

GILVAN WOSIACK

**PRODUÇÃO DE
ENZIMAS HIDROLÍTICAS
POR FUNGOS ISOLADOS
DO CAFÉ**

Tese do mestrado apresentada ao
Instituto de Bioquímica da Universidade
Federal do Paraná.

TRABALHO ORIENTADO
Por D^{ra}. Glaci Therezinha Zancan

CURITIBA
1971

INTRODUÇÃO

As substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos de elevado peso molecular que ocorrem praticamente em todas as plantas superiores, onde se encontram principalmente sob a forma de protopectina na lamela média e membrana celular. Nos frutos encontram-se dissolvidos nos espaços intercelulares. Seus principais constituintes são ácido D-galacturônico e metanol. Muitas preparações pécticas apresentam por hidrólise ácida açúcares neutros como D-galactose e L-arabinose.

O polissacarídeo ácido é constituído de cadeias formadas por ligações glicosídicas alfa (1-4) entre os anéis piranosídicos de ácido D-galacturônico. As hidroxilas dos carbonos C-1 e C-4 ficam assim em posição trans, axial, sendo portanto a pectina um trans (1-4) polissacarídeo de flexibilidade restrita. Os grupamentos carboxílicos estão parcialmente esterificados com metanol (1). Denomina-se ácido péctico à cadeia não esterificada de ácido poligalacturônico, enquanto que ácidos pectínicos podem ter diferentes graus de esterificação (2).

Estudos realizados por HIRST *et al* (3,4,5,6,7) e BEAVEN *et alii* (8) em materiais pécticos de várias fontes levaram à conclusão que D-galactose e L-arabinose encontram-se sob a forma de homopolissacarídeos bem definidos, que acompanham o ácido péctico no processo de-extração.

A degradação enzimática total de substâncias pécticas requer diferentes tipos de enzimas, como glicosidasas e esterases, produzidas por muitos microrganismos saprófitas ou patogênicos que desintegram tecidos vegetais. São também encontradas em plantas superiores onde são responsáveis por várias transformações fisiológicas. Estas enzimas têm sido estudadas nos últimos anos devido a sua grande aplicação industrial, e têm sido assunto de revisões bibliográficas realizadas por LINEWEAVER *et al* (2), KERTESZ (9) e DEUEL *et al* (1).

O desenvolvimento do estudo das enzimas pécticas demonstrou ser intimamente dependente do conhecimento das estruturas de substâncias pécticas, tendo sofrido influências marcantes das diversas teorias (10). A nomenclatura das enzimas e das substâncias pécticas tem sido bastante instável também por esse motivo. Entre as enzimas pécticas encontram-se aquelas que hidrolisam ligações glicosídicas alfa (1-4) entre resíduos de ácido D-galacturônico, denominadas poligacturonases, e as que liberam metanol da molécula esterificada de ácido poligacturônico, denominadas de pectinesterases (2).

A atividade hidrolítica para as ligações glicosídicas alfa (1-4) do ácido péctico foi descrita pela primeira vez em cevada em germinação por Bourquelot e Hèrissey, tendo sido denominada de pectinase, nome esse usado atualmente para designar preparações enzimáticas que contém misturas de enzimas (1,35,2).

EHRlich (11) foi o primeiro a demonstrar, em 1917, que o ácido galacturônico é liberado do ácido péctico por hidrólise, com

enzimas produzidas por uma cultura de *Penicillium ehrlichii*.

HARTER *et al* (12), em 1922, verificaram que culturas de *Rhizopus tritici*, *R. nigricans*, *R. ortocarpus*, *R. chinensis* e *R. microsporum* produziam maior quantidade de poligalacturonase, quando crescidas em presença de pectina, tendo sido o mesmo constatado por Ehrlich em relação a cultura de *Penicillium ehrlichii*.

WASKMAN *et al* (13) verificaram que *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma sp.*, isolados do solo, eram capazes de degradar poliuronides, liberando ácido D-galacturônico no meio de crescimento. *A. niger* demonstrou um mecanismo de degradação diferente dos demais, decompondo rapidamente o ácido galacturônico a CO₂, enquanto os outros degradavam o ácido poligalacturônico acumulando ácido galacturônico no meio, apenas com diferentes intensidades. A atividade enzimática apresentada por *Penicillium sp.* demonstrou marcada preferência por ácido pectico, e maior atividade entre pH 4,0 e 6,0.

Em 1939, MOTTERN *et al* (14) propuseram o método enzimático, para obtenção de ácido galacturônico, a partir de pectina cítrica ou de maçã. Com a utilização de uma preparação comercial (Pectinol 100 D), os autores obtiveram um rendimento de 25%, hidrolisando o ácido pectico em pH 3,7 e 35.º por dez dias, e não tiveram dificuldade em cristalizar o produto.

KERTESZ.(15) demonstrou, usando uma preparação comercial (Pectinol) de enzimas pecticas, que a atividade enzimática não devia ser medida pelo decréscimo da viscosidade, tendo em vista que esta diminui muito mais rapidamente do que as ligações glicosídicas são hidrolisadas. O simples aquecimento a 100.º produzia uma pequena redução na viscosidade, embora não houvesse hidrólise de polissacarídeo.

FISH *et al* (16) verificaram a existência de outras atividades enzimáticas na preparação comercial (Pectinol A), como sacarase, amilase, maltase, inulinase.

JANSEN *et al* (17), em 1945, demonstraram a influência do conteúdo metoxílico do substrato na atividade enzimática produzida por fungos. Os autores constataram pela primeira vez, apesar das indicações de WASKMAN *et al* (13), que a poligalacturonase demonstra maior atividade sobre ácido pectico do que sobre ácidos pectínicos, e que os ácidos pectínicos preparados por ação enzimática são mais sensíveis à poligalacturonase. Os autores sugerem que a enzima requer pelo menos duas carboxilas adjacentes isentas de esterificação, fato este proporcionado mais facilmente pela desesterificação enzimática do que pela ação de álcalis sobre pectina.

JANSEN *et al* (18) demonstraram em seguida que a ação conjunta de poligalacturonase e pectinesterase leva a uma hidrólise da pectina com velocidade comparada à da hidrólise do ácido

péctico, pela ação da poligalacturonase. A adição de pectinesterase, purificada de fruta cítrica, aumentou a capacidade hidrolítica da preparação comercial de enzimas.

PHAFF (19) estudou a natureza adaptativa destas enzimas produzidas por *Penicillium chrysogenum*, e verificou que, das 52 fontes de carbono testadas, seis proporcionavam excelente crescimento e produção de enzima: pectina, ácido péctico, ácido D-galacturônico, ácido múcico e goma tragacanth.

GAUMANN *et al* (20), em 1947, verificaram que *Botrytis cinerea* produzia uma poligalacturonase de maneira constitutiva. O fungo apresentou crescimento e produção de enzimas da mesma forma, tanto em presença de glucose como de pectina, mas em presença de ambos os substratos houve um sensível aumento.

Os mesmos autores (21) estudaram a produção de enzimas pelo *Aspergillus niger*, verificando que este fungo produzia poligalacturonase tanto na presença como na ausência de pectina.

LINEWEAVER *et alii* (22) purificaram poligalacturonases de fontes comerciais (Pectinol) e demonstraram a grande especificidade das enzimas por ácido péctico, hidrolisado 5000 vezes mais rapidamente que outros substratos.

BEAVEN *et al* (23) verificaram em *Byssochlamys fulva* a presença de atividade enzimática capaz de reduzir o peso molecular de pectina sem liberar ácido galacturônico, não tendo sido observada a presença de poligalacturonases nem pectinesterases.

Entretanto, REID (24) examinou duas culturas de *Byssochlamys Fulva* e verificou a produção de enzimas pécticas quando o fungo era crescido em meio adequado. Houve produção de pectinesterase e poligalacturonase, e o autor presume que a falta destas enzimas, sugerida por BEAVEN *et al* (23), seja devida a baixa atividade da preparação.

HOLDEN (25) estudou a atividade enzimática de várias fontes comerciais e de *Botrytis cinerea* Pers and Fr., *Aspergillus aureus* Nakasawa, *Penicillium expansum* Link e *P. digitatum* Sacc. frente a diversos polissacarídios, entre os quais ácido péctico, tendo sido observado que as preparações comerciais apresentavam maior atividade que as preparações obtidas dos micélios dos fungos.

JERMYN *et al* (26) estudaram as enzimas produzidas por *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Aspergillus aureus*, e constataram que as enzimas produzidas por esse último são menos ativas que as dos demais, quando comparadas as suas atividades frente à pectina de baixo conteúdo metoxílico. A preferência por pectina apresentada pelas enzimas produzidas por *B. cinerea* sugere a presença de pectinesterase, além da poligalacturonase. A análise cromatográfica dos produtos de degradação de pectina sugere que a enzima hidrolise ao acaso, levando à obtenção de diferentes oligouronides. Somente após 96 horas é que o ácido D-galacturônico foi o único produto encontrado.

Em 1952, ALTERMATT *et al* (27) estudaram a degradação enzimática do ácido péctico, utilizando uma preparação comercial (Takamine Lab. Inc.). A atividade foi determinada por diminuição de viscosidade e por dosagem de grupamentos redutores. Os produtos de degradação foram cromatografados e caracterizados como ácido galacturônico, ácido digalacturônico e ácido trigalacturônico. Traços do tetrâmero e do pentâmero foram também encontrados nas cromatografias. Os autores isolaram do meio de incubação o ácido digalacturônico e o ácido trigalacturônico, e posteriormente (28), o ácido tetragalacturônico.

SOLMS *et alii* (29) estudaram o mecanismo de degradação do ácido pectínico e do ácido péctico pela mesma preparação comercial (Takamine Lab. Inc.), e verificaram que a degradação dependia do grau de esterificação do substrato, semelhante ao efeito encontrado por JANSEN *et al* (17). A degradação do ácido péctico levou a obtenção de oligouronides como o observado por ALTERMATT *et al* (27), sendo que a pectina foi hidrolisada mais lentamente, acumulando moléculas maiores.

SCHUBERT (30) constatou a presença de quatro poligalacturonases no meio de cultura de *Aspergillus niger*, que foram diferenciadas por sua estabilidade a temperatura e pH, bem como por adsorção em caolim. O autor as denominou de poligalacturonases A, B, C e D.

AYRES *et alii* (31) verificaram que a cultura de *Aspergillus foetidus* v. Thom and Raper produz enzimas pectolíticas diferentes se o meio de crescimento foi sólido ou líquido. No primeiro caso a preparação enzimática degrada ácido péctico até oligouronides e ácido galacturônico, com um pH ótimo de 4,5. No segundo caso, há degradação somente até oligouronides, com um pH ótimo de 5,3. Quando as enzimas foram produzidas em meio líquido, foram encontradas pelo menos duas atividades diferentes: uma que degrada ácido péctico e pectina até oligouronides em pH 5,3 e outra que atua sobre ácido péctico e oligouronides não metilados, degradando também ácido digalacturônico e ácido trigalacturônico, em um pH ótimo de 3,5.

ROBOZ *et alii* (32) purificaram do meio de cultura de *Neurospora crassa*, uma enzima cuja ação independia do grau de esterificação do substrato, e que apresentava um pH ótimo de 5,5 a 6,0. Com um mecanismo diferente de enzima comercial (Pectinol), diminuiu a viscosidade do substrato, hidrolisou 30% das ligações glicosídicas e levou a obtenção de oligouronides. Os autores sugeriram o nome de pectina ou ácido péctico despolimerase para esta atividade enzimática.

Na mesma época, SEEGMILLER *et al* (33) obtiveram, de uma preparação comercial (Hidralase), uma atividade enzimática com características semelhantes à despolimerase já descrita por ROBOZ *et alii* (32). A enzima diminuiu a viscosidade de pectinas de várias

fontes e liberou D-galactose e L-arabinose no meio de incubação.

MCREADY *et al* (34) purificaram uma poligalacturonase de fonte comercial (Pectinol 100-D), e determinaram a atividade enzimática pela liberação de açúcar redutor no meio de incubação. Esta enzima foi capaz de efetuar a completa degradação de ácido pécico até ácido galacturônico, sendo que dímeros e trímeros desse ácido eram hidrolisados com menor velocidade. Apesar da purificação realizada, não se pode excluir a possibilidade de existirem duas enzimas na preparação.

SCHUBERT (35) estudou o efeito do pH na atividade enzimática de duas preparações comerciais (Pectasin A e Pectinex) e do filtrado do meio de cultura de *Aspergillus niger*, na degradação de pectina de vários graus de esterificação. Pectinex apresentou diferentes pHs ótimos, quando foi usado como substrato a pectina com diferentes graus de esterificação: O autor denominou beta-poligalacturonase à enzima de pH 3,5 com especificidade por pectina de menor grau de esterificação, e alfa-poligalacturonase à enzima de pH ótimo 5,5 ativa sobre pectina mais esterificada. Pectasin A apresentou resultados semelhantes, tendo sido observado mais um pico de atividade enzimática em pH alcalino, A enzima foi denominada de gama-poligalacturonase, e o autor observou que atividade enzimática em pH alcalino somente havia sido observada em enzimas de fontes bacterianas.

BROOKS *et al* (36), trabalhando com a preparação S de *Aspergillus foetidus* v. Thom. and Raper (31), conseguiu uma fração relativamente termoestável (60°; pH 5,3; 20 min.) que parece ser a responsável pela hidrólise de ácido digalacturônico e ácido trigalacturônico. A fração com estas características denominaram fração gama, que foi também encontrada em uma preparação comercial (Pectinol 100 D).

SAITO (37) trabalhou com *Aspergillus niger*, fungo que produz uma enzima extracelular capaz de reduzir a viscosidade e outra capaz de liberar grupos redutores em um meio de incubação contendo ácido pécico. A primeira, provisoriamente denominada poligalacturonase depolimérica, era produzida de maneira constitutiva, demonstrou preferência pelas cadeias são esterificadas e degradou o polissacarídeo ao acaso, produzindo oligouronides e ácido galacturônico como produto final. Esta enzima purificada apresentou um pH ótimo entre 3,4 e 4,6 sendo mais estável em pH 3,6. A segunda enzima, poligalacturonase galacturogênica, com o mesmo pH ótimo, teve sua formação induzida pela presença de substâncias pécticas, liberou ácido galacturônico como principal produto e degradou totalmente o ácido pécico em 120 horas, sugerindo que a degradação fosse feita pela liberação de monômeros das pontas do polissacarídeo.

Em 1957, PURR *et alii* (38) procuraram separar os componentes enzimáticos de uma preparação comercial de enzimas pécticas (Pektinol K) em eletroforese. Conseguiram separar uma

gama-poligalacturonase que migrava em direção ao polo positivo, da pectinesterase que migrava ao polo negativo, com grande de contaminação de beta-poligalacturonase. Os autores verificaram que a atividade de beta-poligalacturonase frente à pectina de baixo conteúdo metoxílico apresentava dois picos não distintamente separados quando reeletroforizada. Tendo por base o comportamento na ultracentrifuga, especificidade pelo substrato, conteúdo em amino ácido, efeito do pH e temperatura na atividade enzimática e produtos de degradação, os autores concluíram que beta-poligalacturonase e gama-poligalacturonase eram duas enzimas diferentes, com dois mecanismos de ação distintos. As enzimas são semelhantes as já descritas por SCHUBERT (35), salientando-se que a gama-poligalacturonase apresentava especificidade por pectato de sódio.

DEMAIN *et al* (39) apresentaram um sistema de nomenclatura basicamente dividindo enzimas pécticas em *polimetilgalacturonases*, que atacam preferentemente pectina a ácido péctico, e *poligalacturonases*, que degradam ácido péctico. As enzimas que demonstram um mecanismo terminal de ataque são distinguidas pelo prefixo *exo*, e as que apresentavam um mecanismo de hidrólise ao acaso, pelo prefixo *endo*.

HUSAIN *et al* (40), em 1958, verificaram que, embora pectina a 1% fôsse excelente fonte de carbono para *Cladosporium cucumerinum*, não atuava como indutor de poligalacturonase, em culturas com ou sem agitação. A poligalacturonase produzida demonstrou ter preferência por pectato de sódio e um pH ótimo entre 5,0 e 6,0.

Entretanto, STRIDER *et al* (41) verificaram que esse fungo cresceu bem em pectato de sódio, glucose e pectina cítrica, apresentando produção de enzimas mais ativas no último caso.

DESHPANDE (42) demonstrou que *Rhizoctonia solani* Kuhn produziu, entre outras enzimas pectolíticas, uma enzima que reduziu consideravelmente a viscosidade de ácido péctico e pectina. Esta despolimerase apresentou um pH ótimo de 4,0 quando atuava sobre pectina e 5,6 quando o substrato era o pectato de sódio.

TUTTOBELLO *et al* (43) estudaram as melhores condições para crescimento do *Aspergillus niger* para produção de enzimas pectolíticas com alta atividade. Quando crescido em meio contendo sacarose e pectina, as preparações enzimáticas obtidas degradaram completamente a pectina. Endopoligalacturonase apareceu mesmo na ausência de pectina.

MILL *et al* (44) purificaram, posteriormente, a endopoligalacturonase extracelular de *Aspergillus niger*, 400 vezes, e verificaram que o pH ótimo apresentado variava de acordo com o método de determinação da atividade. Quando a atividade enzimática foi medida por viscosimetria, apresentou um pH ótimo de 3,5 e 4,0 quando foi medida pela liberação de grupamentos redutores. Para a hidrólise de ácido trigalacturônico a enzima apresentava maior atividade em pH 4,7. A enzima demonstrou marcada preferência por

ácido péctico e liberou oligouronides, caracterizados por cromatografia em papel, sendo no entanto incapaz de hidrolisar ácido digalacturônico. A preparação enzimática foi homogênea em eletroforese, e reduziu rapidamente a viscosidade do substrato, liberando açúcares redutores ao acaso, sem degradar completamente o substrato.

KUC (45) testou o aparecimento de enzimas de *Cladosporium cucumerinum* Ell. and Arth. em vários meios de cultura, e constatou a presença de endopoligalacturonase, celulase e protease.

WINSTEAD *et al* (46) verificaram que alguns fungos causadores de antracnose em abóboras produziram poligalacturonase com maior atividade quando crescidos em presença de pectina.

FISHER (47) demonstrou que a produção de enzimas hidrolíticas por alguns fungos fitopatogênicos pertencentes ao gênero *Fusarium* não ocorre quando o microrganismo é crescido em glucose, mas sim em pectina. Os fungos foram cultivados com agitação e as enzimas obtidas não demonstraram preferência por pectato de sódio ou pectina.

KENN *et al* (48) estudaram o caráter da produção de uma endopoligalacturonase por *Pyrenochaeta terrestris*, induzida pela presença de pectina, ácido galacturônico, ácido péctico e ácido múcico. O crescimento e a produção de enzimas foram relativamente proporcionais a quantidade inicial de pectina. Quando ao meio contendo pectina foi adicionado glucose, observou-se que pequenas concentrações (0,005M) ativavam a formação da enzima e maiores concentrações (0,05M) inibiam.

BATEMAN (49) demonstrou que *Fusarium solani* f. phaseoli produz enzimas hidrolíticas que degradam ácido péctico com pH ótimo de 5,0 e outra mais reativa frente à pectina, com pH ótimo de 5,0, sendo que as enzimas não foram produzidas em meio contendo glucose como fonte de carbono. A análise cromatográfica dos produtos de hidrólise indicou a presença de oligouronides e ácido galacturônico.

CAPPELLINI (50) estudou a relação existente entre o crescimento e a produção de enzimas pectolíticas intra e extracelulares de *Rhizopus stolonifer*. Aparentemente, a síntese e a secreção ativa de poligalacturonase ocorre durante a fase de crescimento ativo e cessa antes do crescimento máximo. A enzima extracelular perdia sua atividade com estocagem a -15° . Ambos os sistemas demonstraram ser semelhantes degradando pectato de sódio ao acaso.

Em 1966, UCHINO *et alii* (51) cristalizaram uma endopoligalacturonase de *Acrocylindrium sp.*; a enzima demonstrou ser homogênea em eletroforese em gel de amido, hidrolisou 63% das ligações glicosídicas do ácido péctico, acumulando no meio de incubação apenas ácido galacturônico e ácido digalacturônico. Os autores observaram a marcada preferência da enzima por ácido péctico, pois apenas 6% da pectina foi hidrolisada sob mesmas condições.

YAMASAKI *et alii* (52) estudaram as condições de crescimento de *Aspergillus saitoi*, que demonstrou produzir endopoligalacturonase

mesmo na ausência de pectina. Quando o meio foi inoculado com micélio proliferado, houve marcado acréscimo na atividade enzimática. A maior produção de enzimas pectolíticas ocorreu entre 4 e 6 dias.

Posteriormente, os mesmos autores (53), purificaram a endopoligalacturonase de *Aspergillus saitoi*, e constataram um pH ótimo entre pH 4,8 e 5,0. A enzima apresentou estabilidade maior entre pH 4,0 e 6,0 e temperatura ótima de 45.º, tendo sido verificada também uma acentuada preferência por ácido pécico. A enzima foi homogênea na análise por centrifugação e em eletroforese, além de cromatografia em peneira molecular (Sephadex). Os produtos da reação foram ácido galacturônico e oligouronides.

SWINBURNE *et al* (54) analisaram o meio extracelular de *Fusarium oxysporum* por resina trocadora de íons e por peneira molecular (Sephadex), tendo sido verificado que no meio de cultura havia duas espécies moleculares com atividade enzimática.

PATIL *et al* (55) demonstraram, em 1968, que a síntese de poligalacturonase por *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici é reprimida por glucose (0,05M), ácido galacturônico (0,05M), sorbitol (0,06M) e 2-deoxy-glucose (0,006M), em meio contendo pectina. Os autores extraíram poligalacturonase de tomate infectado e verificaram que a enzima hidrolisou tanto pectina como pectato de sódio, acumulando ácido monogalacturônico e oligouronides no meio de incubação.

BARASH (56) verificou que a pectina e pectato de sódio são indutores efetivos da liberação de poligalacturonase, sob condições ótimas de germinação dos esporos de *Geotrichum candidum*. O meio dialisado e cromatografado em carboximetilcelulose e peneira molecular (Sephadex) revelou a presença de mais de um componente enzimático, o mesmo ocorrendo com a preparação enzimática obtida do micélio. A atividade enzimática contida nos picos "2" demonstrou ataque preferencial por ácido pécico, e a análise cromatográfica indicou que a hidrólise do polissacarídeo foi feita ao acaso.

Em 1969, AYERS *et alii* (57) verificaram que 9 amostras de *Aphanomyces euteiches* liberaram endopoligalacturonase no meio de cultura. Embora tenham verificado anteriormente a ineficiência do uso de indutores desta enzima, neste trabalho os autores constataram que ácido pécico ou pectina em baixa concentração (0,1%) no meio de crescimento aumentava substancialmente a produção de enzimas em todos os casos. Em alguns casos as culturas com agitação forneceram maior teor de enzimas.

Em trabalho posterior (58), os mesmos autores purificaram a endopoligalacturonase de *Aphanomyces euteiches* e constataram que o seu substrato preferencial é o ácido pécico, embora pectato de sódio e pectina possam também ser degradados. A atividade enzimática demonstrou um pH ótimo de 5,0 e a análise dos produtos de hidrólise não revelou a presença de ácido galacturônico.

CURREN (59) estudou duas amostras de *Stemphylium radicinum*, e demonstrou que produziam poligalacturonase, pectinesterase e celulase. A produção de poligalacturonase era induzida por pectina, e esta enzima apresentou maior atividade em pH 5,0 tendo pectato de sódio como substrato. A maior produção da enzima foi encontrada entre 54 e 72 horas para as duas amostras, e o pH do meio alterou-se após 54 horas de cultivo.

SWINBURNE *et al* (60) compararam as poligalacturonases produzidas por *Penicillium expansum* Thom. quando era crescido em fatias de maçã e em meio de composição definida. No primeiro caso, as enzimas produzidas se comportavam como endopoligalacturonase, degradando ácido péctico até ácido tetragalacturônico. No segundo caso, houve degradação até ácido galacturônico. As enzimas foram purificadas em DEAE celulose e CM celulose, e ambas as preparações após purificação apresentaram atividade enzimática semelhante, dando como produtos oligouronides. Não foi constatada a presença de exopoligalacturonase, sugerida pela preparação enzimática crua, obtida quando o fungo era crescido em meio de composição definida.

FIELDING *et al* (61) verificaram as características de uma poligalacturonase de *Sclerotinia fructigena* purificada parcialmente. A análise eletroforética demonstrou a presença de dois componentes. A enzima purificada demonstrou ter maior preferência por ácido péctico do que por pectina, e não liberou ácido galacturônico no meio de incubação após 48 horas, embora tenha sido observada a presença de oligouronides. Apresentou um pH ótimo de 5,5.

KAJI *et al* (62) purificaram 239 vezes uma endopoligalacturonase de *Corticium rolfsii*. Caracteristicamente ácido estável, a enzima apresentou um pH ótimo de 2,5 e degradou ácido péctico, oligouronides e pectina, em ordem de preferência. Para obtenção de enzimas, o fungo foi crescido em presença de pectina. A endopoligalacturonase estudada reduziu rapidamente a viscosidade do substrato, enquanto o aparecimento de açúcar redutor foi mais lento. Como produtos foram obtidos oligouronides e após prolongada incubação, ácido galacturônico somente.

KOLLER *et al* (63) obtiveram uma endopoligalacturonase de *Aspergillus niger*, que demonstrou alta especificidade por ácido péctico. A enzima demonstrou um pH ótimo de 5,5, hidrolisou 48% das ligações glicosídicas e liberou ácido galacturônico, ácido digalacturônico e ácido trigalacturônico. O ácido péctico foi hidrolisado com velocidade maior em relação a oligouronides.

BARASH *et al* (64) purificaram uma endopoligalacturonase produzida por *Geotrichum candidum*. Os resultados das experiências sugerem que esta enzima cliva ácido péctico ao acaso, liberando ácido galacturônico nos primeiros minutos de incubação. O pH ótimo encontrado foi de 4,5 a 5,0 e para hidrolisar ácido trigalacturônico a enzima apresentou um pH ótimo de 3,5 com menor velocidade de ação. Não demonstrou atuar sobre ácido digalacturônico, e foi mais

ativa sobre pectato de sódio do que sobre pectina.

KEEN *et al* (65) estudaram a endopoligalacturonase produzida por um fungo patogênico pertencente ao gênero *Verticillium*, e observaram que quando esse microrganismo era crescido em presença de pectato de sódio a preparação enzimática obtida do meio era 30 vezes mais ativa do que quando era crescido em glucose. Em presença de glucose houve diminuição da síntese da enzima.

PERLEY *et al* (66) detectaram atividade poligalacturonase em cultura de *Fusarium roseum* (LK) emend. Snyder and Hansen. A produção da enzima foi induzida pela presença de ácido múcico ou ácido péctico, em pH 6,5 e pela presença de pectina, em pH 3,4. A endopoligalacturonase induzida apresentou maior atividade com ácido péctico do que quando era usada pectina como substrato, não liberando ácido galacturônico no meio de incubação.

Entre as enzimas responsáveis pela degradação das substâncias pécticas, encontram-se também as glicosidades que atuam sobre polímeros de galactose e arabinose. Estas enzimas começaram a ser estudadas em 1928, quando EHRLICH *et al* (67) verificaram a existência de uma atividade hidrolítica em Takadiastase. Entretanto, comparativamente pouco trabalho tem sido feito no que diz respeito às enzimas que hidrolisam galactanos e arabanos.

Em 1942, RATAJAK *et al* (68) estudaram as melhores condições para cultivo de *Aspergillus niger*, usando arabogalactano como fonte de carbono. Foram definidos a composição do meio, o pH 5,5 e a temperatura de 28 a 30.º como condições ótimas para uma completa hidrólise do polissacarídeo.

DEUEL *et alii* (69), em 1950, constataram numa preparação comercial (Helisol), a presença de poligalacturonase e também de duas enzimas, capazes de degradar as ligações beta (1-4) entre resíduos de manopiranosose e alfa (1-6) galactomanopiranosose de um galactomanano obtido de *Ceratonia siliqua* L. Os autores determinaram o pH 4,0 e a temperatura 50.º como ideais para a atividade enzimática.

SIMPSON (70) fez um levantamento da produção de pentosanases em fungos e bacterias e verificou que a produção era adaptativa em todos os fungos estudados, entre eles espécies não classificadas dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*.

FUCHS *et alii* (71) examinaram a produção de arabanase e galactanase por fungos fitopatogênicos e saprófitos. *Botrytis alii*, *B. fabae*, *B. tulipae*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* f. pisi, *Monilia fructigena*, *Mycosphaerella pinodes*, *Sclerotinia sclerotiorum* mostraram atividade de arabanase mesmo quando crescidos em glucose. A análise dos produtos indicou somente L-arabinose como produto final de degradação de arabano, e traços quando pectina era o substrato. Todos os demais fungos apresentaram o mesmo tipo de degradação, sendo que os fungos fitopatogênicos apresentaram maior quantidade de enzimas. Foi

determinado o pH ideal para a atividade enzimática do meio da cultura de *Glomerella cingulata*, *B. fabae* e *S. sclerotiorum* como sendo 3,8 a 4,8; 4,8; 3,6; a 5,8 respectivamente. A atividade enzimática em todos os casos era maior quando os fungos foram crescidos em farinha de amendoim.

BYRDE *et al* (72) verificaram em meio de cultura de *Sclerotinia fructigena* a presença de uma atividade enzimática capaz de hidrolisar os substratos sintéticos fenil-alfa-L-arabinofuranosídeo e o nitrofenil-alfa-D-galactopiranosídeo, o que foi também encontrado em outros fungos.

KAJI *et alii* (73) purificaram uma arabanase produzida por *Aspergillus niger*, crescido em meio contendo extrato de polpa de beterraba como único doador de carbono. A enzima, que mostrou ser homogênea na análise em ultracentrífuga e em cromatografia, apresentou um pH ótimo de 4,0; degradou o arábano isolado do extrato de polpa de beterraba pelas pontas, liberando apenas L-arabinose no meio de incubação. Demonstrou ser termoestável, retendo 20,8% de sua atividade mesmo após aquecimento a 90.º durante 20 minutos em pH 6,0.

KNEE *et al* (74) determinaram uma atividade extracelular de galactanase em *Phytophthora infestans*, capaz de hidrolisar galactano contendo ligações do tipo beta (1-4) entre resíduos de D-galactose, sendo no entanto incapaz de hidrolisar galactano constituído de ligações beta (1-3) e beta (1-6).

FIELDING *et al* (61) purificaram parcialmente uma alfa-L-arabinofuranosidase produzida por *Sclerotinia fructigena*, separando-a da endopoligalacturonase. O pH ótimo da enzima é 4,0 e a enzima libera L-arabinose quando incubada com arábano, indicando o mesmo ataque relatado por KAJI *et alii* (73). Quando a preparação foi incubada com pectina, traços de L-arabinose foram detectados no meio de reação.

Em 1969, VAN ETTEN *et al* (75) verificaram que, crescendo *Sclerotium rolfsii* em hipocotilédones de feijão, o mesmo produz enzimas capazes de degradar um galactano que contém ligações glicosídicas beta (1-4), isolado de *Lupinus albus*. O pH ótimo encontrado foi menor que 5,0 e a análise dos produtos do meio indicou uma ação do tipo exogalactanase, com liberação de D-galactose no meio de incubação. Entretanto esta preparação não foi capaz de hidrolisar galactano ramificado, contendo ligações glicosídicas do tipo beta (1-3) e beta (1-6). Os autores afirmaram que o mesmo fungo apresentou capacidade de hidrolisar arábano e de liberar D-galactose de um galactomanano.

KAJI *et al* (76) estudaram uma arabanase produzida por *Corticium rolfsii*. A enzima demonstrou ser uma alfa-L-arabinofuranosidase, com atividade ótima catalítica em pH 2,5 e alta tolerância ao meio ácido. O arábano no meio de crescimento demonstrou ser um eficiente indutor desta enzima.

KAJI *et alii* (77) purificaram uma alfa-L-arabinofuranosidase,

que mostrou ser homogênea a análise em ultracentrífuga. A enzima demonstrou um pH ótimo de 3,8 a 4,0 e preferência por fenil-alfa-L-arabinofuranose em relação ao arabano purificado.

KAJI *et al* (78) demonstraram que a enzima atuava sobre ligações glicosídicas alfa (1-3) e alfa (1-5) entre resíduos de L-arabinofuranose terminais, não redutores.

KAJI *et al* (79) verificaram que *Sclerotium rolfsii*, *Hypochnus centrifugus*, *Corticium centrifugum* e *C. rolfsii* tem sua produção de arabanase extracelular aumentada quando são crescidos em presença de arabano e extrato de farelo de trigo. O pH do meio de crescimento caiu de 5,2 inicial para 2,0 a 2,4 devido à formação do ácido oxálico. As enzimas eram estáveis a temperatura ambiente e entre pH 3,0 e 8,0 por longo período, e liberaram L-arabinose de fenil-alfa-L-arabinofuranosídeo, arabano de beterraba e arabinoxilano.

Portanto, entre as enzimas responsáveis pela degradação das substâncias pécnicas, que se entende por uma mistura de polissacarídeos, estão a poligalacturonase, arabanase e galactanase. A poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15) pode ser produzida por fungos tanto de maneira adaptativa como constitutiva (19,21,37,40,41,43,47,49,52,55,56). Na maioria dos estudos realizados sobre indução de poligalacturonases foram empregadas pectinas e ácido péctico purificados como fontes de carbono (19,20,21,40,41,43,46,47,52,55,56,59,66), enquanto que no caso das galactanases e arabanases foram usados tanto arabano purificado quanto extrato bruto de vegetais (61,68,70,73,75,76,79).

Na obtenção de café "fino", o café cereja é submetido ao despulpamento mecânico e os grãos sofrem um tratamento especial para retirada da camada mucilagínosa. A decomposição natural dessa camada mucilagínosa é atribuída a ação de microrganismos (80,81). No entanto, não foi ainda estudada com detalhes a liberação das enzimas hidrolíticas pelos componentes da microflora do café.

O estudo dos polissacarídeos presentes na polpa do café cereja revelaram a presença de ácido péctico (82) e galactoarabano (83).

COLEMAN *et alii* (82) observaram que fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* eram capazes de hidrolisar uma fração polissacarídica, não purificada, de polpa de café cereja. Os autores não esclareceram a natureza das preparações enzimáticas, e os resultados demonstraram comportamentos distintos em diferentes amostras de uma mesma espécie microbiana.

O presente trabalho visa demonstrar que as enzimas pectolíticas liberadas pelos fungos isolados da microflora do café são capazes de despolimerizar o ácido péctico e galactoarabano obtidos da camada mucilagínosa do café cereja.

MATERIAIS E METODOS

Obtenção do extrato de polpa de café

Polpa de café cereja (*Coffea arabica* L. var. Mundo Novo), moída em liquidificador, foi lavada sucessivas vezes com três volumes de etanol (3x), dois volumes de acetona (2x), cloroformio metanol 2:1 (v/v), benzeno etanol 2:1 (v/v), butanol saturado com água e novamente acetona. O resíduo seco e moído serviu como fonte para extração de polissacarídios.

Os polissacarídios foram extraídos com oxalato de amônia a 1%, sob agitação mecânica a quente, com sucessivas extrações em tempos crescentes (4,8,12,24,48 horas). Após cada operação, a suspensão foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos, e o resíduo reextraído, tendo sido precipitada a fração polissacarídica do sobrenadante com etanol a 75%. Os precipitados foram reunidos, ressuspensos em água e dialisados contra água corrente durante 48 horas. Após a precipitação dos polissacarídios da solução dialisada, com etanol a 75%, filtração e secagem o pó obtido foi denominado extrato de polpa de café e utilizado como fonte de carbono para o crescimento dos fungos.

Substratos

Ácido pécico e galactoarabano, contendo 81 a 10% em ácido galacturônico respectivamente, e outra amostra de ácido pécico, que demonstrou cromatograficamente estar isento de outros monossacarídios além de ácido galacturônico, foram isolados da polpa de frutos de café cereja (83,84) e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. J.B.C. Correa, do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Obtenção das culturas de fungos

Quatro amostras de café cereja de vários locais de uma mesma fazenda (Fazenda Horizonte, Bela Vista do Paraíso, Pr) foram recolhidos assepticamente em tubos de ensaio contendo meios de culturas diferentes. Os meios utilizados foram **sabouraud glucose**, **caldo simples**, **sabouraud glucose agar** e **agar simples**. Os tubos foram incubados a 28.º durante 48 horas.

As amostras foram plaqueadas em meio de cultura sólido correspondente e as placas incubadas a 28.º durante 48 horas. As colônias isoladas foram estocadas em **sabouraud glucose agar**, pH 5,0 a 4,0.

Os fungos utilizados nas experiências foram gentilmente tipificados pelo Prof. C.S. Lacaz, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, como **Aspergillus sp.**, **Cladosporium sp.**, **Fusarium sp.** e **Penicillium sp.** As amostras utilizadas foram escolhidas entre outras do mesmo gênero por terem apresentado maior crescimento em meio contendo o extrato de polpa de café.

Condições de cultivo

Os fungos foram adaptados ao meio líquido em erlenmeyer de 250 ml, contendo 10 ml de glucose a 10% como fonte de carbono e 90 ml de meio de composição definida. O meio de cultura era constituído de 15 mmoles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 13 mmoles de NH_4NO_3 , 9 mmoles de KH_2PO_4 ; 1 mmol de Na_2HPO_4 ; 2 mmoles de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 34 umoles de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 30 umoles de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 18 umoles de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 8,5 mmoles de NaCl ; 20 mmoles de KCl ; 50 mmoles de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,9 mmoles de CaCl_2 e 22 umoles de CuCl_2 por 1000 ml. O pH do meio foi ajustado a 5,6 e foi adicionado também extrato de levedura, numa concentração de 0,05%.

A incubação foi feita em agitador rotatório com 180 rpm a 28°.

Os fungos foram crescidos nas condições mencionadas, substituindo-se glucose por extrato de polpa de café (0,1%). Foram utilizados como inóculo culturas de 72 a 96 horas dos fungos adaptados ao meio líquido. Para a determinação do crescimento, foi determinado o peso seco do micélio, tendo sido filtrado o meio de culturas em papel Whatman 40 e o micélio deixado em estufa (85.°) por 24 horas. O peso seco do micélio foi determinado em períodos de 24 horas, por cinco dias.

Atividade enzimática

O filtrado do meio de cultura foi centrifugado a 3600 rpm durante 20 minutos, e dialisado contra água gelada durante 15 horas. A dosagem da proteína dessa preparação enzimática foi feita pelo método de LOWRY *et al* (85).

O sistema de incubação foi constituído de 1 mg do substrato (ácido pécico, galactoarabano ou extrato de polpa de café), 50 umoles de tampão acetato pH 4,8 e preparação enzimática, em um volume final de 1,0 ml. A incubação foi feita a 30° e amostras foram recolhidas nos tempos zero, 2, 4, 6 e 8 horas. A reação foi paralisada pelo aquecimento a 100.° por 5 minutos. A atividade enzimática foi determinada pelo aumento de açúcar redutor, medido pelo método de SOMOGYI (86) e NELSON (87).

A atividade específica foi calculada como o número de umoles de açúcar redutor liberado no meio de incubação, por miligrama de proteína da preparação enzimática.

Para a determinação do efeito do pH na atividade enzimática, foram usados os tampões acetato pH 3,6 a 5,6; imidazol/HCl pH 6,0 a 7,6; veronal/HCl pH 8,2 a 9,0 e glicina/NaOH pH 9,4 a 10,6, que foram preparados segundo GOMORI (88). Para a determinação do pH ótimo a mistura de incubação sofreu o mesmo tratamento das amostras.

Análise dos produtos do meio

Cada sistema de incubação, após inativação de enzimas, foi passado em coluna de resina DOWEX 50W-X8, 200-400 MESH, forma H⁺ (Dow.Chem.Co.) para remoção do sódio. O ácido acético foi eliminado por evaporação quando as amostras foram concentradas a vácuo.

Para caracterização dos produtos da degradação enzimática do ácido pécico., foi feita cromatografia descendente em papel Whatman n.º 1, com os seguintes solventes: a) acetona: etanol: isopropanol:tampão borato pH 10 (0,05M) na relação 3:1:1:2 (89); b) acetato de etila: ácido acético: água 2:1:2 (90).

Os produtos da degradação enzimática do galactoarabano foram caracterizados por cromatografia descendente em papel Whatman n.º 4, usando o solvente benzeno: n-butanol: piridina: água 1:5:3:3 (91), tendo sido empregado como revelador o nitrato de prata alcalino (92).

Os açúcares usados como padrões para as cromatografias foram fornecidos pela Calbiochem, com exceção da L-arabinose, fornecida por Pfanstiehl Laboratories. Todos os produtos utilizados para as experiências foram pró análise.

RESULTADOS

Crescimento

O crescimento dos fungos e o aparecimento de atividade enzimática no meio de cultura, capaz de hidrolisar ácido pécico e galactoarabano no sistema de incubação usado são apresentados na fig. 1. Entre 72 e 96 horas de cultivo foi apresentado um máximo de atividade enzimática, com exceção do *Fusarium sp.*, que demonstrou um nível mais ou menos constante após 24 horas. O aparecimento das enzimas no meio foi posterior ao crescimento dos fungos. Durante o período de crescimento não foi constatada alteração no pH do meio.

Alteração da produção de enzimas

As tabelas 1,2 e 3 mostram a alteração da atividade específica, devido à substituição da glucose por extrato de polpa de café. A atividade específica foi calculada a partir de uma incubação de seis horas. Os dados demonstram que existe um marcado acréscimo na atividade enzimática capaz de hidrolisar os polissacarídios contidos no extrato de polpa de café, quando os fungos são crescidos em presença do substrato. A amostra de *Aspergillus sp.* apresenta atividade enzimática capaz de hidrolisar ácido pécico de maneira constitutiva. O mesmo ocorre com *Penicillium sp.*, em relação ao galactoarabano. Houve aumento na atividade das enzimas de *Penicillium sp.* e *Cladosporium sp.* frente ao ácido pécico, e das enzimas de *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.* frente ao galactoarabano. Em um caso apenas foi notada uma redução na atividade específica, quando a fonte de carbono foi substituída.

Especificidade das enzimas

As enzimas demonstraram preferência por ácido pécico purificado, hidrolisando esse substrato mais rapidamente do que o extrato de polpa. A fig. 2 ilustra os resultados obtidos. O ácido pécico não purificado, contendo 81% em ácido galacturônico apresenta uma velocidade de hidrólise intermediária entre os dois outros substratos apresentados. As amostras de *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* produziram enzimas que degradaram 34% do ácido pécico purificado, em 8 horas de incubação, enquanto que enzimas produzidas por *Cladosporium sp.* no mesmo tempo degradaram 29% e as de *Aspergillus sp.* 13,3%. somente 12% do galactoarabano foi hidrolisado no mesmo tempo pela preparação de *Aspergillus sp.*, 5,85% com a do *Fusarium sp.*, 4,3% com a do *Penicillium sp.* e 3,9% com a de *Cladosporium sp.*

Efeito do pH na atividade enzimática

As enzimas demonstraram maior atividade na faixa ácida do pH, em torno de 4 e 5. A figura 3 mostra as curvas de pH obtidas com as preparações enzimáticas, tendo sido usado ácido pécico como substrato, e a figura 4 ilustra os dados obtidos quando foi usado galactoarabano como o substrato. Uma das amostras, *Cladosporium sp.* apresentou atividade enzimática também em pH alcalino, melhor evidenciada quando ácido pécico foi o substrato. As outras amostras apresentaram baixa atividade em pH acima de 6,0, o que é geralmente encontrado em enzimas pectolíticas de fungos.

Análise dos produtos de degradação

Apesar de terem sido usados outros solventes, capazes de resolver mistura de oligouronides, a análise cromatográfica não revelou manchas que pudessem corresponder a oligouronides. A figura 5 indica o ácido D-galacturônico como o único produto de degradação do ácido pécico pela ação das enzimas extracelulares, tendo sido observado que o aparecimento das manchas foi proporcional ao tempo de incubação.

A degradação enzimática do galactoarabano liberou no meio de incubação ácido D-galacturônico, D-galactose e L-arabinose, conforme fig.6. Foi constatada a presença de manchas que migraram com R-gal 0,3 e 0,5 nesse solvente, após quatro horas de incubação. Após esse tempo, a concentração foi proporcional ao tempo de incubação, a semelhança de todas as outras manchas identificadas nas cromatografias.

Tabela I

Atividade específica das enzimas hidrolíticas quando os fungos eram crescidos em glucose ou em extrato de polpa.

Fonte de carbono	glucose	extrato
<i>Aspergillus sp.</i>	0,07	0,41
<i>Cladosporium sp.</i>	0,55	1,00
<i>Fusarium sp.</i>	0,38	0,71
<i>Penicillium sp.</i>	0,11	0,29

Tabela II

Alteração da atividade específica frente a ácido pécico não purificado, devido à substituição da fonte de carbono.

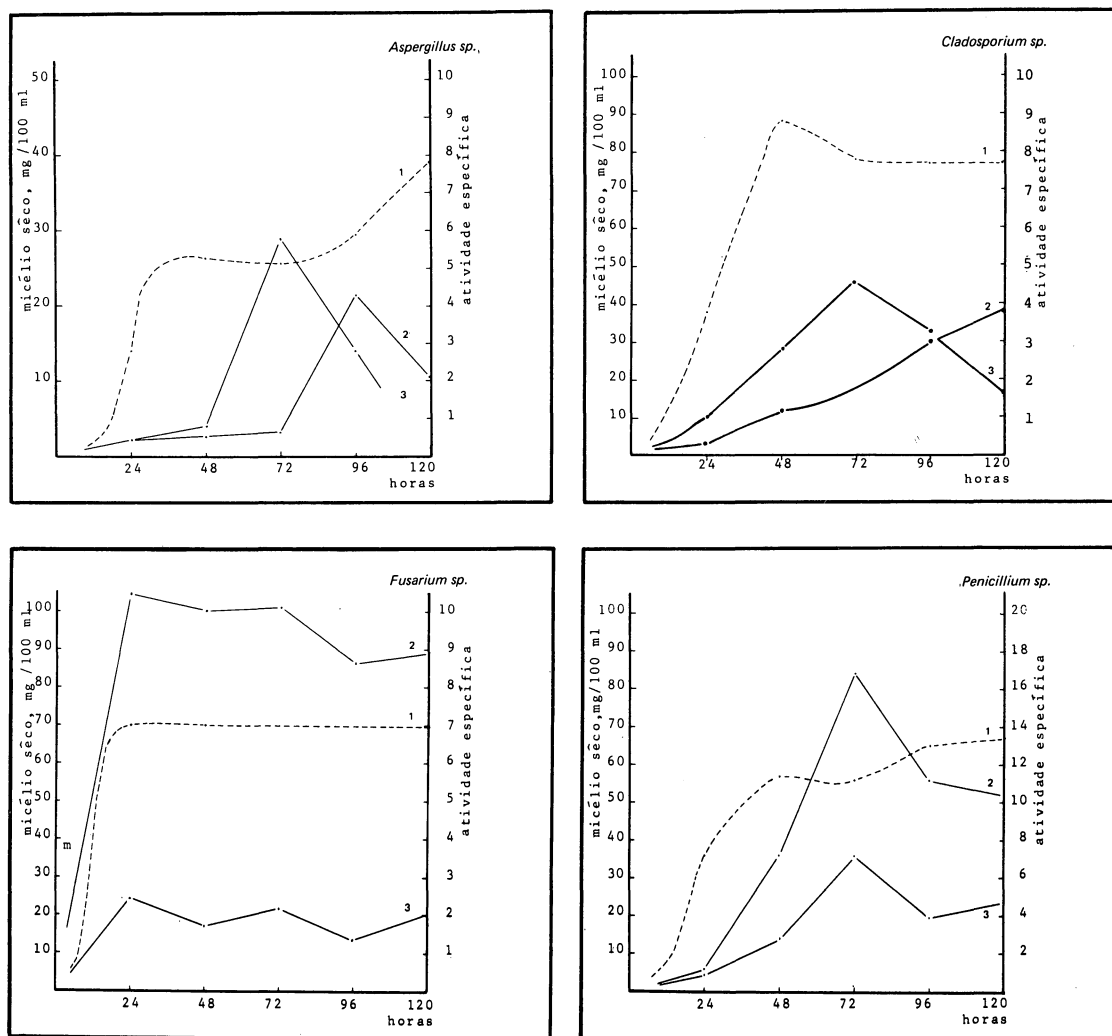
Fonte de carbono	glucose	extrato
<i>Aspergillus sp.</i>	0,63	0,65
<i>Cladosporium sp.</i>	1,80	3,60
<i>Fusarium sp.</i>	2,00	2,14
<i>Penicillium sp.</i>	0,99	1,51

Tabela III

Alteração da atividade específica frente a galactoarabano devido à substituição da fonte de carbono.

Fonte de carbono	glucose	extrato
<i>Aspergillus sp.</i>	0,33	1,26
<i>Cladosporium sp.</i>	0,87	0,54
<i>Fusarium sp.</i>	0,41	0,92
<i>Penicillium sp.</i>	0,41	0,38

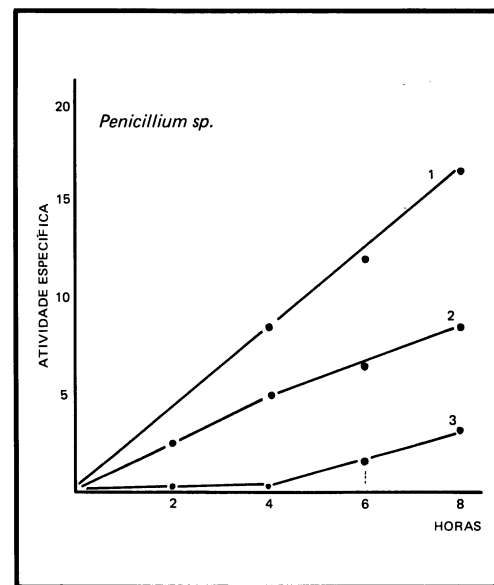
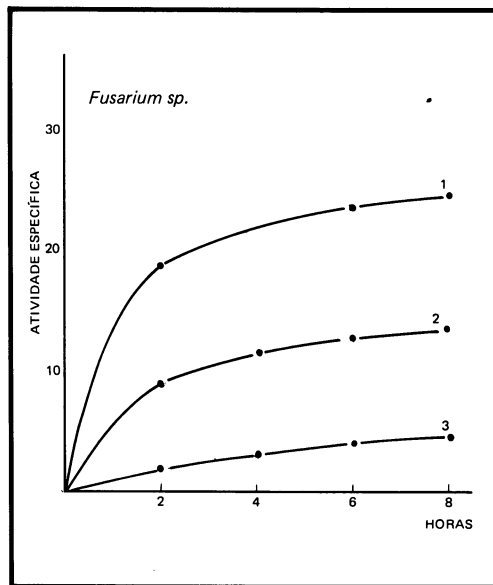
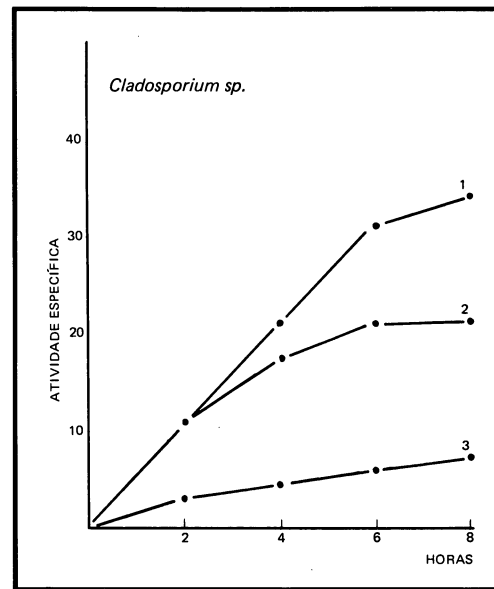
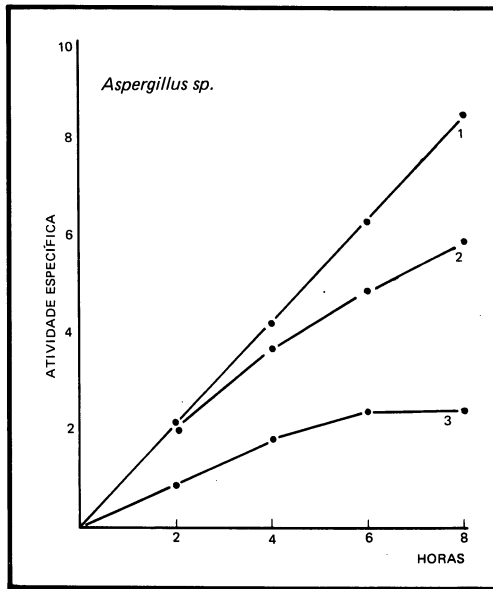
FIGURA 1: Curva de crescimento e atividade enzimática.



- 1) - curva de crescimento;
- 2) - atividade enzimática sobre ácido pécico
- 3) - atividade enzimática sobre galactoarabano.

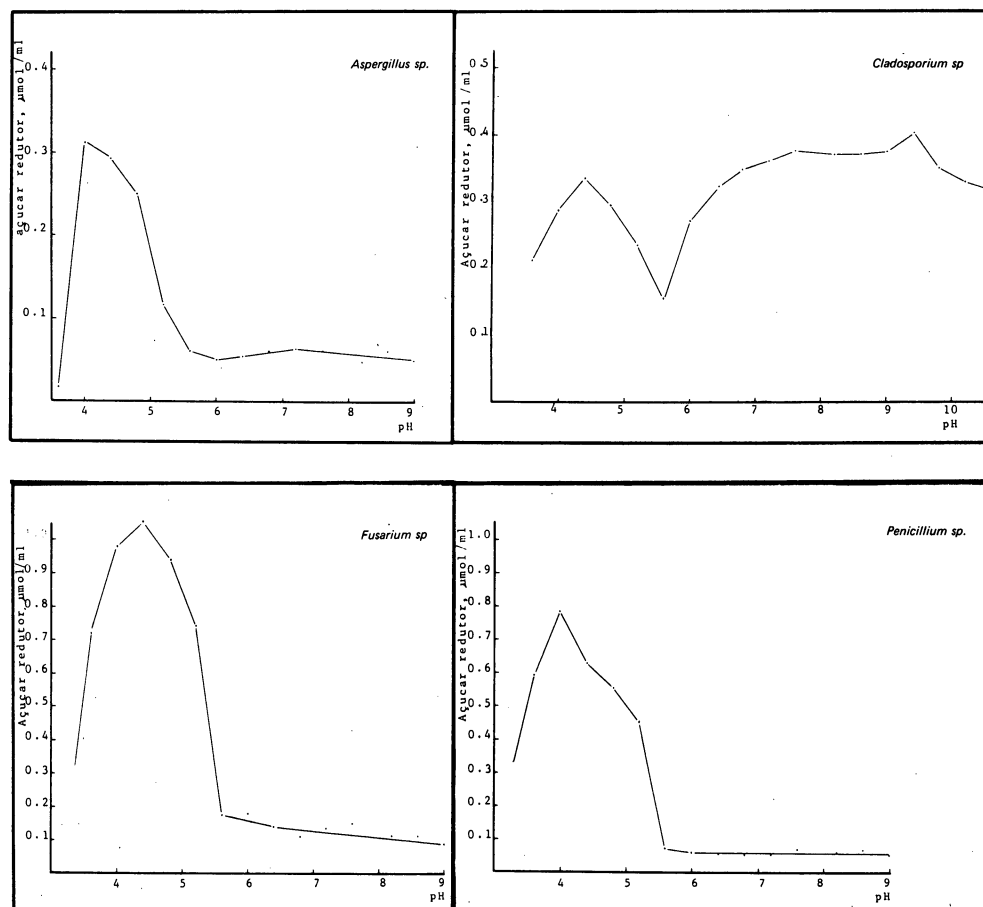
A atividade específica foi calculada como umol de açúcar redutor por mg de proteína.

FIGURA 2: Velocidade de hidrólise enzimática de ácido pécico e extrato de polpa de café pelas enzimas extracelulares produzidas pelos fungos.



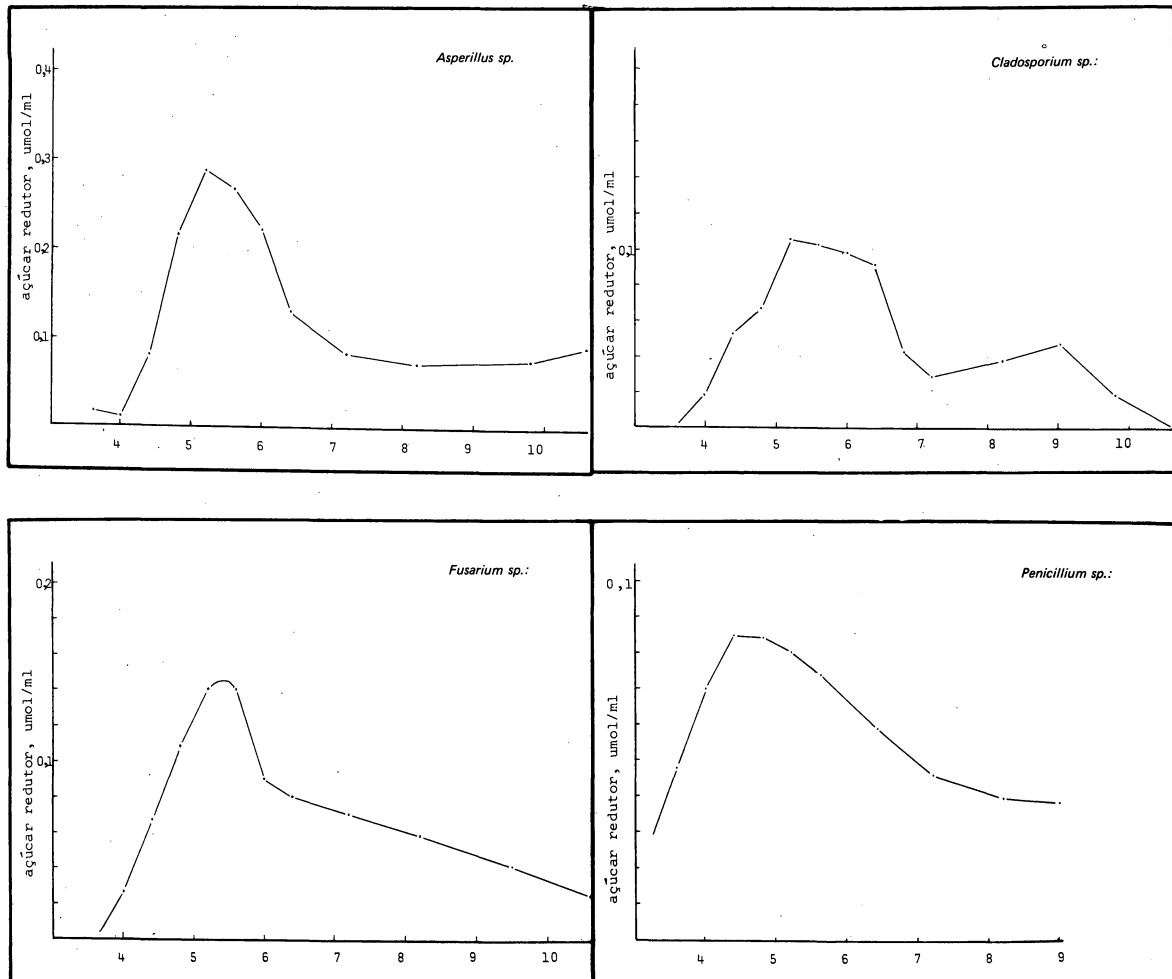
- 1) - ácido pécico
- 2) - ácido pécico não purificado
- 3) - extrato de polpa de café

FIGURA 3: Efeito da variação do pH na atividade enzimática.



Sistema: Enzima *Aspergillus sp.*: 22 ug; *Cladosporium sp.*: 15 ug; *Fusarium sp.*: 40 ug; *Penicillium sp.*: 29 ug), 250 ug de ácido pécico e 10 umoles de tampão, num volume final de 0,25 ml. As incubações foram feitas a 30º, por 3 horas.

FIGURA 4: Efeito da variação do pH na atividade enzimática.



Sistema: Enzima (Aspergillus sp.: 22 ug; Cladosporium sp.: 15 ug; Fusarium sp.: 40 ug; Penicillium sp.: 29 ug), 250 ug de galactoarabano e 10 umoles de tampão, num volume final de 0,25 ml. As incubações foram feitas a 30°, por 3 horas.

FIGURA 5: Produtos da atividade enzimática sobre ácido pécico.

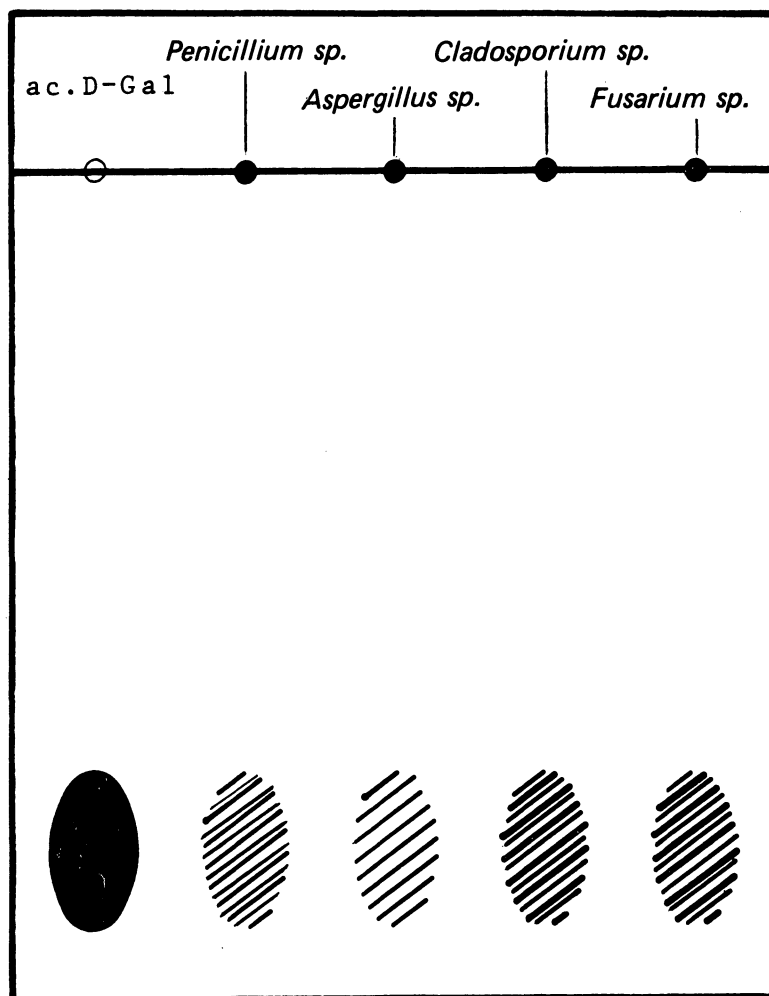
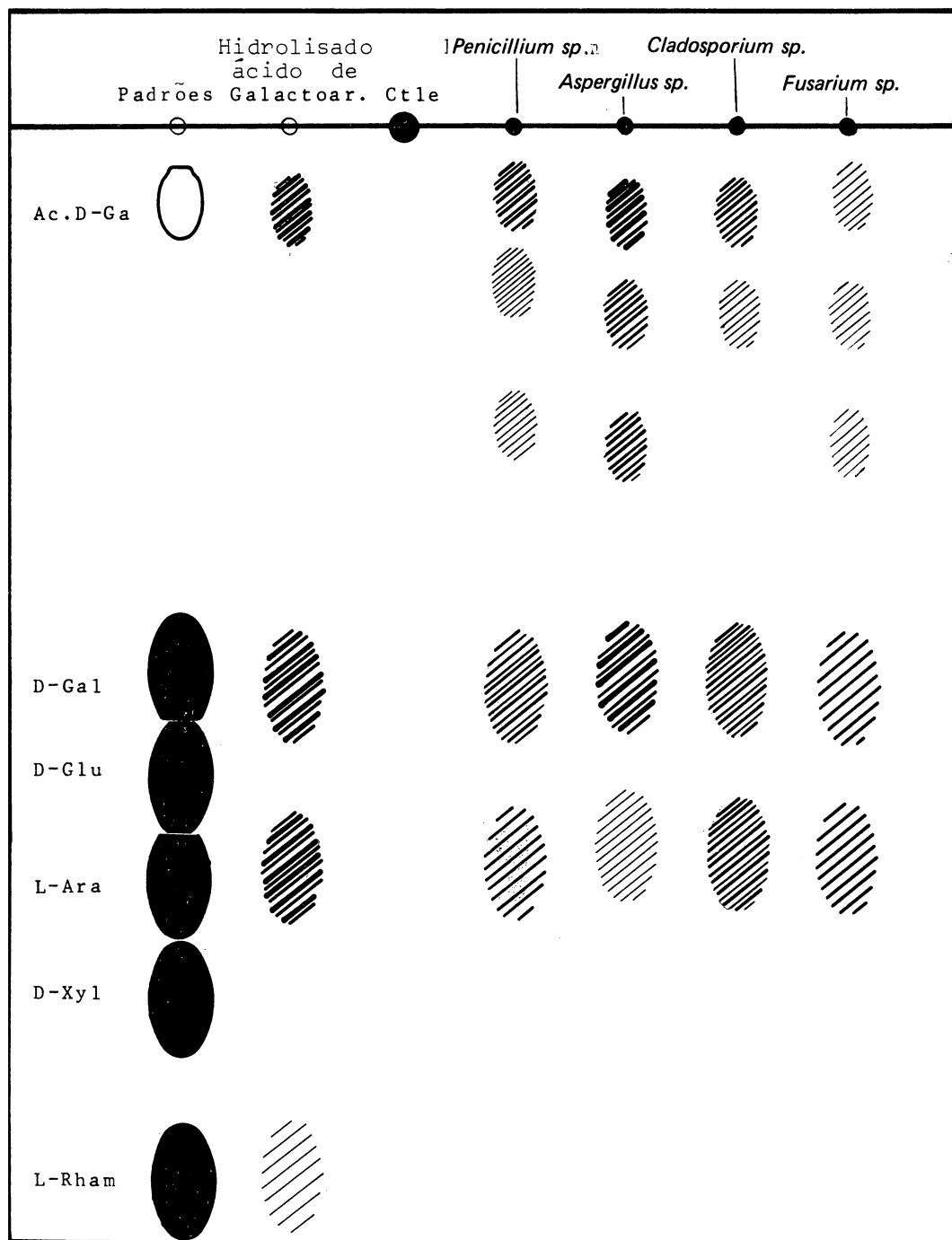


FIGURA 6: Produtos da atividade enzimática sobre galactoarabano.



DISCUSSÃO

Devido à alta viscosidade do extrato de polpa do café, mesmo presente em baixa concentração (0,1%), o meio de cultura apresentava dificuldade de filtração nas primeiras 24 horas de crescimento. Por esta razão não foi determinado o crescimento dos fungos nesse período. A facilidade de filtração nos tempos posteriores indica fortemente a presença de uma atividade enzimática capaz de despolimerizar os polissacarídeos presentes no extrato de polpa de café.

A demonstração de que a medida da atividade enzimática por viscosimetria parece não ser adequada, efetuada por KERTESZ (15), é um forte argumento para a utilização de outros métodos, como o da dosagem do açúcar redutor, que é diretamente proporcional ao rompimento das ligações glicosídicas de polissacarídeos. Portanto, para a medida da atividade enzimática foi usada a determinação dos grupamentos redutores pela técnica de SOMOGYI (85) e NELSON (86), tendo sido verificado recentemente que o tampão acetato não interfere com esse método (93):

Os fungos estudados, isolados de frutos de café cereja, demonstraram produzir enzimas capazes de degradar os polissacarídeos contidos no extrato de polpa de café. Como a polpa de café é constituída de pectina (82,84) e de galactoarabano (83), a atividade hidrolítica pode ser de poligalacturonase, galactanase e arabanase. Realmente, as preparações enzimáticas obtidas dos quatro fungos foram capazes de hidrolisar ácido pécico, galactoarabano e também o extrato de polpa de café, tanto quanto foram crescidos em presença de glucose como quando foram crescidos em presença de extrato.

Quando a atividade enzimática foi determinada frente a ácido pécico não purificado, foi verificada alteração na atividade da enzima em tres casos, devido a mudança da fonte de carbono no meio de cultura. A atividade enzimática obtida do meio extracelular de *Aspergillus sp.* permaneceu no mesmo nível, o que indica que a produção de enzima por este microrganismo tem um caracter constitutivo, o que já foi constatado ocorrer em fungos pertencentes ao mesmo gênero (21,37,43,52). *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.* demonstraram um aumento na atividade enzimática, pela presença do substrato no meio de cultura, o que já foi relatado por KUC (45), STRIDER *et al* (41) ocorrer em *Cladosporium cucumerinum* e por PHAFF (19) em *Penicillium chrysogenum*.

Uma característica observada é a acentuada preferência que as enzimas extracelulares demonstram por ácido pécico purificado (fig. 2). O extrato de polpa de café foi hidrolisado a uma velocidade muito baixa, mesmo após o crescimento dos fungos em meio contendo a mistura de polissacarídeos, fato esse que pode ser explicado pela esterificação presente no extrato de polpa de café, uma vez que

as enzimas poligalacturonases são mais ativas em ácidos pectínicos com baixo grau de esterificação (17, 29).

As atividades enzimáticas sobre ácido pectico purificado demonstraram ser mais altas em pH ácido, o que é geralmente encontrado em fungos (1, 13, 31, 37, 40, 42, 44, 48, 49, 53, 58, 59, 61, 63, 64). Valores mais altos de pH, situados na faixa alcalina, são requeridos por enzimas de fontes bacterianas (1).

Cladosporium sp. apresentou enzimas que hidrolisam ácido pectico mesmo na faixa alcalina do pH, demonstrando maior atividade nestas condições. Casos semelhantes são citados por DEUEL *et al* (1) serem devidos a presença de mais de uma enzima na preparação enzimática, que atua sobre o mesmo substrato de forma diferente. Esta atividade enzimática, em relação ao seu elevado pH se assemelha às citadas por SCHUBERT (35) e PURR *et alii* (38), sendo que, entretanto, estas enzimas degradam também pectina com alto grau de esterificação.

A análise cromatográfica dos produtos de degradação enzimática do ácido pectico indica somente a liberação de ácido D-galacturônico. Não foram detectadas manchas que pudessem corresponder a dímeros ou trímeros de ácido D-galacturônico, nem efetuando a cromatografia com outros sistemas de solventes e nem aumentando a concentração de amostra aplicada.

Resultados semelhantes foram obtidos por SAITO (37), com uma preparação extracelular de *Aspergillus niger*, por ENDO (94), com uma preparação purificada de *Coniothyrium diplodiella*, e com uma preparação não purificada de meio de cultura de *Penicillium expansum* (60). A análise dos produtos do meio indica que as enzimas extracelulares estudadas tem um comportamento semelhante à fração gama da poligalacturonase estudada por BROOKS *et al* (36).

As endopoligalacturonases purificadas (44, 51, 53, 63) dão como produtos ácido galacturônico, mas sempre acompanhado de oligouronides. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem a presença de uma atividade enzimática poligalacturonase no meio de cultura, do tipo exoglicosidade, específica por ácido pectico e que o degrada até ácido galacturônico, em baixo pH. Devido, no entanto, à observação de SWINBURNE *et al* (60) que preparações purificadas do meio de cultura com atividade exopoligalacturonase se comportaram como endopoligalacturonase, não se pode excluir a possibilidade desta enzima estar presente no meio de cultura dos fungos estudados.

O método de determinação da atividade enzimática usado pode, entretanto, determinar a atividade *transeliminase*, que degrada substâncias pecticas de maneira diferente (95). As características das transeliminases produzidas por fungos são bem distintas das verificadas nas preparações, não catalisando a degradação de ácido pectico (95), apresentando marcada preferência por pectina (95,96,97) e levando a produção de oligouronides alfa-beta-insaturados, e não ácido galacturônico somente.

Da polpa do café cereja foi isolado um heteropolissacarídeo constituído de resíduos de galactose e arabinose, em proporções aproximadamente equimoleculares (83). O autor constatou que 40% do heteropolissacarídeo era constituído por resíduos de galactopiranosose interligados por ligações glicosídicas beta (1-6). A atividade enzimática capaz de hidrolisar o galactoarabano foi também encontrada no meio de cultura dos fungos estudados.

A comparação das atividades específicas quando os fungos foram crescidos em glucose ou extrato de polpa de café como fonte de carbono (tabela III), levou à constatação que o *Penicillium sp.* apresentou uma produção de enzimas necessárias para a degradação desse substrato de maneira constitutiva. *Cladosporium sp.* apresentou marcada redução na atividade específica, o que poderia ser explicado pela repressão de síntese das enzimas por algum metabólito liberado no meio de incubação. Pelo contrário, *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.* indicaram um aumento da produção de enzimas devido a mudança da fonte de carbono. Os dados obtidos são coerentes com a bibliografia que, embora reduzida, indica que galactanases e arabanases podem ser produzidas tanto de maneira constitutiva como adaptativa (70,71,72,73,74,75,76,79).

Foi também observado que o pH ideal para a hidrólise do galactoarabano demonstrou ser localizado na faixa ácida do pH, o que é encontrado em enzimas produzidas por fungos (61,68,70,72,74,75,76,77,79).

A análise dos produtos finais de degradação revelou que L-arabinose, D-galactose e ácido D-galacturônico eram liberados proporcionalmente ao tempo de incubação. Foi verificada a presença de oligossacarídeos com comportamento cromatográfico semelhante a dímeros de galactose (98). Os resultados indicam que as preparações enzimáticas demonstram especificidade pelo tipo de ligação, o que já foi observado por KNEE *et al* (74), e por Van ETTEN *et al* (75) com galactanase de *Phytophthora infestans* e *Sclerotium rolfsii*, que são incapazes de hidrolisar ligações do tipo beta (1-3) e beta (1-6) entre resíduos de galactopiranosose.

A presença de L-arabinose no meio de incubação indica a atividade alfa-L-arabinofuranosidase, semelhante em especificidade à uma enzima de *Aspergillus niger* (78), uma vez que o substrato usado continha os mesmos tipos de ligação que o arabano de café. (99).

Estes fungos isolados da microflora do cafezal são, portanto, capazes de liberar no meio de cultura as enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise dos polissacarídeos isolados da camada mucilaginosa de frutos maduros de café cereja. Estas atividades enzimáticas são aumentadas pela presença, no meio de crescimento, do substrato natural como fonte de carbono.

Os dados obtidos sugerem que a decomposição natural da camada mucilaginosa possa ser feita pelas enzimas liberadas pela flora micológica do cafezal.

CONCLUSÕES

1. *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, isolados de frutos de café cereja, demonstraram produzir enzimas capazes de hidrolisar polissacarídeos isolados da polpa de café.
2. As preparações apresentaram maior atividade enzimática para ácido pécico do que para extrato de polpa de café.
3. As atividades enzimáticas apresentaram pH ótimo entre 4,0 e 6,0.
4. Nas condições empregadas, a hidrólise do ácido pécico levou em todos os casos à formação de ácido galacturônico.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, a Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas, ao Conselho de Pesquisas da Universidade Federal do Paraná, ao B.N.D.E. – FUNTEC, ao Conselho Nacional de Pesquisas e à Universidade Estadual de Londrina, por possibilitarem a execução desta tese.

Ao Prof. Dr. J. H. Duarte e Prof. Alceu Schwab, pela orientação prestada em parte dos trabalhos efetuados.

Ao Prof. C. S. Lacaz, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela tipificação dos fungos e ao Prof. Dr. J. B. C. Correa pelo oferecimento dos polissacarídios purificados.

Aos componentes do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelo estímulo e colaboração.

De maneira especial, o autor agradece à Dra. Glaci Therezinha Zancan pela orientação prestada, imprescindível para a elaboração do presente trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. DEUEL, H & STUTZ, E. *Advan Enzymol.* **20**:341, 1958
2. LINEWEAVER, H. & JANSEN, E. *Advan. Enzymol.* **11**:267,1951.
3. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. *J.Chem. Soc.*:496,1938.
4. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. *J.Chem. Soc.*:452,1939.
5. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. *J.Chem. Soc.*:454,1939.
6. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. *J.Chem. Soc.*:1221,1947.
7. HIRST, E.L.; JONES, J.K.N.; WALDER, W.O. *J. Chem. Soc.*:
1225, 1947.
8. BEAVEN, G.H; HIRST,E.L.; JONES, J.K.N. *J. Chem. Soc.*:
1865, 1939.
9. KERTESZ, Z.I *In*: SUMNER, J.B. ed. *The Enzymes vol. 1*,
New York, Academic Press, 1951, p. 745.
10. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. *In*: PIGMAN, W.E., WOLFROM, M.
L. eds. *Advances in Carbohidrate Chemistry vol. 2* - New York,
Academic Press 1946, p. 235.
11. EHRLICH, F. *In*: PIGMAN, W.W., WOLFROM, M.L. eds.
Advances in Carbohidrate Chemistry vol. 2, New York,
Academic Press 1946, p. 241.
12. HARTER, L. & WEIMER, J. *In*: PHAFF, H.J. *Arch. Biochem.*
Biophys. **13**:67, 1947.
13. WASKMAN, S.A. & ALLEN, M.C.J *J. Amer. Chem. Soc.* **55**:
3408, 1933.
14. MOTTERN, H.H. & COLE, H.L. *J. Amer. Chem. Soc.* **61**:
2701, 1939.
15. KERTESZ, Z.I. *J. Amer. Chem. Soc.* **61**: 2544, 1939.
16. FISH, V.B. & DUSTMAN, R.B. *J. Amer. Chem. Soc.* **67**: 1155,1945.
17. JANSEN, E.F. & MACDONNEL, L.R. *Arch. Biochem. Biophys.* **8**: 97,
1945.
18. JANSEN, E.F.; MACDONNEL, L.R.; JANG, R. *Arch. Biochem*
Biophys. **8**: 133, 1945.
19. PHAFF, H.J. *Arch. Biochem. Biophys.* **13**: 67,1947.
20. GAUMANN, E. & BOHNI, E. *Helv. Chim. Acta* **30**: 24, 1947.
21. GAUMANN, E. & BOHNI, E. *Helv. Chim. Acta* **30**: 1519, 1947.
22. LINEWEAVER, H.; JANG, R.; JANSEN, A.F. *Arch. Biochem.*
Biophys. **20**: 137, 1949.
23. BEAVEN, G.H. & BROWN, F. *Biochem. J.* **45**: 221, 1949.
24. REID, W.W. *Nature* **166**: 76, 1950.
25. HOLDEN, M. *Biochem. J.* **47**: 426, 1950.
26. JERMYN, M.A. & TOMKINS, R. G. *Biochem. J.* **47**: 437, 1950.
27. ALTERMATT, H. & DEUEL, H. *Helv. Chim. Acta* **35**: 1422, 1952.
28. ALTERMATT, J. & DEUEL, H. *Helv. Chim. Acta* **36**: 340, 1953.
29. SOLMS, J.; DEUEL, H.; ANYAS-WEISZ, L. *Helv. Chim. Acta* **35**:
2363, 1952.
30. SCHUBERT, E. *Nature* **169**: 931, 1952.
31. AYRES, A.; DINGLE, J.; PHIPPS, A.; REID, W.W.; SOLOMONS, G.L.
Nature **170**: 834, 1952

32. ROBOZ, E.; BARRAT, R.W.; TATUM; E.L. *J. Biol. Chem* **195**: 459, 1952.
33. SEEGMILLER, C.G. & JANSEN, E.F. *J. Biol. Chem.* **195**: 327, 1952.
34. MCCREADY, R.M. & SEEGMILLER, C.G. *Arch. Biochem. Biophys.* **50**: 440, 1952.
35. SCHUBERT, E. *Helv. Chim. Acta* **37**: 691, 1954.
36. BROOKS, J. & REID, W.W. *Chem & Ind.*: 325, 1955.
37. SAITO, H. *J. Gen. Microbiol.* **1**: 38, 1955.
38. PURR, A.; HOTTENROTH, B.; DORING, M.; SCHNEIDER, F. *Biochem. Z.* **329**: 261, 1957.
39. DEMAINE, A.L. & PHAFF, H.J. *In: TUTTOBELLO, R & MILL, P. J. Biochem. J.* **79**: 51, 1961.
40. HUSAIN, A. & RICHES, S. *Phytopathol.* **48**: 316, 1958.
41. STRIDER, D. L. & WINSTEAD, N. N. *Phytopathol.* **51**: 765, 1961.
42. DESHPANDE, K. B. *Enzimologia* **22**: 295, 1961.
43. TUTTOBELLO, R. & MILL, P.J. *Biochem. J.* **79**: 51, 1961,
44. MILL, P.J. & TUTTOBELLO, R. *Biochem. J.* **79**: 57, 1961.
45. KUC, J. *Phytopathol.* **52**: 961, 1962.
46. WINSTEAD, N. N. & MCCOMBS; C.L. *Phytopathol.* **53**: 961, 1963.
47. FISCHER, K.D. *Phytopathol.* **55**: 398, 1965.
48. KEEN, N. T. & HORTON, J.C. *Can. J. Microbiol.* **12**: 443, 1965.
49. BATEMAN, D. F. *Phytopathol.* **56**: 238, 1966.
50. CAPPELLINI, R.A. *Phytopathol*: **54**: 734, 1966.
51. UCHINO, F.; KURONO, Y.; DOI, S. *Agr. Biol. Chem.* **30**: 1066, 1966.
52. YAMASAKI, M.; YASUI, T.; ARIMA, K. *Agr. Biol. Chem.* **30**: 142, 1966.
53. YAMASAKI, M.; YASUI, T.; ARIMA, K. *Agr. Biol. Chem.* **30**: 1119, 1966.
54. SWINBURNE, T.R. & CORDEN, M.E. *Nature* **213**: 286, 1967.
55. PATIL, S.A. & DIMOND, A.E. *Phytopathol.* **58**: 676, 1967.
56. BARASH, I. *Phytopathol.* **58**: 1364, 1968.
57. AYERS, W.A.; PAPAIVIZAS, G.C.; LUMSDEN, R.D. *Phytopathol.* **59**: 796, 1969.
58. AYERS, W. A.; PAPAIVIZAS, G.C.; LUMSDEN, R. D. *Phytopathol.* **59**: 925, 1969.
59. CURREN, T. *Can. J. Microbiol.* **15**: 1241, 1969.
60. SWINBURNE, T.R. & CORDEN, M. E. *J. Gen. Microbiol.* **55**: 75, 1969.
61. FIELDING, A.H. & BYRDE, R. J. W. *J. Gen. Microbiol.* **58**: 73, 1969.
62. KAJI, A. & TAKEHISA, O. *Arch. Biochem. Biophys.* **131**: 203, 1969.
63. KOLLER, A. & NEUKOM, H. *Eur. J. Biochem.* **7**: 485, 1969.
64. BARASH, I. & EYAL, Z. *Phytopathol.* **60**: 27, 1970.
65. KEEN, N. T. & ERWIN, D. C. *Phytopathol.* **61**: 198, 1971.
66. PERLEY, A. F. & PAGE, O. T. *Can. J. Microbiol.* **17**: 415, 1971.

67. EHRLICH, E. & SCHUBERT, E. *In: KAJI, A.; TAGAWA, K.; MATSUBARA, K. Agr. Biol. Chem. 31: 1023, 1967.*
68. RATAJAK, E. J. *Botan. Gaz. 104: 329, 1942.*
69. DEUEL, H.; LEVENBERGER, R.; HUBER, G. *Helv. Chim. Acta 33: 942, 1950.*
70. SIMPSON, F. J. *Can. J. Microbiol. 1: 131, 1954.*
71. FUCHS., A.; JOBSEN, J.A.; WOUTS, W.W. *Nature 206: 714, 1965.*
72. BYRDE, R. J. K. & FIELDING, A. H. *Nature 206: 390, 1965.*
73. KAJI, A.; TAGAWA, K.; MATSUBARA, K. *Agr. Biol. Chem. 31: 1023, 1967.*
74. KNEE, M. & FRIEND, J. *Phytochem. 7: 1289, 1968.*
75. VAN ETTEN, H. D. & BATEMAN, D. F. *Phytopathol. 59: 968, 1969.*
76. KAJI, A. & YOSHIHARA, O. *Appl. Microbiol. 17: 910, 1969.*
77. KAJI, A.; TAGAWA, K.; ICHIMI, T. *Biochim. Biophys. Acta 171: 186, 1969.*
78. KAJI, A. & TAGAWA, K. *Carbohidr. Res. 11: 293, 1969.*
79. KAJI, A. & YOSHIHARA, O. *Agr. Biol. Chem. 34: 1249, 1970.*
80. FRANK, H.A., & CRUZ, A. S. D. *J. Food Science 29: 850, 1964.*
81. FRANCO, C. M. *Bragantia 19: 621, 1960.*
82. COLEMAN, R.; LENEY, J.; COSCIA, A.; DICARLO, F. *Arch. Biochem. Biophys. 59: 157, 1955.*
83. CORREA, J. B.C. Identificação e determinação parcial da estrutura de um galactoarabano do material péctico de frutos de café cereja. Tese de doutoramento apresentada ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Pr, 1969.
84. CORREA, J. B. C. *Ciência e cultura 23: (suplemento) 55, 1971.*
85. LOWRY, O. M.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDAL; R.J. *J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.*
86. SOMOGYI, M. *J. Biol. Chem. 160: 69, 1945.*
87. NELSON, N. *J. Biol. Chem. 153: 375, 1944.*
88. GOMORI, G. *In: COLLOWICK, S.P. & KAPLAN, N. O. Methods in Enzymology vol. 1: New York, Academic Press, 1955, p. 138.*
89. MUKERJEE, H. & RAM, J. S. *J. Chromatogr. 14: 551, 1964.*
90. DEMAIN A. L. & PHAFF, H. J. *Arch. Biochem. Biophys. 51: 114, 1954.*
91. GAILLARD, B. D. E. *Nature 171: 1160, 1953.*
92. TREVELYAN, W. E.; PROCTOR, D.; HARRISON, J. S. *Nature 166: 444, 1950.*
93. EVELEIGH, D.E. *Can. J. Microbiol. 13: 727, 1967.*
94. ENDO, A. *Agr. Biol. Chem. 28: 639, 1964 In: Biolog. Abstracts. 47: 48993, 1966.*
95. ALBERSHEIM, P.; NEUKOM, H.; DEUEL, H. *Helv. Chim. Acta 43: 1422, 1960.*
96. EDSTROM, R. D. & PHAFF, H. J. *J. Biol. Chem. 239: 2409, 1964.*
97. EDSTROM, R. D. & PHAFF, H. J. *J. Biol. Chem. 239: 2403, 1964.*
98. CORREA, J. B. C. & FONTANA, J. D. *Anais da Academia Bras. de Ciências 43: , 1971.*

99. CORREA, J. B. C. Polissacarídios neutros hidrossolúveis do epicarpo e mesocarpo de frutos de café cereja. Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1968.