

PLÍNIO FAGUNDES CONTER

INDUÇÃO E REPRESSÃO DA L-FUCOSE DESIDROGENASE
DE AUREOBASIDIUM (PULLULARIA) PULLULANS

Tese de Mestrado apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

1981

Tese orientada pelo professor

Dr. Luís Alberto da Silva Veiga.

Aos amigos
Alfredo e Cecy,
meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luís Alberto da Silva Veiga e ao Prof. Manoel Francisco Guimarães, pela orientação deste trabalho.

A Iraide de Souza Gonçalves, pelo apoio, estímulo e pelo auxílio na redação deste trabalho.

A Muriel Mourão Vieira e Juliet K. Sugai, pelas sugestões.

Ao Dr. Shigehiro Sunayama, pelas sugestões.

Ao Prof. Sigurd W. Bach, pelas sugestões.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pelotas, que permitiram o meu afastamento.

À Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal de Pelotas, pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

Lista de tabelas	v
Lista de figuras	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. Material	5
2.2. Microorganismo	5
2.3. Método de cultivo	6
2.4. Composição do meio mineral líquido	7
2.5. Método de indução-padrão	8
2.6. Preparação do extrato livre de células	8
2.7. Métodos analíticos	9
3. RESULTADOS	
3.1. Efeito de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento da levedura <i>Pullularia pullulans</i> .	11
3.2. Efeito de diferentes açúcares sobre a atividade da L-fucose desidrogenase	12
3.3. Cinética da indução da L-fucose desidrogenase.	14
3.4. Efeito da densidade de células sobre a indução da L-fucose desidrogenase	15
3.5. Inibição da indução da L-fucose desidrogenase por cicloeximida	15
3.6. Repressão catabólica	16
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
I	Efeito de diferentes açúcares sobre a atividade da L-fucose desidrogenase de <i>Pullularia pullulans</i>	18
II	Efeito da concentração de células sobre a indução da L-fucose desidrogenase de <i>Pullularia pullulans</i>	19
III	Inibição da indução da L-fucose desidrogenase por monossacarídeos	20

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Extração da L-fucose desidrogenase de células de <i>Pullularia pullulans</i> pelo método de vibração	21
2	Curvas de crescimento de <i>Pullularia pullulans</i> em presença de diferentes açúcares ..	22
3	Efeito da concentração de L-fucose sobre a indução da L-fucose desidrogenase	23
4	Efeito da concentração de L-fucose sobre a velocidade de indução da L-fucose desidrogenase	24
5	Inibição da indução da L-fucose desidrogenase por cicloeximida	25

1. INTRODUÇÃO

A utilização de açúcares simples como fonte de carbono por leveduras do gênero *Pullularia* foi descrito por Clark & Wallace (1958a e 1958b). Os referidos pesquisadores verificaram que *Pullularia pullulans* possui enzimas constitutivas para a degradação da maioria dos mono e dissacarídeos mais comuns. Estudos realizados com extratos livres de células mostraram que este organismo é capaz de catabolizar a glucose tanto pela via de Embden-Meyerhof como pelo ciclo das pentoses fosfato. Este fato é evidenciado pela presença no extrato de enzimas como a fosfoglucomutase, frutose 1-6-difosfato aldolase e a gliceraldeído 3-P-desidrogenase, além da capacidade de utilização da ribose (Clark & Wallace, 1958a).

As enzimas chamadas "constitutivas" estão sempre presentes nas células em níveis estáveis, independentemente das condições do meio ambiente, isto é, do substrato energético que está sendo utilizado para o desempenho de suas funções vitais. Ao contrário, as enzimas ditas "induzidas" são encontradas nas células em níveis satisfatórios apenas quando a célula estiver em presença de um agente específico, designado de indutor. Este último, que geralmente é o próprio subs-

trato ou um análogo estrutural, eleva rapidamente os níveis da enzima até alcançar condições suficientes para manter a célula em plena atividade vital (Monod & Melvin, 1952; Magasanik, 1961; Paigen & Willians, 1970). Caso o indutor desapareça do meio, cessa também a indução, caindo assim os níveis da enzima. Este fenômeno se constitui em um dos principais mecanismos de economia da célula, regulando a síntese das enzimas necessárias ao metabolismo da célula.

Com relação aos carboidratos que raramente são encontrados em forma livre na natureza, o fenômeno de indução de enzimas capazes de degradá-los e utilizá-los como material energético e plástico é muito conhecido. Esse fenômeno foi observado em nossos laboratórios com as enzimas da via oxidativa para a L-fucose e L-rhamnose em *Pullularia pullulans* (Rigo *et al.*, 1971a e 1971b; Rigo *et al.*, 1973; Guimarães *et al.*, 1978a, 1978b).

Estudos de indução e repressão catabólica da L-rhamnose desidrogenase foram feitos recentemente por Vieira *et al.* (1979).

A L-fucose desidrogenase (FDH) de *Pullularia pullulans* oxida a L-fucose em presença de NAD^+ que funciona como receptor de elétrons; forma-se L-fucono- γ -lactona, que por ser altamente instável em pH alcalino, sofre hidrólise espontânea e origina o ácido correspondente. Semelhantes desidrogenases têm sido descritas em mamíferos, localizando-se preferencialmente no fígado desses animais (Segal & Topper, 1960; Metzger & Wick, 1967; Schachter *et al.*, 1969; Mobley *et al.*, 1970; Endo & Hiyama, 1979). Além dessas, existe uma desidrogenase descrita em procariotes, que é uma D-arabinose de-

sidrogenase inespecífica e constitutiva, que é encontrada em *Pseudomonas sacharophila*. Esta enzima também oxida a L-fucose, porém seu substrato preferencial é a D-arabinose (Hu & Cline, 1964).

A FDH de *P. pullulans*, aqui estudada, difere das demais descritas principalmente quanto a sua especificidade, pois os únicos substratos utilizados pela enzima são L-fucose e L-galactose. Este último com somente 10% da atividade, relacionada com a atividade da L-fucose. É interessante citar o fato de a D-arabinose não ser substrato da enzima, uma vez que é a pentose conformacionalmente relacionada com aqueles substratos. Esta foi a primeira FDH induzível descrita em eucariotes inferiores ou, mais especificamente, em leveduras (Guimarães, 1973).

O crescente interesse no estudo do metabolismo dessa 6-desoxi-hexose e enzimas a ela relacionadas deve-se ao fato de sua ampla distribuição na natureza, principalmente nos animais superiores. Esse açúcar é encontrado em muitas glicoproteínas e glicolipídeos sintetizados por plantas, animais e microorganismos (Percival, 1962; Buddecke, 1966; Spiro, 1973; Mac Kibin *et al.*, 1977), nos oligossacarídeos do leite (Stacey & Barker, 1962; Kobata, 1963), nas substâncias dos grupos sanguíneos humanos (Watkins, 1966), como também nas mucoproteínas do plasma e urina, localizando-se preferencialmente na ponta não redutora da fração carboidrática (Winzler, 1965). Além dessa ocorrência natural, que já seria suficiente para justificar o crescente interesse pelo seu estudo, têm sido observadas variações nos níveis sanguíneos da L-fucose,

tanto na sua forma livre como combinada, em diversos estados patológicos como o câncer cervical (Barbow & Dillaro, 1972), a hepatite epidêmica (Fedyanin *et al.*, 1972) e a diabete (Sirakow, 1971).

Em decorrência desses estudos foram publicados recentemente métodos enzimáticos para dosagem de L-fucose livre em líquidos biológicos ou hidrolisados totais; tais métodos, entretanto, utilizam FDHs relativamente inespecíficas (Hu & Cline, 1968; Finch *et al.*, 1969; Warren, 1975; Yamanaka, 1975; Tsay & Dawson, 1977; Endo & Hiyama, 1980). O uso da FDH de *Pullularia pullulans*, pelo fato de ser altamente específica pelo substrato, apresentaria vantagens sobre as demais. No entanto, a obtenção dessa enzima requer, em seu meio de crescimento, a presença da L-fucose como fonte de carbono. Este procedimento apresenta uma desvantagem que é o alto custo da L-fucose.

Uma das metas deste trabalho foi estabelecer métodos ideais e alternativos para proceder à indução dessa enzima em *Pullularia pullulans*. Através dos mesmos foi obtida FDH em maiores quantidades e de forma bem menos dispendiosa.

MATERIAL E MÉTODOS

.1. MATERIAL

Os açúcares e demais reagentes usados neste trabalho eram de grau analítico de pureza e foram obtidos das melhores fontes comerciais.

2.2. MICROORGANISMO

A cepa de *Pullularia pullulans*, isolada dos frutos de sapoti, foi cedida pelo Instituto Zimotécnico, Piracicaba, SP, e mantida nesse laboratório durante quinze anos, em meio sólido, com 1,75% de ágar suplementado com 1% de D-glucose, como também em meio de Sabouraud-glucose.

A manutenção das cepas foi feita através de repiques periódicos, em intervalos de tempo de aproximadamente 30 dias, com o intuito de evitar o excesso de pigmentação. Após cada repique as células foram mantidas em aerobiose durante cerca de 48 horas, a 28°C, e estocadas em geladeira.

2.3. MÉTODO DE CULTIVO

As culturas, em meio mineral líquido, seguiram o seguinte procedimento geral: ao tubo de ensaio contendo a cepa, em meio sólido, foram adicionados de 2 a 5 ml de meio líquido. O tubo foi submetido a uma agitação suave para que as células ficassem em suspensão, sendo em seguida transferidas para um Erlenmeyer de 500 ml contendo de 100 a 200 ml de meio mineral, já com o açúcar utilizado como fonte de carbono, e incubadas aerobicamente, a 28°C, em agitador rotatório (120 rotações por minuto), durante um período de aproximadamente 30 horas. Esta cultura em meio líquido foi considerada como um pré-inóculo. Para culturas em maior escala, deste pré-inóculo foram retiradas alíquotas de 20 ml, as quais foram transferidas para frascos de 2 litros contendo 500 ml de meio mineral, já suplementado com a fonte de carbono. Tais frascos foram incubados em condições idênticas às do pré-inóculo. O crescimento da levedura foi acompanhado através da leitura com absorvância em espectrofotômetro do tipo Coleman-Junior, a 660 nm.

Essas células foram coletadas por centrifugação a 5.000 Xg por 10 minutos e a uma temperatura entre 0 e 5°C, em centrífuga refrigerada Sorval RC-5, quando as culturas atingiram uma densidade ótica de 0,50 a 660 nm. Nestas condições as culturas, independentemente do açúcar usado como fonte de carbono, encontraram-se no final da fase exponencial de crescimento.

Todas as operações foram realizadas esterilmente.

2.4. COMPOSIÇÃO DO MEIO MINERAL LÍQUIDO

Esse meio apresenta, por litro, os seguintes elementos: 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, 1,2 g de KH_2PO_4 , 0,14 g de Na_2HPO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,5 g de KCl , 0,5 g de NaCl , 0,1 g de CaCl_2 , 0,0144 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, 0,0088 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, 0,004 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,003 g de CuCl_2 , 0,000064 g de $(\text{NH}_4)_6 \cdot \text{Mo}_7\text{O}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ e 1 g de extrato de levedura. Quando necessário, o pH da mistura era corrigido para 5,6 pela adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio e, posteriormente, esterilizada a 120°C e 1,5 atmosferas de pressão durante 20 minutos. Os açúcares, adicionados assepticamente ao meio, foram esterilizados separadamente, durante 30 minutos em vapor fluente.

O meio sólido foi preparado adicionando-se ao meio líquido 1,75% de ágar e 1% de açúcar, usualmente a glucose, que foi usada como fonte de carbono. Esta mistura foi fervida por 15 minutos em banho-maria e, posteriormente, transferida, geralmente na quantidade de 10 ml, para tubos de ensaio de 180 x 20 mm, que foram fechados com tampões de algodão e esterilizados da mesma forma que o meio mineral líquido. Os tubos foram inclinados para resfriar e os repiques foram feitos na superfície do meio sólido com a utilização de alças de platina.

2.5. MÉTODO DE INDUÇÃO-PADRÃO

O método de indução-padrão, comumente usado durante os experimentos, foi o seguinte: após a obtenção da cultura em determinado açúcar usado como fonte de carbono e energia, conforme descrito em *método de cultivo*, as células foram coletadas esterilmente por centrifugação a 5.000 X g durante 10 minutos, à temperatura de 0-5°C, em centrífuga refrigerada Sorval RC-5. Após a centrifugação, as células foram lavadas por três vezes em KCl 0,154 M gelado e ressuspensas em tampão fosfato 50 mM pH 6,2, até uma densidade final de células de 70 mg/ml (peso úmido), o que corresponde a uma concentração em torno de 10 vezes à da cultura original. A essa suspensão foi adicionado o indutor (L-fucose) a uma concentração variável, conforme indicado no texto. Posteriormente a suspensão foi incubada aerobicamente a 28°C, em agitador rotatório (120 rpm), durante períodos variáveis de tempo.

Nessas condições não foi detectado crescimento nem autólise das células.

2.6. PREPARAÇÃO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

A obtenção de extrato livre de células obedeceu a um dos seguintes procedimentos: em um tubo de ensaio de 10 X 100 mm, contendo aproximadamente 200 mg de células (peso úmido), são colocadas cerca de 400 mg de esferas de vidro de 450

a 500 micra (Sigma Chemical Co.), e 1 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 6,2. A seguir o material é agitado vigorosamente em aparelho vibrador tipo "Vortex" durante 3 minutos com dois intervalos de resfriamento em banho de gelo.

A fração líquida desta mistura é coletada com uma pipeta Pasteur e centrifugada a 12.000 X g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante é o extrato livre de células e contém a enzima.

Este método foi adaptado a partir do descrito por Funayama *et al.* (1980), com base nos resultados apresentados na figura 1.

Quando a quantidade de células era superior a 200 mg o extrato foi preparado fazendo-se a maceração das células em gral de porcelana, com esferas de vidro. Para isto as células são colocadas no gral e adiciona-se uma quantidade de microesferas de vidro três vezes superior; este material é macerado vigorosamente. A maceração deve ser feita com o gral sobre uma cuba de gelo, a fim de evitar que a temperatura seja superior a 5°C. A extração da enzima é feita com tampão fosfato 50 mM, pH 6,2, na proporção de três mililitros para cada grama de células. Este material é centrifugado em centrífuga refrigerada entre 0 e 5°C a 12.000 X g durante 10 minutos. O sobrenadante é o extrato livre de células e contém a enzima.

A fim de equalizar a quantidade de proteína total e a atividade enzimática nos dois métodos, foram feitas variações na relação células:microesferas:tampão, e para isto foi usada a gliceraldeído 3-P-desidrogenase como enzima de referência.

2.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

Nos extratos livres de células foram espectrofotometricamente medidas tanto a concentração de proteínas como também a atividade da FDH. A primeira, pelo método de Warburg e Christian (1941) e a segunda, através da redução do NAD^+ em comprimento de onda de 340 nm, durante 3 minutos. Para essas leituras foi usado um espectrofotômetro termostaticado, 30°C , marca Varian, modelo 635 D, com registrador acoplado.

O sistema de reação usado para medir a atividade enzimática continha, por mililitro, o seguinte: 10 micromoles de L-fucose, 1 micromol de NAD^+ , 68 micromoles de tampão glicina-NaOH, pH 9,5, e 50 a 100 microlitros de extrato livre de células (400 a 800 microgramas de proteína). A reação foi iniciada com a adição de L-fucose.

A atividade endógena para desidrogenases em geral era avaliada não se adicionando L-fucose na mistura de reação ou era eliminada através de diálise por uma noite, contra 2 litros de tampão fosfato 50 mM, pH 6,2, com agitação constante, a uma temperatura entre 0 e 5°C . Este procedimento eliminou os substratos das desidrogenases em geral, incluindo a L-fucose e não alterou a atividade da L-fucose desidrogenase.

Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de catalisar a redução de 1 micromol de NAD^+ por minuto nas condições indicadas, e a atividade enzimática foi medida através da variação da absorvância por minuto a 340 nm; foi usado o valor de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o coeficiente de absorção molar do NADH, no comprimento de onda utilizado (Horecker & Kornberg, 1948).

3. RESULTADOS

3.1. EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE O CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Pullularia pullulans*

O efeito de diferentes monossacarídeos utilizados como fonte de carbono e energia, sobre o crescimento, está mostrado na figura 2, onde se pode observar que ocorrem variações sensíveis tanto na "lag" fase como no tempo de geração das células em função da utilização dos diferentes açúcares.

Os tempos de geração calculados para essas culturas, a partir de suas curvas de crescimento, na forma logarítmica, foram os seguintes: D-xilose, 5 horas, D-glucose, 6 horas, L-arabinose, 6 horas, glicerol, 8,30 horas, D-arabinose, 10 horas, D-galactose, 11 horas e L-fucose, 17 horas. A utilização de culturas previamente adaptadas ao consumo dos respectivos açúcares através de sucessivos repiques em meio sólido, por um período de aproximadamente 30 dias, não alterou os respectivos tempos de geração, porém a "lag" fase foi menor nas culturas crescidas em D-arabinose e L-fucose. Pode-se observar que nas culturas crescidas em açúcares que são comumente encontrados no habitat natural da levedura como a D-glucose e a D-xilose — os quais são encontrados em sua forma livre ou como monômeros de polissacarídeos — ocorreram períodos de "lag" e também tempos de geração menores, se comparados com

as culturas onde foram utilizados como fonte de carbono açúcares menos comuns à levedura no seu habitat natural. Esses resultados indicam que a levedura conservou as enzimas constitutivas necessárias à metabolização destes açúcares.

Quando as células são crescidas utilizando como fonte de carbono L-arabinose ou D-galactose, antes de atingirem a fase estacionária de crescimento ocorre um fenômeno semelhante à floculação; elas adquirem uma forma filamentosa de difícil sedimentação por centrifugação.

3.2. EFEITO DE DIFERENTES AÇÚCARES SOBRE A ATIVIDADE DA FDH

Utilizando células crescidas em diferentes fontes de carbono, nas condições de crescimento já descritas anteriormente, foram feitas medidas da atividade para FDH. Como pode ser observado na Tabela I, apenas a cultura crescida em presença de L-fucose como fonte de carbono e energia apresentou atividade elevada para a FDH. Tais resultados indicam ter ocorrido uma indução específica dessa enzima, visto que nem mesmo a D-arabinose, que é a pentose conformacionalmente relacionada com a L-fucose, levou ao aparecimento da enzima. Possivelmente essa pentose seja metabolizada por uma via degradativa diferente daquela induzida na levedura pela L-fucose. A L-galactose, seu outro substrato, não foi testada como indutor tanto durante o crescimento, como em células em repouso, por não ser disponível em quantidades suficientes.

Possivelmente deveria ter ocorrido indução com a sua utilização. Não foi dada grande atenção ao processo de indução com as células em crescimento, devido ao fato de este processo acarretar grande consumo do indutor, que no caso é um açúcar de elevado custo, a L-fucose.

A tabela I mostra também os resultados obtidos quando a enzima é induzida com as células em condição de repouso, ou seja, condição de não crescimento. Para tal, a massa de células foi conseguida efetuando-se o crescimento conforme as condições-padrão de crescimento já descritas, sendo utilizados como fontes de carbono os açúcares indicados na referida tabela, na concentração de 1%; depois foi procedida a indução, utilizando-se o sistema-padrão de indução para as células em repouso, já descrito em *material e métodos*. Foi utilizado 0,5% de L-fucose e a indução foi realizada conforme previamente estabelecido, por um período de 16 horas (Fig. 3).

Os resultados expressos na tabela I mostram que D-arabinose e glicerol são as fontes de carbono que mais favorecem a indução posterior da FDH. Nos experimentos subsequentes foi utilizado o glicerol, que, além de não interferir na indução posterior da referida enzima, proporciona um crescimento rápido e é um produto de baixo custo.

Observou-se que quando as células são induzidas durante o crescimento através da utilização de L-fucose como fonte de carbono e posteriormente são submetidas a um novo período de indução em condição de repouso, estas apresentam um aumento nos níveis de FDH de aproximadamente 100% se comparadas com aquelas onde se procede à indução em crescimento. Este fato se deve certamente à baixa concentração de L-fuco-

se existente no meio, no final do período de crescimento, o que não ocorre quando a indução se realiza com as células em condições de não crescimento, pois, como foi verificado, não há consumo da mesma.

3.3. CINÉTICA DA INDUÇÃO DA FDH

O efeito da concentração de L-fucose sobre a indução da FDH em células de *Pullularia pullulans*, com as mesmas em estado de repouso, é mostrado nas figuras 3 e 4.

Pode-se observar que a concentração do açúcar indutor no meio altera sensivelmente tanto a velocidade com que a enzima é induzida, como também o nível máximo de enzima obtido. Máximos níveis de FDH são obtidos em torno de 16 horas de indução, dependendo da concentração do indutor. Após este período de indução passa a ocorrer uma queda na atividade da enzima. Esta queda na atividade não é devida ao consumo do indutor, pois a adição de mais L-fucose ao meio não reverte o processo. Se as células são transferidas após este período para o meio de crescimento, voltam a crescer, comprovando a viabilidade das mesmas.

A velocidade de indução também é afetada de maneira semelhante, como se pode observar na figura 4. O aumento da concentração de L-fucose no meio afeta a velocidade de indução da enzima de modo muito semelhante a uma curva de saturação do sítio ativo de uma enzima pelo seu substrato, resultando graficamente numa curva do tipo Michaelis-Menten. Máxima velocidade de indução é obtida quando a concentração de L-fucose é maior que 1%.

3.4. EFEITO DA DENSIDADE DE CÉLULAS SOBRE A INDUÇÃO DA FDH

A tabela II mostra a variação na atividade da FDH em função da variação na quantidade de células no meio de indução, sendo mantidas as outras condições de indução segundo o sistema-padrão descrito anteriormente.

Assumindo um volume fixo para todas as culturas, a quantidade de indutor utilizada em cada uma foi constante.

Assim, analisando o tempo de indução, as culturas com densidade de células superior a 70 mg por mililitro foram favorecidas, porém com prejuízo na atividade enzimática; por isto foram descartadas.

Analisando as culturas com 70 e 35 mg de células por mililitro, os tempos de indução são idênticos e não ocorre diferença significativa na atividade específica da FDH; porém como a produção de proteína total é maior no primeiro caso, esta foi a concentração adotada.

3.5. INIBIÇÃO DA INDUÇÃO DA FDH POR CICLOEXIMIDA

A adição de cicloeximida, que é um inibidor da síntese protéica em eucariotes, no meio de indução com as células em repouso, provocou uma inibição total na indução da FDH. O que pode ser observado na figura 5, indicando que o processo de indução se dá através da síntese "de novo" da enzima.

3.6. REPRESSÃO CATABÓLICA

À exceção de D-arabinose e L-rhamnose, todos os monossacarídeos testados apresentaram um grau apreciável de repressão catabólica, oscilando entre 60 e 20% (tabela III), medido como decréscimo da atividade específica da FDH.

É interessante notar que a disponibilidade natural dos açúcares sem capacidade repressora é bem menos comum que a dos demais açúcares testados.

Em harmonia com o conceito de repressão catabólica (antigamente, "efeito de glucose") como um evento determinado pela disponibilidade de uma fonte de energia que o organismo possa dissimilar com facilidade, a D-glucose confirmou-se como o mais potente repressor (60%). Valores de repressão próximos foram apresentados pela D-xilose (54%) e D-galactose (51%), comparados à menor eficiência repressora da L-arabinose (21%). Pelo menos para D-glucose e D-xilose a rápida metabolização estaria garantida pela duplicidade de vias metabólicas dissimilatórias para cada açúcar (v. introdução, p.ex., via glicolítica e 6-fosfo-gluconato). A condição repressora comum poderia decorrer do fato de estes configômeros todos comporem, de maior a menor porcentagem e sob forma polimérica, a população polissacarídica fundamental do reino vegetal que compõe o "habitat" da levedura: celulose e amido, hemiceluloses (D-xilanos e D-galactomananos) e materiais pécticos (L-arabino-galactanos e L-arabanos).

A eficiência repressora mais pronunciada de D-glucose e D-xilose correlaciona-se bem com os tempos de geração mais curtos propiciados por estes açúcares (na ordem de 5 e 6 ho-

ras), embora a D-galactose se afaste desta situação (11 horas de tempo de geração). Para a L-arabinose (baixa capacidade repressora, mas curto tempo de geração — 6 horas) talvez fosse pertinente o comentário da metabolização por ingresso, mediante epimerização, na via geral degradativa de pentoses (xilulose-5-fosfato).

Quanto ao glicerol, um tri-álcool quimicamente pouco relacionado às hexoses e pentoses antes mencionadas, constatarem-se valores medianos de tempo de geração (8,5 horas) e de repressão (47%). Dado que para todos os repressores testados se utilizou sempre um pré-cultivo comum desenvolvido com glicerol, a retomada nesta mesma fonte de carbono (não obstante a presença equivalente do indutor L-fucose) configura, num tempo curto, uma condição semelhante à longamente estabelecida pelo microorganismo em relação à glucose. Isto poderia então explicar o efeito repressor médio do glicerol. Dado ainda que o pré-crescimento nesta fonte simples e barata de carbono favorece sobremaneira o processo posterior de indução da FDH pelo seu substrato-indutor em condições de não crescimento e nem consumo de açúcar, tomou-se esta circunstância como base experimental para uma alternativa das econômicas para a produção da FDH.

TABELA I. Efeito de diferentes açúcares sobre a atividade da L-fucose desidrogenase de *Pullularia pullulans*.

AÇÚCAR	ATIVIDADE ESPECÍFICA		RELAÇÃO DE INDUÇÃO (%)
	Indução em Crescimento	Indução após Crescimento	
L-fucose	20,69	46,60	100
D-arabinose	3,80	27,60	59
Glicerol	3,20	25,00	53
D-xilose	2,80	9,40	20
L-arabinose	1,20	8,40	18
D-glucose	2,60	7,80	16

As culturas foram feitas segundo as condições-padrão, descritas em *material e métodos*, em presença de 1% do açúcar indicado. As culturas continham 500 ml e foram coletadas quando atingiram uma densidade ótica de 0,5 a 660 nm (fase exponencial de crescimento). Indução em repouso também foi realizada segundo as condições-padrão, durante 16 horas e em presença de 0,5% de L-fucose como indutor específico. O extrato livre de células em ambas as preparações foi obtido utilizando-se o sistema de rompimento em gral. A atividade da enzima foi medida como o descrito, sendo a atividade específica expressa em miliunidades de enzima por miligrama de proteína.

TABELA II. Efeito da concentração de células sobre a indução da L-fucose desidrogenase de *Pullularia pullulans*.

CÉLULAS mg/ml	ATIVIDADE ESPECÍFICA FDH	TEMPO DE INDUÇÃO MÁXIMA
35	26	16
70	25	16
100	16	13
140	4	3

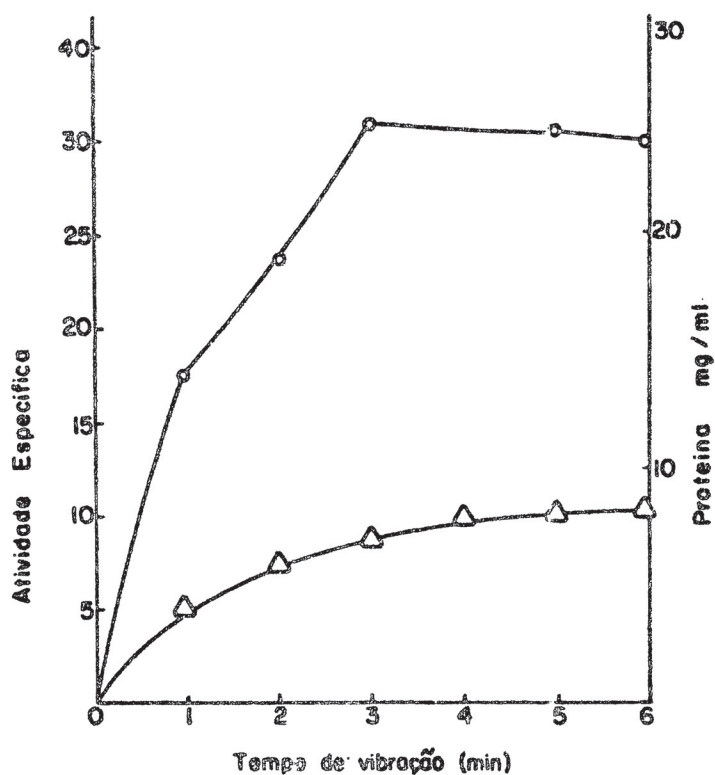
O crescimento das células foi realizado utilizando-se o sistema-padrão de crescimento, com 0,5% de glicerol como fonte de carbono; foram então suspensas em tampão fosfato 50 mM pH 6,2, com 0,5% de L-fucose, e distribuídas em diferentes quantidades por mililitro de meio, conforme o indicado na tabela. Os tempos de indução mostrados na tabela são aqueles em que se conseguiu o máximo de indução, e a atividade está expressa em miliunidades de enzima por miligrama de proteína.

TABELA III. Inibição da indução da L-fucose desidrogenase por monossacarídeos.

AÇÚCAR	ATIVIDADE ESPECÍFICA mU E/mg proteína	REPRESSÃO %
L-fucose	24,98	0
D-glucose	9,23	62,80
D-xilose	11,48	54,05
D-galactose	12,24	51,01
Glicerol	13,09	46,60
L-arabinose	19,82	20,66
D-arabinose	26,44	0
L-rhamnose	25,42	0

A massa de células foi obtida através de um pré-crescimento em glicerol 1% e a indução foi feita como o descrito em *material e métodos*, exceto que foi adicionado ao meio de indução, além de 0,5% de L-fucose, um dos açúcares indicados na tabela, na mesma concentração do indutor. Os valores de atividade específica mostrados na tabela foram obtidos após 16 horas de indução.

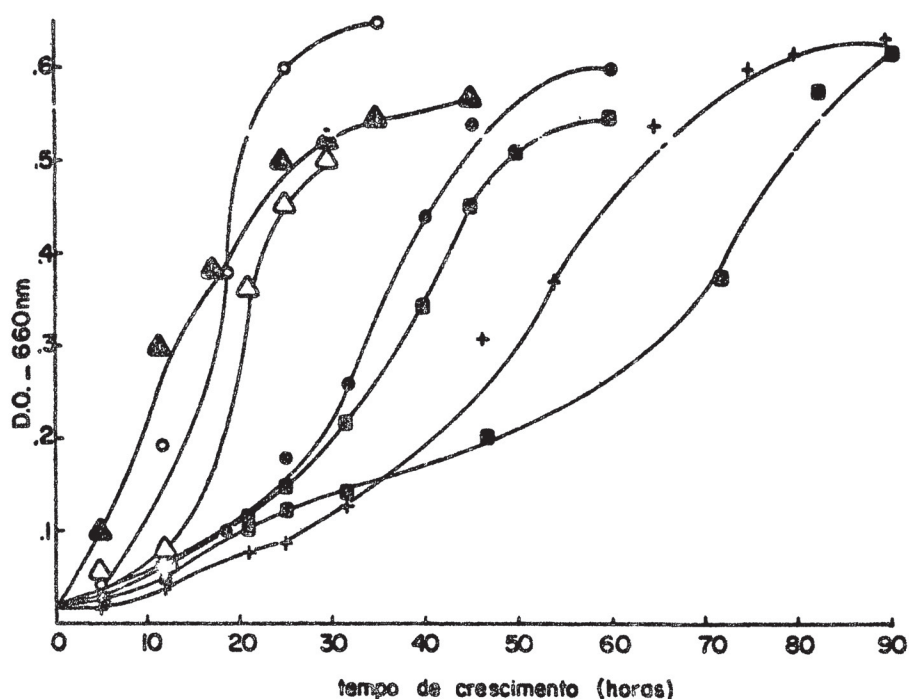
Figura 1: Extração da L-FUCOSE DESIDROGENASE de células de Pullularia Pullulana pelo método da vibração.



A massa de células foi obtida através de um pré-crescimento em glicerol, e induzidas, em estado de repouso, com L-fucose; os extratos foram preparados conforme o método de Funayama (1980) já descrito, com as respectivas modificações. ○—○ atividade específica, expressa em miliunidades de enzima por miligrama de proteína; △—△ miligramas de proteína (ml).

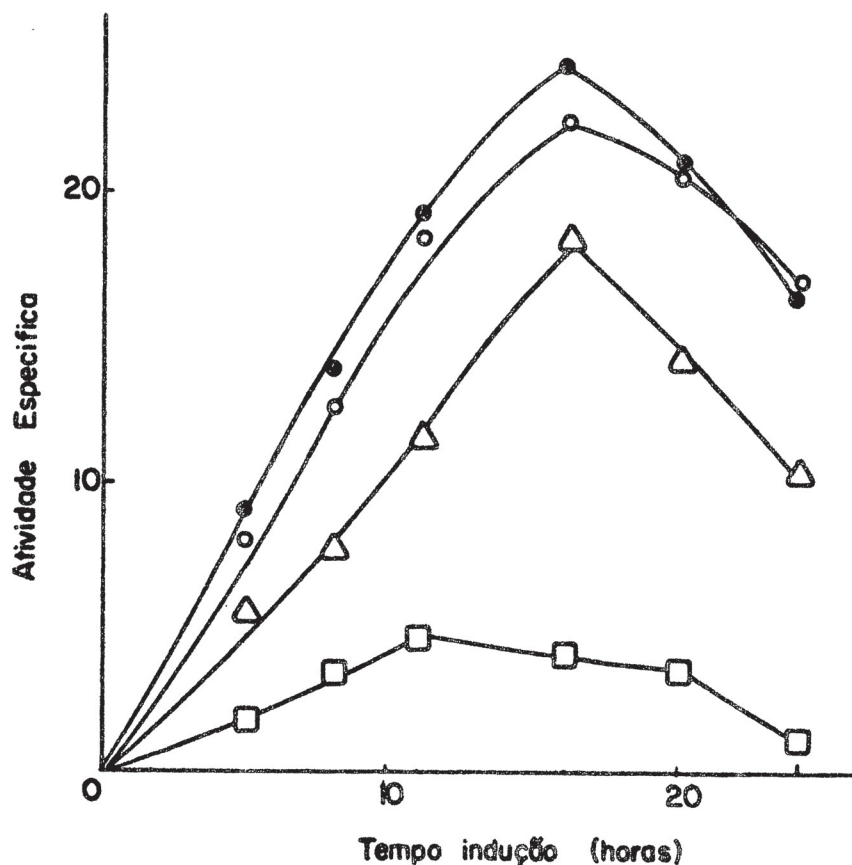
Figura 2.

Curva de crescimento de *Pullularia Pullularis* em presença de diferentes açúcares.



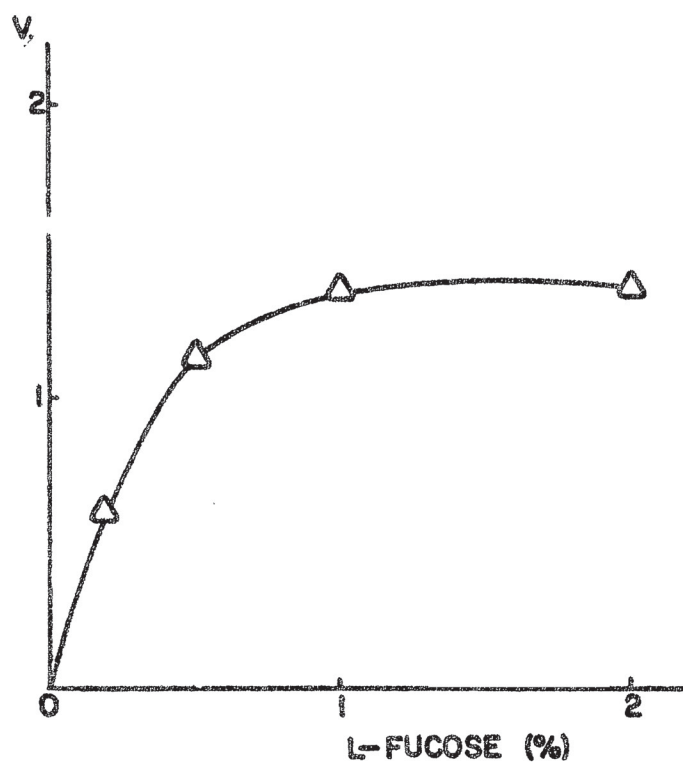
O crescimento das células foi realizado conforme o sistema-padrão já descrito, utilizando-se frascos Erlenmeyer de 2 litros, com 500 ml de meio. O meio foi suplementado com 1% de: ○-○ D-xilose, ▲-▲ D-glucose, △-△ L-arabinose, ●-● glicerol, ◻-◻ D-arabinose; +-+ D-galactose, ■-■ L-fucose, como única fonte de carbono. Foram retiradas alíquotas de 3 ml para proceder-se à leitura da densidade ótica, que foi realizada a 660 nm em espectrofotômetro Coleman Júnior.

Figura 3. Efeito da concentração de L-FUCOSE sobre a indução da L-FUCOSE DESIDROGENASE.



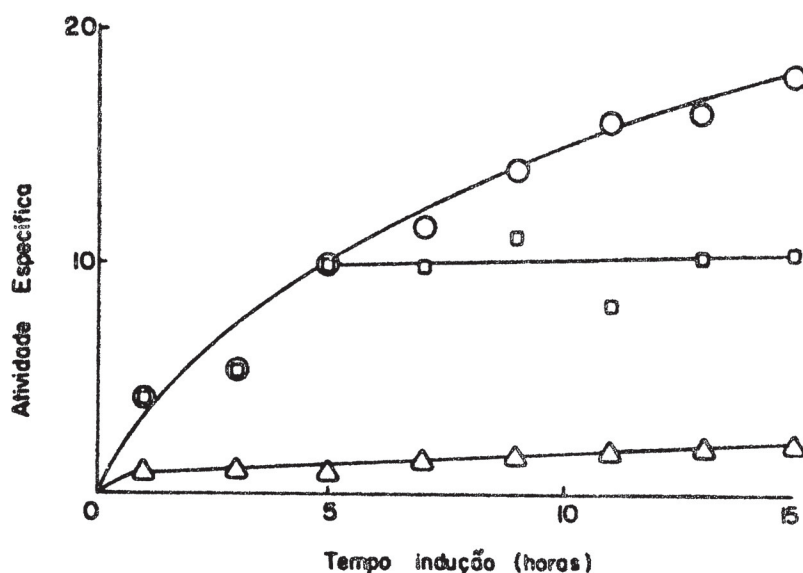
A massa de células foi obtida pelo sistema-padrão de crescimento, usando-se glicerol como fonte de carbono e energia; foram induzidas em repouso conforme sistema descrito em *material e métodos* e usaram-se: □-□ 0,2% de L-fucose, △-△ 0,5% de L-fucose, ○-○ 1% de L-fucose, ●-● 2% de L-fucose. A atividade específica está expressa em miliunidades de enzima por miligrama de proteína.

Figura 4. Efeito da concentração de L-FUCOSE sobre a velocidade de indução da L-FUCOSE DESIDROGENASE.



dições foram as mesmas descritas na figura 3, sendo os valores de velocidade de indução (v) calculados pela tangente às curvas de variação da atividade em função do tempo de indução (somente na faixa entre 0 e 16 horas de indução). A velocidade de indução está expressa em miliunidades de enzima por hora.

Figura 5. Inibição da indução da L-FUCOSE DESIDROGENASE por cicloeximida.



A massa de células foi obtida pelo sistema-padrão de crescimento com 1% de glicerol como fonte de carbono. A indução foi realizada em condição de repouso conforme sistema-padrão descrito em *material e métodos*, com a adição de 10 μ g/ml de cicloeximida em diferentes tempos. ○-○ controle, □-□ adição de cicloeximida após cinco horas de indução, △-△ adição de cicloeximida no início da indução. A atividade específica está expressa em miliunidades de enzima por miligrama de proteína.

4. DISCUSSÃO

Estudos anteriores sobre a FDH de *Pullularia pullulans* mostraram que esta é uma enzima induzível, uma vez que a mesma só era encontrada nessa levedura quando esta crescia em um meio que continha L-fucose, que é o seu substrato, como única fonte de carbono e energia (Rigo *et al.*, 1971a, 1971b; Rigo *et al.*, 1973; Guimarães, 1973; Guimarães *et al.*, 1978a e 1978b). Além disto, quando cepas desta levedura adaptadas ao consumo desta 6-desoxi-aldose eram transferidas para um meio cuja única fonte de carbono fosse outro açúcar — como D-glucose ou D-galactose — estas cepas perdiam a atividade enzimática para a FDH, evidenciando deste modo que não se tratava de uma enzima constitutiva.

Neste trabalho estão descritas as condições para que se proceda à indução da FDH, bem como a capacidade de a levedura crescer utilizando-se diferentes monossacarídeos como fonte de carbono e energia e sua implicação na indução posterior da referida enzima.

Como a L-fucose é um açúcar de elevado custo comercial, a sua utilização como única fonte de carbono e energia durante o crescimento da levedura para a obtenção da FDH torna-se quase proibitiva. Neste sentido, buscaram-se aqui maneiras alternativas de obter a referida enzima com um máximo de economia, e para tal tentou-se encontrar outros indutores

de menor custo, além de procurar determinar a concentração ótima para obtenção do máximo de enzimas com o menor consumo possível de indutor. Assim, chegou-se finalmente à conclusão de que a maneira mais econômica de obter a enzima seria através da obtenção de uma massa de células através de um pré-crescimento em presença de outros açúcares como fonte de carbono e energia e, posteriormente, induzindo essas células para a síntese da FDH em condição de repouso e em presença de L-fucose como indutor.

Dado o meio de indução (apenas tampão-fosfato diluído) e o não consumo significativo do indutor, a L-fucose pode ser facilmente recuperada por expediente de troca iônica seguido de cristalização e/ou liofilização.

Ainda visando o máximo de economia, procurou-se trabalhar sempre com quantidades mínimas de células. Para isso, o método usualmente empregado para a obtenção do extrato livre de células, isto é, através da maceração das células em gral com microesferas, não apresentando bons resultados devido à dificuldade de recuperação da enzima, foi substituído por um alternativo. Assim, tentou-se usar o método descrito por Funayama *et al.* (1980) para a obtenção de extrato livre de células de *Saccharomyces cerevisiae*, o qual permite obter extrato livre de células partindo de pequenas quantidades de células — aproximadamente 100 a 200 mg. Esse método com as citadas modificações mostrou-se eficiente também para romper a parede celular de *Pullularia pullulans*, salvo duas restrições: 1) se mantidas as proporções descritas, o método é ineficaz quando a quantidade de células for superior a 200 mg; 2) uma vez que a cultura atinja a fase estacionária de crescimento,

esse sistema não rompe eficientemente a parede das células; este fato provavelmente se deve a alguma alteração existente na composição da parede celular, que a torna mais resistente ao rompimento nesta fase.

Também a própria natureza da fonte de carbono influencia diretamente as dimensões e arquitetura da parede celular (Cury, 1974).

Nos experimentos de crescimento da levedura ficou evidenciado que existem diferenças na capacidade de utilização dos diferentes monossacarídeos quando utilizados como única fonte de carbono e energia. Os resultados obtidos nesses experimentos, de certa forma, já eram esperados, pois, segundo demonstraram Clark & Wallace (1958a e 1958b), a levedura em questão apresenta enzimas constitutivas para a degradação de alguns monossacarídeos, enzimas tais como as da via glicolítica de Embden-Meyerhof e da via das pentoses-fosfato. Assim, espera-se que monossacarídeos cujas vias de degradação são constitutivas como as citadas sejam metabolizados muito mais rapidamente que aqueles cuja metabolização exige a indução das enzimas para posteriormente degradar o referido açúcar. Também era esperado o resultado apresentado quando da utilização de D-glucose, pois, segundo Magasanik *et al.* (1959), a utilização deste monossacarídeo como fonte de carbono e energia pela maioria dos microorganismos incorre em um tempo de crescimento mais reduzido do que com a utilização da maioria dos monossacarídeos conhecidos. Este fato se fundamenta provavelmente na existência de duas vias simultâneas e distintas para metabolizar este açúcar, sendo uma constitutiva, que é a via glicolítica de Embden-Meyerhof, e a segunda uma

via induzível, que é a do óxido glucônico. Neste trabalho verificou-se que a D-xilose, quando empregada nas mesmas condições, apresenta um tempo de geração semelhante ao obtido com a utilização da D-glucose, e podemos sugerir uma explicação semelhante ao fenômeno, pois esta pentose, quando é utilizada como única fonte de carbono e energia pela levedura *Pullularia pullulans*, segundo Kesling *et al.* (1962), produz simultaneamente xilitol e ácido xilônico, sugerindo assim que existem pelo menos duas vias metabólicas simultâneas e distintas para a degradação deste açúcar: uma através da conversão da xilose a xilulose via xilitol, e a outra através da oxidação da D-xilose a ácido D-xilônico ou (D-xilonolactona). Mais recentemente, Sugai & Veiga (1981) comprovaram a presença de uma xilitol desidrogenase em *Pullularia pullulans* quando seu crescimento se dava em presença de D-xilose como única fonte de carbono e energia.

Um fato que merece certa atenção é que utilizando a L-fucose como única fonte de carbono e energia para o crescimento da levedura, mesmo quando utilizadas cepas adaptadas durante anos ao consumo deste açúcar, o tempo de duração é pelo menos duas vezes maior que quando utilizado para tal outro açúcar para o qual a levedura tenha enzimas constitutivas para degradar, mantendo todas as condições idênticas. Nas mesmas condições de crescimento, porém, segundo Vieira *et al.* (1979), com L-rhamnose como fonte de carbono, uma 6-desoxi-hexose — que como a L-fucose é um açúcar raro na sua forma livre na natureza e também é metabolizado por uma via enzimática induzível semelhante (Guimarães *et al.*, 1978a) — apresenta um tempo de geração idêntico ao apresentado pela

D-glucose. E, ainda, quando testada a sua capacidade como repressor, a rhamnose mostrou-se indiferente. E, no entanto, como pode ser observado pela tabela III, aqueles açúcares que se mostraram mais eficientes para o crescimento foram os mais eficientes em produzir repressão catabólica. Esta diferença na capacidade de utilização desta 6-desoxi-hexose leva a supor a necessidade de um outro fator de crescimento dentro das condições utilizadas, ou mesmo dificuldades inerentes das reações de transformação deste em outros compostos necessários à assimilação e incorporação da cadeia carbonada da L-fucose como material plástico ou de reserva para a célula.

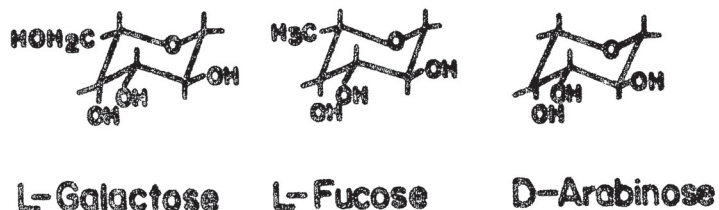
Neste trabalho ficou demonstrado que a FDH em *Pullularia pullulans* pode ser induzida de pelo menos duas maneiras: 1) realizando um crescimento e indução simultâneos e utilizando a L-fucose como única fonte de carbono e energia, e 2) realizando um pré-crescimento com a finalidade de obter uma massa de células, utilizando para tal um outro açúcar que não a L-fucose como fonte de carbono e energia e posteriormente realizando a indução com as células em condição de não crescimento, em presença de L-fucose como indutor. Não foi dada maior atenção ao processo de indução e crescimento simultâneos, utilizando L-fucose como única fonte de carbono e energia porque: 1) trata-se de um processo que consome grandes quantidades de indutor, que é um açúcar de elevado custo comercial, e 2) este processo é mais lento que a indução da enzima com as células em repouso; isto se deve a que o crescimento da levedura nas condições descritas com L-fucose como única fonte de carbono e energia acarreta um tempo de geração muito maior que quando são utilizados outros açúcares.

Em vista do exposto neste trabalho, foram desenvolvidas técnicas de indução com as células em condição de repouso, com as quais se obtêm níveis até mesmo superiores aos da indução em crescimento, com grande economia de L-fucose e em menos tempo.

No processo de indução com as células em repouso deve ser dada atenção especial ao açúcar que é utilizado no pré-crescimento como fonte de carbono e energia para a obtenção da massa de células, pois alguns açúcares interferem no processo de indução posterior, conforme pode ser observado na tabela I. Também a utilização de L-fucose simultaneamente com outro açúcar durante o crescimento -- condição em que deveria ocorrer um consumo diauxico do outro açúcar -- não apresentou bons resultados, pois a quantidade de L-fucose necessária à obtenção de níveis de enzima satisfatórios torna o processo tão dispendioso quanto aquele onde é utilizada apenas a L-fucose.

A L-fucose, dentre os açúcares testados, mostrou ser o único capaz de induzir significativamente a FDH (tabela I). Geralmente todos os substratos de uma enzima também se comportam como indutores. Assim, supõe-se ser a L-galactose, o outro substrato, também um indutor da FDH; porém, por não dispormos do mesmo em quantidades suficientes, não pudemos testá-lo como indutor. Por outro lado, na maioria dos processos de indução enzimática, análogos estruturais dos substratos, que normalmente não são metabolizados, também atuam como indutores. São os chamados indutores "gratuitos". Deste modo, poder-se-ia esperar que a D-arabinose atuasse como indutor da FDH, uma vez que se trata da pentose homóloga de ambos os subs-

tratos L-fucose e L-galactose, diferindo destes apenas pela ausência do carbono seis, como pode ser observado nas projeções estruturais abaixo.



No entanto, como se pode observar pelas tabelas I e III, a D-arabinose, além de não servir como substrato para a enzima, pois deve ser metabolizada por uma via diferente que não envolve esta FDH, tampouco atua como indutor efetivo ou como repressor. Assim, a FDH de *Pullularia pullulans* mostrou no processo de indução também um comportamento especial, como ocorre com a sua especificidade pelo substrato — todas as outras desidrogenases para a L-fucose descritas também são ativas com D-arabinose como substrato (Segal & Topper, 1960; Metzger & Wick, 1967; Schachter *et al.*, 1969; Mobley *et al.*, 1970; Endo & Hiyama, 1979. Ao carbono seis equatorialmente orientado de ambas L-fucose e L-galactose foi atribuído o papel principal determinante estereoespecífico da sua atividade (Guimarães, 1973), podendo-se supor o mesmo com relação ao processo de indução.

Embora não tenham sido feitas tentativas para caracterizar as demais enzimas envolvidas na degradação de L-fucose, parece claro que a via para a sua degradação é semelhante à da L-rhamnose, e também seqüencialmente induzida (Rigo *et al.*, 1981).

5. CONCLUSÕES

1. A L-fucose desidrogenase (FDH) de *Aureobasidium (Pullularia) pullulans* pode ser induzida tanto com as células em crescimento como em condição de repouso com L-fucose como única fonte de carbono e também indutor.

2. O glicerol, por ser uma fonte de carbono abundante e por não interferir no processo de indução, foi a fonte escolhida para realizar o pré-crescimento das células. Esta circunstância combinada com o não consumo de L-fucose durante o processo de indução corresponde a uma variante das mais econômicas para a obtenção da FDH.

3. A L-fucose é o indutor específico da FDH de *Pullularia pullulans*. D-arabinose, que é a pentose estruturalmente relacionada com este açúcar, não atuou como indutor nem como repressor.

4. Alguns monossacarídeos e também o glicerol exercem repressão catabólica, que está relacionada com a capacidade da levedura de utilizar estes compostos como fontes de carbono e energia durante o crescimento. Máxima repressão foi observada com a utilização de D-glucose.

5. Máximos níveis da enzima são obtidos após 16 horas de indução com as células em estado de repouso e utilizando 1% de L-fucose como indutor. Também com esta concentração de indutor se obtém a velocidade máxima de indução.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOW, J.J. & DILLARO, P.H. Serum protein-bound fucose in patients with gynecologic cancers. *Obstet.Gynecol.*, 39(5): 727-734, 1972.
- BUDDECKE, E. Miscellaneous glycoproteins. In: GOTTSCALK, A., ed. *Glycoproteins*. New York, Elsevier Publishing Co., 1966. v.5, p.558-569.
- CLARK, D.S. & WALLACE, R.H. Carbohydrate metabolism of *Pullularia pullulans*. *Can.J.Microbiol.*, 4:43-54, 1958a.
- CLARK, D.S. & WALLACE, R.H. Oxidation of compounds in the Krebs cycle by *Pullularia pullulans*. *Can.J.Microbiol.*, 4: 125-139, 1958b.
- CURY, A.J. *Constituintes da parede celular de Picnoporus cinnabarinus em função das condições de cultivo. Tese de Mestrado. Curitiba, 1974. 40 p.*
- ENDO, M. & HIYAMA, N. Isolation and characterization of L-fucose dehydrogenase from rabbit liver. *J.Biochem.*, 86(5): 1559-1565, 1979.
- ENDO, M. & HIYAMA, N. Enzymic determination of urinary free L-fucose. *Clin.chim.Acta*, 103(3):269-276, 1980.
- FEDYANIN, P.Y.; RABINOVICH, P.D. & VAISTUKER, S.L. Fucose balance associated with biopolymers in patients with epidemic hepatitis. *Ter.Arkh.*, 44(5):44-47, 1972.
- FINCH, P.R.; YUEN, R.; SCHACHTER, H. & MOSCARELLO, M.A. Enzymic methods for the micro assay of D-mannose, D-glucose, D-galactose, and L-fucose from acid hydrolyzates of glycoproteins. *Anal.Biochem.*, 31:296-305, 1969.
- FUNAYAMA, S.; GANCEDO, J.M. & GANCEDO, C. Turnover of yeast fructose - Biphosphatase in different metabolic conditions. *Eur.J.Biochem.*, 109:61-66, 1980.
- GUIMARÃES, M.F. *Purificação e propriedades da L-fucose desidrogenase de Pullularia pullulans. Curitiba, 1973. 52 p. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná.*
- GUIMARÃES, M.F.; RIGO, L.U.; VIEIRA, M.M.; MARECHAL, L.R.; NAKANO, M.; SOUZA, N.J.M. & VEIGA, L.G. Metabolismo de 6-desoxihexoses em *Pullularia pullulans*. *Arq.Biol.Tecnol.*, 21:57-66, 1978a.

- GUIMARÃES, M.F.; RIGO, L.U. & VEIGA, L.A. Metabolism of 6-deoxyhexoses in *Pullularia pullulans*. In: BACILA, M.; HORECKER, B.L. & STOPPANI, A.O.M. eds. *Biochemistry and genetics of yeasts*. Academic Press, New York, 1978b. p.161-169.
- HORECKER, B.L. & KORNBERG, A. The extinction coefficients of the reduced bond of pyridine nucleotides. *J.Biol.Chem.*, 175:385-390, 1948.
- HU, A.S.L. & CLINE, A.L. The regulation of some sugar dehydrogenases in a *pseudomonas*. *Biochem.Biophys.Acta*, 93:237-245, 1964.
- HU, A.S.L. & GRANT, S. Enzymic determination of D-galactose, D-arabinose and their homologs. *Anal.Biochem.*, 25:221-227, 1968.
- KIESSLING, H.; LINDBERG, B. & MAC KAY, J. Some products of the metabolism of D-xylose by *Pullularia pullulans*. *Acta Chem.Scand.*, 16(18):1958-1962, 1962.
- KOBATA, A. The acid-soluble nucleotides of milk. II. Isolation and identification of two novel uridine nucleotide oligosaccharide conjugates from human milk and colostrum. *J. Biol.Chem.*, 53(3):167-175, 1963.
- MAGASANIK, B.; MAGASANIK, A.K. & NEIDHART, F.C. Regulation of growth and composition of the bacterial cell. In: WOLSTENHOLME and O'CONNOR, eds. *Regulation of cell metabolism*. Boston, Little, Brown and Company, 1959. p.334-349.
- MAGASANIK, B. Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol.*, 26:249-256, 1961.
- McKIBBIN, J.M.; SMITH, E.L.; MANSSON, J. & LI, Y.T. Characterization of dog small intestinal fucolipids with human blood group A-activity. Differences in dog and human A-active fucolipids. *Biochemistry*, 16(6):1223-1228, 1977.
- METZGER, R.P. & WICK, A.N. Partial purification of rat liver D-arabinose dehydrogenase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 26(6):742-747, 1967.
- MOBLEY, P.W.; METZGER, R.P. & WICK, A.N. NAD-dependent L-fucose dehydrogenase from sheep liver. *Arch.Biochem.Biophys.*, 139:83-86, 1970.
- MONOD, J. & MELVIN, C. La biosynthèse induite des enzymes (adaptation enzymatique). In: NORD, F.F. ed. *Advances in enzymology*. New York, Interscience Publishers Inc., 1952. v.23, p.67-119.
- PAIGEN, K. & WILLIAMS, B. Catabolite repression and other control mechanisms in carbohydrate utilization. *Adv.Microb. Physiol.*, 4:251-324, 1970.
- PERCIVAL, E. 6-Deoxy- α -L-galactose (α -L-fucose). In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM, M.L. eds. *Methods in carbohydrate chemistry*. New York, Academic Press, 1962. v.1, p.195-198.

- RIGO, L.U.; NAKANO, M.; FEINGOLD, D.S. & VEIGA, L.A. Metabolism de L-rhamnose em *Pullularia pullulans*. *Arq.Biol. Tecnol.*, 14(1):63, 1971a.
- RIGO, L.U.; NAKANO, M.; FEINGOLD, D.S. & VEIGA, L.A. Desidrogenase de L-rhamnose em células de *Pullularia pullulans*. In: Vº Congresso Sul-Americano de Microbiologia, 1971b, Punta del Este, Uruguai.
- RIGO, L.U.; VIEIRA, M.M.; MARECHAL, L.R.; VEIGA, L.A. Indução, repressão e propriedades das enzimas da via de degradação de L-rhamnose em *Pullularia pullulans*. *Arq.Biol. Tec.*, 24(1):39, 1981.
- RIGO, L.U.; NAKANO, M.; VEIGA, L.A. & FEINGOLD, D.S. L-rhamnose desidrogenase of *Pullularia pullulans*. *Biochem. Biophys.Acta*, 445:286-293, 1976.
- SCHACHTER, H.; SARNEY, J.; MCGUIRE, E.J. & ROSENMAN, S. Isolation of diphosphopyridine nucleotide - dependent L-fucose dehydrogenase from pork liver. *J.Biol.Chem.*, 244(17):4785-4792, 1969.
- SEGAL, S. & TOPPER, Y.J. On the biosynthesis of L-fucose and L-fucose metabolism in man. *Biochem.Biophys.Acta*, 42:147-151, 1960.
- SIRAKOW, L.M. Serum fucose levels in diabetic patients. *Acta Diabetol.Lat.*, 8(5):949-956, 1971.
- SPIRO, R.G. Glycoproteins. In: Anfinsen, C.B. & EDSALE, J.T., eds. *Advances in protein chemistry*. New York, Academic Press, 1973. v.27, p.349-467.
- STACEY, M. & BARKER, S.A. Milk oligasaccharides. In: *Carbohydrates of living tissues*. London, D. Van Nostrand Co., 1962. p.122-134.
- SUGAI, J.K. & VEIGA, L.A. Purification and properties of the xylitol desidrogenase from *Pullularia pullulans*. *An.Acad. brasil.Ciênc.*, 53(1):183-193, 1981.
- TSAY, C.C. & DAWSON, G. A sensitive spectrophotometric method for detection of L-fucose. *Anal.Biochem.*, 78(2):423-427, 1977.
- VIEIRA, M.M.; RIGO, L.U.; MARECHAL, L.R. & VEIGA, L.A. Induction and catabolite repression of L-rhamnose in *Pullularia pullulans*. *J.Bacteriol.*, 38(1):55-59, 1979.
- WATKINS, W.M. Blood-group specific substances. In: GOTTSCHALK, A., ed. *Glycoproteins*. New York, Elsevier Publishing Co., 1966. v.5, p.462-512.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des garungs ferments enolase. *Biochem.Z.*, 310:384-421, 1941.

- WARREN, L. An assay for free L-fucose in the presence of the bound sugar. *Anal.Biochem.*, 64(2):343-349, 1975.
- WINZLER, R.J. Glycoproteins and glycosaminoglycans in plasma and in some other body fluids. In: Balazs, E.A. & JEANLOZ, R.W., eds. *The amino sugars*. New York, Academic Press, 1965. v.II A, p.337-352.
- YAMANAKA, K. Specific microassay of D-arabinose and L-fucose with D-arabinose (L-fucose) dehydrogenase. *Agric.Biol.Chem.*, 39(11): 2227-2234, 1975.