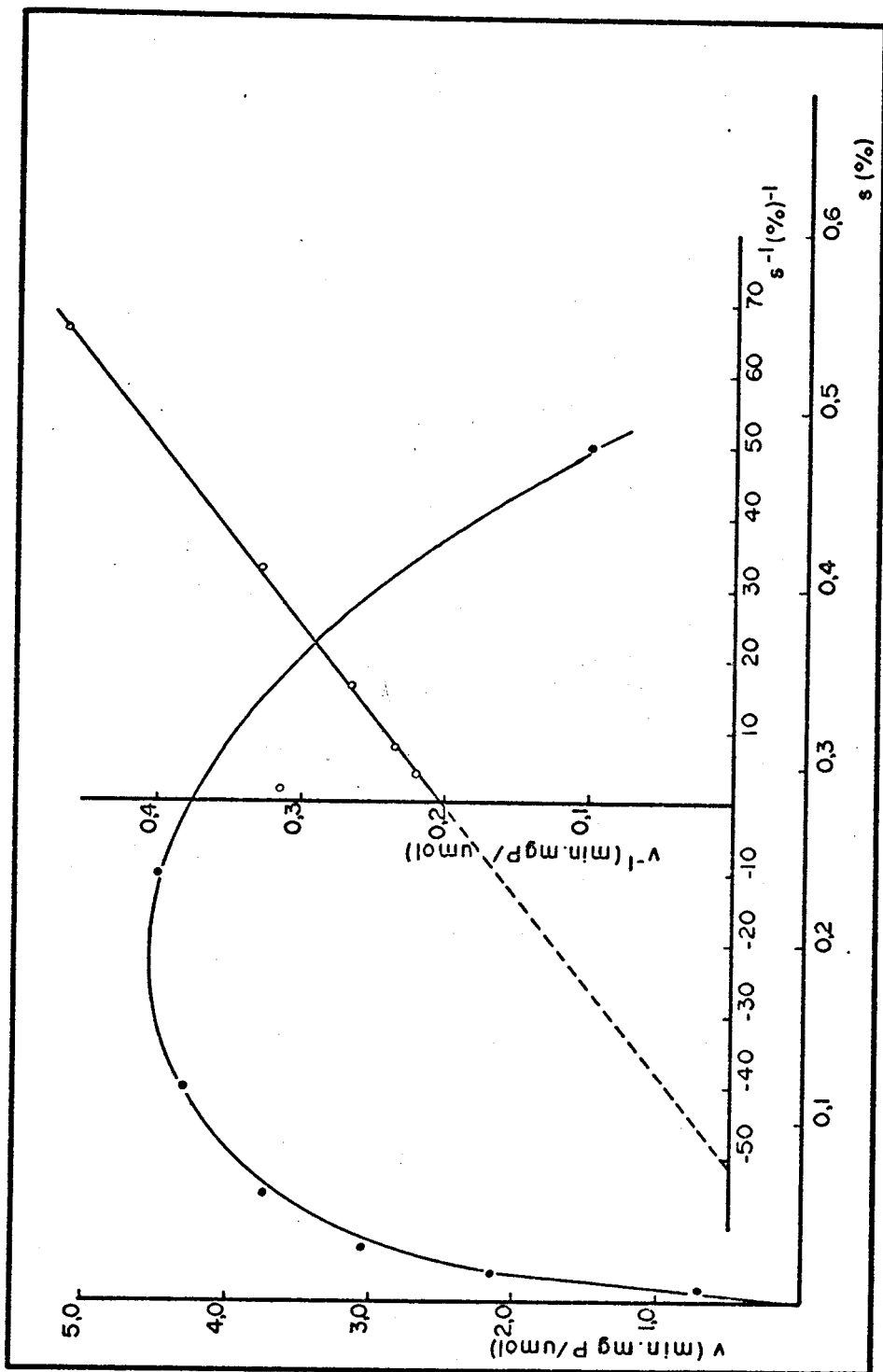


FIGURA 18 Efeito da concentração do substrato na hidrólise enzimática do ácido láctico pela frutose (DE-1). ●—●, seg. Michaelis-Menten, ○—○, seg. Lineweaver-Burk.

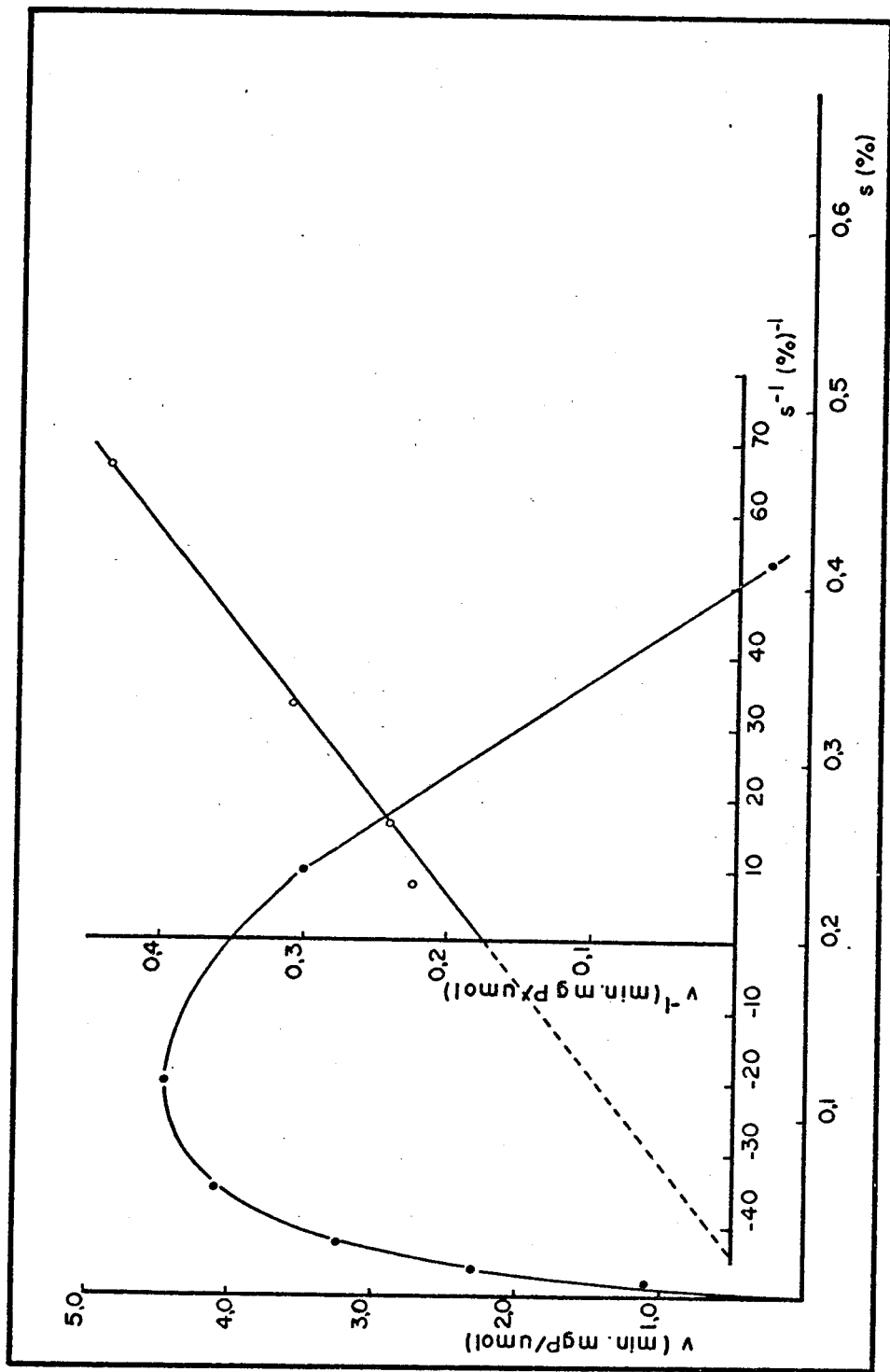


FIGURA 19 Efeito da concentração do substrato na hidrólise enzimática do ácido pécico pela fração (DH-2). ● —●, *scS. Nichollis-Monten*, ○ —○, *scS. Linneaveer-Burk*.

TABELA 01. Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise enzimática do ácido pécico pelo extrato bruto.

nº	R _{ac. gal}				
	Ac.D-gal	Ácido pécico hidrolisado	controle	limão	café
1	1,0	1,0	-o-	1,0	1,0
2	-o-	0,5	-o-	0,49	0,51
3	-o-	0,25	-o-	0,25	0,25
4	-o-	0,12	-o-	-o-	-o-
5	-o-	0,07	-o-	-o-	-o-

TABELA 02 Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise enzimática de diferentes polissacarídios.

AMIDO		CM-CELULOSE		XILANO		ARABANO	
R _f	R _{glc}	R _f	R _{glc}	R _f	R _{xyl}	R _f	R _{ara}
0,39	1,0	0,39	1,0	0,46	1,04	0,42	1,02
0,26	0,67			0,34	0,77	0,32	0,78
0,15	0,38			0,27	0,61		
0,11	0,28			0,12	0,27		
0,05	0,13			0,06	0,14		

TABELA 03 Resumo da purificação da poligalacturonase (CM) a partir do extrato aquoso dessalinizado tratado com DEAE-celulose.

Tratamento	Volume (ml)	Enzima (U/ml)	Unidades totais	Proteína (mg/ml)	Atividade Específica	Purific.
Extrato aquoso	1.000	0,128	128	1,26	0,102	1,0x
CM-celulose	100	0,582	58,2	0,53	1,10	10,8 x
Sephadex G-200	120	0,086	10,32	0,015	5,55	54,4 x

TABELA 04 Resumo da purificação da poligalacturonase (DE) a partir do extrato aquoso dessalinizado tratado com CM-celulose.

Tratamento	Volume (ml)	Enzima (U/ml)	Unidades totais	Proteína (mg/ml)	Atividade Específica	Purific.
Extrato aquoso	300	0,189	56,80	1,25	0,15	1,0x
DEAE-celulose 1º pico (DE-1)	150	0,085	12,75	0,21	0,40	2,68x
2º pico (DE-2)	300	0,048	14,40	0,08	0,60	4,0 x
Sephadex G-200 (DE-1)	30	0,34	10,20	0,083	4,10	27,3x
(DE-2)	30	0,35	10,50	0,077	4,55	30,3x

TABELA 05 Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise enzimática de substâncias pécticas, isoladas de limão e de café, pela poligalacturonase (CM).

nº	R _{ac.gal.}							
	Ac.D-gal	Ácido péctico hidrolisado	controle	limão	café	Pectina limão café		
1	1,0	1,0	-o-	1,0	1,0	1,0	1,0	
2	-o-	0,5	-o-	0,5	0,5	0,5	0,5	
3	-o-	0,25	-o-	0,25	0,25	0,25	0,25	
4	-o-	0,12	-o-	-o-	-o-	0,10	0,10	
5	-o-	0,07	-o-	-o-	-o-	(+)	(+)	

TABELA 06 Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise enzimática de substâncias pécticas isoladas, de limão e de café, pela poligalacturonase (DE).

nº	R _{ac.gal.}							
	Ac.D-gal	Ácido péctico hidrolisado	controle	limão	café	Pectina limão café		
1	1,0	1,0	-o-	1,0	1,0	1,0	1,0	
2	-o-	0,5	-o-	0,5	0,5	0,5	0,5	
3	-o-	0,25	-o-	0,25	0,25	0,25	0,25	
4	-o-	0,12	-o-	0,12	0,12	0,12	0,12	
5	-o-	0,07	-o-	(+)	(+)	(+)	(+)	

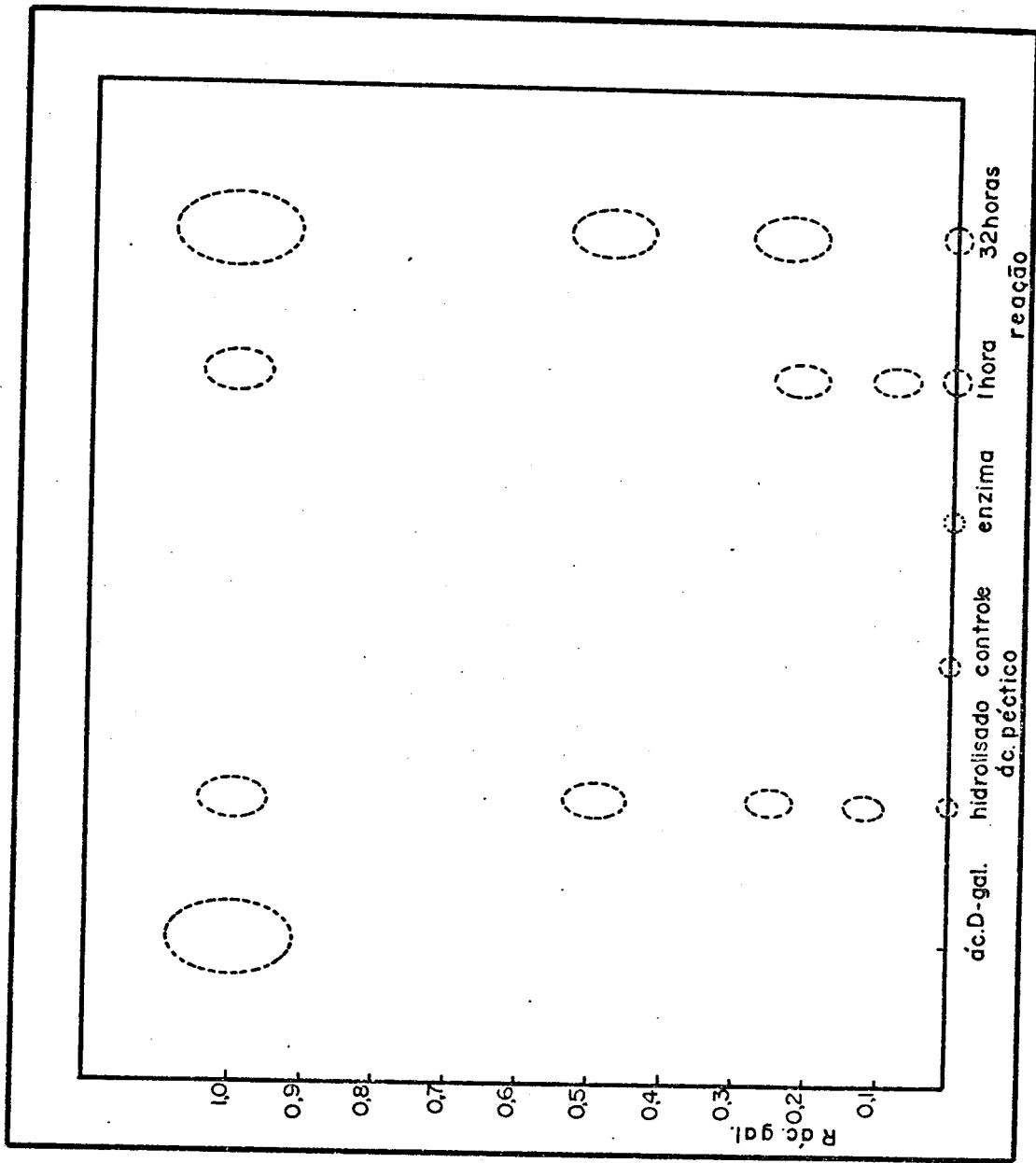
TABELA 07 Efeito de cátions na hidrólise enzimática do ácido pectico a pH 6,0.

CÁTION	- log (cátion) _{50%}		
	(CM)	(DE-1)	(DE-2)
AgNO ₃	-o-	4,3	3,7
BaCl ₂	2,6	2,7	3,7
CaCl ₂	3,8	3,1	3,5
CoCl ₂	3,1	3,9	2,7
CuSO ₄	4,3	5,0	5,0
KCl	-o-	-o-	-o-
MgCl ₂	-o-	2,3	-o-
MnSO ₄	2,6	4,2	3,9
NaCl	-o-	-o-	-o-
NiSO ₄	3,3	3,3	2,7
Pb(CH ₃ COO) ₂	3,6	4,2	4,8
Zn(CH ₃ COO) ₂	3,1	4,0	3,0

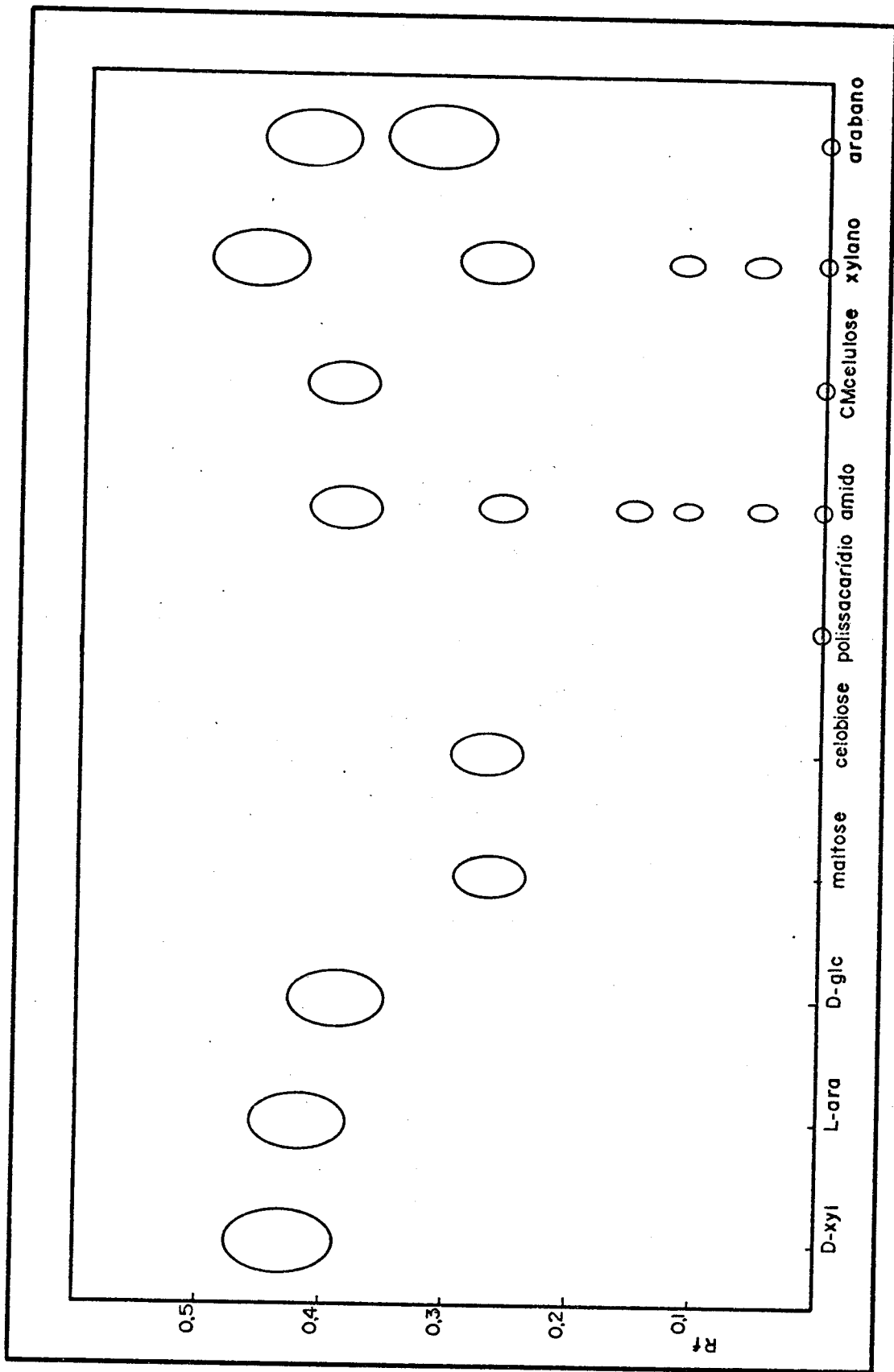
Obs.: Os dados acima referem-se à concentração de cátion necessária para causar uma diminuição de 50% na velocidade da reação enzimática.

TABELA 08 Efeito de inibidores de enzimas na hidrólise do ácido pectico a pH 6,0.

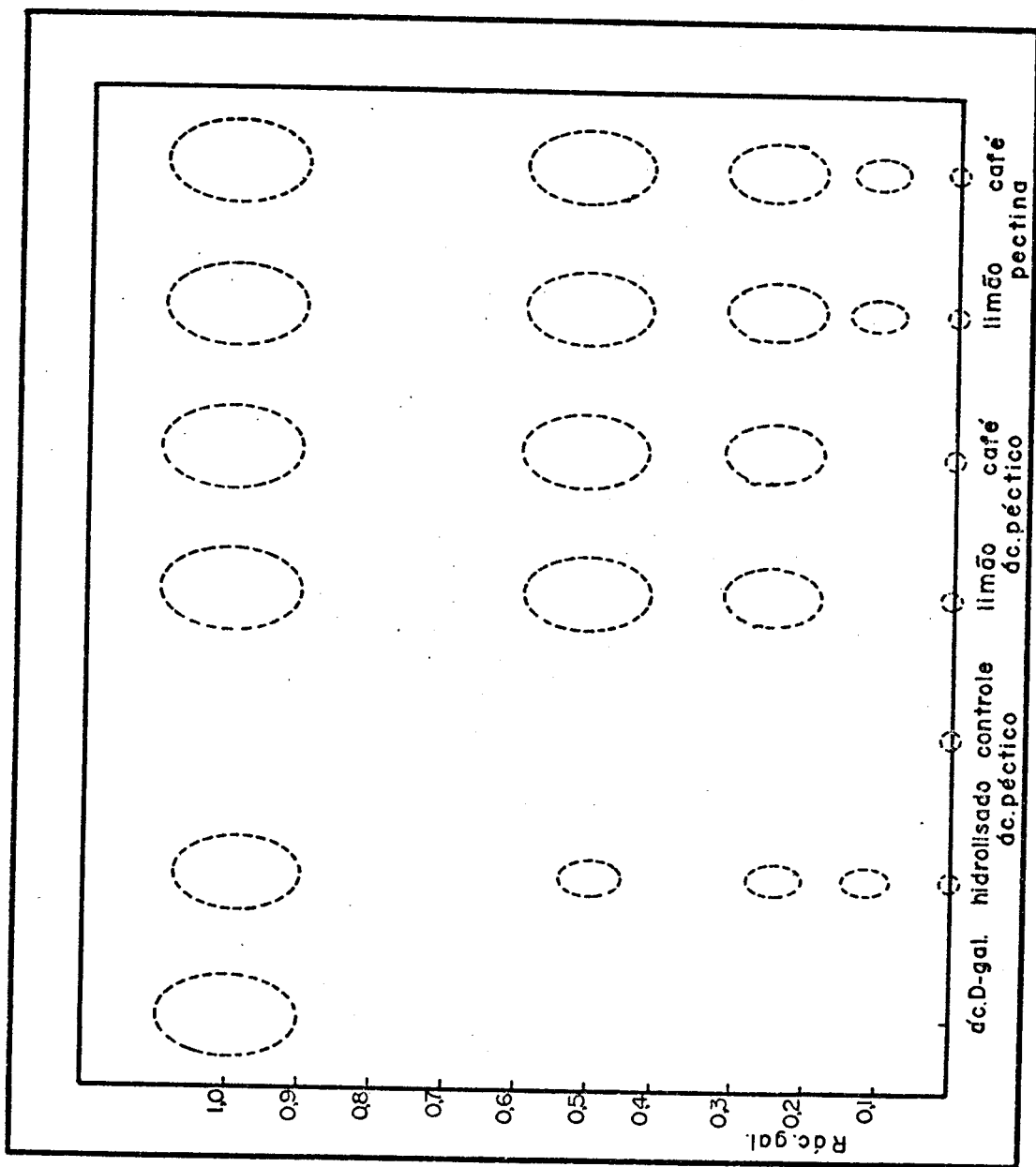
TRATAMENTO	ATIVIDADE RELATIVA(%)		
	(CM)	(DE-1)	(DE-2)
Nenhum	100	100	100
EDTA, 1mM	100	144	187
pHQ, 1mM	100	160	100
DIECA, 1mM	100	120	145
KCN, 1mM	92	95	20
pHMB, 1mM	85	50	100
IAA, 1mM	93	94	95
Cys, 1mM	100	250	210
nBSI, 1mM	0	0	12



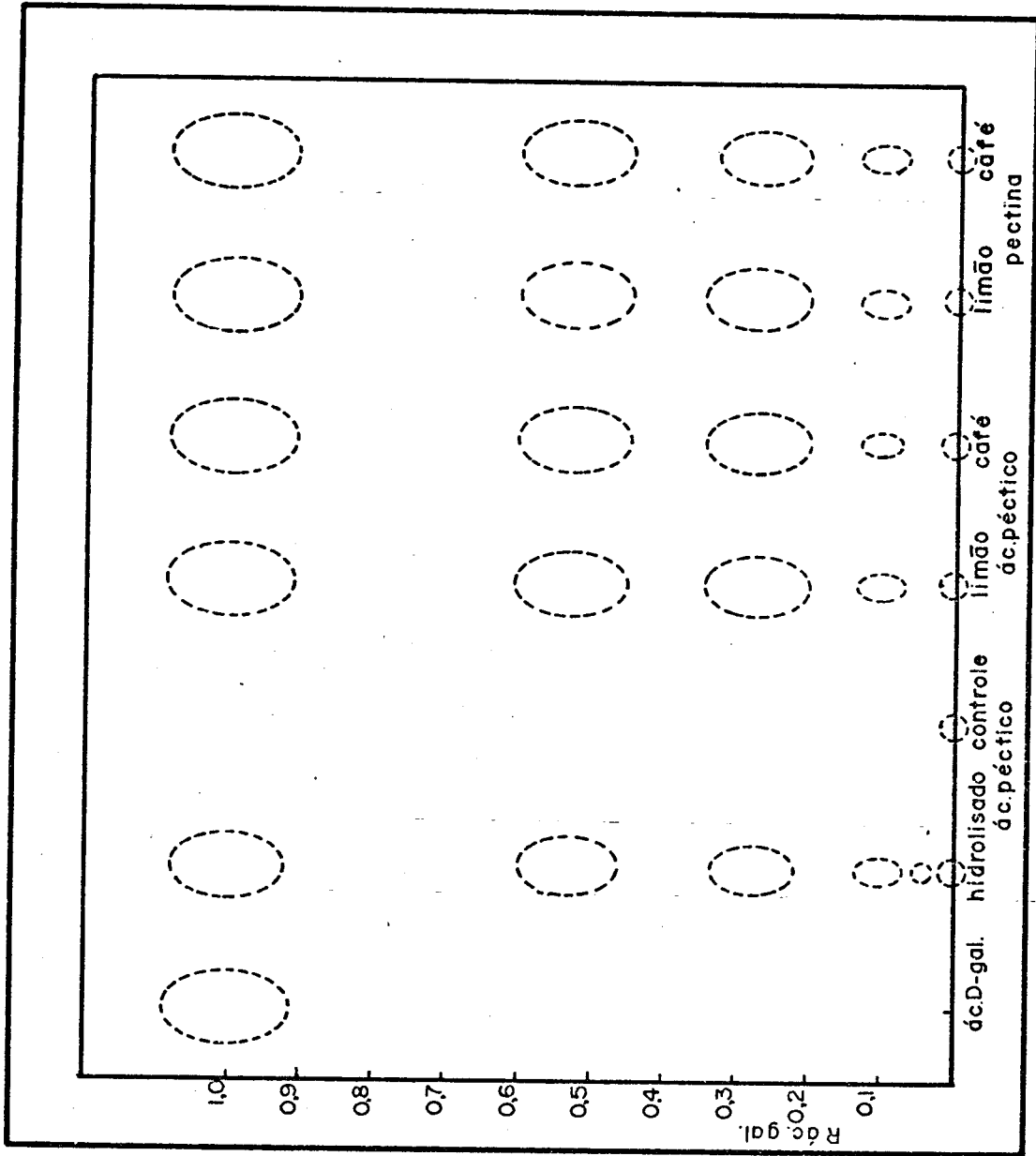
CROMATOGRAMA 01 Ilustração dos resultados apresentados na tabela 01



CROMATOGRAFIA 02 Ilustração dos resultados apresentados na tabela 02.



CRONOFOTOGRAFIA 03 Ilustração dos resultados apresentados na tabela 05.



CRONOFOTOGRAFIA 04 Ilustração dos resultados apresentados na tabela 06.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

A constatação da presença de diferentes polissacarídeos no extrato aquoso do meio de cultura explica o rápido e abundante crescimento de Fusarium oxysporum Schlecht.ex.Fr. em meio semi-sólido, constituído de farelo úmido. As atividades capazes de degradar polissacarídios vegetais, em especial a amilolítica, proporciona ao microrganismo em estudo a utilização de farelo de trigo e arroz como um excelente substituto a meios de composição química definida, barato e de fácil manuseio. Adequadamente utilizado, este meio tem sido usado com êxito na produção de enzimas extracelulares, proporcionando extratos aquosos com atividade enzimática concentrada.

As atividades capazes de degradar amido, xilano, arabinano e celulose foram constatadas no meio de crescimento e apresentaram maior capacidade hidrolítica em condições ácidas, resultados compatíveis com alguns anteriormente publicados (07,14 16) e com o metabolismo de fungos de um modo geral. A presença de oligossacarídios como produtos de hidrólise de amido e de xilano indicam a atividade endo-enzimática, com o rompimento aparentemente aleatório das ligações glicosídicas. A atividade celulolítica demonstrou ser exo-hidrolítica, tendo em vista o aparecimento de glucose como único produto da degradação de

CM-celulose e a acentuada hidrólise de celobiose pela preparação bruta, entre pH 4,0 e 9,0. A presença de atividade celulolítica se fez notar também pelo rápido enfraquecimento de membranas usa das rotineiramente para diálise, causando um arrebentamento em menos de tres horas, a 4°C. A constatação dos diferentes produtos de hidrólise sugere que as atividades enzimáticas presentes no meio de cultura sejam capazes de degradar os polissacarídeos, reduzindo drasticamente a sua estrutura molecular.

A presença de enzimas pectinolíticas no extrato aquoso do meio de cultura confirmou a capacidade do microrganismo de degradar substâncias pécticas, inicialmente evidenciada pelo crescimento do fungo em meio contendo pectina como fonte de carbono. A atividade pectinolítica manteve-se num nível relativamente constante durante o tempo de crescimento pesquisado, após o início da produção. Fato semelhante foi verificado ocorrer com uma cultura de Fusarium sp. isolado de frutos de café, mas cultivado em meio líquido com agitação (81). Após quatro dias de crescimento, as atividades pectinolíticas podem ser recolhidas do meio de cultura sem muita variação de concentração, o que é particularmente interessante em termos de produção de enzimas. O método empregado para a constatação da atividade enzimática não especifica o tipo, mas determina todas aquelas capazes de reduzir o peso molecular do substrato, no caso, esterificado. A redução do peso molecular pode ser drástica, se estiverem presentes enzimas despolimerizantes do tipo endo, ou suave, se forem do tipo exo. Tendo em vista o carácter péctico das substâncias que mantêm as células de tubérculo de batata agregadas (54), a atividade de

maceração deve estar também relacionada à atividade pectinolítica. Diversos trabalhos confirmam esta hipótese, em diferentes tecidos vegetais (04,05,13,25,30,40,76).

A atividade pectinolítica presente no extrato aquoso foi pesquisada com diferentes substratos, com a finalidade de serem detectadas todas as enzimas eventualmente presentes. A degradação enzimática do ácido pécico demonstrou preferência por condições levemente ácidas, resultados compatíveis com outras publicações (06,25,57,76), embora existam algumas atividades pectinolíticas que preferem condições acentuadamente mais ácidas (08,61,70). A hidrólise de pectina demonstrou semelhante comportamento frente a variações de pH, sendo entretanto menos acentuada que a do ácido pécico. A temperatura ótima de 50°C, mesmo para tempos mais longos de reação, evidencia o conhecido efeito estabilizante do substrato na estrutura proteica da enzima. Apesar de ocorrer em temperaturas bem baixas, a degradação do ácido pécico foi mais vigorosa a 50°C e a enzima continuava ativa mesmo após algumas horas de reação, o que era possível de ser observado pela adição de mais substrato ao meio de reação. A atividade enzimática foi caracterizada como endo-poligalacturonase tendo em vista os oligossacarídeos ácidos presentes no meio de reação. A incapacidade de hidrolisar ácido digalacturônico, evidenciada pela presença congstante deste composto no meio de reação, sugere a ausência de atividade exo-poligalacturonase. A ação enzimática frente a substratos isolados de café e de limão demonstra uma rápida despolimerização de todos os polissacarídeos, acentuando-se a preferência por substratos não esterificados logo nos primeiros

minutos de reação. Este tipo de comportamento é típico de poligalacturonases (41) e sugere um baixo teor de pectinesterase no meio de reação. Realmente, a atividade pectinesterase foi considerada ausente, resultado já anteriormente citado a respeito de outras culturas de Fusarium (06) bem como de outros microrganismos (78). Da mesma forma, a atividade pectina-liase não foi encontrada, a semelhança de relatos anteriores (11,78).

O fracionamento do sistema pectinolítico por técnicas de troca iônica levou a obtenção de dois tipos de poligalacturonases de cargas opostas. A adsorção de poligalacturonases em CM celulose, nas condições empregadas, é razoável, tendo em vista o carácter polianiônico do substrato preferido pela enzima e a característica geralmente básica de poligalacturonases purificadas (76). A adsorção de poligalacturonases em DEAE-celulose, sob idênticas condições, pode ser explicado pela existência de outra entidade enzimática de carga negativa semelhante àquela produzida por Aspergillus niger e citada por WANG & KEEN (76) ou associada a carboidratos polianiônicos como ácido pectico (32,71). Mesmo após a purificação, ambos os tipos de atividades, CM e DE, continuaram com o mesmo comportamento frente a trocadores de íons, sugerindo a permanência do carácter positivo ou negativo da molécula.

O comportamento demonstrado pelas preparações enzimáticas frente a Sephadex G-200 evidencia uma diferença de tamanho molecular, sugerindo um elevado peso molecular para as poligalacturonases do tipo DE, o que é compatível com uma associação macromolecular envolvendo enzimas e carboidratos (32,71).

As enzimas encontradas demonstraram constituir um sistema pectinolítico capaz de hidrolisar ácido pécico rapidamente, tanto em baixas quanto em elevadas concentrações de substrato: as poligalacturonases do tipo DE apresentaram elevada atividade frente a baixas concentrações de ácido pécico e marcada inibição frente a elevadas concentrações, condições nas quais a poligalacturonase tipo CM é bastante ativa. O valor da constante de Michaelis, embora difícil de determinar por razões práticas, foi encontrado ser 0,12% para a atividade CM, à semelhança daquele encontrado por WANG & KEEN (76) da ordem de 0,15% para a endo-poligalacturonase de Verticillium albo-atrum. Os valores encontrados para as enzimas DE-1 e DE-2 são mais próximos àqueles citados por JANSSEN & MACDONNEL (41), de 0,03% e por TRESKOT & TAMPION (73), de 0,042%.

A reação de hidrólise do ácido pécico foi marcadamente alterada pela presença de cátions divalentes, o que é razoável tendo em vista a formação de complexos insolúveis com o substrato, além do processo provável de inibição enzimática. O processo de medida da velocidade da reação era sensivelmente influenciado pela presença de cátions, razão pela qual, em alguns casos, apenas uma pequena faixa de concentração podia ser pesquisada. Agentes quelantes foram eficientes em proporcionar condições de maior atividade, confirmando os fatos observados com cátions. Particularmente as enzimas do tipo DE mostraram-se mais ativas em presença de quelantes, como EDTA e DIECA, a uma concentração de 1 mM.

Assim como o extrato bruto, todas as frações purifica

das demonstraram capacidade de hidrolisar substâncias pécticas isoladas de limão e de café. Os produtos de hidrólise foram - em todos os casos açúcares de pequeno peso molecular, mais so lúveis que o polissacarídeo que lhes deu origem. A hidrólise vigorosa, atingindo um nível de 40% em questão de minutos, sugere uma acentuada modificação no polissacarídeo, com redução considerável do peso molecular, o que é evidenciado pela presença apenas de oligossacarídeos pequenos no meio de reação. A preparação DE demonstra a preferência por substratos de maior grau de polimerização, a julgar pela sua incapacidade de hidrolisar oligossacarídeos menores que pentâmeros. O método escolhido para dosagem dos açúcares redutores foi aquele descrito por AVIGAD (03), que não apresenta as inconveniências da presença de substâncias pécticas em meio alcalino, com prováveis distorções dos resultados.

As enzimas fracionadas tem, portanto, o comportamento típico de endo-poligalacturonases, ativas frente ao ácido pécti co, produzindo uma mistura de oligogalacturonídeos em condições ácidas e relativamente insensíveis a inibidores clássicos de enzimas (76). A capacidade de degradar substâncias pécticas de limão e de café, levando a obtenção de açúcares de baixo peso molecular, mais solúveis, é particularmente interessante pois indica a possibilidade de utilização deste tipo de enzima, facilmente obtida, no processo de retirada da polpa do café.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

- 1.- Fusarium oxysporum Schlecht.ex Fr., isolado de café, quando crescido em farelo úmido produz diversas polissacaridases extracelulares, entre as quais aquelas capazes de degradar amido, celulose, xilano e arabano, com atividade ótima em condições ácidas.
- 2.- A atividade pectinolítica extracelular catalisa a hidrólise de substâncias pécticas isoladas de limão e café semelhante_{te}, com a liberação de oligogalacturonídeos de baixo peso molecular e marcada preferência por substratos não esterificados.
- 3.- O sistema pectinolítico demonstrou ser constituído de três endo-poligalacturonases, sendo uma delas adsorvida em CM - celulose a pH 5,5 e as outras em DEAE-celulose, sob idênti_{cas} condições.
- 4.- Tanto nas frações purificadas quanto no extrato bruto foi observada a capacidade de despolimerizar substâncias pécti_{cas} de limão e de café, com maior atividade em pH 6,0.

5.- O crescimento do microrganismo em um meio de cultura relativamente barato e de fácil manuseio, e a capacidade de produção de enzimas capazes de hidrolisar drasticamente - polissacarídios reconhecidamente constituintes da estrutura de frutos de café, indica a possibilidade de sua utilização no processo de retirada da camada mucilaginosa - que envolve os grãos de café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01.- ALBERSHEIM, P. & ANDERSON, A.J. Protein from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. Proc. Natl. Acad. Sciences USA 68;1815-1821, 1971.
- 02.- ALBERSHEIM, P. & KILLIAS, V. Studies relating on the purification and properties of pectintranseliminase. Arch. Biochem. Biophys. 97;107-115, 1962.
- 03.- AVIGAD, G. Colorimetric assays for hexuronic acids and some keto sugars. in COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. "Methods in enzymology" vol. XLI (B); 29-31, Academic Press. New York-London, 1975.
- 04.- AYERS, W.A., PAPAVIDAS, G.C., LUMSDEN, R.D. Purification and properties of the endo-polygalacturonase of Aphanomyces euteiches. Phytopathol. 59, 925-930, 1969.
- 05.- BATEMAN, D.F. The "macerating enzyme" of Rhizoctonia solani. Phytopathol. 53;1178-1186, 1963.
- 06.- BATEMAN, D.F. Hydrolytic and transeliminase degradation of pectic substances by extracellular enzymes of Fusarium solani f. phaseoli. Phytopathol. 56;238-244, 1966.
- 07.- BATEMAN, D.F. Some characteristics of the cellulase system produced by Sclerotium rolfsii. Phytopathol. 59;37-42, 1969.
- 08.- BATEMAN, D.F. & BERR, S.V. Simultaneous production and syner

- gistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by Sclerotium rolfsii. Phytopathol. 55;204 - 211,1965.
- 09.- BEAVEN,G.H. & JONES,J.K.N. Pectic substances. V - The molecular structure of strawberry and apple pectic acids. J.Chem.Soc. 1218-1221,1947
- 10.- BEAVEN,G.H., HIRST,E.L., JONES,J.K.N. Pectic substances. IV - Citrus araban. J.Chem Soc. 1865-1868,1939
- 11.- BIEHN,W.L. & DIMOND,A.E. Effect of galactose on polygalacturonase production and pathogenesis by Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici. Phytopathol 61(1);242-243,1971.
- 12.- BLACK,S.A. & SMIT,C.J.B. The effect of demethylation procedures on the quality of low ester pectins used in dessert gels. J.Food Science 37 (5);730-732,1972.
- 13.- BYRDE,R.J.W. & FIELDING,A.H. Pectin methyl transeliminase as the maceration factor of Sclerotinia fructigena and its significance in brown rot of apple. J.Gen.Microbiol. 53;287 297, 1968.
- 14.- BYRDE,R.J.K. & FIELDING,A.H. An extracellular alfa-L-arabinofuranosidase secreted by Sclerotinia fructigena. Nature 205;390-391,1965
- 15.- CARUSO,F.L., TATTAR,T.A., MOUNT,M.S., MALIA,M.E. Presymptomatic detection of Fusarium wilt of tomato by electrical resistance measurement as related to pectic enzyme production. Can.J.Botan. 54 (8);752-756,1976.

- 16.- COLE, A.L.J. & BATEMAN, D.F. Arabanase production by Sclerotium rolfsii and its role in tissue maceration. Phytopathol. 59 (11); 1750-1753, 1969.
- 17.- COLEMAN, R., LENEY, J., COSCIA, A., diCARLO, F. Pectic acid - from the mucilage of coffee cherries. Arch. Biochem. Biophys. 59; 157-164, 1955.
- 18.- CORREA, J.B.C., COELHO, E.O., FONTANA, J.D. Polysaccharide - from the epicarp and the mesocarp of coffee cherries. Part III - Some structural features of pectic acid. An. Acad. Bras. Ciências 46 (2); 357-360, 1974.
- 19.- CORREA, J.B.C. & FONTANA, J.D. Polysaccharide from the epicarp and the mesocarp of coffee cherries. Part I - Some structural studies of neutral galactoaraban. An. Acad. Brasil. Ciências 43; (3-4); 804-812, 1971.
- 20.- CORREA, J.B.C., ODEBRECHT, S., FONTANA, J.D. Polissacarídeos do epicarpo e do mesocarpo de café cereja. Parte II - Fracionamento e hidrólise ácida parcial da pectina solúvel em água. An. Acad. Brasil. Ciências 46 (2); 349-356, 1974.
- 21.- DAVIDSON, E.A. Analysis of sugars found in mucopolysaccharides. in COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. "Methods in enzymology" vol VIII; 52-60. Academic Press. New York-London. 1966.
- 22.- DAWSON, R.M.C., ELLIOTT, D.C., ELLIOTT, W.H., JONES, K.M. "Data for biochemical research", 2nd ed. Oxford Univ. Press. New York Oxford. 1969.
- 23.- DEMAINE, A.L. & PHAFF, H.J. Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances. Wallerstein. Lab. Commun. 20;

119-140,1957.

- 24.- DEUEL,H. & STUTZ,E. Pectic substances and pectic enzymes. Advan.Enzymol. 20;341-382,1958.
- 25.- EL-AROSI,H. Fungal associations. 3 - The role of pectic enzymes on the synergistic relation between Rhizoctonia solani Snyder and Hanses in the rotting of potato tubers.Ann. Botan. 22;399-416,1958.
- 26.- FISHER,K.D. Hydrolytic enzymes and toxin production by sweet potato Fusaria. Phytopathol. 55 (7);396-398,1965.
- 27.- FOGARTY,W.M. & WARD,O.P. Pectic substances and pectinolytic enzymes. Process Biochem. 7;13-17,1972.
- 28.- FRANCO,C.M. A eliminação da substância péctica do café despolpado é causada por microrganismos. Bragantia 19;621-626, 1960.
- 29.- FRANK,H.A. & CRUZ,A.S.D. Role of incidental microflora in natural decomposition of mucilage layer in Kona coffee cherries. J.Food Science 29;850-853,1964.
- 30.- HALL,J.A., WOOD,R.K.S., O'BRIEN,F. The effects of pectic enzymes and phosphatidases on potato tuber tissue. Ann.Botan. 38 (156);719-728,1974.
- 31.- HARMAN,G.E. & CORDEN,M.E. Purification and partial characterization of the polygalacturonases produced by Fusarium oxysporum f.lycopersici. Biochim.Biophys.Acta. 264 (2);328-338, 1972.
- 32.- HARTREE,E.F. Determination of protein; a modification of the

- Lowry method that gives a linear photometric response.
Anal.Biochem. 48;422-427,1972
- 33.- HEGELUND, N. Use of fungal pectinases and beta-glucanases in food industry. Voedingsmiddelentechnologie 8 (47);13-17,1975.
- 34.- HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. Pectic substances. III - Composition of apple pectin and the molecular structure of the araban component of apple pectin. J.Chem.Soc. 454-460,1939.
- 35.- HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. The chemistry of pectic materials. Advan.Carbohydr.Chem. 2,236-263,1946.
- 36.- HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. Pectic substances. VI - The structure of the araban from *Arachis hypogaea* (pea-nut). J.Chem.Soc. 1221-1224,1947.
- 37.- HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. Pectic substances VIII - The araban component of sugar-beet pectin. J.Chem.Soc. 2311-2313,1948.
- 38.- HIRST, E.L., JONES, J.K.N., WALDER, W.O. Pectic substances. VII - The constitution of the galactan from *Lupinus albus*. J.Chem.Soc. 1225-1229,1947.
- 39.- HORST, R.K. Pathogenic and enzymatic variation in *Fusarium oxysporum* f. *callistephi*. Phytopathol 55; 848-851,1965.
- 40.- ISHII, S. & YOKOTSUKA, T. Purification and properties of endopolygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. Agr.Biol.Chem. 36 (11);1885-1893,1972.
- 41.- JANSEN, E.F. & MACDONNELL, L.R. Influence of methoxyl content of pectic substances on the action of polygalacturonase. Arch.Biochem.Biophys. 8;97-112,1945.

- 42.- JOHNSTON, V.R. & FOOTE, H.E. Development of a new process for curing coffee. Food Technol. 5; 464-467, 1951.
- 43.- JOSLYN, M.A. The chemistry of protopectin: a critical review of historical data and recent development. Advan. Food Res. 11; 1-107, 1962.
- 44.- KASUKABE, I., YASUI, T., KOBAYASHI, T. A new method for preparation of xylobiose, eliminating xylose from enzymatic xylan hydrolysate by yeast. Agr. Biol. Chem. 39 (7); 1355-1363, 1975.
- 45.- KAWAI, M. & ABE, S. Maceration of plant tissues by basidiomycetes. I - Screening test of basidiomycetes on the production of macerating enzymes. J. Ferm. Technol. 50 (10); 685-690, 1970.
- 46.- KERTESZ, Z.I. "The pectic substances" Willey-Interscience New York. 1951.
- 47.- KERTESZ, Z.I. Polyuronides in FLORKIN & STOTZ (eds.) "Comprehensive Biochemistry" vol. 5. Elsevier Publ. Co. 1963.
- 48.- KERTESZ, Z.I. & MCCOLOCH, R.J. Enzymes acting on pectic substances. Advan. Carbohyd. Chem. 5; 79-97, 1950
- 49.- KOHN, R. & FURDA, I. Distribution of free carboxyl groups in the molecule of pectin after esterification of pectic acid and pectinic acid by methanol. Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 34; 641-648, 1969
- 50.- KOOIMAN, P. Cold water-extractable pectin in cells walls of plant leaves. J. Sci. Food Agric. 20 (1); 18-20, 1969

- 51.- LINEVEAWER, H. & JANSEN, E. Pectic enzymes. Advan. Enzymol. 11; 267-295, 1951.
- 52.- LOWRY, O.M., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193; 265-271, 1951.
- 53.- LUH, B.S. & PHAFF, H.J. End products and mechanism of hydrolysis of pectin and pectic acid by east polygalacturonase (YPG). Arch. Biochem. Biophys. 51:102-121, 1954.
- 54.- MCCLENDON, J.H. Evidence for the pectic nature of the middle lamella of potato tuber cell wall band on chromatography of macerating enzymes. Amer. J. Botan. 51:628-633, 1964.
- 55.- MCCREADY, R.M. Extraction of pectin from citrus peels and conversion of pectin to pectic acid. Meth. Carbohydrate Chem. 5:167-170, 1965.
- 56.- MCCREADY, R.M. Pectin in JOSLYN, M.A. (ed.) "METHODS IN FOOD ANALYSIS", cap. XIX, p. 565. Academic Press New York. 1970.
- 57.- MEYER, J.A., GARBER, E.D., SCHAFFER, S.G. Effect of buffers on the pectolytic activity of culture filtrates of Fusarium oxysporum. Nature 202 (4930); 414-415, 1964.
- 58.- MONEY, R.W. The industrial uses of pectin. Chem & Ind 412-413, 1951.
- 59.- MUSSEL, H.W. & GREEN, R.J. Host colonization and polygalacturonase production by two tracheomycotic fungi. Phytopathol. 60; 192-195, 1970.
- 60.- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for

- 61.- PAGE, O.T. Quantitative paper chromatography techniques for the assay of products of polygalacturonase activity of fungus culture. Phytonathol. 51;337-338,1961.
- 62.- PATIL,S.S. & DIMOND,A.E. Repression of polygalacturonasesynthesis in Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici by sugars and its effect on symptom reduction in infected tomato plants. Phytopathol. 58 (5);676-682,1967.
- 63.- PEE,W.van & CANN,J.M. Study of the pectinolytic microflora particularly the enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. J.Food Science 37;171-174,1972.
- 64.- PEREIRA,J.,Jr. Método rápido de liberação da mucilagem do café despulpado pela ativação de suas próprias enzimas. II - Desgomagem rápida do café despulpado em contraste com a fermentação prolongada da mucilagem bruta liberada. Arch.Inst.Biol. 24 93-103,1957.
- 65.- PERLEY,A.F. & PAGE,O.T. Differential induction of pectolytic enzymes of Fusarium roseum (LK) emend Snyder and Hansen. Can. J.Microbiol. 17; 415-420,1971.
- 66.- PERRIER,A. Recherches sur le rôle de la pectinase dans la fermentation du café. Compt.Rend.Acad.Sci,Paris 193;547-549, 1932.
- 67.- PETERSON,E.A. Cellulosic ion exchangers in WORK & WORK (ed.) "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology" North Holland Publ.Co., Amsterdam. 1970.
- 68.- RAO,G.S. Pectin as potential by-products of coffee waste. J.Coffee Res. 5 (1/2);29-35,1975.

- 69.- "Report of the Commission on enzymes of the International Union of Biochemistry. Symp.ser. vol 20. Pergamon Press, Oxford, 1961.
- 70.- SREEKANTIAN, K.R., JALEEL, S.A., RAO, D.N., RAO, M.R.R. Pectinolytic enzymes produced by *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom. Eur.J.Appl.Microbiol. 1 (2); 173-181, 1975.
- 71.- SWINBURNE, T.R. & CORDEN, M.E. Dissociation and recombination of a polygalacturonase complex during ion exchange chromatography. Nature 213; 286-287, 1967.
- 72.- SZAJER, I. & BOUSQUET, J.F. Production en culture d'endopolygalacturonase et de pectinemethylesterase par des champignons phytopathogènes: quelque aspects d'influence de la source de carbon du millieu nutritif. Annal.Phytonathol. 7(4); 299-307, 1975.
- 73.- TRECOTT, A.S. & TAMPION, J. Properties of the endo-polygalacturonase secreted by *Rhizopus stolonifer*. J.Gen.Microbiol. 80; 401-409, 1974.
- 74.- TREVELYAN, W.E., PROCTOR, D., HARRISON, J.S. Detection of sugar on paper chromatogram. Nature 166; 444-445, 1950.
- 75.- WAGOONER, P.E. & DIMOND, A.E. Production and role of extra-cellular enzymes of *Fusarium oxysporum* f.lycopersici. Phytopathol. 45; 79-87, 1955.
- 76.- WANG, M.C. & KEEN, N.T. Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. Arch.Biochem.Biophys. 141; 749-757, 1970.

- 77.- WASKMAN, S.A. & ALLEN, M.C. Decomposition of pectin and pectic acid by fungi and formation of pectic enzymes. J. Amer. Chem. Soc. 55; 3408-3418, 1933.
- 78.- WIESE, M.V., DEVAY, J.E., RAVESCROFT, A.V. Relationship between polygalacturonase activity and cultural characteristics of Verticillium isolates pathogenic in cotton. Phytopathol. 60; 641-646, 1970.
- 79.- WHISTLER, R.L. & SMART, C.L. Pectic Substances in "Polysaccharide Chemistry", Academic Press. New York, 1953.
- 80.- WHORT, H.G.J. The chemistry and biochemistry of pectic substances. Chem. Rev. 67; 465-473, 1967.
- 81.- WOSIACKI, G. "Produção de enzimas hidrolíticas por fungos isolados do café". Tese de Mestrado. Instituto de Bioquímica U.F.P. Curitiba, 1971.
- 82.- WOSIACKI, G. & ZANGAN, G. Degradação enzimática de polissacarídeos da polpa de café cereja. Arq. Biol. Tecnol. 16(2); 129-134, 1973.
- 83.- ZAUBERMANN, G. & SCHIFMANN-NADEL, M. Changes in the ripening process of avocado fruit infected by Fusarium solani. Phytopathol. 64; 188-190, 1974.