

RICARDO GENARI

**CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PECTINASES
POR *Klebsiella oxytoca* ISOLADA DE FRUTOS DE CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
DEZEMBRO - 1999

RICARDO GENARI

**CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PECTINASES
POR *Klebsiella oxytoca* ISOLADA DE FRUTOS DE CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 20 de agosto de 1999.

Prof. Jorge Luiz Cavalcante Coelho
(Conselheiro)

Prof^ª Marisa Vieira de Queiroz
(Conselheira)

Prof. Arnaldo Chaer Borges

Dr^ª. Virgínia Maria Chaves Alves

Prof. Daison Olzany Silva
(Orientador)

Aos meus pais, Claudio e Dulcinea.

À minha irmã, Regina.

À minha esposa, Alexandra.

AGRADECIMENTO

À Santíssima Trindade e à Nossa Senhora.

Ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, que possibilitou-me a execução do projeto da tese, o aprofundamento nos conhecimentos científicos, a realização de trabalhos em grupos e a resolução de experimentos laboratoriais; o desempenho de atividades de monitoria e o ministério de aulas práticas da disciplina Microbiologia Geral, com a utilização dos mais modernos equipamentos envolvidos na área, além do convívio social de trabalho e organizacional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo auxílio financeiro.

À minha família, pelo constante apoio, pelas orações e pelos conselhos.

À minha querida e amada esposa Alexsandra, pelo carinho e amor dedicados, sempre ao meu lado, em todos os momentos, pelo incentivo e ensinamentos.

Ao Sr. Idio, D. Lizete, Renata, Marcelo, Célia, Marcela e Micaela, pelo carinho, pela alegria, pelo apoio e pelas orações.

Ao professor Daison Olzany Silva, pela orientação, pela animação e pelo estímulo nestes cinco anos de trabalho; e à sua esposa e também nossa madrinha de casamento, D. Maria, pela amizade.

Aos professores Arnaldo Chaer Borges, Jorge Luiz Cavalcante Coelho, Marisa Vieira de Queiroz, Flávia Maria Lopes Passos e Virgínia Maria Chaves Alves, pela ajuda, pelo estímulo, pela amizade e pelo interesse por este trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, pela convivência e amizade, em especial a Silvia, Evandro e Ann que, também, contribuíram diretamente para o desenvolvimento dos meus trabalhos.

A todos os amigos dos Laboratórios de Microbiologia Industrial, Genética Molecular e de Microrganismos e Associações Micorrízicas, pelo apoio e pelo companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pela disponibilidade, pelo apoio, pela amizade e pelos serviços prestados.

A todas as pessoas que, de alguma outra forma, contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

BIOGRAFIA

RICARDO GENARI, filho de Dulcinea Marilisa Bossa Genari e Claudio Genari, nasceu em Ribeirão Preto, São Paulo, no dia 18 de maio de 1974.

Em setembro de 1994, foi selecionado para atuar no projeto “Estudos de Fisiologia e Genética Molecular de Fungos Filamentosos Visando a Produção de Pectinases para a Degomagem de Fibras Naturais”, como bolsista de iniciação científica da FAPEMIG, pelo Departamento de Microbiologia/ BIOAGRO.

Em janeiro de 1997, foi selecionado pelo Convênio INTERCAMPUS - Brasil e Espanha para desenvolver trabalhos de IC, pelo Departamento Ingeniería Química da Facultad de Ciencias Químicas da Universidad Complutense de Madrid, por 40 dias.

Em dezembro de 1997, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, iniciando, em seguida, o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola nesta mesma Instituição, defendendo tese em 20 de agosto de 1999.

CONTEÚDO

EXTRATO	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Microrganismo utilizado.....	16
3.2. Condições de cultivo	16
3.3. Caracterização do crescimento.....	17
3.3.1. Determinação das taxas de crescimento de <i>K. oxytoca</i>	17
3.3.2. Definição do espectro de absorção da pectina.....	17
3.3.3. Determinação da concentração ótima de pectina como fonte de carbono	18
3.3.4. Avaliação do crescimento sob agitação	18
3.3.5. Determinação do tempo de geração.....	19
3.3.6. Determinação do crescimento na ausência de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	19
3.3.7. Determinação do crescimento em condição de anaerobiose	19
3.3.8. Análise do crescimento em diferentes fontes de carbono	20
3.4. Métodos analíticos.....	20
3.4.1. Obtenção do periplasma	20
3.4.2. Dosagem de nitrogênio total	21

3.4.3. Dosagem de proteínas solúveis	21
3.4.4. Coleta e rompimento das células	21
3.5. Ensaio Enzimáticos.....	22
3.6. Detecção das pectinases de <i>Klebsiella oxytoca</i>	24
3.7. Ensaio preliminares à caracterização da pectato liase	25
3.8. Caracterização da pectato liase	26
3.8.1. Efeito do tempo de estocagem e descongelamentos sucessivos.....	26
3.8.2. Análise de especificidade sobre vários substratos pécticos.....	26
3.8.3. Verificação da estabilidade térmica.....	27
3.8.4. Determinação da temperatura ótima de atividade	27
3.8.5. Determinação do pH ótimo de atividade.....	27
3.8.6. Determinação da constante de Michaelis-Menten, Km	27
3.8.7. Análise do efeito de EDTA e de íons bivalentes na atividade de PAL.....	28
3.9. Fracionamento da pectina e indução de pectinases.....	28
3.9.1. Ultrafiltração de solução de pectina em Amicon CH2R.....	29
3.9.2. Difusão de solução de pectina por membrana de diálise	29
3.9.3. Contenção de solução de pectina em membranas de diálise	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Caracterização do crescimento.....	31
4.2. Detecção da pectinase de <i>Klebsiella oxytoca</i>	37
4.3. Caracterização da pectato liase	39
4.4. Indução da pectato liase	53
4.5. Crescimento em diferentes fontes de carbono e dosagem das enzimas hidrolíticas.....	60
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICES	81

EXTRATO

GENARI, Ricardo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 1999.
Características de crescimento e produção de pectinases por *Klebsiella oxytoca* isolada de frutos de café. Orientador: Daison Olzany Silva.
Conselheiros: Jorge Luiz Cavalcante Coelho e Marisa Vieira de Queiroz.

A bactéria *Klebsiella oxytoca*, isolada do interior de frutos de *Coffea arabica*, obtidos de plantio na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG, foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 2,8 L, com 1,0 L de meio mineral, pH 7,0, contendo pectina cítrica Sigma como única fonte de carbono, na concentração final de 0,28% (p/ v). A cultura foi incubada a 25°C, sem agitação, por 24 horas e alcançou população de 10⁸ células por mililitro em menos de 20 horas. O tempo de geração, nessas condições, correspondeu a 60 min. A taxa de crescimento a 37°C, nesse meio, pouco diferiu das taxas obtidas a 25°C e 30°C. *K. oxytoca* mostrou-se capaz de crescer nesse meio, sem a presença de sulfato de amônio e mesmo sob condições de anaerobiose. A enzima pectinolítica produzida foi a pectato liase, intracelular, induzida, que atua primordialmente sobre substrato não-metilado. A atividade ótima dessa enzima foi obtida em temperatura de 40°C, pH 9,0, na presença de íons magnésio. A pectato liase possuiu uma Km de 4,51 mg/ mL e não perde atividade a -18°C por 9 meses ou sob 40°C por 1 hora e 40 min. As características físico-químicas da pectinase produzida foram similares às

encontradas em outras bactérias e fungos. A bactéria secretou a pectato liase, quando foi cultivada em meio contendo pectina com massa molecular maior que 30.000 Da, obtida por ultrafiltração. A secreção dessa enzima foi inibida por algum composto de massa molecular entre 3.000 e 30.000 Da, presente na pectina ou por oligogalacturonídeos, que podem ser degradados de alguma outra forma pela bactéria. O substrato retido no interior de membranas de diálise de 2.000 e 14.000 Da induziu a maior secreção da enzima, sendo essa maior em membranas de 14.000 Da. Os compostos presentes na pectina cítrica Sigma, que interferiram em mecanismos de regulação da enzima, não foram ainda identificados. *K. oxytoca* cresceu rapidamente, quando amido, galacturonato, poligalacturonato, caseína e glicose foram utilizados como fonte de carbono. Entretanto, não se observou o crescimento, quando essa fonte foi a celulose. As enzimas despolimerizantes foram detectadas em níveis mínimos, característica de microrganismo endofítico. As bactérias endofíticas, por não causarem danos visíveis às plantas, devem possuir algum mecanismo regulatório para controlar a síntese e a atividade de suas enzimas. Os resultados indicam a potencialidade de *K. oxytoca* contribuir para os processos fermentativos em grãos de café.

ABSTRACT

GENARI, Ricardo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, December, 1999.
Characteristics of growth and pectinase production by *Klebsiella oxytoca* isolated from coffee beans. Adviser: Daison Olzany Silva. Committee Members: Jorge Luiz Cavalcante Coelho and Marisa Vieira de Queiroz.

The bacteria *Klebsiella oxytoca*, isolated from the interior of *Coffea arabica* beans, obtained from the Universidade Federal de Viçosa plantation, in Viçosa, MG, was grown in 2.8 L Erlenmeyer flasks containing 1,0 L of minimal medium, pH 7,0, and Sigma citric pectin as sole carbon source, at a final concentration of 0.3% (w/ v). The culture was incubated at 25°C, without shaking, for 24 hours and reached a population of 10⁸ cells per milliliter in less than 20 hours. Generation time under these conditions corresponded to 60 minutes. The growth rate at 37°C, in this medium, differed little from the rates obtained at 25°C and 30°C. *K. oxytoca* proved capable of growing in this same medium without ammonium sulfate even under anaerobic conditions. The pectinolytic enzyme produced was induced intracellular pectate lyase, which acts primarily on unmethylated substrate. Optimal activity of this enzyme was obtained at a temperature of 40°C, pH 9.0, in the presence of magnesium ions. The pectate lyase presented a Km of 4.51 mg/ mL and did not lose activity when stored at -18°C for 9 months or when held at 40°C for 1 hour and 40 minutes. The physico-chemical

characteristics of the pectinase produced were similar to those found in other bacteria and fungi. The bacteria secreted pectate lyase when grown in medium containing pectin of molecular mass greater than 30,000 Da, obtained by ultrafiltration. The enzyme's secretion was inhibited by a compound present in the pectin of molecular mass between 3,000 e 30,000 Da or by oligogalacturonides, which could somehow be degraded by the bacteria. The substrate retained inside 2,000 and 14,000 Da dialysis membranes induced greater enzyme secretion, being greatest in the 14,000 Da membranes. The compounds present in the Sigma citric pectin that interfered in enzyme regulation mechanisms were not identified. *K. oxytoca* quickly grown when starch, galacturonate, poligalacturonate, casein, and glucose were used as carbon source. However, growth was not observed when using cellulose as carbon source. The depolymerizing enzymes were detected at minimal levels, a characteristic of endophytic microorganisms. Endophytic bacteria, that don't make visible damage in the plants, should have some regulatory mechanism to control the synthesis and the activity of their enzymes. The results indicate the potential contribution of *K. oxytoca* in fermentative processes in coffee beans.

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos desempenham papel de importância, durante os períodos de pré-processamento, secagem e armazenamento do café. Durante o crescimento das populações microbianas, são produzidos metabólitos que interferem positiva ou negativamente na qualidade da bebida. A atividade da microbiota e a duração do período de fermentação natural dos frutos de café variam com o estágio de maturação do fruto, com a temperatura, o pH, a concentração de íons, a aeração, a variedade de café e, naturalmente, com a microbiota presente.

A composição do mesocarpo mucilaginoso de frutos maduros inclui açúcares simples, polissacarídeos, minerais, proteínas e lipídeos, que se constituem em excelente meio de cultura para o crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Os fatores ecológicos dominantes nas regiões produtoras do Estado de Minas Gerais, associados aos cuidados das fases pré e pós-colheita, e, possivelmente, às variedades de café cultivadas, são determinantes da prevalência dos microrganismos típicos do fruto de café que contribuem para as características organolépticas da bebida. A atividade dessa microbiota e os metabólitos resultantes do processo de maturação e secagem dos frutos podem ser

mais bem estudados com o uso de técnicas e equipamentos atualmente disponíveis, com vista à melhoria do padrão de qualidade da bebida.

A qualidade da bebida do café determina o valor do produto para a comercialização. A valorização do produto com qualidade superior no mercado é estimada em até 40%.

O Estado de Minas Gerais é o maior produtor brasileiro de café e tem sua relevância traduzida pelo seu papel no mercado, como gerador de emprego, como fator de fixação de mão-de-obra no meio rural e gerador de receitas financeiras para o Estado.

O efetivo controle da atividade microbiana contribui para a melhoria da qualidade da bebida do café. Essa condição de excelência é uma exigência da cafeicultura nacional, para atender as demandas dos mercados interno e externo. Nesse contexto, a regionalização da qualidade do produto, como estratégia de “marketing”, deve ser consolidada em bases precisas e científicas.

A pectólise é um fenômeno de degradação das substâncias pécicas, em que estão envolvidas reações catalisadas por enzimas chamadas pectinases. Essas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza e têm como substrato os polissacarídeos complexos, localizados principalmente na lamela média entre células dos tecidos de plantas superiores. Bactérias e fungos saprófitas e fitopatogênicos são conhecidos por produzirem enzimas pectinolíticas, promovendo perdas no campo e na pós-colheita. O estudo das substâncias pécicas e das pectinases tem sido considerado também de grande importância em razão, também, da aplicação industrial dessas enzimas.

As bactérias endofíticas, aquelas que visivelmente não causam danos às plantas, após ganharem entrada para o interior das plantas através de aberturas naturais ou ferimentos, penetram rapidamente nos tecidos celulares, usando enzimas hidrolíticas como as pectinases. Essas bactérias são potencialmente benéficas, muitas delas fixadoras de nitrogênio ou atuantes no controle biológico de pragas e doenças.

Neste trabalho, foram desenvolvidos estudos das características de crescimento de uma bactéria isolada de frutos de café cultivado no *campus* da

Universidade Federal de Viçosa, identificada como *Klebsiella oxytoca*, bem como a caracterização de suas pectinases, com vista à determinação da participação dessa bactéria no processo fermentativo natural dos frutos de café nas fases de pré e pós-colheita.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A realidade atual da cafeicultura brasileira indica que a agroindústria nacional tem capacidade de abastecer os mercados, interno e externo, com um produto de qualidade.

Historicamente, o Brasil ocupa a posição de maior produtor e exportador de café no mercado internacional. Entretanto, no ano de 1963, era responsável por 38,21% das exportações mundiais do produto, enquanto, em 1997, respondeu por 20,33% dessas exportações (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ, 1998).

Entre os fatores determinantes do declínio nas exportações, destacou-se a falta de um padrão de qualidade para o café exportado (SOUZA, 1996). O equívoco da estratégia brasileira foi o de exportar grandes quantidades para um mercado em que a exigência, quanto à qualidade, era cada vez mais pronunciada. Enquanto isso, os principais concorrentes brasileiros perceberam a importância de ofertar um produto de melhor qualidade e introduziram modificações significativas em seus produtos, como foi o caso da Colômbia, do México e dos países da América Central, que passaram a ofertar café arábica como bebida do tipo suave (SOUZA, 1996).

A expressão final da qualidade do café depende de vários fatores, como a espécie botânica, a variedade, a origem geográfica e a interação entre os processos nas fases de pré e pós-colheita, em que se incluem a fermentação, o

armazenamento, a torrefação, a moagem e o preparo da infusão (ARCILA e VALÊNCIA, 1975).

O sabor característico do café é atribuído à presença de constituintes químicos voláteis e não-voláteis, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos e, também, à ação de enzimas sobre alguns desses constituintes, o que gera, como produtos de reações, compostos que interferem no sabor e odor do mesmo (AMORIM et al., 1974a, 1974b, 1974c, 1975, 1976).

A presença de muitos desses compostos está relacionada com o processo fermentativo, conduzido nos grãos, que é influenciado pelas fases de pré e pós-colheita. No Brasil, por ocasião da colheita, os frutos se encontram em diferentes estádios de amadurecimento e o preparo é feito por “via seca”, em que a secagem dos grãos, ainda com casca, é feita em terreiros ou em secadores, ao contrário de outros países, como a Colômbia, em que o processo de colheita é seletivo (colheita a dedo) e os frutos são despolidos (LEITE, 1998).

A fermentação do café é um processo em que o mesocarpo mucilaginoso do fruto é degradado por ação de enzimas, o que resulta em uma secagem mais rápida e na melhora da aparência do produto (ARUNGA, 1982). Essas enzimas são naturalmente presentes nos frutos de café ou são produzidas pela microbiota contaminante. Muitos desses contaminantes podem não ter nenhuma importância particular no processo fermentativo. A ocorrência de leveduras pectinolíticas, durante a degradação da camada mucilaginosa de grãos de *Coffea robusta*, no estágio cereja, já foi registrada (Agate e Bhat, 1966, citados por DOYLE et al., 1997). O processo fermentativo pode durar de 16 a 100 horas, e depende da maturação do fruto, da temperatura, do pH, da concentração de íons, da variedade do café, da microbiota contaminante e da aeração (ARUNGA, 1982). Várias mudanças químicas acontecem durante o processo de fermentação do café e essa fermentação deve ser cuidadosamente controlada, para que a formação de compostos indesejáveis que afetam a qualidade final da bebida seja evitada.

A qualidade da bebida, que é determinada no processo fermentativo, não depende das condições de cultivo, altitude, clima ou colheita, sendo, em grande parte, o resultado do processo de fermentação. Assim, o ácido propiônico, que

pode ser produzido durante a fermentação, por exemplo, é o responsável pelo gosto indesejável de cebola no café. A quantidade desse ácido também depende dos microrganismos presentes (Mônaco, 1961, citado em INFORME AGROPECUÁRIO, 1997).

Os resultados de análises de amostras de café de qualidades diferenciadas, pelo teste organoléptico, referentes à presença de carboidratos livres totais, açúcares redutores, proteínas solúveis, ácido clorogênico total, fenóis solúveis em metanol e água, e fenóis hidrolisáveis, demonstraram que esses compostos interferem positivamente na qualidade da bebida e conferem o sabor e o aroma peculiares do café (AMORIM, 1975). A atividade de polifenoloxidasas também está, comprovadamente, relacionada com a qualidade do café, sendo mais baixa em café de qualidade inferior (OLIVEIRA et al., 1977). A descoberta do composto 2,4,6-tricloroanisol, em amostras do café classificado como de bebida rio, demonstrou que a ação do fungo *Aspegillus niger* está relacionada com a má qualidade da bebida (AMORIM e MELO, 1992).

Embora tenha sido repetidamente mostrado por vários pesquisadores que a degradação da camada mucilaginosa do fruto do café, durante o processo fermentativo, ocorre, inicialmente, pela atividade das enzimas presentes naturalmente no fruto, a participação das enzimas extracelulares produzidas por microrganismos é de maior importância na fermentação natural (ARUNGA, 1982).

Estudos sobre a fermentação do café têm demonstrado a ocorrência de uma alta atividade microbiana, durante as primeiras 12 a 14 horas após a colheita dos frutos (DOYLE et al., 1997). A participação de bactérias no processo fermentativo do café tem sido evidenciada em alguns trabalhos. Vaughn (1958), citado por ARUNGA (1982), isolou bactérias do grupo coliforme e espécies pectinolíticas de *Bacillus* em café brasileiro. A maioria dos microrganismos detectados durante o primeiro estágio fermentativo foi classificada como *Aerobacter* (*Enterobacter*) e *Escherichia* (Frank et al., 1965, citados por DOYLE et al., 1997). Populações dessas bactérias aumentam de 10^2 para 10^9 UFC/ g, durante as primeiras 24 horas. Estudos de fermentação conduzidos em frutos de café *Kona* demonstraram que *Erwinia dissolvens* foi a principal responsável pela degradação da mucilagem

(Frank et al., 1965, citados por DOYLE et al., 1997).

Apenas poucas espécies de leveduras têm sido identificadas no processo de fermentação da camada mucilaginosa do café. Espécies pectinolíticas de *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* também têm sido detectadas (DOYLE et al., 1997). Apontam-se bactérias do gênero *Erwinia* como microrganismos que possuem papel fundamental na produção de enzimas pécticas extracelulares, que irão hidrolisar a camada mucilaginosa do café. Em algumas situações, as enzimas pectinolíticas produzidas por fungos podem ser adicionadas para acelerar o processo fermentativo (ARUNGA, 1982).

As substâncias pécticas ocorrem na natureza apenas na lamela média das plantas superiores, atuando no preenchimento das paredes celulares primárias e exercendo o papel principal de cimentar duas adjacentes (BARTLING et. al., 1995). Essas são constituídas por cadeias lineares de ácido galacturônico, unidos por ligação α - (1,4). Dessa forma, a despolimerização dos componentes pécticos causam separação das células, perda de proteínas ligadas à parede celular e vazamento de eletrólitos dos protoplastos, resultando em lise celular (BARTLING et. al., 1995).

A parede celular da planta consiste de celulose, hemiceluloses e pectinas, unidas umas às outras por ligações covalentes e não-covalentes (SALYERS et al., 1996).

O polissacarídeo parcialmente metoxilado é chamado de pectina. A pectina desmetoxilada é chamada ácido poligalacturônico ou ácido péctico. Os microrganismos podem degradar a pectina diretamente, por clivagem em oligômeros metoxilados, ou após desmetoxilação da pectina, pela ação da enzima pectinesterase (PE; EC 3.1.1.11). A clivagem direta da pectina ou do ácido poligalacturônico pode ocorrer por hidrólise ou ação transeliminativa (TARDY et. al., 1997).

As hidrolases são denominadas poligalacturonases e são subdivididas, quanto ao mecanismo de ação sobre a cadeia de pectato, em: endopoligalacturonases (endo-PG; EC 3.2.1.15) que produzem uma série de oligogalacturonatos, tais como mono, di, tri, e tetragalacturonatos (REXOVÁ-

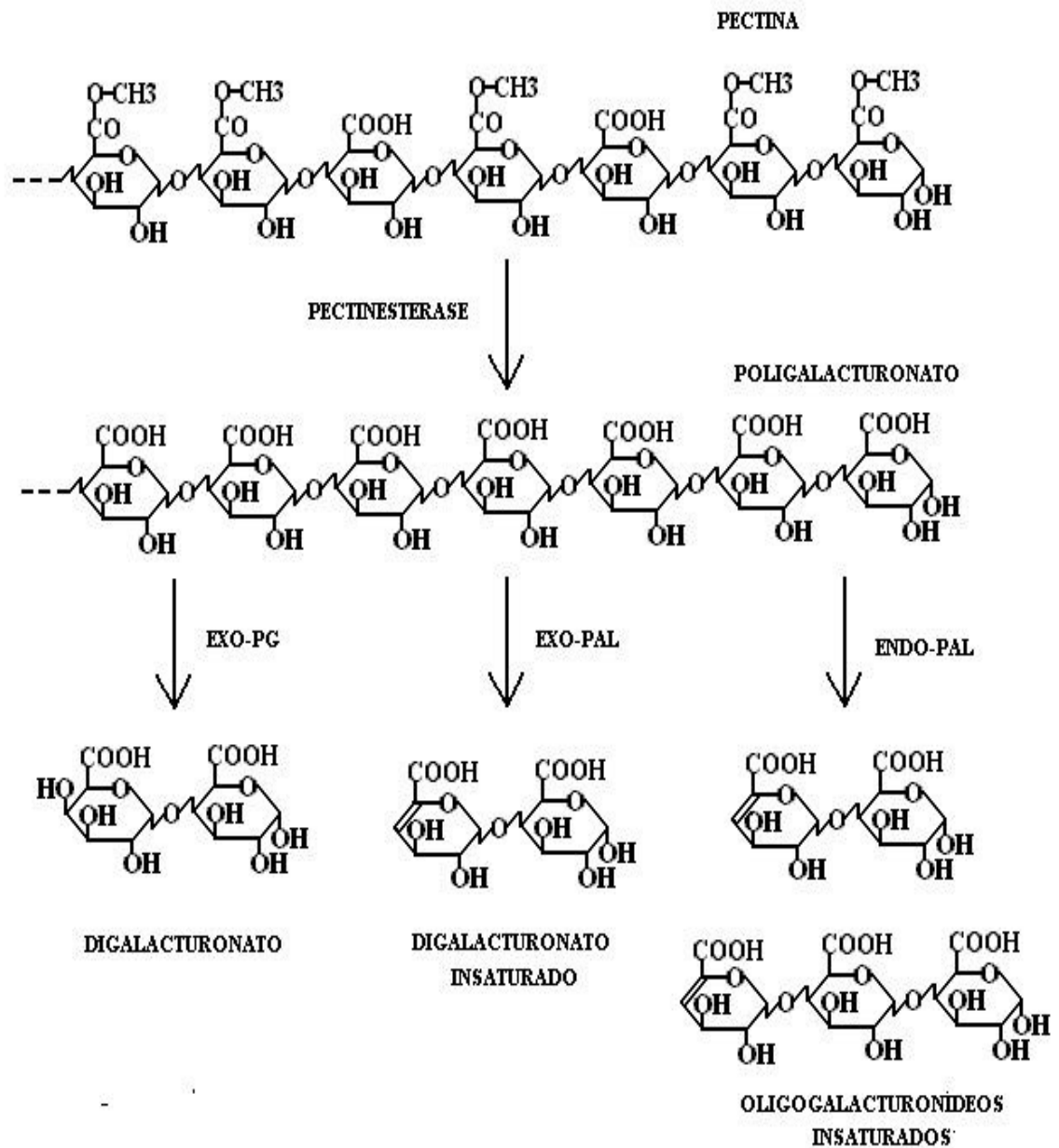
BENKOVÁ e MARKOVIC, 1976) e exopoligalacturonases (exo-PG; EC 3.2.1.87), que atuam nas extremidades da cadeia de pectato (ROMBOUTS e PILNIK, 1980)

As liases degradam o substrato por meio da transeliminção, sendo os produtos finais o ácido galacturônico insaturado (ou seus oligômeros) e o ácido galacturônico saturado com extremidade redutora livre (LINHARDT et al., 1986). A pectina liase atua sobre pectinas de elevado conteúdo metil-éster e age sobre duas formas: a partir da extremidade da cadeia de pectina (exo-PL; EC 4.2.2.10) (ZETELAKI-HORVÁTH, 1982), ou atuando ao acaso sobre a cadeia polimérica (endo-PL; EC 4.2.2.3) (WHITAKER, 1972). A pectato liase atua sobre o ácido poligalacturônico, liberando 4-deoxy-5-oxo-D glicuronato (dímero alterado), sendo assim denominada exo-PAL, EC 4.2.2.9 (MACMILLAN e VAUGHN, 1964), ou, também, atuando, aleatoriamente, liberando oligogalacturonídeos insaturados (endo-PAL; EC 4.2.2.2) (NAGEL e ANDERSON, 1965), conforme mostrado no Esquema 1.

É muito provável que microrganismos pectinolíticos tenham maior significado na fermentação do café, considerando a presença de substâncias pecticas na camada mucilaginosa que envolve a semente. Essa hipótese pode ser suportada pelas observações de que, durante o curso da fermentação do café, foi detectado um aumento da atividade de pectinesterases, provavelmente, produzidas por microrganismos (ARUNGA, 1982).

A bactéria *Klebsiella oxytoca*, isolada de frutos de café, é, provavelmente, endofítica. Ela foi retirada da camada mucilaginosa dos frutos, em diferentes estádios de maturação (VIANA et al., 1997).

Esquema 1



Microrganismos endofíticos são aqueles que ocorrem no interior das plantas, especialmente em suas partes aéreas, e não produzem qualquer efeito fenotipicamente detectável nas plantas. São, principalmente, fungos e bactérias, encontrados em todos os vegetais superiores, estudados até o momento (PAMPHILE, 1997). Bactérias endofíticas também podem ser definidas como

aquelas que podem ser isoladas de superfícies desinfestadas de tecidos de plantas, ou extraídas de dentro da mesma planta e que não sejam visivelmente prejudiciais à mesma (HALLMANN et al., 1997). Inúmeros trabalhos, desde 1948, demonstraram que bactérias habitam, naturalmente, tecido de plantas saudáveis, incluindo os seus frutos (McINROY e KLOEPPER, 1995).

Basicamente, os microrganismos endofíticos podem ser usados em dois campos principais: no controle de pragas e doenças (PISHCHIK et al., 1998), ou como vetores hospedeiros de genes para a transformação genética de plantas, como em trabalhos realizados com utilização do fungo endofítico *Acremonium* sp. 187BB (PAMPHILE, 1997). Muitos endofíticos são capazes de produzir componentes antibióticos em cultura e são ativos contra bactérias patogênicas de plantas e humanos, bem como para fungos. A função primária da produção de antibióticos deve ser uma competição, contra os antagonistas (PAMPHILE, 1997).

No controle biológico de pragas de culturas, LIU et al. (1995a, 1995b, 1995c) observaram que *Pseudomonas fluorescens* 89B-27 e *Serratia marcescens* 90-166 induziram, em pepinos, resistência a *Pseudomonas syringae lachrymans*, como também aos fungos patogênicos *Fusarium oxysporum cucumerium* e *Colletrotrichum orbiculare*.

As bactérias endofíticas diazotróficas podem ser mais prevalentes do que anteriormente admitido e, provavelmente, há muito mais bactérias potencialmente benéficas, fixadoras de nitrogênio que podem ser isoladas de outras culturas agronomicamente importantes (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997). Uma grande variedade de espécies tem sido encontrada e quantificada, em diferentes plantas. Em culturas de cana de açúcar, mais de 60% do nitrogênio, biologicamente fixado (cerca de 150 kg-N/ ha-ano), é originado por atuação de endofíticos (KIRCHHOF et al., 1997).

Historicamente, pesquisadores acreditavam que uma bactéria endofítica não-diazotrófica seria um fraco patógeno virulento de plantas. Contudo, recentemente, são demonstrados efeitos benéficos à planta hospedeira, tais como a

promoção do crescimento e o aumento da resistência da planta a patógenos e parasitas (HALLMANN et al., 1997).

Geralmente, a densidade populacional de bactérias endofíticas é menor que a de patogênicas e, pelo menos algumas delas, não induzem resposta hipersensível, indicando não serem reconhecidas pela planta ou não serem tratadas como patogênicas (HALLMANN et al., 1997). Evolucionariamente, os endofíticos aparecem como intermediários entre bactérias saprófitas e patógenos de plantas. De modo geral, a microbiota endofítica é de estrutura dinâmica e é influenciada pelos fatores bióticos e abióticos que também influenciam o solo e a planta hospedeira (HALLMANN et al., 1997).

A utilização de métodos experimentais específicos para as investigações de bactérias endofíticas é de fundamental importância para se determinar a natureza endofítica do microrganismo (HALLMANN et al., 1997). Em razão do tamanho das bactérias e da natureza do trabalho requerido para a maioria dos métodos, o conhecimento sobre as bactérias endofíticas evolui vagarosamente (HALLMANN et al., 1997). Entretanto, essa evolução do conhecimento tem demonstrado o significado ímpar do potencial das bactérias endofíticas em sistemas de produção agrícolas (HALLMANN et al., 1997).

O procedimento de isolamento das bactérias endofíticas é de fundamental importância para o enquadramento do organismo como um endofítico. Teoricamente, qualquer procedimento deveria retratar a população interna completa e apenas a população interna. Entretanto, erros podem advir como resultado de uma desinfestação incompleta da superfície, da adsorção de células bacterianas por estruturas celulares das plantas ou da penetração do agente esterilizante, no interior dos tecidos da planta, resultando em perda de alguns endofíticos (HALLMANN et al., 1997).

As bactérias endofíticas originam-se de comunidades bacterianas epifíticas da rizosfera e filosfera, como também de sementes infestadas por endofíticos ou materiais utilizados durante o plantio. Após ganharem entrada para o interior das

plantas, através de aberturas naturais ou ferimentos, as bactérias endofíticas penetram rapidamente nos tecidos celulares usando enzimas despolimerizantes como celulases e pectinases (HALLMANN et al., 1997). Se a bactéria não pode prontamente fixar nitrogênio do ar, fontes sustentáveis de relação combinada entre carbono e nitrogênio devem estar disponíveis. A razão C:N varia amplamente nos exsudados de plantas, sendo as menores relações encontradas em leguminosas, em relação às gramíneas (SPRENT e De FARIA, 1988).

Ferimentos e raízes laterais não são, entretanto, absolutamente requeridos para a entrada de bactérias endofíticas. Sementes germinadas, com distúrbio mínimo, no meio líquido ou em ágar-água, foram penetradas por bactérias endofíticas muito antes da raiz lateral ter emergido (LEVANONY et al., 1989; QUADT-HALLMANN et al., 1997a). Por meio de plantas controle livres de endofíticos, observou-se que o comportamento das bactérias indicava uma penetração ativa. Essa hipótese é suportada pela presença de enzimas celulolíticas e pectinolíticas, produzidas por numerosas bactérias endofíticas, a exemplo de *Azoarcus* sp. (HUREK et al., 1994), *Azospirillum irakense* (Khammas e Kaiser, 1991, citados em HALLMANN et al., 1997), e *Pseudomonas fluorescens* (QUADT-HALLMANN e KLOEPPER, 1996).

A degradação enzimática das paredes celulares das plantas por essas bactérias foi observada apenas quando elas colonizam as epidermes das raízes, ao invés de os espaços intercelulares do córtex da raiz (QUADT-HALLMANN et al., 1997a). Esses resultados sugeriram que a produção de celulases e pectinases pelos endofíticos ocorreria apenas quando na penetração para o interior da planta hospedeira. As observações indicaram a possibilidade de existência de mecanismos de penetração ativa para algumas bactérias endofíticas, porém, pouco é conhecido sobre a origem e a regulação dessas enzimas. Em verdade, há controvérsias com relação à existência de mecanismos de penetração ativa e o fato de bactérias do solo mostrarem uma alta produção de enzimas hidrolíticas, quando comparadas aos habitantes do xilema. Alguns autores admitem como improvável a entrada de bactérias endofíticas para o interior da planta, pelo uso exclusivo de suas enzimas hidrolíticas (BELL et al., 1995).

As enzimas hidrolíticas podem ser produzidas por endofíticos apenas durante a primeira fase de invasão, e não por residentes nos tecidos da planta (BENHAMOU et al., 1996). Além disso, os endofíticos podem produzir enzimas somente quando cultivadas in vitro ou na planta. A *Enterobacter asburiae* JM 22, e a *Pseudomonas fluorescens* 89B-61 não produziram celulases, quando cultivadas em meio contendo celulose, embora a atividade celulolítica de bactérias que colonizam raízes de algodoeiro já tenha sido demonstrada (QUADT-HALLMANN e KLOPPER, 1996). A perda de paredes celulares da planta, pela atividade de bactérias endofíticas, é indesejável, uma vez que isso confere patogenicidade à bactéria (COLLMER et al., 1982). Dessa forma, as bactérias endofíticas devem possuir algum mecanismo regulatório para, especificamente, regular a síntese e a atividade das enzimas. Em *Xanthomonas campestris*, são encontradas estirpes virulentas e avirulentas, as quais diferem quanto a atividade celulolítica (KNÖSEL e GARBER, 1967).

As *Enterobacteriaceae* constituem um componente significativo da microbiota epifítica não-patogênica (PISHCHIK et al., 1998). *Klebsiella oxytoca* mostrou ser avirulenta em tubérculos de batata (PISHCHIK et al., 1998). A atividade pectinolítica também tem sido reportada em espécies não-patogênicas, tais como *Rhizobium* (TIEN et al., 1981) e algumas estirpes de *Klebsiella pneumoniae* e *Yersinia* (TIEN et al., 1981).

A atividade pectinolítica da estirpe de *Azospirillum brasiliense* foi considerada pequena, demonstrando-se, também, que estirpes isoladas da rizosfera de arroz foram capazes de usar pectina como fonte de carbono para a fixação biológica do nitrogênio (TIEN et al., 1981). O *Azospirillum* foi considerado um competidor fraco em presença de outros organismos do solo, com relação à utilização de exsudados ou lisados das raízes, quando da existência desses compostos como fonte de carbono para bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico. (Gaskins e Hubbell, 1979, citados por TIEN et al., 1981). É possível que materiais pectínicos no solo, ou lisados de células de raízes, possam ser fonte adicional significativa de energia e suportar o crescimento e a fixação de nitrogênio por *Azospirillum* e outras bactérias do solo. *Azospirillum* é geralmente observado

em espaços intercelulares de tecidos de raiz e, dessa forma, possivelmente as enzimas pectinolíticas possuem um importante papel na invasão dos tecidos pelas bactérias (TIEN et al., 1981).

Klebsiella oxytoca tem sido isolado de diversos ambientes, tais como: leites e derivados (WESSEL et al., 1989), águas poluídas com cianeto (LIU et al., 1997), açúcar de cana (NUNEZ e COLMER, 1968), de infecções humanas e de animais, em vários locais de hospitais, incluindo os refeitórios, de águas de rios e flores, (EDMONDSON et al., 1980). Foi, também, isolado de um tipo de salame espanhol (“salchichón”) produzindo histamina (ROIG-SAGUES et al., 1996), em amostras de água potável (PACKER et al., 1995), do intestino humano (LIVRELLI et al., 1996), de frutos de café (VIANA et al., 1997) e fixando nitrogênio atmosférico, em rizosfera de plantas de arroz (YOO et al., 1986).

K. oxytoca inclui estirpes com capacidade de usar nitrato e nitrito como únicas fontes de nitrogênio (WU et al., 1998) e também podem fixar o nitrogênio do ar atmosférico, em condições estritamente anaeróbias (LIU et al., 1997). *K. oxytoca* é descrito como uma bactéria capaz de fixar nitrogênio atmosférico, tanto em forma livre, no ambiente, como em simbiose associativa (CAKMAKCI et al., 1981). Em estudos com 18 isolados de *Klebsiella*, sua característica de fixadora de nitrogênio atmosférico ficou evidenciada, pelo fato de causarem um aumento na concentração de nitrogênio nas partes aéreas e raízes de híbridos de milho (SARIĆ et al., 1987). Essa bactéria é descrita como produtora de pectinases e com capacidade de formar biofilmes em uma matriz péctica (RUBINSTEIN et al., 1992). Em trabalhos genéticos, seu DNA tem sido usado, inclusive, na construção de transposon, contendo o gene da enzima pectato liase (poligalacturonato transeliminase) (WALKER et al., 1987).

As bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser isoladas de plantas não-leguminosas, onde são encontradas na rizosfera, no rizoplano e no interior de tecidos de *Gramineae* e de outras plantas (KIRCHHOF et al., 1997). A adesão de *Klebsiella pneumoniae* “in situ” em raízes de grama já foi também descrita (HAAHTELA et al., 1986; KIRCHHOF et al., 1997). *K. pneumoniae* também foi associado com a fixação de nitrogênio, em árvore de abeto, semelhante ao pinheiro

(AHO et al., 1974).

Espécies de *Klebsiella* também foram isoladas de nódulos de leguminosas, como a soja, a alfafa e o trevo (CAKMAKCI et al., 1981) ou de caules de milho, como a *K. terrigena* (FISHER et al., 1992).

K. oxytoca isolada do solo, e com capacidade fixadora de nitrogênio, produziu auxina e ácido indol acético (AIA) a partir do triptofano (ZIMMER et al., 1994). Em outro trabalho, *K. oxytoca* produziu AIA (5,3 µg/ mL) e acetileno (10,2·10⁻⁵ % v/ v), além de ser capaz de fixar o nitrogênio atmosférico (PISHCHIK et al., 1998). Os hormônios vegetais podem interagir com enzimas produzidas por microrganismos, a exemplo de pectina liase e pectato liase (ALBERSHEIM e KILLIAS, 1962). Por outro lado, existem espécies como *K. mobilis* e *K. planticola* que não apresentam atividade de pectato liase (PISHCHIK et al., 1998).

Não foi encontrada atividade antibacteriana de grãos verdes de café, em testes MIC (concentração inibitória mínima) feitos com *S. aureus* (gram positivo) e *E. coli* (gram negativa) (DAGLIA et al., 1994).

A complexidade do processo de fermentação natural, onde são incluídos os fatores que determinam o curso da fermentação, junto com o pouco que se conhece a respeito dos microrganismos, nesse processo, dificultam a avaliação conclusiva dos fatores que interferem com a qualidade do café.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia/ BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

3.1. Microrganismo utilizado

A *Klebsiella oxytoca* isolada de frutos de café *Coffea arabica* de plantio na Universidade Federal de Viçosa (VIANA et al., 1997) foi a bactéria utilizada para os experimentos de caracterização do crescimento e de produção de enzimas despolimerizantes. A cultura estoque está conservada em caldo nutriente, adicionado de glicerol na concentração final de 50% (v/ v) em ultrafreezer da Forma Scientific, Inc., modelo 826, a - 86°C.

3.2. Condições de cultivo

A cultura estoque foi inicialmente ativada em um meio de cultura designado por MMP (meio mineral com pectina), contendo em gramas por litro: K_2HPO_4 , 7; KH_2PO_4 , 2; $(NH_4)_2SO_4$, 1 e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,1 (meio mineral), além de pectina cítrica Sigma como única fonte de carbono, na concentração final de 0,28% (p/ v),

sem adição de vitaminas e aminoácidos, no pH final de 7,0. A cultura foi incubada a 25°C em BOD MA415 Marconi, sem agitação, por 24 horas. A nova cultura ativada, com população aproximada de 10^8 células por mililitro, foi utilizada para inocular 100 mL do meio de cultura MMP, contido em frasco Erlenmeyer de 250 mL. O frasco foi incubado a 25°C, sem agitação, por 24 horas, e a cultura resultante foi utilizada como inóculo para os experimentos.

3.3. Caracterização do crescimento

3.3.1. Determinação das taxas de crescimento de *K. oxytoca*

O estudo foi realizado com a utilização de 100 mL de meio MMP contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL e a cultura incubada separadamente em BOD MA415 Marconi às temperaturas de 12, 20, 25, 30 e 37°C, sem agitação. As determinações de células viáveis foram feitas a cada três horas, no decorrer de 24 horas, em triplicata. A média dos três valores foi tomada como estatisticamente aceita para o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ mL), no dado tempo de crescimento.

A avaliação do crescimento foi feita pelo método de contagem de colônias, em placas de Petri, com a utilização do Autoplate 4000 da Spiral Biotech, Inc (KLOEPPER et al., 1991). As placas continham 15 mL de ágar nutriente Mikrobiologie, e as células das culturas foram diluídas em solução de NaCl 0,8% (p/ v). As placas foram incubadas em BOD MA415 Marconi a 25°C por 24 horas e, em seguida, foi avaliado o número de colônias.

3.3.2. Definição do espectro de absorção da pectina

O espectro de absorção da pectina foi determinado no meio MMP, a 25°C, e a avaliação da absorvância dessa solução, entre 200 e 800 nm, em cubeta de quartzo, foi realizada com o uso do espectrofotômetro Beckman modelo DU 640.

O gráfico obtido com os valores de absorvância nos diferentes comprimentos de onda serviu para a definição do comprimento da onda a ser usado. O comprimento de onda de 420 nm foi o escolhido, pelo fato de que pode haver interferências de absorção de outros compostos nas radiações em torno de 300 nm.

3.3.3. Determinação da concentração ótima de pectina como fonte de carbono

Para a determinação da concentração ótima de pectina, no meio mineral, foi avaliado o crescimento de *K. oxytoca*, em concentrações finais de 0,023, 0,047, 0,093, 0,140, 0,186, 0,233 e 0,279% (p/ v) de pectina cítrica Sigma, em 100 mL de meio mineral, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL. As determinações das células viáveis foram feitas a cada três horas, no decorrer de 30 horas, em triplicata. A avaliação do crescimento foi feita pela contagem do número de colônias em Placas de Petri, após a incubação a 25°C, por 24 horas.

Ao final do cultivo em frasco, incubado em BOD MA415 Marconi a 25°C, sem agitação, as células foram separadas por centrifugação a 4.000 g, por 10 min, em centrífuga Fisher Scientist Marathon Micro A, e o sobrenadante foi utilizado para a avaliação da absorvância a 420 nm, em espectrofotômetro Hitachi modelo U-1100A. O valor da absorvância foi comparado com o de uma curva padrão, para se determinar a porcentagem de pectina não-consumida.

3.3.4. Avaliação do crescimento sob agitação

O crescimento de *K. oxytoca* em meio MMP, sob condições de agitação de 150 rpm, em agitador rotatório, New Brunswick Scientific Incubator Shaker Series 25D, a 25°C, foi realizado com utilização de frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de MMP. As determinações de células viáveis foram feitas a cada três horas, no decorrer de 24 horas, em triplicata. A avaliação do crescimento foi feita pela contagem do número de colônias em Placas de Petri,

após a incubação, a 25°C por 24 horas. O controle do experimento foi considerado como o crescimento nas mesmas condições, porém, sem agitação.

3.3.5. Determinação do tempo de geração

Esse índice foi determinado por meio de incubação de *K. oxytoca*, em 100 mL de meio MMP, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, em BOD MA415 Marconi na temperatura de 25°C, sem agitação. As determinações de células viáveis foram feitas a cada três horas, no decorrer de 30 horas, em triplicata. A avaliação do crescimento foi feita pela contagem do número de colônias, em Placas de Petri, após a incubação a 25°C, por 24 horas.

3.3.6. Determinação do crescimento na ausência de (NH₄)₂SO₄

O estudo foi realizado por meio de incubação de *K. oxytoca*, em 100 mL de meio MMP com ou sem sulfato de amônio, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, em BOD MA415 Marconi à temperatura de 25°C, sem agitação. As determinações de células viáveis foram feitas a cada três horas, no decorrer de 24 horas, em triplicata. A avaliação do crescimento foi feita pela contagem do número de colônias, em Placas de Petri, após a incubação a 25°C por 24 horas. O inóculo utilizado foi obtido nas mesmas condições previamente descritas.

3.3.7. Determinação do crescimento em condição de anaerobiose

A *K. oxytoca* foi cultivada em fermentadores de bancada, contendo 400 mL de meio MMP, com ou sem a presença de (NH₄)₂SO₄. Após a adição do inóculo, foi efetuado o borbulhamento de nitrogênio gasoso, por 20 min, para obtenção da anaerobiose (CAKMAKCI et al., 1981). O ambiente anaeróbio foi confirmado, usando-se fita de azul de metileno presa, sem tocar no líquido. A temperatura de incubação foi a ambiente, em torno de 25°C e sem agitação.

A coleta de amostras foi feita por sucção, usando-se agulha e seringa, após breve agitação. As determinações de células viáveis foram feitas a cada três horas, no decorrer de 30 horas, em triplicata. A avaliação do crescimento foi feita pela contagem do número de colônias, em Placas de Petri, após a incubação a 25°C por 24 horas. O inóculo utilizado foi obtido nas mesmas condições previamente descritas.

3.3.8. Análise do crescimento em diferentes fontes de carbono

A *K. oxytoca* foi cultivada em meio mineral, acrescido de diferentes substratos tais como caseína Sigma, polpa de celulose, amido Mallinckrodt (após ultrafiltração por membrana de 100.000 Da), galacturonato Sigma, glicose Sigma, pectina Sigma e poligalacturonato Sigma, nas concentrações finais de 0,3% (p/ v). O estudo foi realizado com a utilização de 1,0 L de meio contido em frascos Erlenmeyer de 2,8 L e a cultura incubada em BOD MA415 Marconi à temperatura de 25°C, sem agitação. Após o cultivo, por 24 horas, foi feita uma avaliação de suas enzimas despolimerizantes detectadas, extra, ou intracelularmente, quando existentes.

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Obtenção do periplasma

A separação do esferoplasto foi feita com a utilização do método descrito por COOPER (1992). As células contidas em 1,0 L de cultura foram separadas por centrifugação a 9.000 g, por 10 min, a 4°C e ressuspensas, a 0°C, em 10 mL de tampão Tris/ HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 20% (p/ v) de sacarose. A seguir, 2,0 mL de solução de lisozima (10 mg/ mL) foram adicionados sob agitação mínima e a suspensão foi incubada a 0°C, por 10 min. Após a adição, com agitação lenta, de 5,0 mL de EDTA 42 mM, pH 8,0, a suspensão foi diluída pela

progressiva adição de 10 mL de tampão Tris/ HCl, pH 8,0, contendo 9% (p/v) de sacarose e 22 mL de tampão Tris/ HCl 50 mM, pH 8,0, com sacarose 9% (p/v) e MgCl₂ 15 mM. A solução do periplasma de aproximadamente 50 mL foi obtida após a centrifugação a 9.000 g a 4°C, por 10 min, para a sedimentação dos esferoplastos.

3.4.2. Dosagem de nitrogênio total

A porcentagem de nitrogênio total da pectina Sigma (6,9% de umidade) foi obtida, adotando-se o procedimento modificado do método de Kjeldahl (BREMNER e MULVANEY, 1982). O ensaio foi realizado em triplicata. A pectina (massas de 0,3669 g, 0,3453 g, 0,3501 g) foi colocada em um frasco de digestão semimicro-Kjeldahl. Em seguida, foram adicionados 1,1 g de mistura digestora (100 g de K₂SO₄, 10 g de CuSO₄.5H₂O, e 1 g de Se) e 5 mL de H₂SO₄ concentrado. A digestão ocorreu durante duas horas, seguida da destilação e da titulação dos cerca de 35 mL do destilado recolhido em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 mL de solução indicadora de ácido bórico. A concentração de NH₄⁺ foi determinada no destilado, pela titulação com HCl 0,02 N. O volume branco foi obtido com a titulação de água destilada.

3.4.3. Dosagem de proteínas solúveis

As proteínas solúveis do sobrenadante da cultura, das células íntegras e das células rompidas, foram determinadas pelo método proposto por BRADFORD (1976), com a utilização de BSA (Albumina de Soro Bovino) como padrão e o kit da BioRad.

3.4.4. Coleta e rompimento das células

As células resultantes do crescimento após 24 horas, a 25°C em BOD MA415 Marconi, sem agitação, em 1,0 L de meio MMP, contido em frascos Erlenmeyer de 2,8 L, foram coletadas por centrifugação a 9.000 g por 10 min, a 25°C, e ressuspendidas em 35 mL de tampão fosfato, contendo, em gramas por litro: K₂HPO₄, 7; KH₂PO₄, 2 e MgSO₄.7H₂O, 1, pH 7,0. A suspensão de células foi colocada no cilindro 40K FRENCH Pressure Cell Press, e submetida a uma pressão de 8.619 kPa equivalente a 85 atm (pressão sobre as células de 137.895 kPa equivalente a 1.365 atm). Com a descompressão, foram obtidos os lisados de células com mínima perda das enzimas, em banho de gelo (STUTZENBERGER, 1987).

3.5. Ensaio Enzimáticos

As dosagens das pectinases, proteases e amilases foram realizadas no sobrenadante da cultura, nas células íntegras e nas suspensões de células rompidas.

A atividade de pectina liase (PL) foi determinada pelo monitoramento do aumento da absorvância a 235 nm, como descrito por ALBERSHEIM e KILLIAS (1962) e por ALBERSHEIM (1966), em espectrofotômetro Hitachi modelo U-1100. A mistura de reação foi constituída de 1,5 mL de pectina cítrica Sigma, 2,33% (p/v) em tampão K₂HPO₄/ Na₂HPO₄ 80 mM, pH 6,8 e 0,5 mL da amostra com a enzima, mantida à temperatura de análise. Alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 40 min de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 N, para interromper, assim, a reação. Uma unidade relativa de atividade de PL (U) foi definida como micromoles de $\Delta^{4,5}$ galacturonídeo por miligrama de proteína, por minuto, utilizada para o cálculo a absortividade molar para o produto insaturado de 5.550 L/ cm · mol (ALBERSHEIM, 1966).

A atividade de pectato liase (PAL) foi determinada pelo monitoramento espectrofotométrico da formação de produtos insaturados (p. i.), a partir de ácido poligalacturônico (PGA), a 230 nm, em espectrofotômetro Hitachi modelo

U-1100. A mistura de reação padrão foi constituída de 3,0 mL de ácido poligalacturônico Sigma, 1,0% (p/v) em tampão Tris/ HCl 0,1 M, pH 9,5 e 0,5 mL da amostra enzimática, ambos a 40°C. Alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 40 min de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 N, para paralisar a reação. Uma unidade relativa de atividade de PAL (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1,0 micromol de produtos insaturados por miligrama de proteína por minuto, utilizando para o cálculo o coeficiente de absorção molar para o produto insaturado, como sendo de 5.200 L/ cm · mol (MORAN et al., 1968).

A atividade de poligalacturonase (PG) foi determinada a 540 nm, em espectrofotômetro Hitachi modelo U-1100, usando ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959) e D(+) ácido galacturônico Sigma como padrão. A mistura de reação foi constituída de 0,5 mL da amostra enzimática da cultura e 2,0 mL de uma solução de ácido poligalacturônico Sigma, numa concentração final de 1,0% (p/v), preparada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e NaCl 0,1 M. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas após 0 e 20 min de incubação e adicionadas à mistura de 1,0 mL de DNS. Uma unidade relativa de atividade de PG foi definida como micromoles de ácido galacturônico liberados por miligrama de proteína por minuto de reação.

A atividade de pectinesterase (PE) foi determinada, por meio de titulação com NaOH 0,05 N. O método baseia-se na determinação de grupos ácidos, por NaOH, liberados pela ação da enzima, usando-se o indicador de pH vermelho de metila (FORSTER e RASCHED, 1985). A mistura de reação foi constituída de 2,0 mL de substrato e 1,0 mL de sobrenadante ou células. O tratamento controle da reação foi a mesma amostra enzimática, submetida à fervura, durante cinco minutos, antes de ser adicionada ao substrato. O mesmo processo de fervura foi utilizado para paralisar a reação, que foi conduzida durante três horas a 40°C. O substrato foi preparado pela homogeneização de pectina cítrica Sigma 1,4% (p/ v), em uma solução de MgCl₂ 0,5 g/ L, sendo o pH ajustado para 4,5 com a adição de NaOH 2 N. A unidade relativa de atividade de PE foi definida como a quantidade de enzima por mililitro do sobrenadante da cultura que promova a

liberação de 1,0 micromol de grupo carboxílico na mistura de reação, por miligrama de proteína por minuto (REXOVÁ-BENKOVÁ e MARKOVIC, 1976).

Para a determinação das atividades de proteases, foi utilizado o método proposto por CHARNEY e TOMARELLI (1947), com azocazeína como substrato. A um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de amostra enzimática, foi adicionado 0,5 mL da amostra de azocazeína a 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0. O tubo foi incubado em banho-maria, a 37°C, por 90 min, sem agitação. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v), gelado, e o tubo contendo a mistura de reação foi mantido em banho de gelo. A mistura foi centrifugada por 10 min, a 4.000 g, 25°C, em centrífuga Fisher Scientist Marathon Micro A. Uma alíquota de 1,0 ml do sobrenadante foi adicionada a 1,0 mL de KOH 5 N para o desenvolvimento de cor. A absorvância foi determinada espectrofotometricamente no Hitachi modelo U-1100, a 428 nm. Uma unidade relativa de atividade de protease (U) foi expressa como absorvância a 428 nm por miligrama de proteína por minuto.

A amilase foi detectada por meio de reação entre 2,0 mL de substrato, constituído de amido a 1% (p/v), e de 0,5 mL de amostra enzimática, em pH 4,8 (β -amilase) e temperatura de 40°C por cinco minutos, segundo BERNFELD, 1955. A glicose foi medida pelo método colorimétrico do sistema glicose-peroxidase-GOD PAP Merck, com solução de glicose Sigma como substrato para a curva padrão. O volume de 10 μ L da mistura de reação foi adicionado a 1,0 mL de GOD PAP. A reação ocorreu a 37°C por 10 min, conforme recomendações do fabricante, e em seguida analisada a absorvância do complexo de cor formado pela utilização do espectrofotômetro Hitachi modelo U-1100, a 500 nm. Uma unidade relativa de atividade de amilase (U) foi expressa como micrograma de glicose liberada por miligrama de proteína por minuto de reação.

3.6. Detecção das pectinases de *Klebsiella oxytoca*

A *K. oxytoca* foi cultivada em 1,0 L de meio MMP, contido em frasco Erlenmeyer de 2,8 L, à temperatura de 25°C, em BOD MA415 Marconi, sem agitação. Após 24 horas de crescimento, foram feitas as dosagens de atividade das

diferentes pectinases, às temperaturas de 25°C e 40°C, no sobrenadante do meio de crescimento ou nas células íntegras, obtidos por centrifugação a 9.000 g por 10 min, a 25°C, bem como no periplasma, nos esferoplastos, no sobrenadante das células rompidas e no sedimento.

Em um segundo experimento, a localização da pectato liase na célula foi estudada, nas mesmas condições de cultivo das células, descritas acima, porém, com a extração do periplasma efetuada sem a adição de EDTA, em virtude, provavelmente, da inibição da enzima por este composto complexante. O periplasma foi dialisado (3 trocas de 20 volumes) anteriormente à análise de PAL. Medidas de atuação enzimática sobre o ácido poligalacturônico foram tomadas também no sobrenadante do crescimento, nas células íntegras, nos esferoplastos, no sobrenadante das células lisadas e no sedimento.

3.7. Ensaios preliminares à caracterização da pectato liase

A medida de atividade de PAL foi realizada na suspensão de células rompidas e nas duas frações obtidas após centrifugação da suspensão a 9.000 g por 10 min, a 4°C, ou seja, o sobrenadante e o sedimento da suspensão de células lisadas foram utilizados na determinação de PAL, em ensaio preliminar.

A verificação do efeito da centrifugação por 10 min, a 4.000 g e 25°C da mistura de reação paralisada em HCl, proveniente do ensaio de dosagem da atividade de PAL, foi analisada por meio de realização das leituras de absorvância a 235 nm.

O tempo de reação utilizado para a caracterização da PAL foi padronizado como o de 40 minutos, por existir uma relação linear entre o tempo de reação e a formação dos uronídeos, durante as duas primeiras horas da degradação do ácido poligalacturônico.

O efeito do banho de gelo sobre a atividade da enzima foi determinado por meio de medidas de atividade, a cada 30 min, desde o momento final de rompimento das células até o tempo de cinco horas de permanência da suspensão de células rompidas em banho de gelo.

A atividade de proteases presentes na suspensão de células rompidas foi determinada pela utilização de azocaseína como substrato. As atividades de pectato liase e de proteases foram determinadas nas células rompidas, em reação a 40°C por um período de três horas. A atividade de protease também foi determinada à temperatura de 25°C.

3.8. Caracterização da pectato liase

As células utilizadas nos experimentos de caracterização da enzima foram resultantes do crescimento em 1,0 L de meio MMP, contido em frascos Erlenmeyer de 2,8 L, por 24 horas a 25°C em BOD MA415 Marconi, sem agitação.

3.8.1. Efeito do tempo de estocagem e descongelamentos sucessivos

Para o estudo do efeito do tempo de estocagem e resistência ao congelamento e descongelamentos sucessivos, a suspensão de células rompidas foi submetida ao congelamento a -18°C em um frasco e em vários outros tubos Eppendorfs. A amostra enzimática contida no frasco foi descongelada para as análises periódicas e recongelada em seguida. Cada amostra enzimática contida em tubo Eppendorf foi descongelada somente no momento de análise e descartada. As dosagens de pectato liase foram realizadas por um período de nove meses.

3.8.2. Análise de especificidade sobre vários substratos pécticos

A análise de especificidade de PAL sobre quatro substratos tais como o ácido poligalacturônico Sigma, a pectina cítrica Sigma de alta (90%) e baixa (cerca de 9,5%) esterificação e a pectina de maçã Sigma, todos a uma concentração final de 1,0% (p/ v) na mistura de reação, à temperatura de 40°C, por 40 min, foi determinada na suspensão de células rompidas.

3.8.3. Verificação da estabilidade térmica

O estudo da estabilidade térmica da enzima foi realizado na suspensão de células rompidas incubadas às temperaturas entre 20 e 60°C, por uma hora. As temperaturas escolhidas para a incubação foram as de 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C e o método padrão de dosagem de PAL foi adotado, a 40°C, por 40 min, para a verificação da taxa de produtos formados.

3.8.4. Determinação da temperatura ótima de atividade

A determinação da temperatura de maior taxa de formação dos produtos insaturados foi efetuada por meio de incubação das misturas de reação compostas por 0,5 mL de suspensão de células rompidas e 3,0 mL de substrato, separadamente, em diferentes temperaturas do intervalo de 20 a 60°C. As análises enzimáticas de PAL das células rompidas seguiram o método padrão de análise, com alteração apenas da temperatura de incubação, escolhidas como as de 16, 22, 30, 35, 40, 45, 50 e 56°C.

3.8.5. Determinação do pH ótimo de atividade

Para a determinação do pH de maior taxa de formação dos produtos insaturados pela enzima, foi efetuada uma solubilização do substrato PGA, em diferentes soluções tampões e o pH corrigido para valores distintos. As soluções tampões utilizadas foram: acetato de sódio (pH 4,1, 4,5, 5,1, e 5,8), solução de acetato de sódio/ KH_2PO_4 / Tris (pH 6,4, 6,7, 7,0 e 7,4) e Tris-HCl (pH 7,7, 8,2, 8,6, 9,1, 9,4, 9,6 e 10,0), cada componente a uma concentração de 50 mM. As análises enzimáticas de PAL das células rompidas seguiram o método padrão de análise, com alteração apenas do pH das misturas de reação.

3.8.6. Determinação da constante de Michaelis-Menten, K_m

A constante K_m foi determinada por meio da dosagem da atividade de PAL da suspensão das células rompidas em concentrações finais de substrato, variando de 0 até 2,0% (p/v). As análises enzimáticas seguiram o método padrão de análise, com alteração apenas na concentração do substrato nas misturas de reação. Os valores de K_m e da velocidade máxima de reação (V_{max}) foram obtidos pela utilização do programa SAS - Statistical, pela análise de regressão não-linear (SAS INSTITUTE, INC., 1985), pelo método do duplo recíproco, com análise de regressão linear (LEHNINGER et al., 1995) e também segundo o método de CORNISH – BOWDEN e EISENTHAL, 1978, que elimina o erro do tipo Bias.

3.8.7. Análise do efeito de EDTA e de íons bivalentes na atividade de PAL

O efeito do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) nas medidas de atividade de PAL das células rompidas foi verificado pela sua adição na mistura de reação e análise posterior das taxas de produtos formados. A cada tubo de ensaio contendo uma mistura de reação, foram tomadas alíquotas de 0,5 mL a cada cinco minutos, como rotineiramente realizado pelo método padrão de dosagem, até o tempo de 14 min de reação, quando foi adicionado o EDTA a uma concentração de 20 mM. Essas alíquotas de 0,5 mL, necessárias para a dosagem dos produtos formados, continuaram a ser tomadas até o tempo de 29 minutos, quando $MgSO_4$ e $CaCl_2$ foram adicionados, separadamente, em concentração superior à do EDTA, de 40 mM, para análise do efeito de indução da atividade de PAL por dois diferentes íons bivalentes. O ensaio enzimático foi realizado por um tempo total de 50 minutos de reação.

3.9. Fracionamento da pectina e indução de pectinases

A pectina cítrica Sigma foi submetida a fracionamento, por diferentes métodos, e as frações obtidas foram utilizadas como única fonte de carbono, em meio mineral, para o crescimento de *Klebsiella oxytoca*.

3.9.1. Ultrafiltração de solução de pectina em Amicon CH2R

Uma solução de 2,0 L pectina Sigma 0,75% (p/ v) foi ultrafiltrada em membrana de 3.000 ou 30.000 Da, até a obtenção de um volume de 1,0 L, na coluna do ultrafiltrador (DLAMINI e PEIRIS, 1997). As amostras dos dois filtrados foram utilizadas para a determinação da massa seca. As quatro diferentes frações obtidas (maiores e menores do que 3.000 e 30.000 Da) foram utilizadas como fontes de carbono, individualmente, em meio mineral, para o cultivo da bactéria. As concentrações de pectina das frações maiores que 3.000 e 30.000 Da foram diluídas para a final de 0,28% (p/ v) do meio de cultivo. A *K. oxytoca* foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 2,8 L com 1,0 L de meio, por 48 horas, a 25°C em BOD MA415 Marconi, sem agitação. O meio de crescimento não foi esterilizado.

3.9.2. Difusão de solução de pectina por membrana de diálise

A *K. oxytoca* foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 2,8 L com 1,0 L de meio mineral, contendo uma membrana de diálise de 2.000 Da, ou duas de 12-14.000 Da, com 100 mL de solução de pectina Sigma a 1,4% (p/ v), em seu interior. As cadeias menores que o diâmetro dos poros das membranas foram difundidas para o meio mineral, sendo utilizadas como fonte de carbono pela bactéria. O meio de cultivo não foi esterilizado e o crescimento ocorreu por 48 horas, a 25°C em BOD MA415 Marconi, sem agitação.

3.9.3. Contenção de solução de pectina em membranas de diálise

Volumes de 100 mL de pectina Sigma, obtidos de parte da solução ultrafiltrada em membrana de 30.000 Da foram colocados dentro de uma membrana de diálise de 2.000 Da, ou duas de 12-14.000 Da. A *K. oxytoca* foi

cultivada em frascos Erlenmeyer de 2,8 L com 1,0 L de meio mineral, juntamente com essas membranas, de acordo com o seu tamanho de poro, e que continham solução de pectina maior do que 30.000 Da como fonte única de carbono. O meio de cultivo não foi esterilizado e o crescimento ocorreu por 96 horas a 25°C em BOD MA415 Marconi, sem agitação.

Em outro experimento, volumes de 100 mL de pectina cítrica Sigma 1,4% (p/ v) foram colocados dentro de uma membrana de 2.000 Da ou duas de 12-14.000 Da e os volumes dialisados em água destilada por três trocas de 2,0 L. Em seguida, as membranas com pectina foram autoclavadas submersas em 2,0 L de água. Após esse tratamento, cada membrana de determinada porosidade foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 2,8 L, contendo 1,0 L de meio mineral, devidamente esterilizado. A *K. oxytoca* foi cultivada nesse meio com a pectina no interior das membranas como única fonte de carbono, por 48 horas, a 25°C em BOD MA415 Marconi, sem agitação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do crescimento

A bactéria *Klebsiella oxytoca* mostrou um rápido crescimento, com tempo de geração de 60 min, em meio mineral, com pectina cítrica Sigma 0,28% (p/ v) como fonte única de carbono (meio MMP), à temperatura de 25°C e pH 7,0 (Figura 1). A pectina foi escolhida por ser abundante no fruto de café e a temperatura de 25°C por ser próxima a do ambiente. O pH de frutos de café pode variar de 5,4 a 6,4 (DOYLE et al., 1997). A pectina não foi hidrolisada na autoclavagem do meio (resultado não-mostrado), o que confirma resultados já descritos (OCHUBA et al., 1980).

A *K. oxytoca* fixadora de nitrogênio, isolada de raízes de trigo, também revelou crescimento rápido (10^8 células/ mL em 24 horas), em meio Hino-Wilson, contendo extrato de levedura (CAKMAKCI et al., 1981). Essa bactéria foi capaz de hidrolisar pectina, porém não hidrolisou o amido, ao contrário da *K. oxytoca* isolada de frutos de café (Quadro 9), que apresentou a característica de hidrolisar as duas fontes de carbono, pectina e amido.

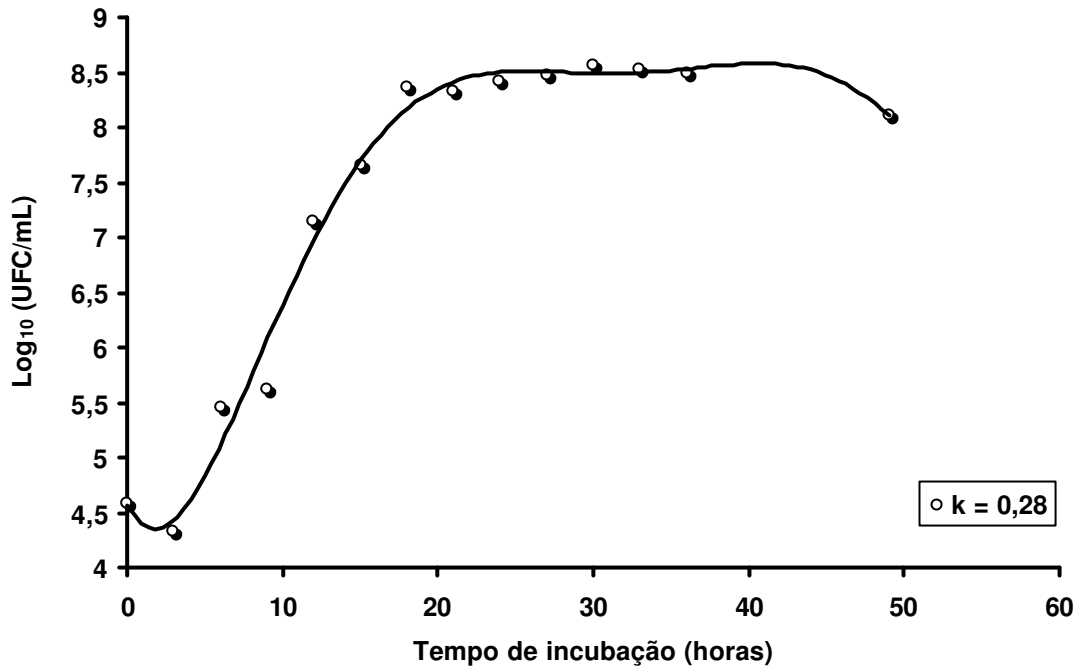


Figura 1 - Crescimento de *Klebsiella oxytoca* em 100 mL de meio MMP, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, pH 7,0, sem agitação e a 25°C.

A melhor temperatura de crescimento encontrada para a bactéria foi considerada como a de 37°C, em razão da maior densidade populacional ao final de 24 horas de crescimento (Figura 2). As taxas de crescimento às temperaturas de 25°C e 30°C não diferiram de forma expressiva, talvez pelo fato de ter sido isolada do meio ambiente. A temperatura ótima de crescimento de 37°C também foi encontrada nos trabalhos com *K. oxytoca* fixadora de nitrogênio isolada de raízes de trigo (CAKMAKCI et al., 1981).

A temperatura de crescimento de 25°C foi a utilizada para *Klebsiella* nos trabalhos de PISHCHIK et al.(1998), e de VAN PEE e CASTELEIN (1972), a temperatura de 28°C em HAAHTELA et al.(1986), e a de 37°C nos trabalhos de DAVIS e EWING (1964), e de OCHUBA et al. (1980). A temperatura de crescimento escolhida para o cultivo de *Klebsiella oxytoca* em CAO et al. (1997), foi de 25°C, enquanto 28°C foi a utilizada por DLAMINI e PEIRIS (1997), a de 30°C em ZIMMER et al. (1994) e BOTHAST et al. (1994), e a de 37°C nos trabalhos de EITEMAN e MILLER (1995).

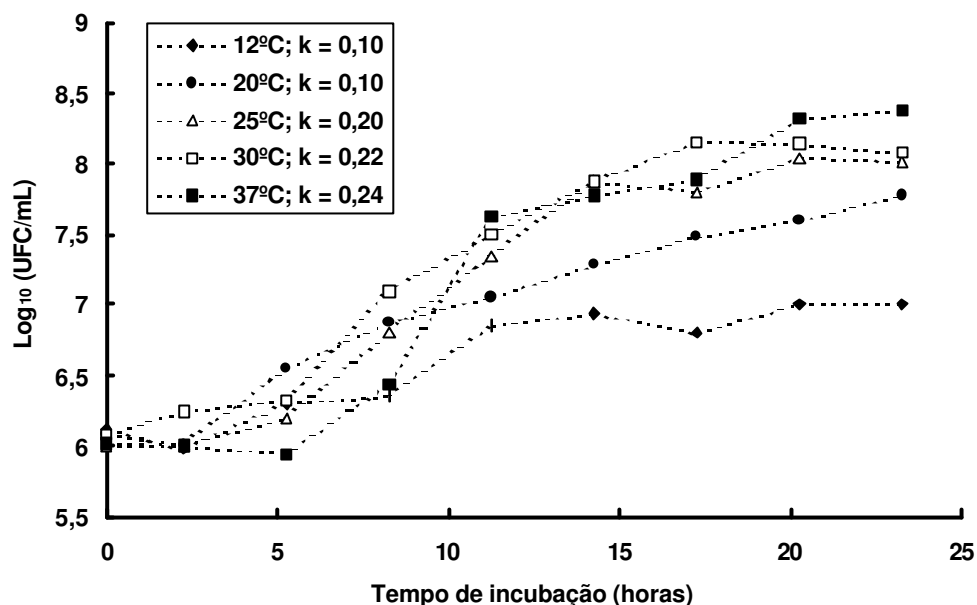


Figura 2 - Crescimento de *Klebsiella oxytoca* em 100 mL de meio MMP, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, pH 7,0, sem agitação, às temperaturas entre 12 e 37°C.

A taxa de crescimento da *K. oxytoca*, sob agitação, em meio MMP, não diferiu significativamente daquela obtida sem a agitação, nas primeiras 15 horas de crescimento (Figura 3), demonstrando que o crescimento não foi limitado pelo oxigênio presente no meio líquido de crescimento.

O meio de cultura mineral com a pectina cítrica, em concentrações maiores que 0,19% (p/v), com $k = 0,38$, não limitou a taxa de crescimento da *K. oxytoca*, durante as 12 horas iniciais e suportou populações próximas a 10^9 UFC/ mL na cultura (Figura 4). No período de 30 horas de incubação, a concentração da pectina não-consumida nos meios contendo concentrações iniciais de 0,23% ou 0,28% (p/ v) dessa fonte de carbono foi similar (Figura 5). Ao mesmo tempo, é ressaltado que 99% da pectina inicial não foi consumida no meio contendo 0,23% (p/ v) de pectina e 84% da pectina inicial não foi consumida, quando a concentração foi de 0,28% (p/ v) de pectina (Figura 5). Nas concentrações limitantes de crescimento, em concentrações iniciais de pectina cítrica Sigma de 0,02% e 0,05% (p/ v), apenas 50% do substrato foi degradado, mostrando que, possivelmente, a parte metoxilada da pectina não foi consumida.

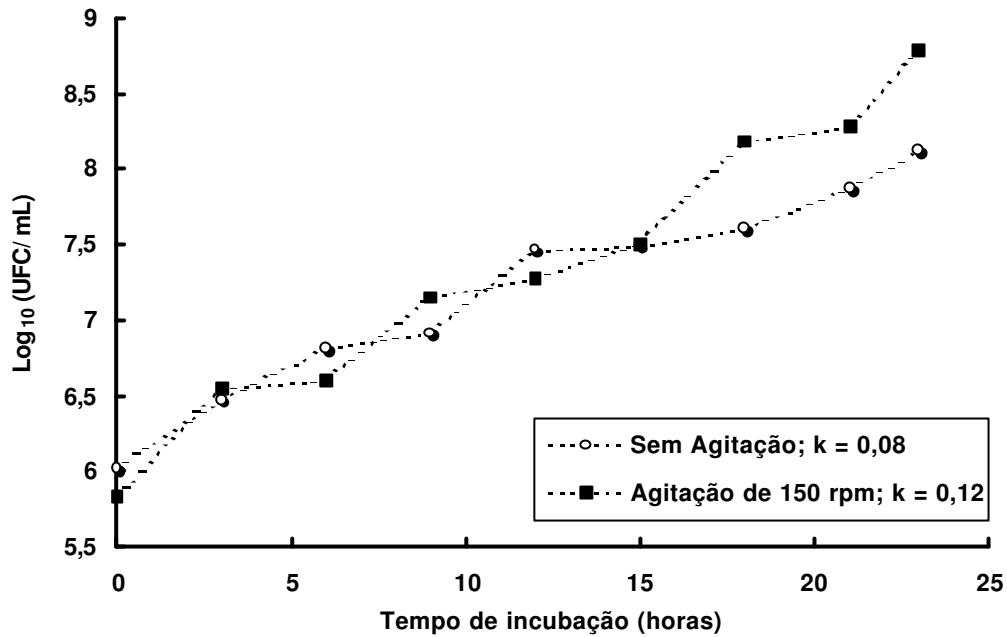


Figura 3 - Crescimento de *Klebsiella oxytoca* em 100 mL de meio MMP, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, pH 7,0, 25°C, com ou sem a agitação rotatória de 150 rpm.

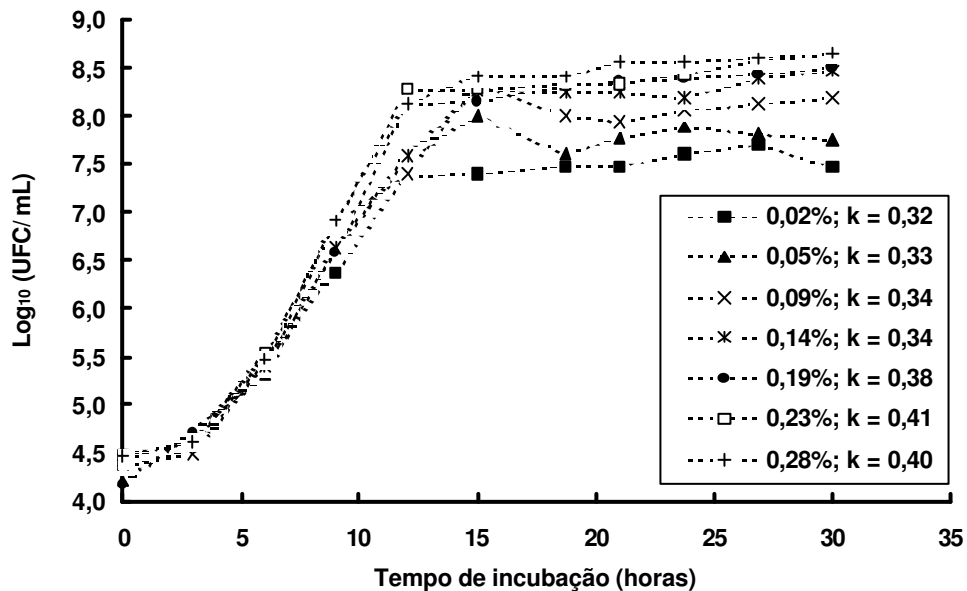


Figura 4 - Crescimento de *Klebsiella oxytoca* em 100 mL de meio mineral, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, acrescidos de pectina cítrica Sigma em concentrações entre 0,02 e 0,28% (p/v), como fonte de carbono, pH 7,0, sem agitação e a 25°C.

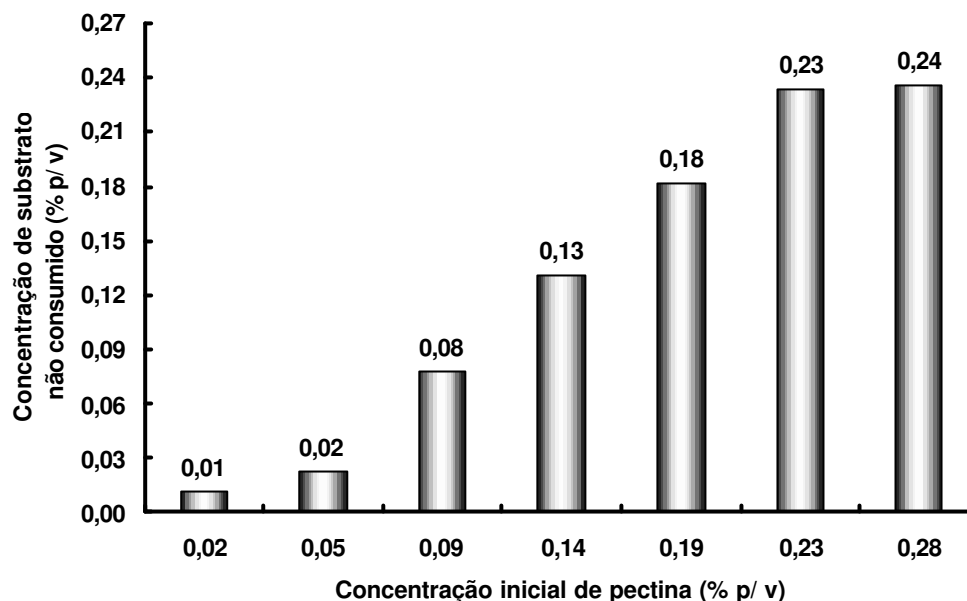


Figura 5 - Concentração de substrato não-consumido (mostrado pelas barras) ao final de cada crescimento de 30 horas de *K. oxytoca*, cultivada em 100 mL de meio, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com diferentes concentrações de pectina cítrica Sigma como fonte de carbono, pH 7,0, sem agitação e a 25°C.

A análise do cultivo de *K. oxytoca*, em meio MMP isentado de fonte de nitrogênio, revelou que o crescimento no meio adicionado de sulfato de amônio 1,0 g/L ocorreu sem a fase lag evidenciada nas primeiras seis horas de incubação, no meio MMP sem sulfato de amônio (Figura 6). Embora as taxas de crescimento nessa primeira fase tenham sido distintas, pouco diferiram quanto às populações nos períodos subseqüentes, até o final do tempo de incubação (Figura 6). A análise do nitrogênio total da pectina cítrica Sigma utilizada revelou, em único ensaio em triplicata, que o teor de nitrogênio desse composto correspondeu a 0,25% (p/ p).

A característica de utilização do nitrato como fonte de nitrogênio não foi determinada para a *K. oxytoca* isolada de frutos de café. Entre as bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas, apenas *Azotobacter paspali* (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988) e *Bacillus azotofixans* (Seldin et al., 1984, citados por CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988) mostraram não possuir nitrato redutase.

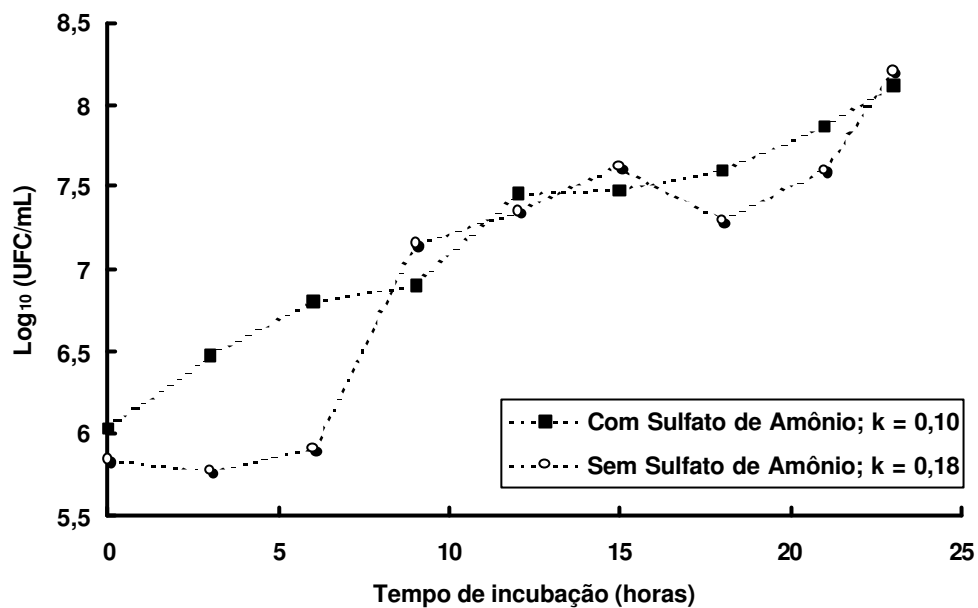


Figura 6 - Crescimento de *Klebsiella oxytoca* em 100 mL de meio MMP, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, pH 7,0, sem agitação, a 25°C, na presença e na ausência de sulfato de amônio 1g/L no meio de cultivo.

Na verificação do crescimento de *K. oxytoca* no meio MMP sob condições de anaerobiose, com adição ou não de fonte de nitrogênio, os resultados mostraram que houve diferenças mínimas nas taxas de crescimento, durante as 30 horas de incubação (Figura 7). As análises de fermentação, como a produção de ácidos após o crescimento, não foram realizadas.

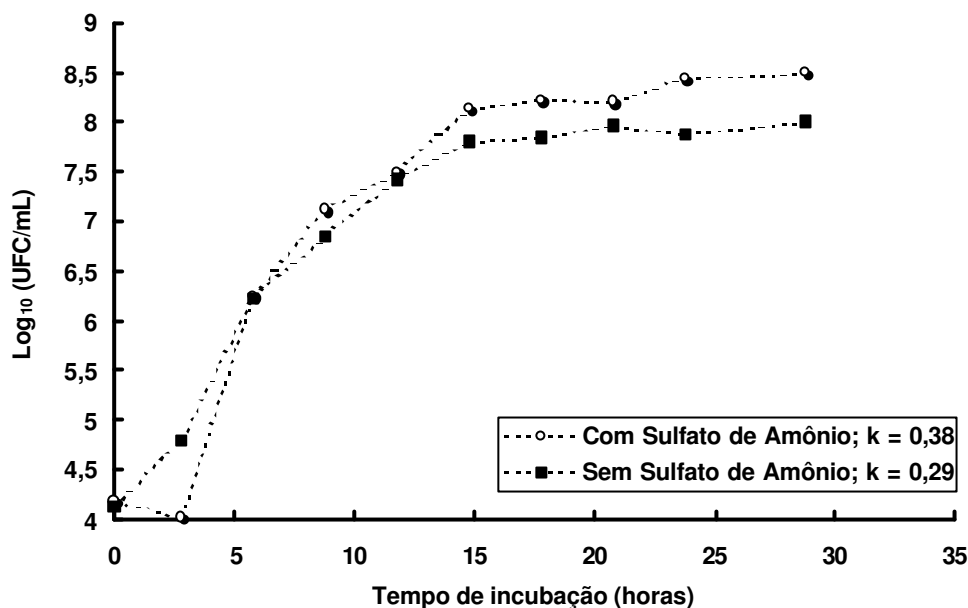


Figura 7 - Crescimento de *Klebsiella oxytoca* em anaerobiose, com 400 mL de meio MMP, contidos em fermentadores de bancada, pH 7,0, sem agitação, a 25°C, na presença e na ausência de sulfato de amônio 1g/ L no meio de cultivo.

4.2. Detecção da pectinase de *Klebsiella oxytoca*

A *K. oxytoca* isolada de frutos de café demonstrou ser capaz de utilizar a pectina como única fonte de carbono, porém, as dosagens de pectinases no sobrenadante do crescimento e em células centrifugadas íntegras, nas diversas temperaturas, pHs e tempos de reação, não demonstraram a presença de enzimas pectinolíticas, nem mesmo quando as células foram submetidas a um choque térmico ou o magnésio foi adicionado na mistura de reação.

A permeabilização das células de *K. oxytoca* com tolueno também não resultou em detecção de atividade de pectinases, bem como a lavagem das células e a reação sem fosfato. A adição de azida ao meio MMP, após 24 horas de crescimento e a dosagem das pectinases 24 horas, depois da adição de azida de sódio, para verificar se o acúmulo de produtos de reação das pectinases poderiam ser secretados da célula, não obteve sucesso. A azida inibe o crescimento das células mas não altera a atividade de pectinases. O crescimento da bactéria em

meio contendo poligalacturonato como fonte de carbono, também não indicou a presença de pectinases, nas frações celulares já referidas.

A demonstração da atividade de enzimas pectinolíticas somente ocorreu quando foi utilizada a técnica de rompimento das células (Quadro 1). A presença de pectato liase (PAL) intracelular com índice expressivo de atividade ocorreu apenas no sobrenadante das células rompidas (Quadro 1). As atividades de pectinesterase (PE) e de poligalacturonase (PG) não foram detectadas (resultados não-mostrados). A PAL extracelular purificada de *Clostridium multifementans* também exibiu atividade sobre pectina ainda que PE não estivesse presente (MACMILLAN e VAUGHN, 1964).

Quadro 1 - Atividades de PAL e PL tomadas a 40°C (maiores atividades encontradas), medidas no sobrenadante do crescimento e nas várias porções isoladas das células de *Klebsiella oxytoca*. A bactéria foi cultivada por 24 horas em 1,0 L de meio MMP, contido em frasco Erlenmeyer de 2,8 L, pH 7,0, sem agitação e a 25°C

Localização da Atividade Enzimática	Atividade de Pectato liase (U)	Atividade de Pectina liase (U)
Sobrenadante da Cultura	0,37	0
Células Íntegras	0,11	0,13
Periplasma	0,54	0,11
Esferoplastos	0,05	0,10
Sobrenadante de células rompidas	3,09	0,20
Precipitado de células rompidas	0,35	0,11

A pectato liase já foi encontrada em espécies de *Erwinia* (*E. carotovora* em MORAN et al., 1968, *E. chrysanthemi* em TARDY et al., 1997, *E. atroseptica* em QUANTICK et al., 1983), em espécies de *Bacillus* (*B. pumillus* em DAVÉ e VAUGHN, 1971, *Bacillus* sp. em HASEGAWA e NAGEL, 1966, e *Bacillus*

polymyxa em NAGEL e VAUGHN, 1961), em *Clostridium multifermentans* (MACMILLAN e VAUGHN, 1964), em *Pseudomonas fluorescens* (LIAO et al., 1993) e *Xanthomonas campestris* (NASUNO e STARR, 1967), entre outras.

Nos casos de *Clostridium* e *Erwinia* (MORAN et al., 1968), a PAL atua a partir da extremidade do substrato (exo-PAL), clivando em moléculas de ácido digalacturônico a partir de extremidades redutoras (MACMILLAN, PHAFF, et al., 1964). Enzimas PAL secretadas no meio por *Bacillus*, *Erwinia* (TARDY, F., et al., 1997), *Xanthomonas* e *Pseudomonas* atuam ao acaso no ácido pécico, sendo chamadas endo-PAL (NAGEL e ANDERSON, 1965). Somente PAL foi detectada no fluido extracelular do cultivo de *B. pumilus* (DAVÉ e VAUGHN, 1971).

Em trabalho com *Erwinia*, MORAN et al.(1968) encontraram a PAL completamente livre de PE e PG, extra e intracelularmente, sendo, provavelmente, idêntica ou semelhante àquelas encontradas em outras bactérias. (MORAN et al., 1968). Atividade de PG também não foi detectado em preparações de *B. pumilus* (DAVÉ e VAUGHN, 1971).

4.3. Caracterização da pectato liase

A PAL presente na suspensão de células rompidas permaneceu sem perda de atividade em banho de gelo por cinco horas, tempo suficiente para a caracterização físico-química (Figura 8).

A determinação da atividade de proteases sobre azocaseína demonstrou que não houve atuação expressiva de proteases durante o período de três horas, a 40°C ou a 25°C (dados não-mostrados na Figura), o que, possivelmente, poderia diminuir a atividade de PAL na suspensão de células rompidas (Figura 9).

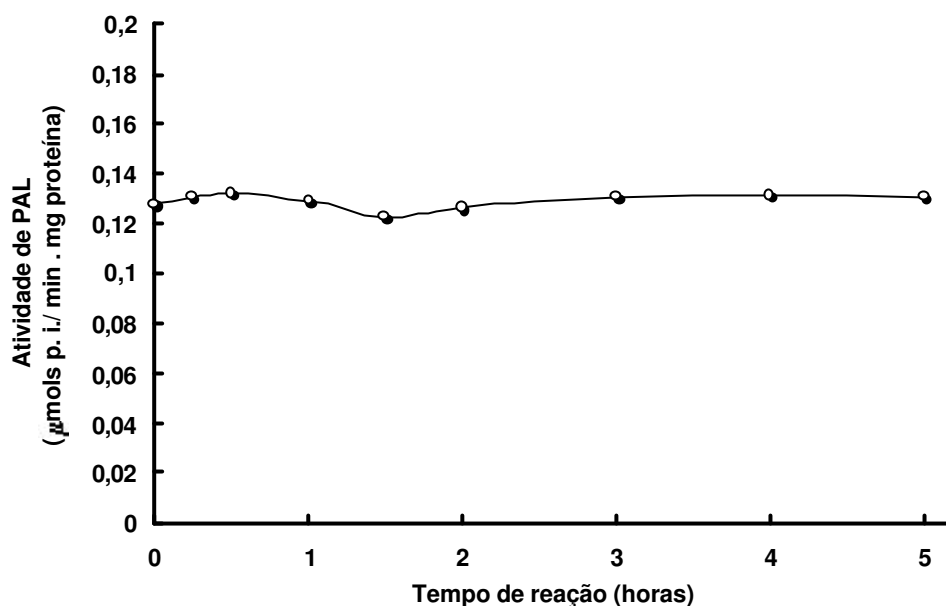


Figura 8 - Atividade de PAL de *Klebsiella oxytoca* em relação ao tempo de permanência em banho de gelo, após a lise celular. Análises foram feitas a 40°C em ácido poligalacturônico 1% (p/ v), Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM e MgSO₄ 4,2 mM, por 40 min.

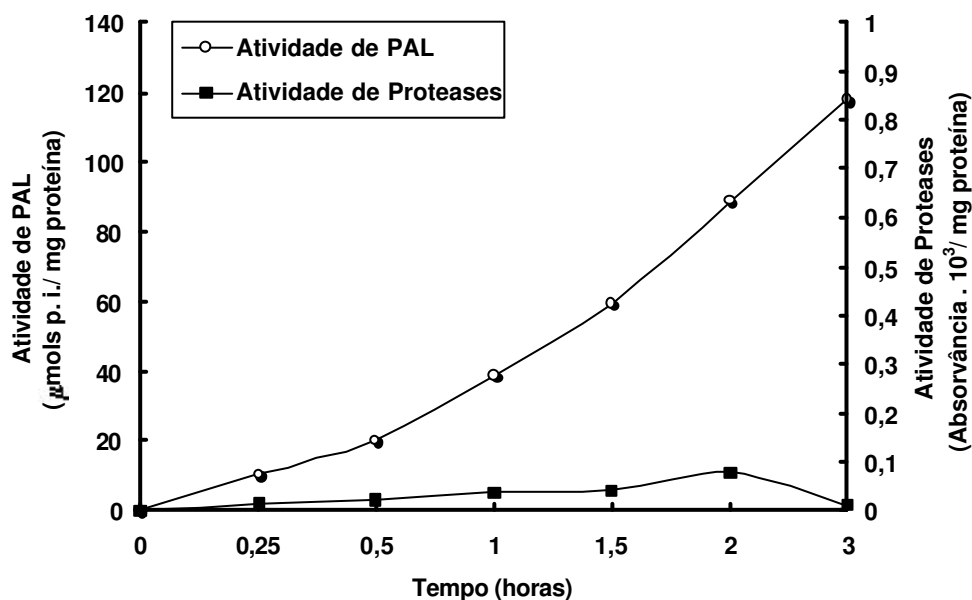


Figura 9 - Atividade de proteases da suspensão de células rompidas de *Klebsiella oxytoca* sobre azocaseína. A atividade de proteases foi realizada a 40°C, com azocazeína a 0,5% (p/ v) como substrato, em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0. As análises de pectato liase foram feitas a 40°C em ácido poligalacturônico 1% (p/v), Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM e MgSO₄ 4,2 mM, por três horas.

A pectato liase da *K. oxytoca* permaneceu estável após o período de estocagem de nove meses, à temperatura de -18°C . Não houve alterações na atividade de PAL, que sofreu descongelamentos sucessivos (sete vezes), durante esse período (Figura 10). A PAL intracelular parcialmente purificada de *Erwinia carotovora* perdeu 50% da atividade, quando estocada a 4°C , por seis dias, em contraste com a não-purificada, que manteve 80% da atividade, quando estocada nas mesmas condições por um mês (MORAN et al., 1968). As PALs extracelulares purificadas de *Xanthomonas campestris* (NASUNO e STARR, 1967) e *Erwinia carotovora* (MORAN et al., 1968) não perderam atividade após estocagem por três semanas a -20°C . Também, a isoenzima PALa extracelular purificada de *E. chrysanthemi* teve sua atividade reduzida pela metade, somente após três anos, a 4°C , revelando grande estabilidade (FAVEY et al., 1992).

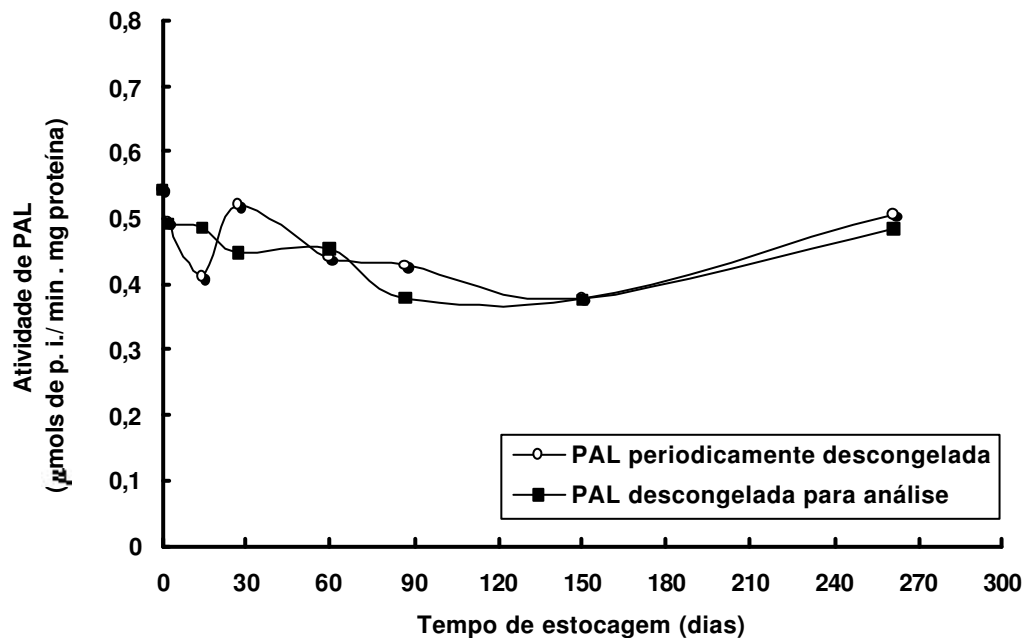


Figura 10 - Estabilidade de pectato liase de *Klebsiella oxytoca* a descongelamentos sucessivos e à estocagem a -18°C . Análises foram feitas a 40°C em ácido poligalacturônico 1% (p/ v), Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM e MgSO_4 4,2 mM por um período de nove meses.

A PAL desse isolado de *K. oxytoca*, assim como a de *Azospirillum*,

mostrou fraca capacidade de degradar o ácido poligalacturônico, com relação à apresentada por *Erwinia carotovora* (MORAN et al., 1968) e *Xanthomonas campestris* (NASUNO e STARR, 1967). Cerca de uma hora (muitas horas para *Azospirillum*) foi requerida para a mesma degradação alcançada por *Erwinia* e *Xanthomonas* em poucos minutos. Isso, aparentemente, resulta da diferença na quantidade de enzimas produzidas pelas espécies citadas. Os baixos níveis de PAL em *K. oxytoca* e *Azospirillum* podem contribuir para suas associações não-patogênicas com plantas, frutos e raízes, em contraste com a atividade patogênica de *Erwinia* (TIEN et al., 1981).

A taxa de formação de produto insaturado, resultante da atuação da enzima da *K. oxytoca* sobre o ácido poligalacturônico, revelada pelo aumento da absorvância a 230 nm, foi um pouco inferior (0,3 unidades de absorvância/20 min) à obtida por MACMILLAN e VAUGHN (1964) para *Clostridium multifermentans*, que foi de 0,4 unidades/20 minutos. Já para *Xanthomonas* patogênica, a relação foi de 1,3 unidades/5 minutos (NASUNO e STARR, 1967).

A atividade da enzima foi maior, quando em ácido poligalacturônico como substrato, que sobre pectina, uma característica que a identifica como sendo pectato liase (EC; 4.2.2) (Figura 11). A atuação dessa enzima é diminuída pela presença das metilações, como pode ser verificado pela sua atuação sobre pectina altamente esterificada, em que a atividade foi apenas 13% daquela obtida em ácido poligalacturônico (Figura 11).

Os trabalhos com a PAL intracelular parcialmente purificada de *Erwinia carotovora*, também revelaram que a extensão da degradação do substrato foi inversamente proporcional à extensão de desmetoxilação da molécula (MORAN et al., 1968), uma característica que é também de PAL de *Clostridium multifermentans* (MACMILLAN e VAUGHN, 1964) e *Xanthomonas campestris* (NASUNO e STARR, 1967). A PAL intracelular bruta de *Azospirillum* RO7 apresentou 54,7% de degradação sobre a pectina, comparando-se à atuação sobre ácido poligalacturônico, enquanto esse valor corresponde a 17% em *Azospirillum* SP7 (TIEN et al., 1981).

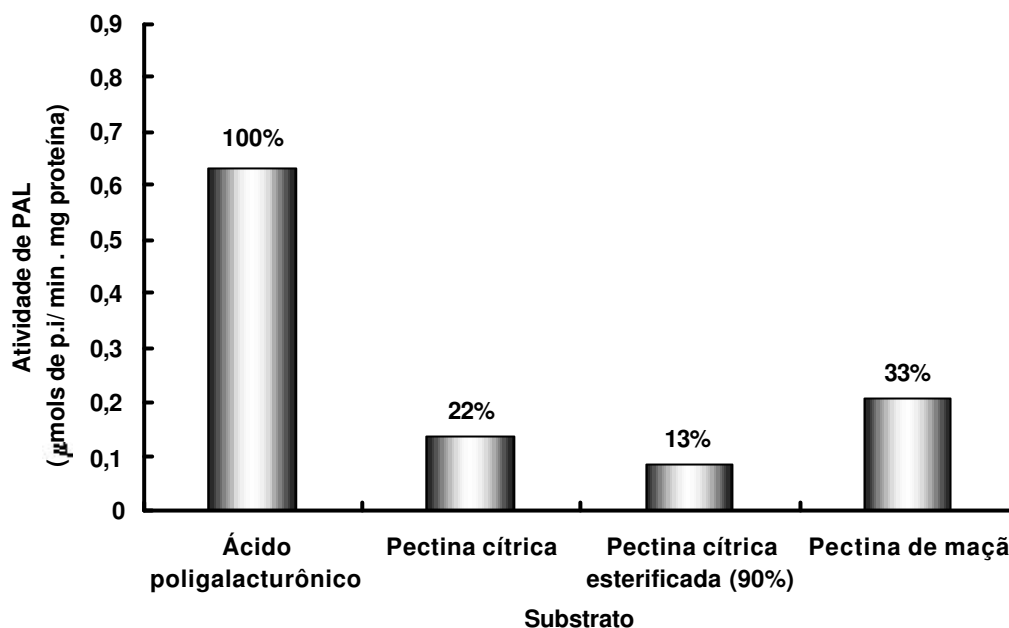


Figura 11 - Especificidade de pectato liase de *Klebsiella oxytoca* a diferentes substratos. Análises foram feitas a 40°C, por 40 min e pH 7,0. Índices revelam a porcentagem de atividade relacionada à atuação da enzima sobre ácido poligalacturônico.

A baixa atividade da PAL, quando o substrato foi a pectina altamente esterificada, é decorrente da presença de alguns grupos carboxílicos livres, uma indicação clara de que PAL é específica para composto não-esterificado.

A temperatura ótima para a atividade de PAL, nas condições padrões especificadas, foi estabelecida como sendo 40°C (Figura 12), uma vez que apresentou estabilidade a 40°C por 1 hora e 40 min, e perdeu quase a totalidade da atividade a 45°C. A temperatura ótima encontrada foi próxima a 45°C, obtida para a PAL de *B. polymyxa* (NAGEL e VAUGHN, 1961), porém menor que a encontrada para a PAL de *B. pumilus*, a 60°C (DAVÉ e VAUGHN, 1971).

A PAL extracelular purificada de *Thermonospora fusca* possuiu temperatura ótima de atividade a 60°C (STUTZENBERGER, 1987), enquanto a PAL extracelular purificada de *Xanthomonas campestris* atuou melhor a 45°C (NASUNO e STARR, 1967). Já as isoenzimas de PAL extracelulares purificadas de *E. chrysanthemi* foram mais ativas em torno de 50°C (FAVEY et al., 1992).

A PAL extracelular de *Fusarium oxysporum lycopersici* possuiu atividade

ótima à temperatura de 42°C (Di PIETRO e RONCERO, 1996). Parâmetros similares a esses foram encontrados em endo-PAL de *F. solani pisi* (CRAWFORD e KOLATTUKUDY, 1987), *F. oxysporum ciceris* (PÉREZ ARTÉS, e TENA, 1990), *Colletotrichum lindemithianum* (WIJESUNDERA et al., 1984) e *C. gloesporioides* (WATTAD et al., 1994).

A curva de estabilidade térmica demonstrou que em temperaturas acima da ótima para a atividade da PAL ocorre a desnaturação (Figura 12).

Curvas de inativação térmica similares foram obtidas para duas isoenzimas de PAL de *Erwinia atroseptica* (QUANTICK et al., 1983). A ocorrência de múltiplas formas de uma enzima pode constituir uma vantagem para o patógeno, pois algumas podem ser mais estáveis que outras.

O coeficiente térmico Q_{10} foi calculado para a PAL de *K. oxytoca*, como sendo 2,4 entre 20°C e 40°C, um valor superior ao de 1,7 encontrado para PAL de *Thermomonospora fusca*, entre 40°C e 60°C (STUTZENBERGER, 1987), apresentando um aumento maior na velocidade de reação, com um aumento de 10°C na temperatura, quando comparada com a PAL extracelular do fungo decompositor de matéria orgânica. Através da plotagem, segundo Arrhenius, foi estimada uma energia de ativação para a PAL de *K. oxytoca*, de 19,3 kcal/ mol. A energia de ativação de PAL de *Bacillus pumilus*, encontrada por DAVÉ e VAUGHN (1971), foi de 12,2 kcal/ mol e a de *Thermomonospora fusca*, de 10,7 kcal/ mol (STUTZENBERGER, 1987), ambos inferiores ao da PAL de *K. oxytoca*, revelando uma provável maior afinidade inicial pelo substrato, por esses microrganismos, com relação a *K. oxytoca*.

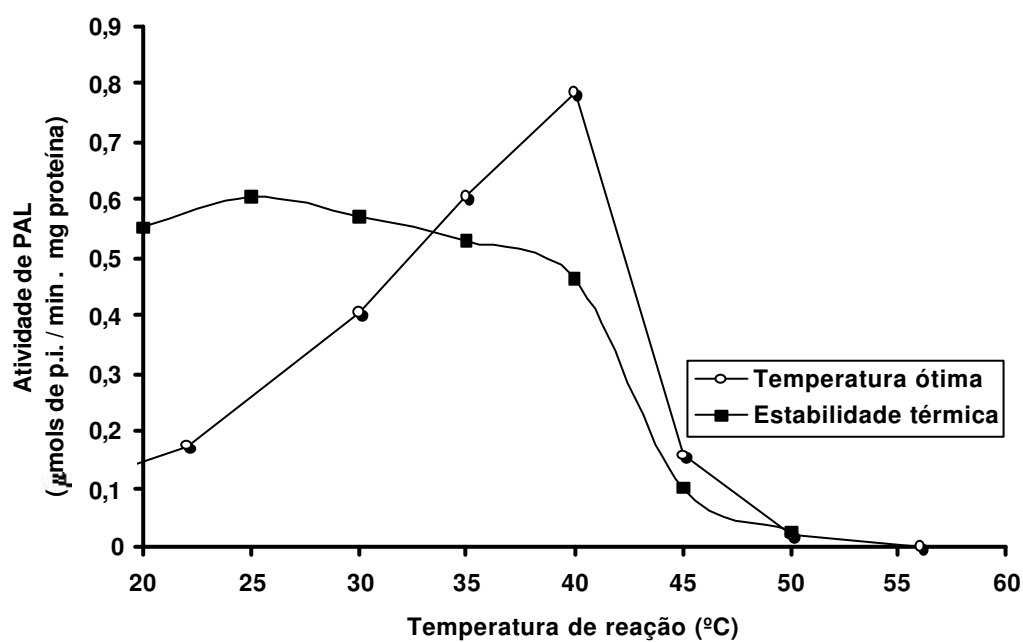


Figura 12 - Efeito da temperatura sobre a atividade de pectato liase de *Klebsiella oxytoca*. As análises foram feitas em várias temperaturas, em ácido poligalacturônico 1% (p/v), Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM e MgSO₄ 4,2 mM, por 40 min. A PAL também foi submetida a tratamento prévio de uma hora, a cada diferente temperatura, para análise de estabilidade térmica, após as dosagens enzimáticas.

O pH ótimo para a atividade de PAL da *K. oxytoca* variou de 8,6 a 9,4, porém, apresentou atividade em valores de pH menores do que 7,0 (Figura 13). A

possível ocorrência de isoformas dessa enzima não foi verificada. Essa variação é próxima à encontrada para a PAL de *C. multifementans* (MACMILLAN e VAUGHN, 1964). Para a PAL extracelular purificada de *Bacillus polymyxa*, foi requerido um pH do substrato entre 8,9 e 9,4 para a atividade ótima (NAGEL e VAUGHN, 1961), enquanto a PAL intracelular parcialmente purificada de *Erwinia carotovora* atuou de forma máxima em pH 8,5 (MORAN et al., 1968).

O valor de pH ótimo da PAL de *K. oxytoca* está próximo ao encontrado para PAL extracelular parcialmente purificada de *Bacillus pumilus*, ou seja, entre 8,0 e 8,5 (DAVÉ e VAUGHN, 1971). Entretanto, esse valor é um pouco menor que o encontrado para o pH ótimo de um *Bacillus* não-identificado, entre 9,3 e 9,7 (HASEGAWA e NAGEL, 1966). As três isoenzimas purificadas de PAL de *Erwinia atroseptica* foram similarmente afetadas pelo pH, com ótimo de 9,0 (QUANTICK et al., 1983). A PAL extracelular purificada de *Thermonospora fusca* possuiu pH ótimo de atividade em 10,5 (STUTZENBERGER, 1987), enquanto as isoformas de PAL extracelulares purificadas de *E. chrysanthemi* foram mais ativas em pH em torno de 8,5 (FAVEY et al., 1992).

A PAL extracelular purificada de *Xanthomonas campestris* atuou melhor em pH 9,5 e foi mais estável em pH entre 6,0 e 9,5 (NASUNO e STARR, 1967). O pH ótimo de atuação de PAL intracelular bruta de *Azospirillum* RO7 esteve entre 7,5 e 8,0 (TIEN et al., 1981), características similares às obtidas para *Yersinia* e *Klebsiella pneumoniae* (Chatterjee et al., 1978, citados por TIEN et al., 1981). De modo contrário, a PAL encontrada nos sobrenadantes de cultura de *Pseudomonas viridiflava* e *Cytophaga johnsonae* atuaram melhor em pH um pouco menos elevado que os dos microrganismos citados (LIAO, 1989).

A base bioquímica para o fato de que as PALs atuantes em pH ótimo mais elevado são mais efetivas na indução da maceração de tecidos que as atuantes em pH ótimo neutro ou ácido, não é conhecida e merece investigações.

A PAL extracelular de *Fusarium oxysporuns lycopersici* tem atividade ótima em substrato com pH final 9,0 (Di PIETRO e RONCERO, 1996).

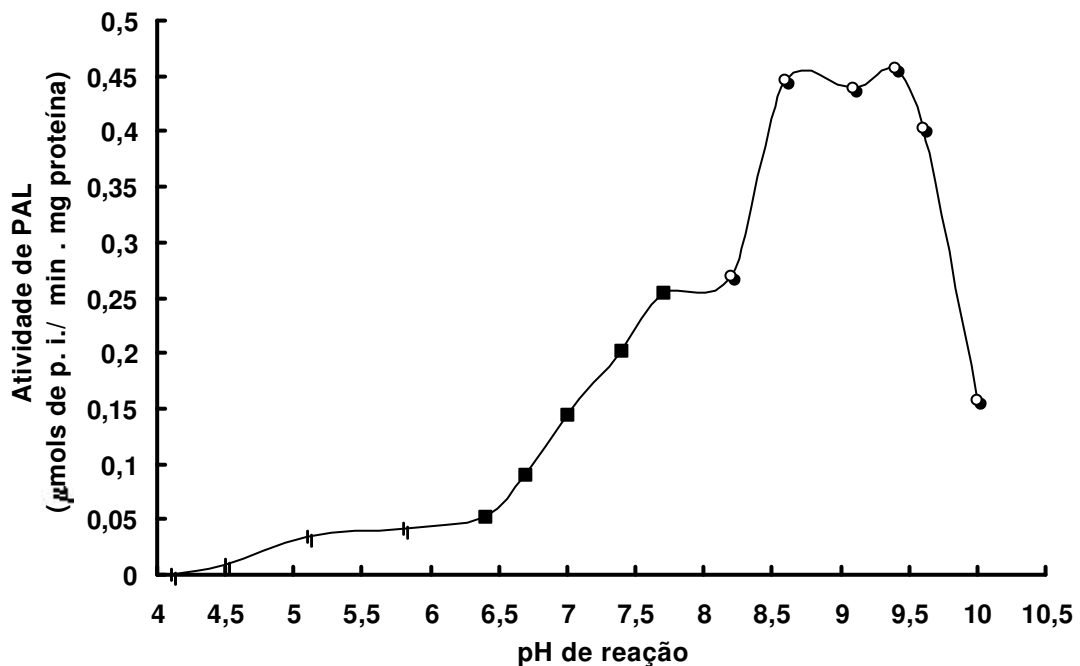


Figura 13 - Efeito do pH sobre a atividade de pectato liase de *Klebsiella oxytoca*. Análises foram feitas em diferentes pHs com substrato dissolvido nos seguintes tampões: Acetato de sódio (pH 4,0 a 5,5; —◇—), Acetato/ Fosfato/ Tris (pH 6,0 a 7,5; —■—) e Tris-HCl (pH 8,0 a 10,5; —○—), cada um a uma concentração de 50 mM. Análises seguiram sobre ácido poligalacturônico 1% (p/ v) contendo MgSO₄ 4,2 mM, a 40°C, por 40 min.

Parâmetros similares a esses foram encontrados em endo-PAL de *F. solani pisi* (CRAWFORD e KOLATTUKUDY, 1987), *F. oxysporum ciceris* (PÉREZ ARTÉS e TENA, 1990), *Colletotrichum lindemithianum* (WIJESUNDERA et al.,

1984) e *C. gloesporioides* (WATTAD et al., 1994), enquanto a PAL extracelular de *Cladosporium cucumerinum* possuiu atividade máxima em pH de 9,7 (ROBERTSEN, 1989).

A pequena liberação de grupos redutores por PAL de *K. oxytoca* isolada de frutos de café foi atribuída a ação transeliminativa. Essa suposição tem como base a observação de que a enzima produziu apenas uma pequena quantidade de grupos redutores a pH 4,8, suportando a sugestão de ausência de PG, que possui um índice ótimo de atividade ao redor de pH 5,0 (Figura 13).

Microrganismos de uma mesma espécie podem possuir poucas ou várias isoenzimas de PAL, com características também distintas como em trabalhos com *E. chrysanthemi* (BOCCARA et al., 1991). A ação combinada de enzimas (cinco isoenzimas de *E. chrysanthemi*, BARTLING et al., 1995), pode exibir ação sinérgica sobre as várias pectinas. A Figura 14 revela concentração de cerca de 0,8% (p/v) para saturação pelo substrato, nas condições padrões de dosagem.

A velocidade máxima de reação de PAL de *K. oxytoca* encontrada foi de 5,4 μ moles produto insaturado/min \cdot mg de proteína e o valor de Km foi de 4,5 mg/mL, segundo transformação de Lineweaver-Burk (Figura 14) ou pela análise de regressão não-linear do programa estatístico SAS. A determinação do valor de Km segundo método de CORNISH-BOWDEN e EISENTHAL (1978), que elimina o erro tipo Bias, foi de 3,36 (\pm 2,09) mg/mL, muito abaixo do primeiro valor encontrado e com alto desvio-padrão. O valor de Km de PAL de *K. oxytoca* foi assumido como o de 4,5 mg/mL e é superior ao encontrado por DAVÉ e VAUGHN (1971), para PAL extracelular, parcialmente purificada de *Bacillus pumilus*, cujo valor foi de 1,37 mg/mL.

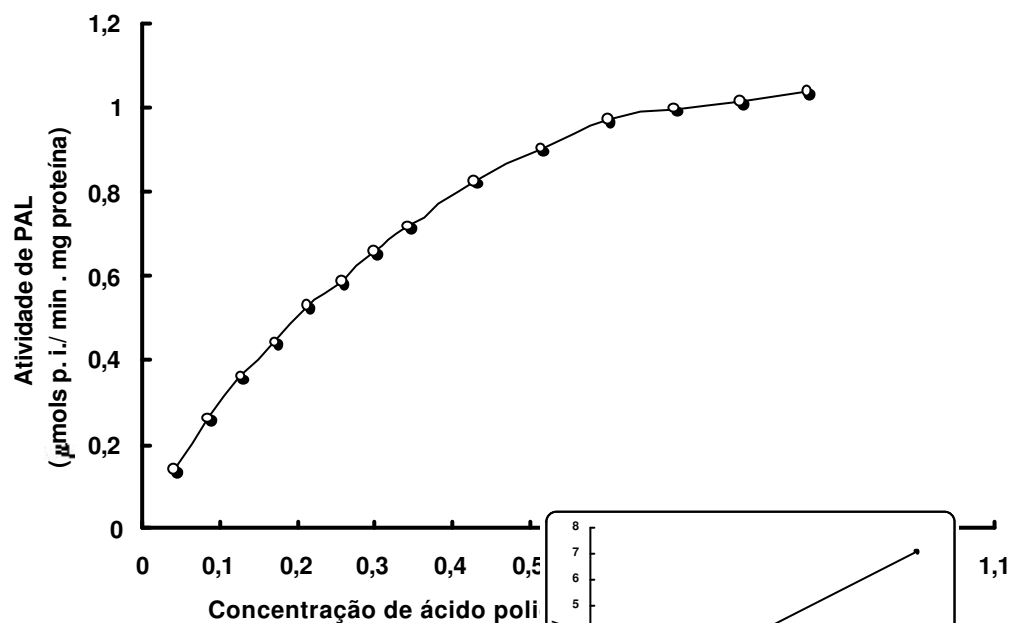


Figura 14 - Curva de saturação de pectinase pelo substrato. Análises de atividade em várias concentrações de ácido poligalacturônico em Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM e MgSO₄ 4,2 mM, por 40 min, a 40°C. Em escala reduzida, o duplo recíproco de Lineweaver-Burk, para o fornecimento dos valores de Vmax e Km.

O valor de Km da isoenzima PLAa de *E. chrysanthemi* foi de 0,43 mg/mL (FAVEY et al., 1992) e resultados similares a esses foram obtidos com outra isoenzima PALe de *E. chrysanthemi*, cujo valor foi de 0,42 mg/mL (TARDY et al., 1997). As três isoenzimas purificadas de PAL de *Erwinia atroseptica* possuíram Km em ácido poligalacturônico com valores de 0,075, 0,10 e

0,058 mg/mL (QUANTICK et al., 1983). Esses valores revelam que a PAL de *K. oxytoca* apresenta uma baixa afinidade pelo substrato, quando comparada com os outros microrganismos.

A adição de EDTA ao substrato de reação de PAL, na concentração de 20 mM, foi suficiente para a completa inativação da enzima, enquanto os cátions bivalentes Mg^{+2} e Ca^{+2} (50 mM) tiveram um papel reativador da atividade da enzima (Figura 15). O efeito de ativação do $MgSO_4$ foi maior que o do $CaCl_2$, ao contrário dos efeitos encontrados em PAL purificadas (MACMILLAN e VAUGHN, 1964; DAVÉ e VAUGHN, 1971; STUTZENBERGER, 1987; TARDY et al., 1997) ou não-purificadas (HASEGAWA e NAGEL, 1966; TIEN et al., 1981; LIAO et al., 1993), em que os autores mostram uma forte ativação do íon cálcio, apenas maior que outros cloretos de bivalentes.

A ativação promovida pelo cálcio, na PAL intracelular de *K. oxytoca*, foi semelhante à obtida por NAGEL e VAUGHN (1961), em trabalhos com *Bacillus polymyxa*. A PAL intracelular parcialmente purificada de *Erwinia carotovora* também mostrou completa inibição por EDTA e forte estímulo em reação com $CaCl_2$ (MORAN et al., 1968). A PAL extracelular de *Pseudomonas fluorescens* requereu cálcio para sua indução e maior atividade da enzima, sendo que o EDTA também exerceu efeito inibitório total (LIAO et al., 1993). A ativação da PAL de *Clostridium multif fermentans* por Ca^{+2} foi muito maior que a verificada para a *K. oxytoca* (Figura 15), embora seja também inibida por EDTA (MACMILLAN e VAUGHN, 1964).

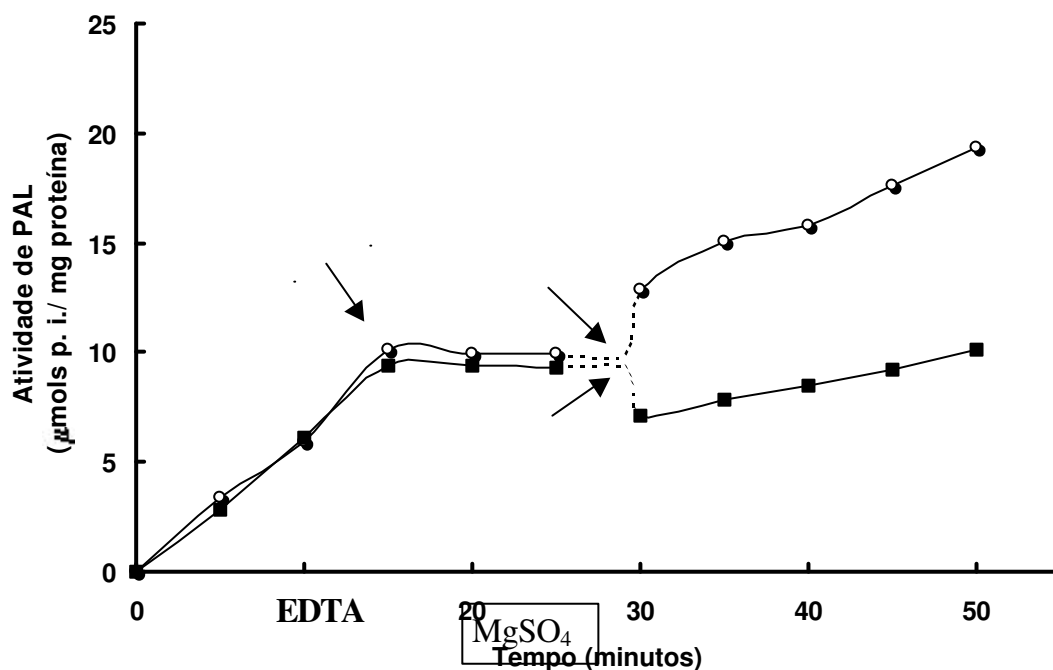


Figura 15 - Efeito de EDTA 20 mM e íons Ca^{+2} (—■—) e Mg^{+2} (—○—), cada um a uma concentração de 50 mM sobre a atividade de pectato liase de *Klebsiella oxytoca*. Análises foram feitas a 40°C em ácido poligalacturônico 1% (p/ v) contendo Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM e inicialmente MgSO_4 4,2 mM, por 50 min.

A atividade da PAL extracelular purificada de *Xanthomonas campestris* também foi completamente inibida por EDTA, sendo esta novamente recuperada pela adição de 1 mM de CaCl_2 , não sendo substituível por íons monovalentes (NASUNO e STARR, 1967). A PAL intracelular bruta de *Azospirillum* RO7 teve sua atividade aumentada por CaCl_2 , entretanto, este composto não foi absolutamente necessário para a atividade da enzima (TIEN et al., 1981). Essas

características são semelhantes às obtidas para *Yersinia* e *Klebsiella pneumoniae* (Chatterjee et al., 1981, citados por TIEN et al., 1981). As isoenzimas de PAL extracelulares purificadas de *E. chrysanthemi* foram mais ativas com Ca^{+2} , enquanto outros monovalentes não interferiram em suas atividades (FAVEY et al., 1992).

A PAL extracelular de *Fusarium oxysporum lycopersici* também foi inibida por EDTA e ativada com CaCl_2 (Di PIETRO e RONCERO, 1996). A PAL extracelular de *Cladosporium cucumerinum* possuiu atividade dependente de cálcio, à razão de 0,32 de íon cálcio por grupos carboxil de ácido poligalacturônico, não sendo repostos por outros cátions mono ou bivalentes (ROBERTSEN, 1989). Para *F. solani*, a razão foi de 0,24 (CRAWFORD e KOLATTUKUDY, 1987).

Os cátions bivalentes possuem uma forte afinidade pelos grupos carboxil do ácido poligalacturônico e também podem atuar como cofatores para a enzima. O polímero tende a possuir alguma forma de ligação iônica com os cátions, causando um efeito progressivo de redução das cargas negativas do substrato e, talvez, induzindo a ação transeliminativa sobre o mesmo (ROBERTSEN, 1989).

A análise do sobrenadante da cultura de *Klebsiella oxytoca* e das várias frações obtidas das células mostrou que a enzima está presente no interior da célula (2,62 $\mu\text{moles p. i./ min.} \cdot \text{mg proteína}$) (Quadro 2). O índice expressivo de atividade ocorreu apenas em pectato liase do sobrenadante das células rompidas. Contudo, em razão de a extração da enzima do periplasma ter sido feita sem a adição de um forte inativador da enzima, o EDTA, a eficiência do método de extração ficou prejudicada. Além disso, não foi verificada a possibilidade de o método resultar em lise de algumas células e se a sua eficiência, mesmo com EDTA, seria suficientemente alta, para que se pudessem detectar atividades mínimas de enzima periplasmática. Dessa forma, não foi descartada a possibilidade de a PAL extracelular ser uma enzima intracelular.

Quadro 2 - Atividade de pectato liase no sobrenadante do crescimento e nas várias

porções isoladas das células de *Klebsiella oxytoca*. A bactéria foi cultivada por 24 horas em 1,0 L de meio MMP contido em frasco Erlenmeyer de 2,8 L, pH 7,0, sem agitação, a 25°C. A metodologia de extração do periplasma foi realizada sem a adição de EDTA

Localização da Atividade Enzimática	Atividade de Pectato liase (U)
Sobrenadante da cultura	0,34
Células íntegras	0,11
Periplasma	0,16
Esferoplastos	0,40
Sobrenadante de células rompidas	2,62
Precipitado de células rompidas	0,48

A extrusão, a secreção, a difusão ou a autólise da célula podem ser facilitadas pela ação quelante do EDTA, para a retirada da enzima intracelular (HSU e VAUGHN, 1969). A classificação da enzima como extracelular, segundo Pollock (1963), citado por HSU e VAUGHN (1969), exige a demonstração de que ela ocorra no meio sobrenadante, separado das células e, também, de que o seu aparecimento no meio não dependa de danos irreversíveis à estrutura celular (HSU e VAUGHN, 1969).

A localização de PAL em *K. oxytoca* é distinta da pululanase, a qual está ancorada na superfície celular, como uma estratégia para degradar polissacarídeos (HSU e VAUGHN, 1969).

4.4. Indução da pectato liase

Em análise de indução de PAL, foi encontrado que *Klebsiella oxytoca* secretou a enzima quando cultivada em meio de cultura mineral tendo como fonte de carbono, cadeias de pectina menores que 2.000 e 14.000 Da (Quadro 3). Dessa forma, a exemplo de outros microrganismos, o comprimento da cadeia de pectina

presente no meio interfere também na atividade de PAL (ALBERSHEIM e KILLIAS, 1962). Os estudos com PAL intracelular parcialmente purificada de *Erwinia carotovora* revelaram que sua atividade sobre o tetrâmero foi inferior à do polímero de galacturonato (MORAN et al., 1968).

Quadro 3 - Atividades de pectato liase e pectina liase no sobrenadante do crescimento, nas células íntegras e na suspensão de células rompidas de *Klebsiella oxytoca* de cultura obtida após 48 horas de crescimento, a 25°C e sem agitação, em frascos Erlenmeyer com 1,0 L de meio mineral contendo uma membrana de diálise de 2.000 ou 12-14.000 Da, com solução de pectina Sigma a 1,4% (p/v) em seu interior. As cadeias menores que o diâmetro dos poros das membranas foram difundidas para o meio mineral, sendo utilizadas como fonte de carbono pela bactéria

Localização da Atividade Enzimática	Membrana de 2.000 Da		Membrana de 14.000 Da	
	PAL (U)	PL (U)	PAL (U)	PL (U)
Sobrenadante da Cultura	118,5	13,5	96,4	7,1
Células Íntegras	4,7	0,9	0,7	0,2
Células Rompidas	7,9	2,9	0,8	0,2

A bactéria também secretou pectato liase quando foi cultivada em meio mineral contendo cadeias de pectina maiores que 30.000 Da (Quadro 5). Entretanto, níveis insignificantes de enzima extracelular foram detectados, quando *Klebsiella oxytoca* foi cultivada em meio mineral contendo cadeias de pectina maiores que 3.000 Da e menores que 30.000 Da (Quadros 4 e 5). As baixas atividades específicas de PAL encontradas no experimento com frações de pectina menores que 3.000 Da (Quadro 4) são explicadas pela menor quantidade de células obtidas no experimento em virtude da menor quantidade de fonte de carbono (0,056% p/v). Além disso, atividade de PAL foi detectada na suspensão de células

rompidas do experimento com pectina maior que 3.000 Da e não foi detectada na mesma fração obtida no experimento com fração de pectina menor que 3.000 Da.

Os resultados sugerem que um composto de massa molecular entre 3.000 e 30.000 Da, presente na pectina, esteja inibindo a secreção dessa enzima pela célula e que as cadeias pequenas de pectina (oligogalacturonídeos) possam estar sendo degradadas de alguma outra forma pela célula.

Quadro 4 - Atividades de pectato liase e pectina liase no sobrenadante do crescimento, nas células íntegras e na suspensão de células rompidas de *Klebsiella oxytoca* de cultura obtida após 48 horas de crescimento em frascos Erlenmeyer com 1,0 L de meio mineral contendo pectina maior ou menor que 3.000 Da, de ultrafiltração em Amicon CH2R, como fonte de carbono, pH 7,0, a 25°C e sem agitação

Localização da Atividade Enzimática	Pectina maior que 3.000 Da		Pectina menor que 3.000 Da	
	PAL (U)	PL (U)	PAL (U)	PL (U)
Sobrenadante da Cultura	3,40	2,20	1,50	1,00
Células Íntegras	0,02	0,01	0,01	0,01
Células Rompidas	0,11	0,01	0	0

Quadro 5 - Atividades de pectato liase e pectina liase no sobrenadante do crescimento, nas células íntegras e na suspensão de células rompidas de *Klebsiella oxytoca* de cultura obtida após 48 horas de crescimento em frascos Erlenmeyer com 1,0 L de meio mineral contendo pectina maior ou menor que 30.000 Da, de ultrafiltração em Amicon CH2R, como fonte de carbono, pH 7,0, a 25°C e sem agitação

Localização da Atividade Enzimática	Pectina maior que 30.000 Da		Pectina menor que 30.000 Da	
	PAL (U)	PL (U)	PAL (U)	PL (U)
Sobrenadante da Cultura	62,6	4,1	8,5	10,7
Células Íntegras	10,0	0,9	0,9	1,1
Células Rompidas	9,3	1,3	0,1	0,2

No cultivo da *K. oxytoca* em meio onde a fonte de carbono esteve contida em membranas de diálise, onde teoricamente a fonte de carbono foi apenas as partes da cadeia da pectina que porventura estivessem cruzando os poros da membrana, a presença de pectato liase extracelular também foi detectada, enquanto a atividade da enzima intracelular foi reduzida, como verificado pelos dados nos Quadros 6 e 7. A análise da relação de enzima por célula mostrou valores maiores para o experimento com membrana de diâmetro de poros maiores, como o de 14.000 Da (Quadro 8).

Os altos valores de atividade específica de PAL extracelular, encontrados no primeiro experimento de indução, mostrados no Quadro 3, também podem ser explicados pelo fato de o substrato estar contido no interior de membranas, apesar de as membranas não terem sido dialisadas.

As atividades de pectinesterase (PE) e de poligalacturonase (PG) não foram detectadas nos experimentos de indução realizados (resultados não-mostrados).

Quadro 6 - Atividades de pectato liase e pectina liase no sobrenadante do crescimento, nas células íntegras e na suspensão de células rompidas de *Klebsiella oxytoca* de cultura obtida após 96 horas de crescimento em frascos Erlenmeyer com 1,0 L de meio mineral contendo uma membrana de diálise de 2.000 ou de 12-14.000 Da, com solução de pectina cítrica Sigma maior que 30.000 Da como fonte de carbono, pH 7,0, a 25°C e sem agitação

Localização da Atividade Enzimática	Membrana de 2.000 Da		Membrana de 14.000 Da	
	PAL (U)	PL (U)	PAL (U)	PL (U)
Sobrenadante da Cultura	405,0	38,7	35000,0	3500,0
Células Íntegras	0,4	0	0,6	0,2
Células Rompidas	0,8	0,1	1,7	0,7

Quadro 7 - Atividades de pectato liase e pectina liase no sobrenadante do crescimento, nas células íntegras e na suspensão de células rompidas de *Klebsiella oxytoca* de cultura obtida após 96 horas de crescimento em frascos Erlenmeyer com 1,0 L de meio mineral contendo uma membrana de diálise de 2.000 ou 12-14.000 Da, com solução de pectina cítrica Sigma 1,4% (p/ v), dialisada e esterilizada à parte, na mesma membrana, como fonte de carbono, pH 7,0, a 25°C e sem agitação

Localização da Atividade Enzimática	Membrana de 2000 Da		Membrana de 12-14000 Da	
	PAL (U)	PL (U)	PAL (U)	PL (U)
Sobrenadante da Cultura	859,0	66,3	83.000,0	8.000,0
Células Íntegras	3,1	0,2	2,4	0,2
Células Rompidas	39,0	0,4	3,5	1,0

Quadro 8 - Relação de enzima por célula encontrada quando membranas de diálise de 2.000 ou 14.000 Da com pectina 1,4% (p/ v) foram dialisadas, esterilizadas e colocadas dentro de 1,0 L de meio mineral estéril, como fonte de carbono, para o cultivo de *Klebsiella oxytoca*, pH 7,0, 25°C, sem agitação, por 96 horas

Localização da Atividade Enzimática	Membrana de 2.000 Da (7,69 . 10 ⁸ UFC/ mL)	Membrana de 14.000 Da (5,92 . 10 ⁷ UFC/ mL)
	PAL (U . 10 ⁴ /UFC)	PAL (U . 10 ⁴ /UFC)
Sobrenadante da Cultura	5,3	22,5
Células Íntegras	1,1	3,8
Células Rompidas	1,3	4,9

O modo de regulação da síntese de pectato liase está melhor correlacionada com a patogenicidade da espécie que com a sua própria habilidade em sintetizar liases (ZUCKER et al., 1972). Trabalhos na literatura indicam que uma variedade de mecanismos regulatórios controlam a síntese de liases em bactérias patogênicas de plantas (ZUCKER et al., 1972). Entretanto, as condições da cultura e os níveis de produção de liase, freqüentemente, variam amplamente de estudo para estudo, dificultando comparações gerais.

Os mecanismos regulatórios poderiam ser usados como características taxonômicas estáveis (ZUCKER et al., 1972). HSU e VAUGHN (1969) demonstraram que um pequeno oligossarídeo, produto de degradação da pectina, atuou como repressor catabólico da síntese de PAL em *Aeromonas liquefaciens*. A atividade de PAL de *C. multifermentans*, encontrada após o crescimento em tetragalacturonato, foi um pouco menor que em poligalacturonato (MACMILLAN e VAUGHN, 1964). As glicoproteínas também podem inibir as enzimas pécticas (QUANTICK et al., 1983). Outros compostos, a exemplo do IPTG, podem ser utilizados como indutores de PAL em meio de crescimento de *E. chrysanthemi* (TARDY et al., 1997).

Para *E. chrysanthemi* 3937, muitos derivados pécticos, como análogos de 2-keto-3-dioxigliconato, identificados como indutores catabólicos da via pectinolítica possuem genes que são normalmente reprimidos pelo repressor transcripcional KdgR (Condemine e Robert-Baudouy, 1991, citados por SAUVAGE e EXPERT, 1994). Além disso, a atividade transcripcional dos genes

pel responde, em extensão variável, à repressão catabólica, à fase de crescimento, à temperatura, e à necessidade de nitrogênio (SAUVAGE e EXPERT, 1994).

Epicatequina e ácido salicílico na concentração de cerca de 0,2 mM inibiram a atividade de PAL (TARDY et al., 1997). Epicatequina foi o primeiro inibidor de atividade de PAL relatado, isolado de plantas. Ácido salicílico também é um composto importante produzido pelas células vegetais, durante resposta de defesa da planta contra patógenos (Delaney et al., 1994, citados por TARDY et al., 1997). Epicatequina, na concentração de 15 µg/ mL, reduziu em até 95% a atividade de PAL do fungo *Colletotrichum gloeosporoides* (WATTAD et al., 1994).

Em vista da preparação e da metodologia para dosagem de PAL de *K. oxytoca* ser simples, esta pode ser um modelo ideal para a investigação detalhada do mecanismo de indução e da possível repressão catabólica. A PAL extracelular de *Aeromonas liquefaciens* sofre inibição da atividade e é produzida constitutivamente (HSU e VAUGHN, 1969).

É provável que a maioria, senão todas as enzimas pectinolíticas, de bactérias, possua atividade transeliminativa (TIEN et al., 1981). A enzima produzida pela bactéria entérica *Klebsiella* e também por *Yersinia* pode ter uma função puramente catabólica (Chatterjee et al., 1978, citados por TIEN et al., 1981). O nível de significância de pectina como fonte de carbono para a *Klebsiella oxytoca* no fruto de café ainda deve ser investigado.

A PAL provoca acúmulo de fitoalexina, pela liberação do indutor ativo que são os oligossacarídeos ricos em ácido galacturônico oriundos de polímeros pécticos de paredes celulares de soja, pectina cítrica e ácido poligalacturônico Sigma (DAVIS et al., 1984). As fitoalexinas são compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, produzidos pelas plantas e que limitam o crescimento de patógenos (Bailey, 1982, citado por DAVIS et al., 1984). Há trabalhos que mostram atividade indutora de fitoalexinas, por paredes celulares bacterianas e polissacarídeos extracelulares (SANZ, 1981).

A caracterização estrutural de indutores estáveis ao aquecimento, obtidos por hidrólise parcial da pectina cítrica, mostrou que apenas os

oligogalacturonídeos contendo aproximadamente 9 a 13 resíduos galacturonosil possuíram atividade indutora de fitoalexinas (NOTHNAGEL et al., 1983).

4.5. Crescimento em diferentes fontes de carbono e dosagem das enzimas hidrolíticas

A *K. oxytoca* cresceu rapidamente quando amido, galacturonato, poligalacturonato, caseína e glicose foram utilizados como fonte de carbono, pela alta turbidez do meio observada em menos de 24 horas de crescimento (Quadros 9 e 10). Esses resultados são comprovados quando *K. oxytoca* foi cultivado em amilopectina e poligalacturonato como fonte de carbono (OCHUBA e LYLE VON RIESEN, 1980). Entretanto, ocorreu ausência de crescimento quando cultivada em celulose. A *K. oxytoca* possui atividade celulolítica apenas quando possui plasmídeos expressando genes de celulase termoestável de *Clostridium thermocellum* (WOOD e INGRAM, 1992). As enzimas despolimerizantes foram detectadas em níveis mínimos (Quadro 9), uma característica própria de microrganismos endofíticos (HALLMANN et al., 1997).

A perda do processo de regulação de enzimas degradantes da parede celular por bactérias endofíticas é indesejável, o que conferiria patogenicidade à bactéria. As bactérias endofíticas devem possuir algum mecanismo regulatório para, especificadamente, controlar a produção enzimática em termos de quantidade e momento de expressão.

A *K. oxytoca* revelou ser uma das espécies mais ativas entre a família *Enterobacteriaceae*, fermentando cinco polissacarídeos, alginato, gama guar, karaya, xantana e xilana (OCHUBA e LYLE VON RIESEN, 1980).

Quadro 9 - Atividades de enzimas despolimerizantes no sobrenadante do crescimento, nas células íntegras e na suspensão de células rompidas de *Klebsiella oxytoca* de cultura obtida após 24 horas de crescimento em frascos Erlenmeyer com 1,0 L de meio mineral, contendo diferentes polímeros como fonte de carbono, pH 7,0, a 25°C e sem agitação

Localização da Atividade Enzimática	Substrato de Crescimento					
	Amido	Galacturonato		Poligalacturonato		Caseína
	Amilase (U)	PAL (U)	PL (U)	PAL (U)	PL (U)	Protease (U)
Sobrenadante da Cultura	0	4,70	0	0,23	0,09	0
Células Íntegras	0	0	0	0	0,03	0,04
Células Rompidas	0,92	0	0,01	1,32	0,07	0,03

Quadro 10 - Atividade de pectato liase no sobrenadante do crescimento, nas células íntegras e na suspensão de células rompidas de *Klebsiella oxytoca* de cultura obtida após o cultivo por 24 horas de crescimento em frascos Erlenmeyer com 1,0 L de meio mineral contendo glicose Sigma como fonte de carbono, pH 7,0, a 25°C e sem agitação

Localização da Atividade Enzimática	Glicose (Substrato de Crescimento)
	PAL (U)
Sobrenadante da Cultura	0,09
Células Íntegras	0
Células Rompidas	0

A degradação de amilopectina é uma das características de *Klebsiella* (OCHUBA e LYLE VON RIESEN, 1980).

A *K. oxytoca* isolada do café não foi caracterizada quanto à capacidade de utilizar lipídeos. A *Klebsiella* sp. não possuiu atividade lipolítica sobre triacetina, óleo de milho e tributirina (DAVIS e EWING, 1964).

A pectato liase não foi encontrada nos meios minerais contendo galacturonato ou glicose, indicando que a enzima não atua sobre o produto de reação e que ela é uma enzima induzida e não-constitutiva. A PAL extracelular

purificada de *Xanthomonas campestris* também não foi produzida em meio com ácido galacturônico ou glicose (NASUNO e STARR, 1967).

As análises dos compostos produzidos e liberados nos meios de cultivo ainda devem ser feitas para a avaliação do potencial de *K. oxytoca* em produzir compostos que possam interferir na qualidade da bebida do café. A *K. oxytoca* produziu vários compostos voláteis em cultura suplementada com metil-cisteína-sulfóxido, tais como: dimetil dissulfeto, dimetil trissulfeto, acetofenona, 2-fenil-etanol, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano e indol (THIBOUT et al., 1995).

A biossíntese de PAL é constitutiva em algumas bactérias como *Aeromonas liquefaciens* e *Erwinia carotovora*, e induzida em outras como *Bacillus subtilis* e *Flavobacterium pectinovorum*, ou sob repressão catabólica em outras (STUTZENBERGER, 1987). Em *Pseudomonas fluorescens* é uma enzima induzida (LIAO, et al., 1993). Os microrganismos com alta taxa de síntese de liase constitutiva podem ser patógenos potenciais, já que podem formar um suplemento de indutor rapidamente (ZUCKER e HANKIN, 1970). *Aeromonas liquefaciens* mostrou alto nível de síntese constitutiva, entretanto, a síntese de liase foi muito susceptível a repressão catabólica (HSU e VAUGHN, 1969).

A *Klebsiella oxytoca* pode ser utilizada como inóculo para tratamento de resíduo das indústrias de café, como a fermentação anaeróbica da polpa de café (BOOPATHY, 1987) e dos grãos de café que sofreram processamento para obtenção do café instantâneo (OI et al., 1981), em que *K. oxytoca* consumiria produtos originários da degradação da celulose.

Um estudo comparativo da evolução da microbiota natural presente na polpa de café e na casca revelou a presença de uma grande variedade de microrganismos, sendo a porcentagem de distribuição de fungos, bactérias e leveduras, muito similar em todas as amostras, exceto na casca do café, onde a população de fungos foi um pouco maior (ROUSSOS et al., 1995). A polpa de café é rica em carboidratos, proteínas e minerais, especialmente o potássio (ROUSSOS et al., 1995).

A *K. oxytoca* também pode utilizar a lactose do soro de queijo para

produção de grandes quantidades de biopolímero (DLAMINI e PEIRIS, 1997), ou ainda produzir 2,3-butanodiol, a partir de sabugo de milho pré-tratado, na presença de celulase fúngica (CAO et al., 1997). Esta bactéria, a *K. oxytoca*, utiliza produto misto de degradação da lignocelulose por *Fibrobacter succinogenes* para produção de 2,2-butanodiol (EITEMAN e MILLER, 1995).

A análise da habilidade decompositora da *K. oxytoca*, isolada de frutos de café, é recomendável, uma vez que a biomassa de plantas contém mais de 15% (p/p) de pectina (Beldman et al., 1984, citados por STUTZENBERGER, 1987), embora as espécies de *Yersinia* (MANULIS et al., 1988) e *Klebsiella* (Chatterjee et al., 1979, citados por LIAO, 1989) geralmente exibam muito pouca ou nenhuma atividade de maceração.

A PAL com pouca atividade de maceração em tubérculo de batata e baixo valor de pI, similares a isoenzima PALa de *E. chrysanthemi*, tem também sido descrita para a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, estirpe não-patogênica (Chatterjee et al., 1979, citados por FAVEY et al., 1992) e *Yersinia pseudo tuberculosis* (MANULIS et al., 1988). Pelo fato de essas bactérias serem freqüentemente encontradas na rizosfera, existe a possibilidade das PALs acídicas possuírem uma função fisiológica para a sobrevivência no solo. (FAVEY et al., 1992).

Os resultados indicam que a interação *K. oxytoca* – frutos de café é potencialmente benéfica, para ambos, uma vez que a planta pode fornecer os nutrientes (exsudados ou lisados de células) e proteger a bactéria quanto às intempéries do meio externo, radiação ultravioleta e competição com outros microrganismos. Por outro lado, a bactéria *K. oxytoca* não secreta enzimas despolimerizantes, tem potencial para fixar nitrogênio atmosférico e ser relativamente independente da planta com relação ao nitrogênio. Ela pode induzir a produção de hormônio de crescimento vegetal (auxina) ácido indol acético (AIA) e também outros como o acetileno.

O estudo da presença desse microrganismo na planta, bem como o efeito de suas atividades, pode vir a contribuir para o desenvolvimento da melhoria da qualidade da bebida do café.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os microrganismos são responsáveis em grande parte pela qualidade da bebida do café, atuando diretamente nos grãos, durante os períodos de pré e pós-colheita, secagem e processamento dos grãos para o beneficiamento.

A *Klebsiella oxytoca*, isolada do interior de frutos de café (*Coffea arabica*) colhidos em área experimental do *campus* da Universidade Federal de Viçosa, durante trabalho de avaliação da microbiota encontrada nos grãos, foi a bactéria utilizada neste trabalho.

Essa bactéria cresceu rapidamente em meio de cultura mineral adicionado de pectina cítrica Sigma 0,28% (p/ v) como fonte única de carbono, alcançando população de 10^8 células/ mL, em menos de 20 horas, quando incubada sem agitação, à temperatura de 25°C e pH 7,0. O tempo de geração dessa bactéria nas condições descritas foi de 60 min.

A *K. oxytoca* também mostrou-se capaz de crescer nesse meio isentado de sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio, mesmo sob condições de anaerobiose.

A enzima pectinolítica de maior expressão foi a pectato liase, intracelular, induzida, que atua primordialmente sobre substrato não-metilado. A atividade ótima foi em temperatura de 40°C, pH 9,0, na presença de íons magnésio. A K_m da PAL

dessa bactéria é de 4,51 mg/ mL e ela não perde atividade a -18°C por nove meses ou sob 40°C por 1 hora e 40 min.

A bactéria secretou PAL quando foi cultivada em meio mineral contendo, como fonte de carbono, cadeias de pectina maiores que 30.000 Da, obtidas por ultrafiltração. Um composto de pequeno peso molecular entre 3.000 e 30.000 Da, presente na pectina, pode estar inibindo a secreção dessa enzima pela célula e as cadeias pequenas de pectina (oligogalacturonídeos) podem ser degradadas de alguma outra forma pela célula. Quando o substrato esteve contido no interior de membranas de poros de 2.000 e 14.000 Da, a bactéria, no exterior desse invólucro, sem contato direto com o substrato, secretou mais enzima por célula quanto maior foi o diâmetro dos poros das membranas.

A *K. oxytoca* cresceu rapidamente quando amido, galacturonato, poligalacturonato, caseína ou glicose foram utilizadas como fonte de carbono. No entanto, foi incapaz de utilizar a celulose como fonte de carbono. As enzimas despolimerizantes foram detectadas em níveis mínimos, uma característica própria de microrganismos endofíticos.

As características físico-químicas da pectinase de *K. oxytoca* foram muito semelhantes às encontradas em outras bactérias e fungos. Os compostos presentes na pectina cítrica Sigma, relacionados à regulação dessa enzima, devem ainda ser mais bem investigados.

Os resultados indicam que a interação *K. oxytoca* – frutos de café é potencialmente benéfica, para ambos, uma vez que a planta pode fornecer os nutrientes (exsudados ou lisados de células) e proteger a bactéria quanto às intempéries do meio externo, radiação ultravioleta e competição com outros microrganismos. Por outro lado, a bactéria *K. oxytoca* pode não secretar enzimas despolimerizantes, e tem potencial para ser relativamente independente da planta, com relação ao nitrogênio. Pode, ainda, induzir a produção de hormônio de crescimento vegetal (auxina) ácido indol acético (AIA) e também outros como o acetileno.

O estudo da presença desse microrganismo na planta, bem como o efeito de suas atividades, pode vir a contribuir para o desenvolvimento da melhoria da qualidade da bebida do café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHO, P. E., SEIDLER, R. J., EVANS, H. J., RAJU, P. N. Distribution, enumeration, and identification of nitrogen-fixing bacteria associated with decay in living white fir trees. **Phytopathology**. v. 64, p.1413-1420, 1974.
- ALBERSHEIM, P. Pectin lyase from fungi. **Methods in Enzymology**, v.8, p. 628-635. 1966.
- ALBERSHEIM, P., KILLIAS, U. Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 97, p. 107-115, 1962.
- AMORIM, F. G., MELO, M. Significance of enzymes in non alcoholic coffee beverage. **Food Enzimology**. Amsterdan: Elsevier, 1992. v.2, p.189-209.
- AMORIM, H. V. Chemistry of brazilian green coffee and the quality of the beverage: V-Multiple linear regression analysis. **Turrialba**, v.25, n.1, p.25-28, 1975.
- AMORIM, H. V., TEIXEIRA, A. A., BREVIGLIERI, O., CRUZ, V. F., MALAVOLTA, E. Chemistry of brazilian green coffee with the quality of the beverage. I. Carbohydrates. **Turrialba**, v. 24, n. 2, p. 214-216, 1974a.

- AMORIM, H. V., TEIXEIRA, A. A., GUERCIO, M. A., CRUZ, V. F., MALAVOLTA, E. Chemistry of Brazilian Green Coffee with the Quality of the Beverage. II. Phenolic Compounds. **Turrialba**, v.24, n.2, p. 217-221, 1974b.
- AMORIM, H. V., TEIXEIRA, A. A., MELO, M., CRUZ, V. F., MALAVOLTA, E. Chemistry of brazilian green coffee with the quality of the beverage. III. Soluble Proteins. **Turrialba**, v.24, n.3, p.304-308, 1974c.
- AMORIM, H. V., TEIXEIRA, A. A., MELO, M., CRUZ, V. F., MALAVOLTA, E. Chemistry of brazilian green coffee with the quality of the beverage. IV. Electrophoresis of proteins in agarose and its Interaction with Chlorogenic Acids. **Turrialba**, v.25, n.1, p.18-24, 1975.
- AMORIM, H. V., LEGENDRE, M. G., AMORIM, V. L., ANGELO, A. J. St., ORY, R. L. Chemistry of brazilian green coffee with the quality of the beverage. VII. Total Carbonils, Activity of Polyphenol Oxidase and Hydroperoxides. **Turrialba**, v.26, n.2, p. 193-195, 1976.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ. **Coffee Business**. Rio de Janeiro, 1998. 63p.
- ARCILA, J. P., VALENCIA, G. A. Relación entre la actividad de la polifenol oxidasa (PFO) y las pruebas de catación como medidas de la calidad de la bebida del café. **Cenicafé**, v. 26, n.2, p.55-71, 1975.
- ARUNGA, R.O. Coffee. In: ROSE, A. H. **Economic microbiology. fermented foods**. New York: Academic Press, 1982. v.7.
- BARTLING, S., WEGENER, C., OLSEN, O. Sinergism between Erwinia Pectate Lyase Isoenzymes that Depolymerize both Pectate and Pectin. **Microbiology**, v. 141, p. 873-881, 1995.
- BELL, C. R., DICKIE, G. A., HARVEY, W. L. G., CHAN, J. W. Y. F. Endophytic Bacteria in Grapevine. **Can. J. Microbiol**, v. 41, p. 46-53, 1995.
- BENHAMOU, N., BÉLANGER, R. R., PAULITZ, T. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and

Ri T-DNA transformed pea roots: host response to colonization by *Pythium ultimum*. **Trow. Planta**, v.199, p. 105-117, 1996.

BERNFELD, P. Amylases, [[alpha]] and [[beta]], em *Methods in Enzymology*, I, (Colowick, S., and Kaplan, N., eds.), **Academic Press**, NY, p. 149. 1955.

BOCCARA, M., VEDEL, R., LALO, D., LEBRUN, M., LAFAY, J. F. Genetic diversity and host range in strains of *Erwinia chrysanthemi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, n.3, p.293-299, 1991.

BOOPATHY, R. Inoculum source for anaerobic fermentation of coffee pulp. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 26, p.588-594, 1987.

BOTHAST, R. J., SAHA, B. C., VANCE FLOSENZIER, A., INGRAM, L. O. Fermentation of L-Arabinose, D-Xylose and D-Glucose by Ethanologenic Recombinant *Klebsiella oxytoca* Strain P2. **Biotechnology Letters**, v. 16, n.4, p. 401-406, 1994.

BRADFORD, M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREMNER, J. M., MULVANEY, C. S. Nitrogen Total. In: WEAVER, R. W., ANGLE, J. S., BOTTOMLEY, P. S. **Methods of Soil Analysis**. Part 2.(Soil Science Society of America Book Series, 5). Madison: 1994. p. 936-941. 1994.

CAKMAKCI, M. L., EVANS, H. J., SEIDLER, R. J. Characteristics of nitrogen-fixing *Klebsiella oxytoca* isolated from wheat roots. **Plant and Soil**, v.61, p. 53-63, 1981.

CAO, N., XIA, Y., GONG, C. S., TSAO, G. T. Production of 2,3-Butanediol from pretreated corn cob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of fungal cellulase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.63-65, p.129-139, 1997.

CAVALCANTE, V. A., DOBEREINER, J. a new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v.108, p. 23-31, 1988.

- CHARNEY, J., TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biological Chemistry**, v. 171, p.501-505, 1947.
- COLLMER, A., BERMAN, P., MOUNT M. S. Pectate lyase regulation and bacterial soft-rot pathogenesis. MOUNT M. S., LACY, G.H. *Phytopathogenic procaryotes*. New York: **Academic Publishers**, 1982. v.1, p. 395-422.
- COOPER, R. A., KNOWLES, P. F., BROWN, D. E., McGUIRL, M. A., DOOLEY, D. M. Evidence for Copper and 3,4,6- Trihydroxyphenylalanine Quinone Cofactors in na Amine Oxidase from the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli* K-12. **Biochemistry Journal**, v. 288, p.337-340, 1992.
- CORNISH-BOWDEN, A., EISENTHAL, R., Estimation of michaelis constant and maximum velocity from the direct linear plot. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 523, p.268-272, 1978.
- CRAWFORD, M. S., KOLATTUKUDY, P. E. Pectate lyase from *Fusarium solani* f.sp. *pisii*: Purification, characterization, in vitro translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 258, p. 196-205, 1987.
- DAGLIA, M., CUZZONI, M. T., DACARRO, C. Antibacterial activity of coffee. **Jounal Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 2270-2272, 1994.
- DAVÉ, B. A., VAUGHN, R. H. Purification and Properties of a Polygalacturonic Acid trans-Eliminase Produced by *Bacillus pumilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 108, n.1, p. 166-174, 1971.
- DAVIS, B. R., EWING, W. H. Lipolytic, pectolytic and alginolytic activities of *Enterobacteriaceae*. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n.1, p.16-19, 1964.
- DAVIS, K. R., LYON, G. D., DARVILL, A. G., ALBERSHEIM, P. Host-Pathogen Interactions, XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. **Plant Physiology**, v. 74, p.52-60, 1984.

- Di PIETRO, A., RONCERO, M. I. G. Purification and characterization of a pectate lyase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* produced on tomato vascular tissue. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p.177-185, 1996.
- DLAMINI, A. M., PEIRIS, P. S. Biopolymer production by a *Klebsiella oxytoca* isolated using whey as fermentation substrate. **Biotechnology Letters**, v. 19, n.2, p. 127-130, 1997.
- DOYLE, M. P., BEUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**, Washington: ASM Press, 1997. p. 658-661.
- EDMONDSON, A. S., COOKE, E. M., WILCOCK, A. P., SHINEBAUM, R. A. Comparison of the properties of *Klebsiella* strains isolated from different sources. **J. Med. Microbiol**, v. 13, n.4, p. 541-550, 1980.
- EITEMAN, M. A., MILLER, J. H. Effect of Succinic Acid on 2,3-Butanediol Production by *Klebsiella oxytoca*. **Biotechnology Letters**, v.17, n.10, p.1057-1062, 1995.
- FAVEY, S., BOURSON, C., BERTHEAU, Y., KOTOUJANSKY, A., BOCCARA, M. Purification of the acidic pectate lyase and nucleotide sequence of the corresponding gene (*pel A*) of *Erwinia chrysanthemi* Strain 3937. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 499-508, 1992.
- FISHER, P. J., PETRINI, O., LAPPIN SCOTT, H. M., The Distribution of Some Fungal and Bacterial Endophytes in Maize (*Zea Mays* L.). **New Phytol**, v.122, p. 299-305, 1992.
- FORSTER, H., RASCHED, I. Purification and characterization of extracellular pectinesterases from *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**, v. 77, p. 109-112, 1985.
- HAAHTELA, K., LAAKSO, T., KORHONEN, T. K. Associative Nitrogen fixation by *Klebsiella* spp.: Adhesion sites and inoculation effects on grass roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n.5, p. 1074-1079, 1986.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F., KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of**

Microbiology, v. 43, p.895-914, 1997.

HASEGAWA, S., NAGEL, C. W. A new pectic acid transeliminase produced exocellularly by a bacillus. **Journal of Food Science**, v.31, p.838-845, 1966.

HSU, E. J., VAUGHN, R. H. Production and catabolite repression of the constitutive polygalacturonic acid trans-eliminase of *Aeromonas liquefaciens*. **Journal of Bacteriology**. v. 98, p. 172-181, 1969.

HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B., VAN MONTAGU, M., KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v.176, p. 1913-1923, 1994.

INFORME AGROPECUÁRIO. v.18, n.187, 1997.

JIMENEZ-SALGADO, T., FUENTES-RAMIREZ, L. E., TAPIA-HERNANDEZ, A., MASCARUA-ESPARZA, M. A., MARTINEZ-ROMERO, E., CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.9, p. 3676-3683, 1997.

KIRCHHOF, G., REIS, V. M., BALDANI, J. I., ECKERT, B., DÖBEREINER, J., HARTMANN, A., Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, v.194, p.45-55, 1997.

KIRCHHOF, G., SCHLOTTER, M., AßMUS, B., HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biol. Biochem**, v.29, n. 5/6, p. 853-862, 1997.

KLOEPPER, J. W., MAHAFFEE, W. F., McINROY J. A., BACKMAN P. A. Comparative analysis of five methods for recovering rhizobacteria from cotton roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, p. 953-957, 1991.

- KNÖSEL, D., GARBER, E. D. Pektolytische und cellulolytische enzyme bei *Xanthomonas campestris*. **Journal Phytopathology**, v.59, p. 194-202, 1967.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Savier. 1995. p. 156-164.
- LEITE, R. A. **Qualidade Tecnológica do Café (*Coffea arabica L.*) Pré Processado por “Via Seca” e “Via Úmida”**. Viçosa: UFV, 1998. 54p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. 1998.
- LEVANONY, H., BASHAN, Y., ROMANO, B., KLEIN, E. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* on and within wheat root by immunogold labeling. **Plant Soil**, v.117, p. 207-218, 1989.
- LIAO, C. Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. **Applied and Environment Microbiology**, v.55, n.7, p. 1677-1683, 1989.
- LIAO, C. -H., McCALLUS, D. E., WELLS, J. M. Calcium-dependent pectate lyase production in the soft-rotting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v. 83, p. 813-818, 1993.
- LINHARDT, R. J., GALLIHER, P. M., COONEY, C. L. Polysaccharide lyases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.12, p. 135-176, 1986.
- LIU, J. K., LIU, C. H., LIN, C. S. The Role of nitrogenase in a cyanide-degrading *Klebsiella oxytoca* Strain. **Proc Natl Sci Coun Repub China B**. v. 21, n.2, p.37-42, 1997.
- LIU, L., KLOEPPER, J. W., TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 85, p. 695-698, 1995a.
- LIU, L., KLOEPPER, J. W., TUZUN, S. Induction of systemic resistance in

cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p. 843-847, 1995b.

LIU, L., KLOEPPER, J. W., TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, v.85, p.1064-1068, 1995c.

LIVRELLI, V., De CHAMPS, C., Di MARTINO, P., DARFEUILLE-MICHAUD, A., FORESTIER, C., JOLY, B. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. **Jornal Clinycal Microbiology**, v. 34, n.8, p.1963-1969, 1996.

MACMILLAN, J. D., PHAFF, H. J., VAUGHN, R. H. The pattern of action of an exopolygalacturonic acid-trans-eliminase from *Clostridium multifementans*. **Biochemistry**, v.3, n.4, p.572-578, 1964.

MACMILLAN, J. D., VAUGHN, R. H. Purification and properties of a poligalacturonic acid-trans-eliminase produced by *Clostridium multifementans*. **Biochemistry**, v. 3, n.4, p.564-572, 1964.

MANULIS, S., KOBAYASHI, D. Y., KEEN, N. T. Molecular cloning and sequencing of a pectate liase gene from *Yersinia pseudotuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v.170, p. 1825-1830, 1988.

McINROY, J. A., KLOEPPER, J. W. Population dynamics of endophytic bacteria in fiel-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p. 895-901, 1995.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v.31, p. 426-428, 1959.

MORAN, F., NASUNO, S., STARR, M. P. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans-eliminases of *Erwinia carotovora*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.123, p. 298-306, 1968.

- NAGEL, C. W., ANDERSON, M. M. Action of a bacterial transeliminase on normal and unsaturated oligogalacturonic acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.112, p. 322-330, 1965.
- NAGEL, C. W., VAUGHN, R. H. The Characteristics of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 93, p. 344-352, 1961.
- NASUNO, S., STARR, M. P. Polygalacturonic acid trans-eliminase of *Xanthomonas campestris*. **Biochemistry Journal**, v. 104, p.178-185, 1967.
- NOTHNAGEL, E. A., McNEIL, M., ALBERSHEIM, P., DELL, A. Host-patogen interactions XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. **Plant Physiology**. v.71, p.916-926, 1983.
- NUNEZ, W. J., COLMER, A. R. Differentiation of *Aerobacter-Klebsiella* isolated from sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.16, n.12, p.1875-1878, 1968.
- OCHUBA, G. U, LYLE VON RIESEN, V. Fermentation of polysaccharides by *Klebsiella* and other facultative bacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, n.5, p. 988-992, 1980.
- OI, S., TANAKA, T., YAMAMOTO, T. Methane fermentation of coffee grounds and some factors to improve the fermentation. **Agricultural Biological Chemistry**, v.45, n.4, p. 871-878, 1981.
- OLIVEIRA, F. C. de., SILVA, D. M., TEIXEIRA, A. A., AMORIM, H. V. Atividade enzimática da polifenoloxidase, peroxidase e catalase em grãos de *Coffea arabica* L. e relações com a qualidade da bebida. **Turrialba**, San Jose, v.27, n.1, p.76-82, 1977.
- PACKER, P. J., MACKERNESS, C. W., RICHES, M., KEEVIL, C. W. Comparison of selective agars for the isolation and identification of *Klebsiella oxytoca* and *Escherichia coli* from environmental drinking water samples. **Lett Appl Microbiol**. v. 20, n.5, p. 303-307, 1995.

- PAMPHILE, J. A. **Variabilidade, transformação genética e transposons em linhagens endofíticas de *Fusarium moniliforme* isoladas de milho (*Zea mays* L).** Piracicaba: ESALQ, 1997. Tese. (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
- PÉREZ ARTÉS, E., TENA, M. Purification and characterization of pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* differing in virulence to chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 37, p. 107-124, 1990.
- PISHCHIK, V. N., MOKROUSOV, I. V., LAZAREV, A. M., VOROBYEV, N. I., NARVSKAYA, O. V., CHERNYAEVA, I. I., KOZHEMYAKOV, A. P., KOVAL, G. N. Biological properties of some nitrogen-fixing associative *Enterobacteria*. **Plant and Soil**. v. 202, p.49-59, 1998.
- QUADT-HALLMANN, A., BENHAMOU, N., KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: Mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, p.577-582, 1997a.
- QUADT-HALLMANN, A., BENHAMOU, N., KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: Location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 254-259, 1997b.
- QUADT-HALLMANN, A., KLOEPPER, J. W. immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1144-1154, 1996.
- QUANTICK, P., CERVONE, F., WOOD, R. K. S. Isoenzymes of a polygalacturonate trans-eliminase produced by *Erwinia atroseptica* in potato tissue and in liquid culture. **Physiological Plant Pathology**. v.22, p. 77-86, 1983.
- REXOVÁ-BENKOVÁ, L., MARKOVIC, O. Pectic enzymes. In: TIPSON, R.S., HORTON, D. (Eds.) *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. New York: **Academic Press**, 1976. p. 323-385.
- ROBERTSEN, B. Pectate lyase from *Cladosporium cucumerinum*, purification, biochemical properties and ability to induce lignification in cucumber

hypocotyls. **Mycological Reserch**, v. 94, n.5, p.595-602, 1989.

ROIG-SAGUES, Artur X., HERNANDEZ-HERRERO, Manuela, LOPEZ-SABATER, Emilio I., RODRIGUEZ-JEREZ, Jose J., MORA-VENTURA, Maria T. Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened *Salchichón*, a spanish cured sausage. **Journal of Food Protection**, v.59, n.5, p. 516-520, 1996.

ROMBOUITS, F. M., PILNIK, W. Pectic Enzymes. Em ROSE, A. H. (Ed.). Economic Microbiology: Microbial enzymes and bioconversions. London: **Academic Press**, 1980.v. 5, p. 227-282.

ROUSSOS, S., AQUIÁHUATL, M. DE LOS A., TREJO-HERNÁNDEZ, M. DEL R., PERRAUD, I. G., FAVELA, E., RAMAKRISHNA, M., RAIMBAULT, M., VINIEGRA- GONZÁLES, G. Biotechnological Management of Coffee Pulp- Isolation, Screening, Characterization, Selection of Caffeine-Degrading Fungi and Natural Microflora Present in Coffee Pulp and Husk. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p.756-762, 1995.

RUBINSTEIN, A., EZRA, M., ROKEM, J. S. Adhesion of Bacteria on Pectin Casted Films. **Microbios**, v. 70, n.284-285, p.163-170, 1992.

SALYERS, A. A., REEVES, A., D'ELIA, J. Solving the Problem of How to Eat Something as Big as Yourself: Diverse Bacterial Strategies for Degrading Polysaccharides. **Journal of Food Microbiology**, v.17, p. 470-476, 1996.

SANZ M. P. Bacterial Induction of the Accumulation of Phaseollin, Pisatin and Rishitin and their Antibacterial Activity. **Neth. J. Plant Pathol**, v. 87, p. 119-129, 1981.

SARIĆ, M. R., SARIĆ, Z., GOVEDARICA, M. Specific Relations between some Strains of Diazotrophs and Corn Hibrids. **Plant and Soil**. v. 99, p. 147-162, 1987.

SAS INSTITUTE, INC. **SAS User's Guide: Statistics**. Sas Institute, Inc. 5. ed. Cary, NC: 1985.

- SAUVAGE, C., EXPERT, D. Differential Regulation by Iron of *Erwinia chrysanthemi* Pectate Lyases: Pathogenicity of Iron Transport Regulatory (*cbr*) Mutants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, v.1, p. 71-77, 1994.
- SOUZA, S.M.C.de. **O Café (*Coffea arabica* L.) na Região Sul de Minas Gerais: Relação da Qualidade com Fatores Ambientais, Estruturais e Tecnológicos.** UFLA, 1996. Tese. (Doutorado) Lavras: Universidade Federal de Lavras. 171p., 1996.
- SPRENT, J. I., De FARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, p. 157-165, 1988.
- STUTZENBERGER, F. J. Inducible thermoalkalophilic polygalacturonate lyase from *Thermomonospora fusca*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n.6, p. 2774-2780, 1987.
- TARDY, F., NASSER, W., ROBERT-BAUDOY, J., HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: Enzyme characteristics and potential inhibitors. **Journal of Bacteriology**. v. 179, n.8, p. 2503-2511, 1997.
- THIBOUT E., GUILLOT, J. F., FERARY, S., LIMOUZIN, P., AUGER, J. Origin and identification of bacteria which produce kairomones in the frass of *Acrolepiopsis assectella* (Lep., Hyponomeutoidea). **Experientia**, v. 51, p.1073-1075, 1995.
- TIEN, T. M., DIEM, H. G., GASKINS, M. H., HUBBELL, D. H. Polygalacturonic acid transeliminase production by *Azospirillum* species. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 27, p. 426-431, 1981.
- VAN PEE, W., CASTELEIN, J. M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the *Enterobacteriaceae*, from fermenting coffee in the Congo. **Journal of Food Science**. v. 37, p. 171-174, 1972.
- VIANA, S. C., PEREIRA, A. A., VANETTI, M. C. D., BORGES, A. C. Método para se Conservar a Viabilidade de Bactérias e Leveduras do Mesocarpo Mucilaginoso de Frutos de Café. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19. 1997, Rio de Janeiro: **Resumos...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia. 1997. p.147.

- WALKER, M. J., PEMBERTON J. M., RUBINSTEIN, A., EZRA, M., ROKEM, J. S. Construction of a transposon containing a gene for polygalacturonate trans-eliminase from *Klebsiella oxytoca*. **Arch Microbiol.** v. 146, n.4, p. 390-395, 1987.
- WATTAD, C., DINOOR, A., PRUSKY, D. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: A possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** v.7, n.2, p. 293-297, 1994.
- WESSEL, D., JOOSTE, P. J., MOSTERT, J. F. Psychrotrophic, proteolytic and lipolytic properties of *Enterobacteriaceae* isolated from milk and dairy products. **Int. J. Food Microbiol,** v. 9, n.1, p. 79-83, 1989.
- WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences.** New York: Marcel Dekker, 1972. p. 291-349.
- WIJESUNDERA, R. L. C., BAILEY, J. A., BYRDE, R. J. W. Production of pectin lyase by *Colletotrichum lindemuthianum* in culture and in infected bean (*Phaseolus vulgaris*) Tissue. **Journal of General Microbiology,** v.130, p.285-290, 1984.
- WOOD, B., INGRAM, L. O. Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. **Applied Environmental Microbiology,** v. 58, p. 2103-2110, 1992.
- WU, Q., STEWART, V. NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Klebsiella oxytoca* (*pneumoniae*) M5al. **Journal Bacteriology,** v.180, n.5, p.1311-1322, 1998.
- YOO, I. D., FUJII, T., SANO, Y., KOMAGATA, K., YONEYAMA, T., IYAMA, S., HIROTA, Y. Dinitrogen fixation of rice-*Klebsiella* associations. **Crop**

Science, v.26, p. 297-301, 1986.

ZETELAKI-HORVÁTH, K. Factors affecting pectin lyase activity. **Acta Alim**, v.11, p.21-29, 1982.

ZIMMER, W., HUNDESHAGEN, B., NIEDERAU, E. Demonstration of the indolepyruvate decarboxylase gene homologue in different auxin-producing species of the *Enterobacteriaceae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.1072-1076, 1994.

ZUCKER, M., HANKIN, L. Regulation of pectate lyase synthesis in *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia carotovora*. **Journal of Bacteriology**, v. 104, n.1, p. 13-18, 1970.

ZUCKER, M., HANKIN, L., SANDS, D. Factors Governing Pectate Lyase Synthesis in Soft Rot and Non-Soft Rot Bacteria. **Physiological Plant Pathology**, v.2, p. 59-67, 1972.

APÊNDICES

APÊNDICE A

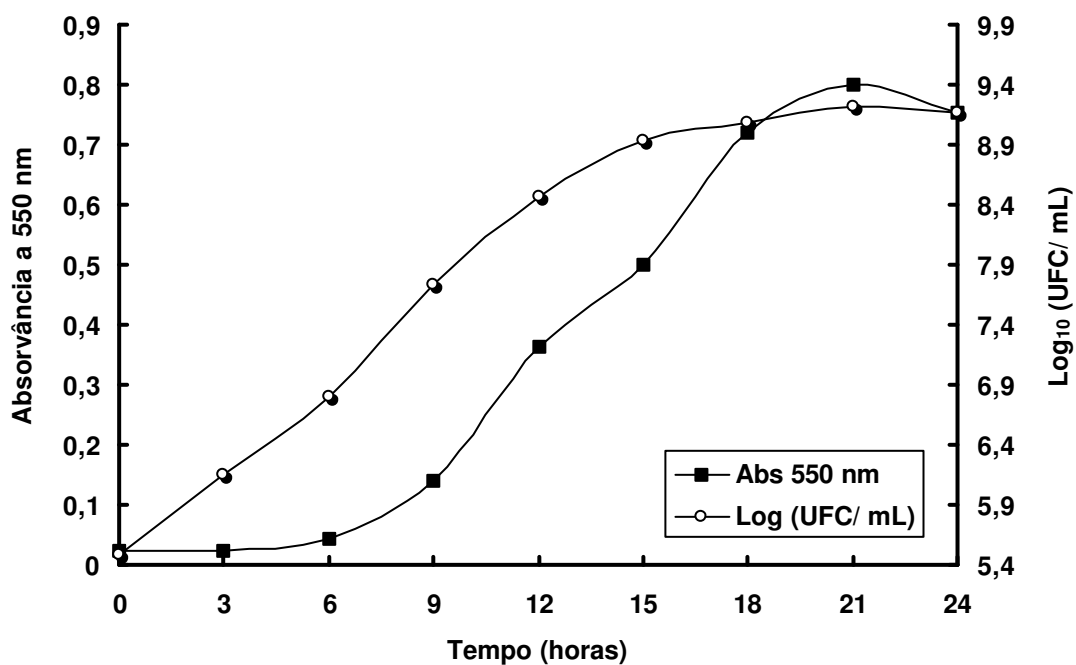


Figura 1A - Crescimento de *Klebsiella oxytoca* em meio mineral contendo glicose como fonte de carbono, relacionado com absorvância da suspensão de células no meio de cultivo a 550 nm.

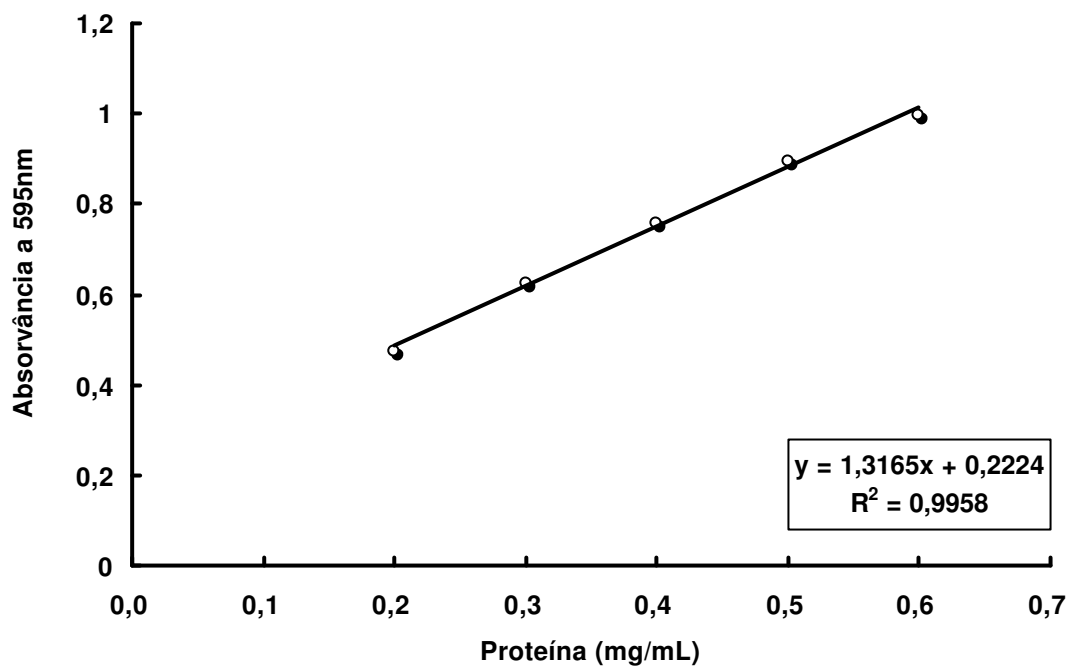


Figura 2A - Relação entre a concentração de proteína (mg/ mL) na amostra com a absorvância obtida a 595 nm, segundo método de BRADFORD (1976).

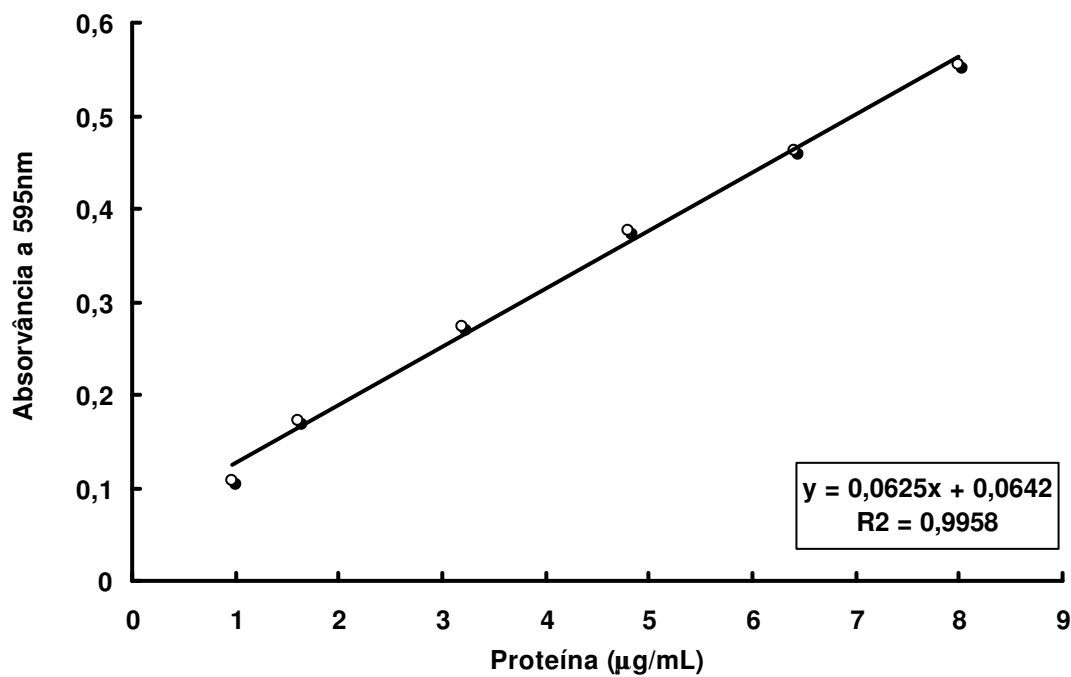


Figura 3A - Relação entre a micro-concentração de proteína (µg/ mL) BSA com a absorvância obtida a 595 nm, segundo microensaio do kit BioRad.

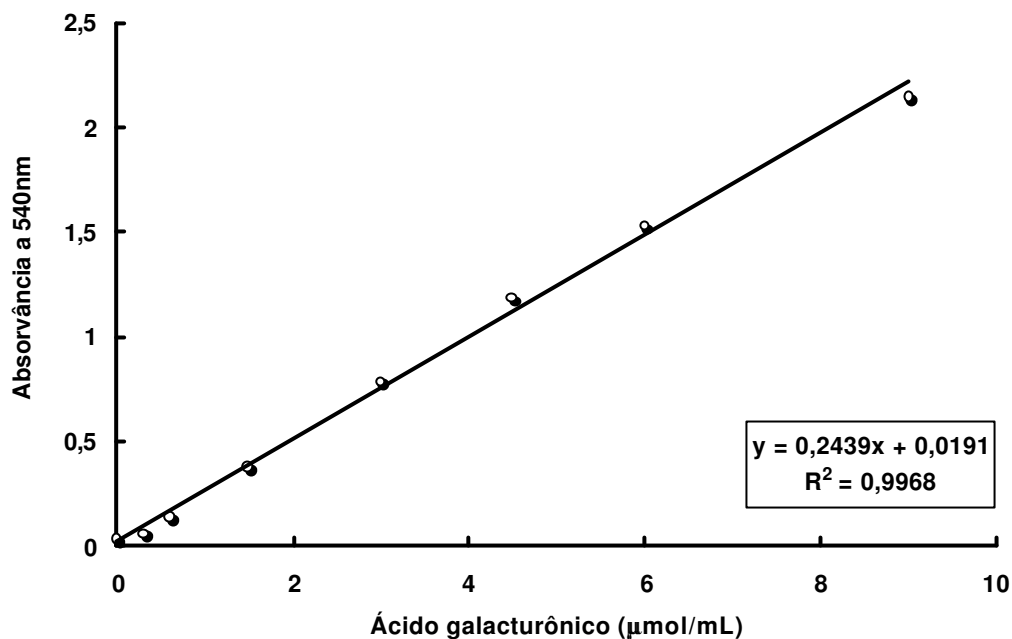


Figura 4A - Relação entre a concentração de ácido galacturônico ($\mu\text{mol/ mL}$) Sigma com a absorvância a 540 nm, segundo método proposto para dosagem de poligalacturonase em MILLER (1959).

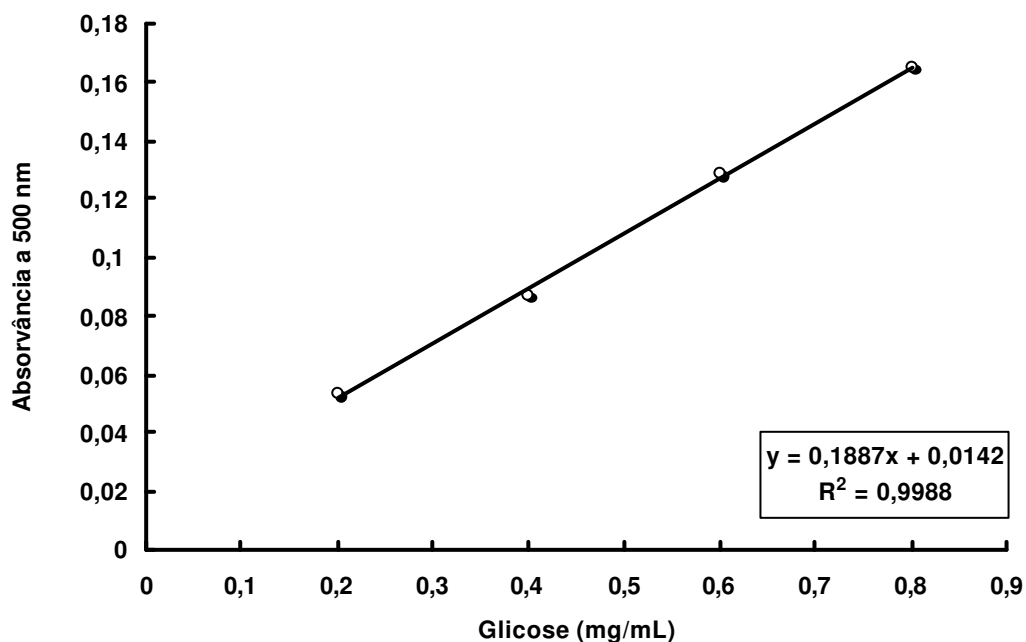


Figura 5A - Relação entre a concentração de glicose (mg/ mL) com a absorvância a 500 nm, segundo método de dosagem de enzimas amilolíticas proposto por BERNFELD (1955). A glicose foi medida através da utilização do KIT-GOD PAP da Merck.

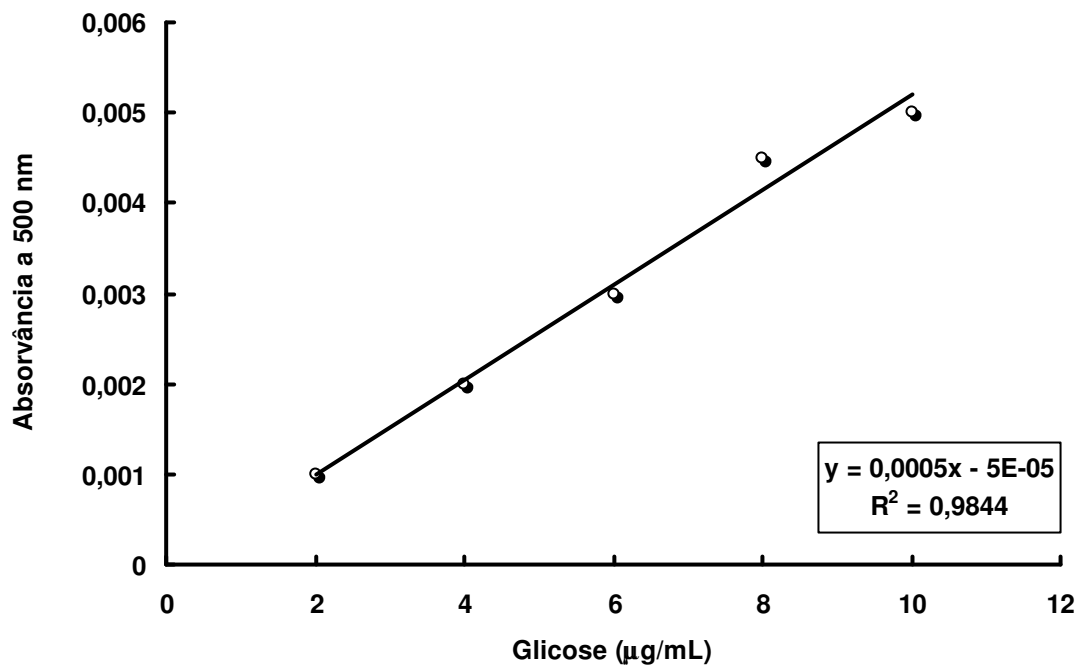


Figura 6A - Relação entre a micro-concentração de glicose ($\mu\text{g}/\text{mL}$) com a absorvância a 500 nm, segundo método de dosagem de enzimas amilolíticas proposto em BERNFELD (1955). A glicose foi medida através da utilização do kit GOD PAP da Merck.

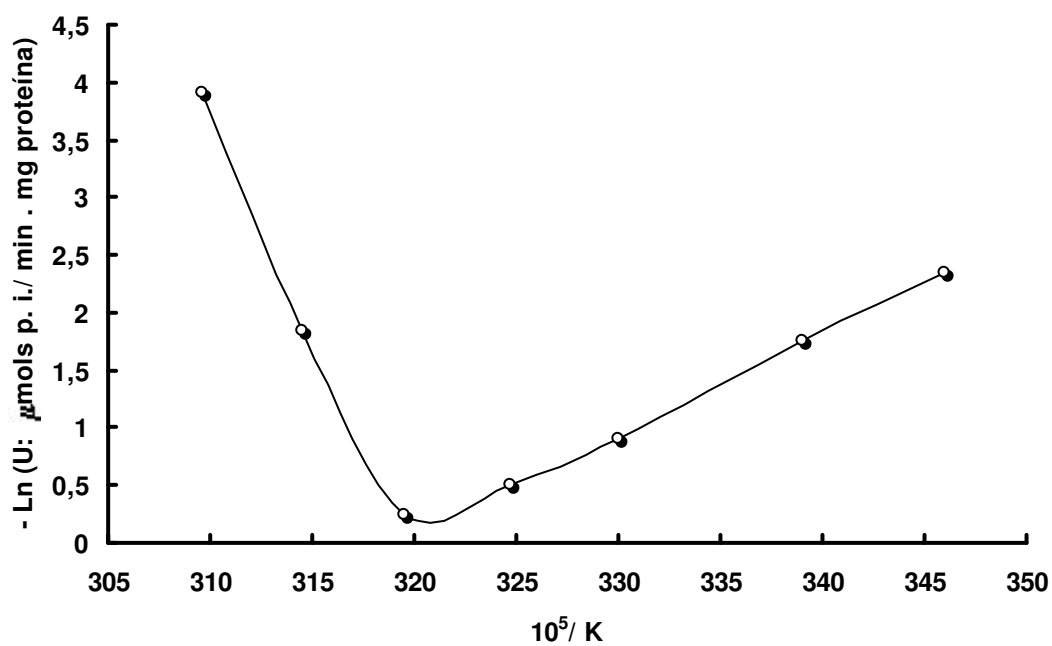


Figura 7A - Relação ($-\ln$) da atividade de PAL versus $10^5/T$, também chamado de Plotagem de Arrhenius, para o cálculo da energia de ativação.

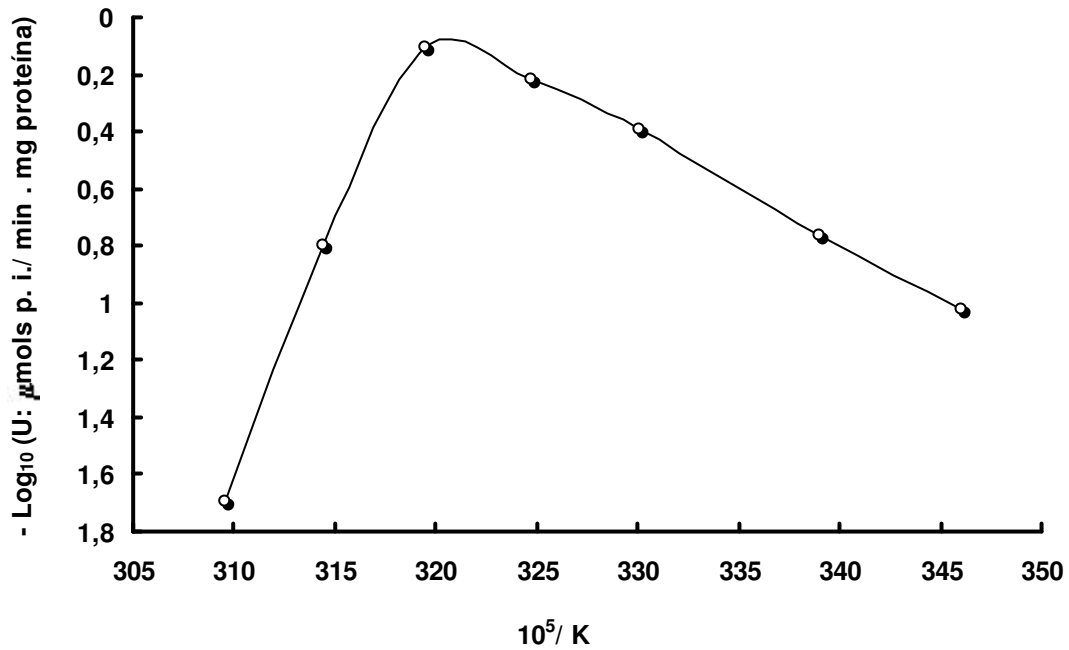


Figura 8A - Relação Log da atividade de PAL versus $10^5/T$, utilizado para o cálculo da constante térmica Q_{10} .

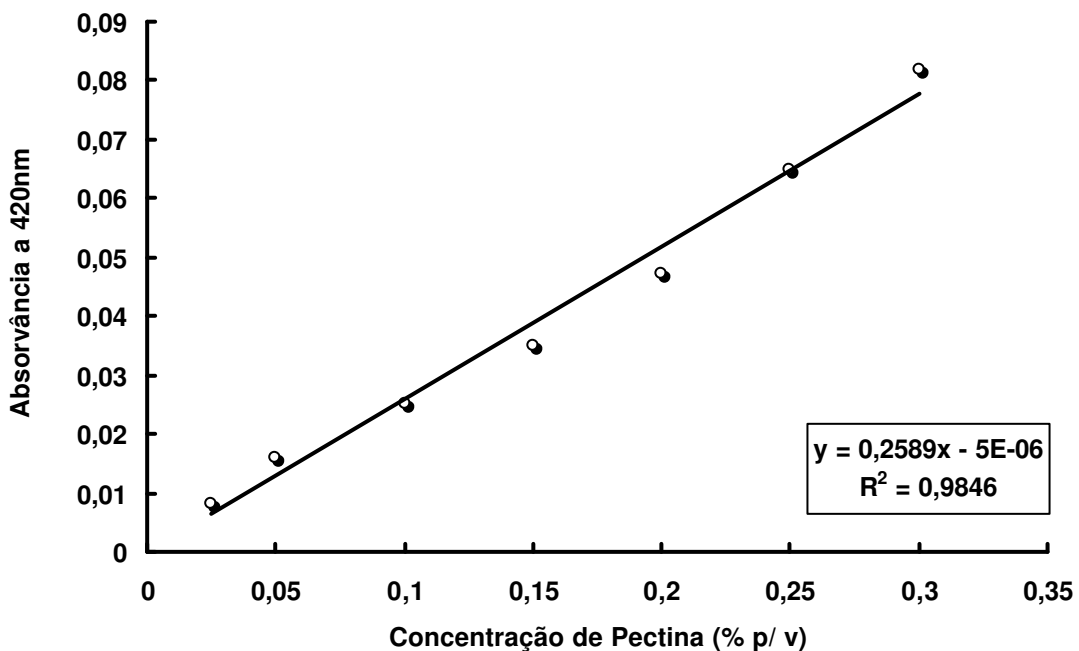


Figura 9A - Curva-padrão de relação de valores de absorvância da pectina cítrica Sigma, dissolvida em tampão de crescimento com a sua concentração (p/v) na solução, após a centrifugação a 4.000 g, por 10 min.

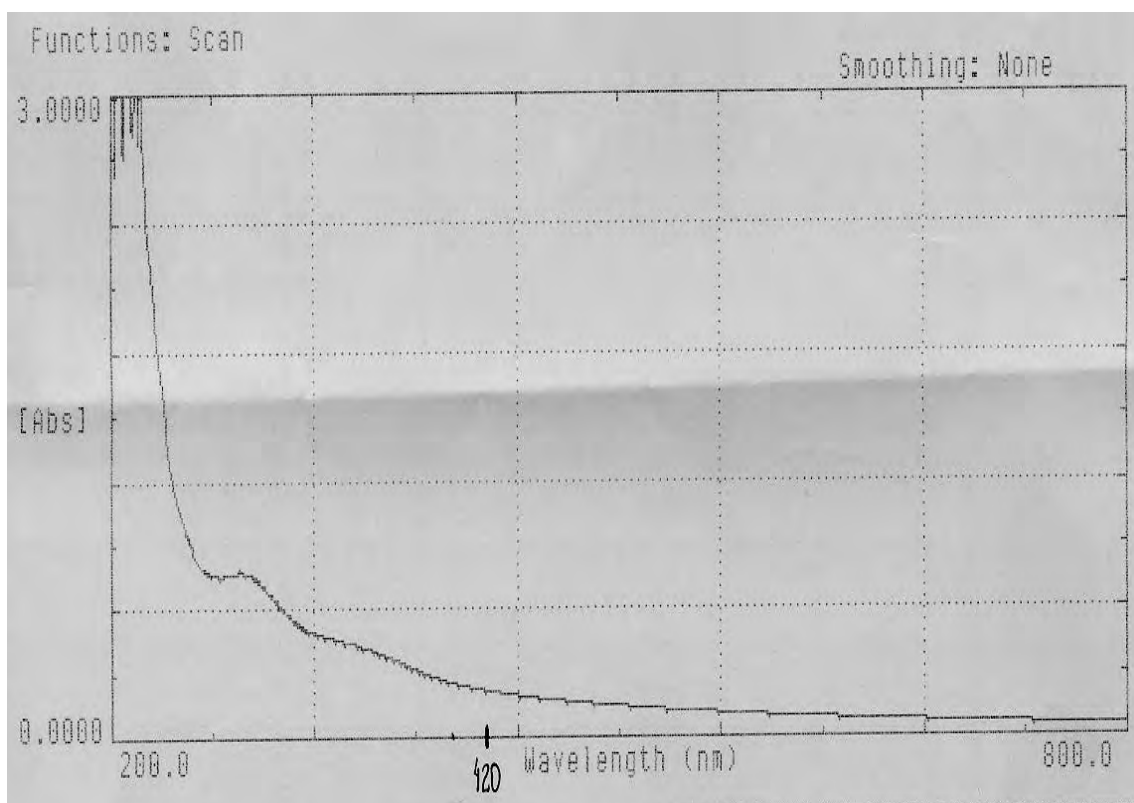


Figura 10A - Espectro de absorção da pectina cítrica Sigma 0,28%, em meio mineral, no intervalo de 200 a 800 nm, a 25°C.

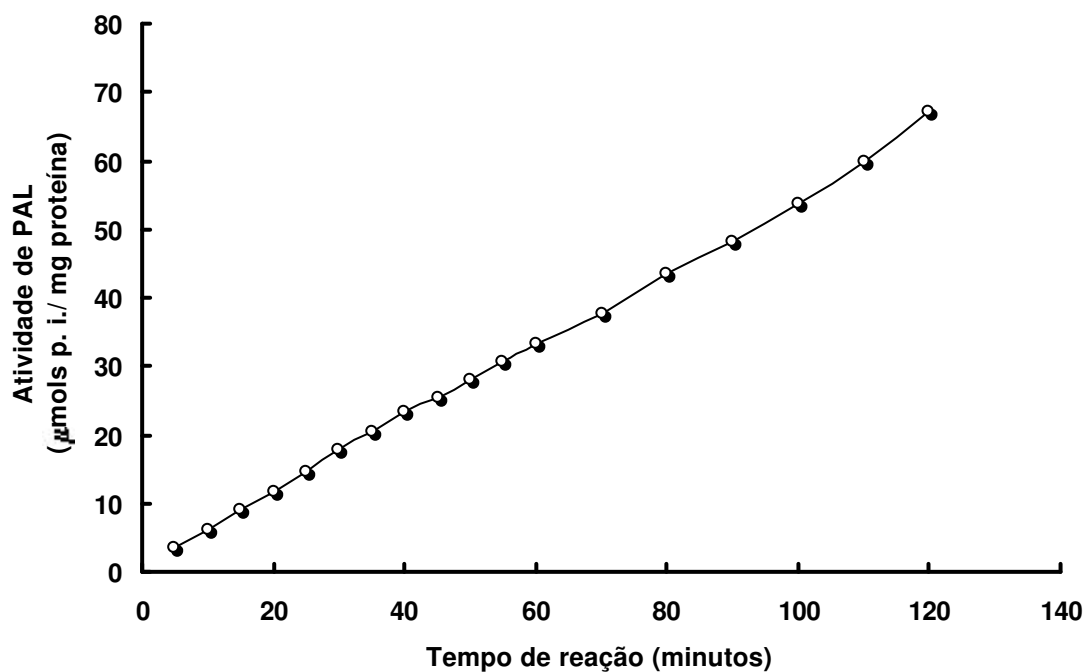


Figura 11A - Atividade de pectato liase de *Klebsiella oxytoca* sobre ácido poligalacturônico. Análises foram feitas a 40°C em substrato a 1% (p/ v), contendo Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM e MgSO₄ 4,2 mM, por um período de duas horas.

APÊNDICE B

Quadro 1B - Atividade de PAL de *Klebsiella oxytoca* presente na suspensão de células rompidas e nas duas frações obtidas após centrifugação da suspensão a 9.000 g por 10 minutos e atividade de PAL obtida através de leituras de absorvância de misturas de reação paralisadas em HCl centrifugadas. Cultivo da bactéria foi por 24 horas em meio mineral e pectina cítrica Sigma 0,28%, pH 7,0, sem agitação, a 25°C

Localização da Atividade	Atividade de PAL(U)
Suspensão das células rompidas	0,17
Sobrenadante da centrifugação das células rompidas	0,12
Precipitado da centrifugação das células rompidas	0
Sobrenadante da centrifugação realizada após paralisação da reação (células rompidas)	0,19

DECLARAÇÃO

Declaro, junto ao Conselho de Pós-Graduação, que a tese de RICARDO GENARI, matríc. 31006/93-5, intitulada **CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *Klebsiella oxytoca* ISOLADA DE FRUTOS DE CAFÉ** e apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”, passou por Revisão de Português.

Viçosa, 03 de novembro de 1999.

ROZIMAR GOMES DA SILVA FERREIRA