

EVANDRO MARCUS DE PAULA

CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PECTINA LIASE DE
Paenibacillus amylolyticus ISOLADO DE FRUTOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

EVANDRO MARCUS DE PAULA

CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PECTINA LIASE DE
Paenibacillus amylolyticus ISOLADO DE FRUTOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 16 de março de 2001.

Prof^ª Flavia Maria Lopes Passos
(Conselheira)

Prof. Jorge Luiz Cavalcante Coelho
(Conselheiro)

Prof^ª Maria Cristina Baracat Pereira

Dr.^a Virgínia Maria Chaves Alves

Prof. Daison Olzany Silva
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais Euripedes e Maria.

Ao meu irmão Márcio.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e à FAPEMIG, pela oportunidade de realização do Programa de Mestrado e pelo auxílio financeiro.

Ao Departamento de Microbiologia da UFV, por ter-me possibilitado a execução do projeto de tese e o aproveitamento científico, entre outras.

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

Ao professor Daison Olzany Silva, pela orientação e amizade.

Aos professores Flavia Maria Lopes Passos e Jorge Luiz Cavalcante Coelho, pelos conselhos, pelas sugestões, pelo convívio e pela amizade.

À Virgínia, pelas sugestões e pela amizade.

À minha querida Rosycler, pelo companheirismo, pela amizade e pelo auxílio moral, imprescindíveis nesta etapa de minha vida.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos Ana Paula, Ann, Cássia, Cláudia, Fábria, Fábio, Leonardo, Lizia, Marcelo, Otávio, Pollyanna, Wendel, Ximena e tantos outros aqui não citados, pela amizade e pelo auxílio.

A todos os meus amigos dos Laboratórios de Microbiologia Industrial, Genética Molecular e de Microrganismos e Associações Micorrízicas, pela agradável convivência.

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

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se realizasse.

BIOGRAFIA

EVANDRO MARCUS DE PAULA, filho de Maria Tomázia Nascimento de Paula e Euripedes da Silva Paula, nasceu em Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, no dia 7 de junho de 1974.

No período de março de 1996 a março de 1999, exerceu atividades de iniciação científica, como bolsista do CNPq, no projeto “Estudos de Fisiologia e Genética Molecular de Fungos Filamentosos Visando à Produção de Pectinases para a Degomagem de Fibras Naturais”, no Departamento de Microbiologia/BIOAGRO-UFV.

Em 26 de março de 1999, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, iniciando, em seguida, o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola nessa mesma Instituição, submetendo-se à defesa de tese em 16 de março de 2001.

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE EQUIPAMENTOS UTILIZADOS | viii |
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | xi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 11 |
| 3.1. Microrganismo utilizado | 11 |
| 3.2. Manutenção da cultura e preparo do inóculo | 12 |
| 3.3. Condições de cultivo | 13 |
| 3.4. Determinação das condições nutricionais mínimas | 13 |
| 3.4.1. Fonte de carbono para o crescimento | 13 |
| 3.4.2. Efeito da agitação no crescimento | 14 |
| 3.4.3. Requerimento nutricional | 14 |
| 3.4.4. Dependência de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na presença de tiamina como promotor de crescimento | 15 |
| 3.4.5. Averiguação da fixação de nitrogênio | 15 |
| 3.5. Ensaio enzimáticos | 15 |

| | |
|--|--------|
| 3.6. Caracterização da pectina liase | 17 |
| | Página |
| 3.6.1. Curva de tempo de reação | 17 |
| 3.6.2. Especificidade ao substrato | 17 |
| 3.6.3. Curva de produção de pectina liase | 18 |
| 3.6.4. Temperatura ótima de atividade da pectina liase | 18 |
| 3.6.5. Estabilidade térmica da pectina liase | 18 |
| 3.6.6. pH ótimo de atividade | 18 |
| 3.6.7. Efeito de EDTA e íons na atividade | 19 |
| 3.6.8. Determinação dos valores de Km e Vmax aparentes | 19 |
| 4. RESULTADOS | 20 |
| 4.1. Determinação das condições nutricionais mínimas | 20 |
| 4.1.1. Fonte de carbono para crescimento | 20 |
| 4.1.2. Efeito da agitação no crescimento | 20 |
| 4.1.3. Requerimento nutricional | 23 |
| 4.1.4. Dependência de (NH ₄) ₂ SO ₄ na presença de tiamina como promotor de crescimento | 24 |
| 4.1.5. Averiguação da fixação de nitrogênio | 26 |
| 4.2. Produção de pectinases | 26 |
| 4.3. Caracterização da pectina liase | 26 |
| 4.3.1. Curva de tempo de reação | 26 |
| 4.3.2. Especificidade ao substrato | 27 |
| 4.3.3. Curva de produção da pectina liase | 28 |
| 4.3.4. Temperatura ótima de atividade e termoestabilidade da pectina liase | 28 |
| 4.3.5. pH ótimo de atividade | 30 |
| 4.3.6. Efeito de EDTA e íons na atividade | 31 |
| 4.3.7. Determinação dos valores de Km e Vmax aparentes | 32 |
| 5. DISCUSSÕES | 34 |
| 6. CONCLUSÕES | 39 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 41 |

LISTA DE EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Autoplate 4000, da Spiral Biotech, Inc.

BECKMAM DU[®] 640.

BOD MA415 Marconi.

Espectrofotômetro Pharmacia Biotech Novaspec[®] II.

Incubator Shaker Series[™] 25D New Brunswick Scientific CO., INC.

Ultrafreezer Scientific, Inc., modelo 826.

RESUMO

PAULA. Evandro Marcus, M. S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Crescimento e caracterização de pectina liase de *Paenibacillus amylolyticus* isolado de frutos de café (*Coffea arabica* L.)**. Orientador: Daison Olzany Silva. Concelheiros: Flavia Maria Lopes Passos e Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

A bactéria *Paenibacillus amylolyticus*, isolada de frutos de café que tiveram sua superfície devidamente desinfestada, foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 125 mL, com 50 mL de volume de trabalho, em meio mineral suplementado com extrato de levedura 0,06% (p/v), com diferentes fontes de carbono, sempre a 0,3% (p/v) e pH 7,0, sendo a cultura incubada a 25 °C, com agitação de 150 rpm ou sem agitação. A bactéria também apresentou crescimento quando o extrato de levedura foi substituído por tiamina 50 mg L⁻¹ e outras vitaminas do complexo B, mas nunca quando alguns desses fatores não eram adicionados ao meio mineral. *Paenibacillus amylolyticus* cresce na ausência de sulfato de amônio, desde que extrato de levedura 0,06% (p/v) esteja presente, porém o mesmo não se verifica quando se substitui o extrato de levedura por tiamina 50 mg L⁻¹. O microrganismo não foi capaz de crescer em anaerobiose provocada pelo borbulhamento de nitrogênio gasoso, tanto na presença quanto na

ausência de sulfato de amônio, indicando que tal bactéria não é capaz de crescer em anaerobiose e fixar nitrogênio nessa condição. *P. amylolyticus* é capaz de crescer em pectina como única fonte de carbono e, para tal, produz pectina liase (PL), para lise deste carboidrato. A enzima PL acumula-se no meio mais eficientemente após 24 horas de crescimento, apresentando maior especificidade por pectina cítrica, quando utilizada como substrato enzimático. A atividade ótima de PL ocorre a 40 °C e a termoestabilidade, até 45 °C. Entre os valores de pH avaliados, PL apresentou atividade entre pH 5,6 e 8,6, sendo o ótimo 7,9. A adição de EDTA e íons metálicos na mistura de reação mostrou pequeno efeito na atividade da enzima, e os valores de K_m e V_{max} aparentes foram, respectivamente, de $6,61 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,24 \times 10^{-7} \text{ mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$.

ABSTRACT

PAULA, Evandro Marcus, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March of 2001. **Growth and characterization of pectin liase of *Paenibacillus amylolyticus* isolated from coffee beans (*Coffea arabica* L.)**. Adviser: Daison Olzany Silva. Commeette Members: Flavia Maria Lopes Passos and Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

The bacterium *Paenibacillus amylolyticus*, isolated from surface-sterilized coffee beans, was cultured at 25 °C, with and without agitation, in 125 mL shaker flasks containing 50 mL of mineral media (pH 7.0) supplemented with yeast extract 0.06% (w/v) and different carbon sources at a concentration of 0.3% (w/v). *P. amylolyticus* also showed growth when yeast extract was replaced with thiamin 50 mg L⁻¹ and other B complex vitamins, but no growth was detected when one of these substances was not added to the media. This bacterium grows in absence of ammonium sulfate when yeast extract 0.06% (w/v) is added, although growth is not detected when yeast extract is replaced with thiamin 50 mg L⁻¹. When submitted to na anaerobic environment, through of addition of gas nitrogen, no growth was verified in a medium with and without fixed nitrogen, indicating that this organism is not capable of fixing gas nitrogen. *P. amylolyticus* is capable of using pectin as a sole carbon source, a result that

indicates production of pectin liase (PL). The production of this enzyme is detected in higher concentrations after 24 hours of growth, showing an increased affinity, or specificity, for citric pectin when this is used as the enzymatic substrate. Optimum activity for PL occurs at 40°C and is thermostable for up to 45 °C. PL shows activity between pH values of 5.6 and 8.6, although pH 7.9 is best. Addition of EDTA and metal ions to the reaction mixture present a small effect in enzyme activity, and the Km and Vmax values are 6.61 mg mL⁻¹ and 1.24 x 10⁻⁷ mol min⁻¹ mL⁻¹, respectively.

1. INTRODUÇÃO

A incidência de microrganismos nas fases de pré e pós-colheita do café tem sido um dos principais fatores envolvidos na qualidade e valor comercial, principalmente nas modalidades de colheita e preparo adotados no Brasil, isto é, colheita de frutos em diferentes estádios de amadurecimento e preparo “via seca”, ao contrário de outros países como a Colômbia, onde o processo de colheita é seletivo (colheita a dedo) e os frutos são despulpados.

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

A camada mucilaginosa dos frutos de café é composta, em sua maioria, de substâncias pécticas. A presença de pectina na camada mucilaginosa constitui sério obstáculo para a rápida secagem da semente, sendo também um meio favorável ao desenvolvimento de microrganismos. O excesso da ação de microrganismos pode alterar o “flavor” e o valor comercial do café produzido. A fermentação decompõe a camada mucilaginosa em poucas horas, devido a uma rápida ação da microbiota e de enzimas pectinolíticas. Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza, e seu substrato, a pectina, são

polissacarídeos complexos, localizados principalmente na lamela média entre células dos tecidos de plantas superiores. Bactérias e fungos são conhecidos por produzirem enzimas pectinolíticas, provocando perdas no campo e na pós-colheita. O estudo das substâncias pécticas e das pectinases tem sido considerado também de grande importância pela aplicação industrial dessas enzimas.

A aplicação industrial das enzimas pectinolíticas, em sua grande maioria, se baseia na clarificação de suco de frutas, na extração de óleo de abacate, na degradação da mucilagem durante a cura do cacau e café e na degomagem de fibras naturais, como rami e linho.

Microrganismos endofíticos são, principalmente, fungos e bactérias que ocorrem no tecido interno das plantas, especialmente em suas partes aéreas, e não produzem qualquer efeito patogênico detectável nas plantas; ao contrário, possuem relação simbiótica, de que os dois organismos se beneficiam. Bactérias endofíticas também são definidas como aquelas que podem ser isoladas de superfícies desinfetadas de tecidos de plantas ou extraídas de dentro da mesma planta e que não sejam visivelmente prejudiciais a esta.

Uma bactéria isolada do interior de frutos maduros de café (*Coffea arabica* L.) proveniente do Município de Viçosa, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, foi identificada como *Paenibacillus amylolyticus*. Essa bactéria foi estudada com o objetivo de avaliar seus requerimentos nutricionais mínimos para crescimento e seu potencial como produtora de enzimas pectinolíticas, bem como a caracterização de suas pectinases, com vistas 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

Desmucilagem é o processo de remoção da camada mucilaginosa dos frutos de café, o qual pode ser realizado por vários mecanismos, sendo um deles o enzimático, com preparações pectinolíticas comerciais (FRANK e DELA CRUZ, 1964). O resultado do estudo desenvolvido por esses autores indica que a desmucilagem é sempre acompanhada de evidências microscópicas de grande número de microrganismos. Essa desmucilagem não ocorre em condições que excluam o crescimento microbiano, e um rompimento na casca dos frutos de café não irá, necessariamente, causar rápido escurecimento no local da injúria. Tais observações indicam que a desmucilagem resulta da atividade de um grupo específico de bactérias, que podem solubilizar a pectina na camada mucilaginosa, e que esses organismos são inoculados no fruto, via rupturas na casca (FRANK e DELA CRUZ, 1964).

Vários autores, citados por VAN PEE e CASTELEIN (1972), relataram que a composição da camada mucilaginosa em frutos de café possui maior quantidade de substâncias pécticas. A microflora pectinolítica, particularmente de enterobacteriáceas que participam da fermentação do café coletado no Congo, foi testada quanto à atividade das enzimas poligalacturonase e pectina esterase, ressaltando-se que, de todos os isolados durante a fermentação, apenas *Erwinia*

dissolvens apresentou habilidade para hidrolisar substâncias pécticas, sendo detectado apenas exopoligalacturonase (VAN PEE e CASTELEIN, 1972).

JIMENEZ-SALGADO et al. (1997) estudaram a ocorrência natural de bactérias diazotróficas na rizosfera e nos tecidos de diferentes cultivares de plantas de café, produtoras de ácido acético. Testes microbiológicos, bioquímicos e genéticos evidenciaram que a maioria dessas bactérias pertence à espécie *Acetobacter diazotrophicus*. Também, foram obtidas fortes evidências que suportam a hipótese de que algumas dessas estirpes representam novas espécies do gênero *Acetobacter* capazes de fixar nitrogênio.

Com poucas exceções, as células de plantas são envolvidas por paredes de camadas múltiplas com estruturas específicas, que conferem proteção contra invasores e força mecânica, dando forma e tamanho ao tecido e aos órgãos da planta. A parede primária, a secundária e a lamela média são níveis de subunidades formadas em uma parede celular típica. As camadas primária e secundária contêm vários acúmulos de celulose, hemicelulose e pectina. A parede secundária nem sempre está presente, mas sim usualmente envolvida em fornecer suporte estrutural. Entretanto, o conteúdo de celulose é aumentado, enquanto o de pectina é diminuído na parede secundária. A lamela média também contém substâncias intercelulares, preenchendo os espaços entre a parede primária e células adjacentes (PRADE et al., 1999).

Carboidratos são os componentes da parede celular das plantas presentes em maior quantidade, formando o complexo suporte estrutural. A parede celular das plantas representa o material orgânico natural aproveitável mais abundante e renovável da Terra. Essa fonte pode ser utilizada favoravelmente como fonte de energia e material para processos bioquímicos (PRADE et al., 1999).

Uma parede celular primária típica de uma planta de dicotiledônea consiste de 25 – 30% de celulose, 15 – 25 % de hemicelulose, 35% de pectina e 5 – 10% de proteína, com base no peso da matéria seca. A composição molecular precisa e a estrutura da parede celular dependem da célula, do tecido e da espécie da planta (TAIZ e ZEIGER, 1991).

Apesar de a síntese de enzimas pectinolíticas no campo ser extremamente indesejável em termos econômicos, por representar perdas no campo e também de pós-colheita, as pectinases microbianas apresentam diversas aplicações.

O uso de pectina liase (PL) em processos industriais voltados para a produção de suco de frutas traz vantagens em relação ao uso de outras enzimas pectinolíticas, como pectina esterase e poligalacturonase. Estas possuem ação combinada e podem ser substituídas por PL, que realiza o trabalho das duas enzimas. A imobilização de pectina liase oferece possibilidades interessantes para aplicação em processos contínuos de tratamento do suco de fruta (SPAGNA et al., 1993).

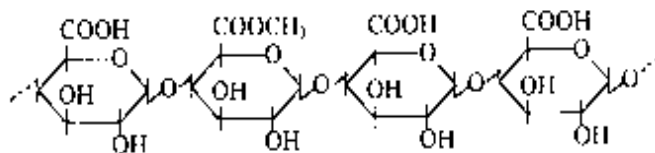
Embora pectina liase seja comum entre os fungos (PRADE et al., 1999), existem vários relatos da produção por bactérias. Produção de pectinases bacterianas foi reportada por diversos autores como TSUYUMU e MIYAMOTO (1986), que verificaram a indução de pectato liase (PAL) e PL por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. PAL e PL de *Pseudomonas marginalis* MAFF 03-11173 também foram descritas (HAYASHI et al., 1997). A Enterobacteriacea *Erwinia chrysanthemi* secreta PL, PAL e exopoli- α -D-galacturonosidase, causando doenças em várias plantas (COLLMER et al., 1988). *Pseudomonas fluorescens* W51 apresentou produção de PL (SCHLEMMER et al., 1987). PL de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI 1043 foi purificada e caracterizada por GODFREY et al. (1994).

Pectina é um heteropolissacarídeo, que consiste de unidades repetidas de D-metil-galacturonato com ligações α -(1,4) (esquema 1), com inserção eventual de moléculas de ramnose (HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT et al., 1996). As pectinases podem ser combinadas em dois grupos, metilesterases, as quais removem grupos metil da pectina e despolimerases (hidrolases e liases), as quais clivam as ligações entre as unidades de galacturonato. As liases clivam as ligações glicosídicas por β -eliminação, gerando, assim, produtos insaturados (SORIANO et al., 2000) (esquema 2).

Existem dois tipos de liases, uma é a pectato liase (poligalacturonato liase, EC 4.2.2.2), a qual é específica para resíduos de ácido galacturônico, sendo a

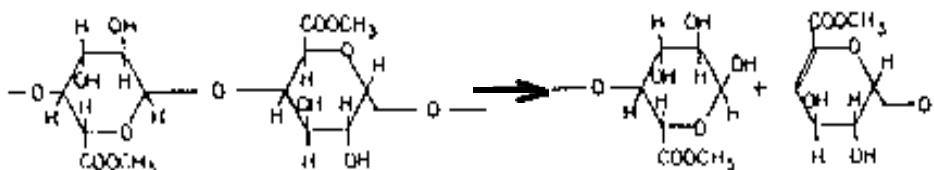
outra a pectina liase (polimetilgalacturonato liase, EC 4.2.2.10), específica para resíduos metil galacturonato (HAYASHI et al., 1997).

ESQUEMA 1



ESTRUTURA QUÍMICA DA CADEIA PRINCIPAL DA PECTINA

ESQUEMA 2



Degradação da pectina por pectina liase

Bactérias produtoras de liases e outras pectinases, como *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (CHATTERJEE et al., 1995; LIU et al., 1999), *E. chrysanthemi* (NASSAR et al., 1996) e *Ralstonia solanacearum* (TANSKERSTEN et al., 1998) têm sido encontradas em associação com plantas, causando doença do tipo podridão-mole, que tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores.

Uma bactéria isolada de frutos de café sadios foi identificada como *Klebsiella oxytoca*, sendo estudada e caracterizada quanto à produção de pectato liase (GENARI et al., 1999), bactéria que possivelmente seja endofítica em frutos de café.

Bactérias endofíticas são mais bem 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 a esta (HALLMANN et al., 1997). Microrganismos endofíticos exercem vários efeitos benéficos nas plantas, sendo usados em controle biológico de fitopatógenos para elevar as características agronômicas da planta, como aumentar a tolerância à seca e a deficiência ao nitrogênio (BACON e HINTON, 1997).

Em geral, bactérias endofíticas originam-se da própria comunidade epifítica da rizosfera e filosfera, bem como de infestações endofíticas das sementes e material de propagação vegetal (HALLMANN et al., 1997).

A entrada no tecido das plantas ocorre através de aberturas naturais ou por ferimentos (HALLMANN et al., 1997). Em geral, a entrada nos tecidos da planta pode ser via estômatos, lenticelas, ferimentos, áreas de emergência lateral de raízes e germinação de radículas (HUANG, 1986). Todavia, a maior entrada de bactérias endofíticas parece ser através de feridas que ocorrem naturalmente como resultado do crescimento da planta, ou através de pêlos radiculares e invaginações da epiderme (SPRENT e FARIA, 1988).

Bactérias endofíticas também parecem ativar sua penetração nos tecidos das plantas usando enzimas hidrolíticas. Esta hipótese é suportada pela presença de enzimas celulolíticas e pectinolíticas, produzidas por grande número de bactérias endofíticas, como *Azoarcus* sp. (HUREK et al., 1994), *Azospirillum irakense* (KHAMMAS e KAISER, 1991) e *Pseudomonas fluorescens* (BENHAMOU et al., 1996; QUADT-HALLMANN et al., 1997). Degradação enzimática da parede celular das plantas por essas bactérias foi unicamente observada quando elas colonizaram a epiderme das raízes, mas nunca após colonizar os espaços intercelulares do córtex da raiz (HALLMANN et al., 1997). Esses resultados indicam que indução e produção endofíticas de celulasas e pectinases são apenas para penetração na planta. Embora essas observações demonstrem a possibilidade de mecanismo efetivo de penetração para algumas bactérias endofíticas, muito pouco é conhecido sobre a origem e regulação dessas enzimas (HALLMANN et al., 1997). Penetração ativa é ainda motivo de controvérsias, mas o fato é que bactérias no solo mostraram maior frequência de enzimas hidrolíticas do que bactérias habitando o xilema, indicando diferenças

no sistema de entrada das bactérias endofíticas na planta, via produção de enzimas hidrolíticas (BELL et al., 1995). Além disso, há diferença na produção enzimática “in vitro” e na planta. Nem *Enterobacter asburiae* JM22 e nem *Pseudomonas fluorescens* 89B-61 produziram celulase quando cultivadas em meio com celulose. Entretanto, atividade celulolítica foi observada através da seção de colonização bacteriana em raízes de algodão (QUADT-HALLMANN et al., 1997).

Bactérias endofíticas devem possuir alguns mecanismos regulatórios para produção específica de suas enzimas em termos de qualidade e tempo de expressão, fato bem conhecido para *Xanthomonas campestris*, em que estirpes virulentas e avirulentas diferem em suas atividades celulolíticas (KNOSEL e GARBER, 1967).

Quando no interior da planta a bactéria endofítica se localiza em um tecido específico da planta, junto ao córtex da raiz, ou coloniza a planta sistemicamente, por transporte pelos elementos condutores ou apoplasto (HUREK et al., 1994). No geral, microrganismos endofíticos colonizam espaços intercelulares (BACON e HILTON, 1997).

Bactérias endofíticas colonizam nichos ecológicos similares aos de patógenos de plantas, sendo candidatos como agentes de biocontrole (HALLMANN et al., 1997). Bactérias endofíticas têm sido associadas com a promoção do crescimento de várias plantas, como arroz (HUREK et al., 1994) e batata (FROMMEL et al., 1991). *Pseudomonas* sp. estirpe PSJN induziu crescimento significativo no número de raízes de batata, no peso de matéria seca das raízes, comprimento do pecíolo e conteúdo total de lignina na planta (FROMMEL et al., 1991).

Com a finalidade de estudar a fisiologia de microrganismos endofíticos obtidos a partir de frutos de café e ao mesmo tempo selecionar um microrganismo que fosse exímio produtor de enzimas pectinolíticas, uma bactéria (isolado F 7-4) se destacou dentre a coleção de microrganismos endofíticos de frutos de café, obtidos no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, pertencente ao Departamento de Microbiologia da Universidade

Federal de Viçosa. Tal cultura bacteriana foi enviada para identificação na Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” (<http://www.fat.org.br>) e identificada como *Paenibacillus amylolyticus*.

Recentemente, ASH et al. (1993) propuseram a transferência de *Bacillus amylolyticus*, *B. pabuli* e *B. validus* para o gênero *Paenibacillus*. SHIDA et al. (1997) observaram aumento na descrição de *Paenibacillus amylolyticus*.

Bactérias do gênero *Paenibacillus* têm sido isoladas de sistemas agrícolas, como a micorrizosfera de sorgo (BUDI et al., 1999), rizosfera, filosfera e raízes aéreas de milho (SELDIN et al., 1998; ROSADO et al., 1998) e rizosfera de arroz, milho, batata e tapioca (YIM et al., 1997).

Nos últimos anos, vários microrganismos têm sido descritos associados com rizosfera de diferentes plantas hospedeiras colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares (BUDI et al., 1999). Uma bactéria isolada da micorrizosfera de sorgo (*Sorghum bicolor*) apresentou atividade antagonista significativa sobre *Phytophthora parasitica*, que causa necrose em raízes de sorgo, reduzindo em até 63% das raízes necrosadas, quando inoculada juntamente com o fungo micorrízico *Glomus mosseae*. Essa bactéria foi identificada como uma nova espécie de *Paenibacillus* (BUDI et al., 1999). A descoberta de uma estirpe de *Paenibacillus* que atua como agente de biocontrole, inibindo a ação de fungos causadores de doenças e promovendo a formação de micorrizas arbusculares, abre a possibilidade de utilização da inoculação conjunta bactéria-fungo para promover a produção de plantas de alto valor em sistemas compatíveis com o ambiente (BUDI et al., 1999).

SELDIN et al. (1998) fizeram uma comparação de estirpes de *Paenibacillus azotofixans*, conhecido como fixador de nitrogênio, isolado de rizoplano, rizosfera e raízes aéreas, em solos de milho plantados em dois diferentes solos brasileiros, determinando a diversidade entre populações de *P. azotofixans* por características fenotípicas e genotípicas. Este trabalho foi complementado pela mesma equipe, averiguando a diversidade genética de seqüências do gene *nifH* (ROSADO et al., 1998).

Até o momento não foi encontrado na literatura bactéria pertencente ao gênero *Paenibacillus* e produtora de enzimas pectinolíticas e tampouco endofítica, apesar da estreita relação entre tal bactéria e plantas onde foi isolada. Há poucas referências sobre bactéria endofítica e produção de pectinases, como é o caso de *Azospirillum irakense* (KHAMMAS e KAISER, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente 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 bactéria *Paenibacillus amylolyticus* utilizada neste estudo foi isolada do interior de frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de plantio no Município de Viçosa, situado na região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. O isolamento da bactéria foi realizado durante o desenvolvimento das pesquisas referentes à tese de doutorado de Cássia Sakiama, desenvolvida no Departamento de Microbiologia, no ano de 1999. Os frutos tiveram sua superfície devidamente desinfestada, o que caracteriza a bactéria como endofítica nessa parte da planta. A identificação da bactéria isolada foi realizada pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, por análise filogenética de seqüências parciais de DNA ribossomal 16S (rDNA 16S) (Figura 1).

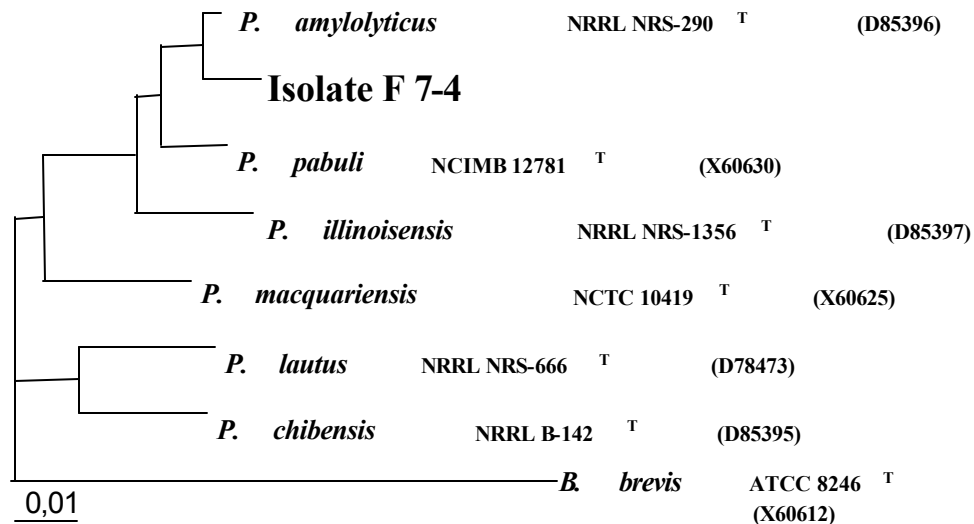


Figura 1 – Árvore filogenética baseada nas análises de seqüências parciais do rRNA 16S, de linhagens de *Paenibacillus amylolyticus*, *Paenibacillus chibensis*, *Paenibacillus ilinoísensis*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus macquariensis*, *Paenibacillus paduli* e *Brevibacillus brevis* (esta última usada como "outgroup") e da amostra F 7-4. Os números entre parênteses correspondem a acrônimo de acesso na base de dados Genbank.

3.2. Manutenção da cultura e preparo do inóculo

A bactéria está estocada e conservada em glicerol 50% (v/v), na temperatura de -86 °C, em "ultrafreezer." A produção do inóculo foi realizada cultivando *Paenibacillus amylolyticus* em meio mineral (MM) (K_2HPO_4 , 7; KH_2PO_4 , 2; $(NH_4)_2SO_4$, 1; e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,1, pH 7,0, composição em gramas por litro), adicionado de glicose como fonte de carbono na concentração final de 0,3% (p/v) e extrato de levedura na concentração final de 0,06% (p/v), a 25 °C, e agitação de 150 rpm.

3.3. Condições de cultivo

A bactéria foi cultivada em MM, conduzido em frascos Erlenmeyers de 125 mL com volume de trabalho de 50 mL, mantidos a 25 °C em regime de batelada sob agitação (150 rpm). As fontes de carbono foram adicionadas separadamente na concentração final de 0,3% (p/v) e extrato de levedura 0,06% (p/v). O meio foi esterilizado a 121 °C por 30 min, e a fonte de carbono, o extrato de levedura e o sulfato de magnésio foram autoclavados, separadamente.

Foram realizadas três repetições de cada experimento.

3.4. Determinação das condições nutricionais mínimas

3.4.1. Fonte de carbono para crescimento

Curvas de crescimento foram obtidas na concentração de 0,3% (p/v) da fonte de carbono no meio. A bactéria foi cultivada em MM adicionado das fontes de carbono em frações separadas (amido, caseína, caseína hidrolisada, celobiose, celulose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, pectina, ribose, sacarose e xilose).

O crescimento foi acompanhado de turbidimetria, averiguando-se a densidade ótica a 600 nm, tendo o meio mineral como branco. Quando *P. amylolyticus* foi cultivado em celulose, o crescimento foi acompanhado pela contagem de colônias, em placas de Petri. As placas continham 15 mL de ágar nutriente Merck. Após inoculadas, as placas foram incubadas a 25 °C por 24 horas, sendo determinado, em seguida, o número de colônias.

As velocidades de crescimento microbiano em cada fonte de carbono foram determinadas pela regressão linear dos valores da densidade ótica referente à fase log de crescimento.

3.4.2. Efeito da agitação no crescimento

Paenibacillus amylolyticus foi cultivado em MM contendo glicose ou pectina 0,3% (p/v) como fonte de carbono e incubado a 150 rpm, sem agitação.

O crescimento foi acompanhado de turbidimetria, conforme descrito anteriormente, sendo os dados analisados, para determinação das velocidades de crescimento.

3.4.3. Requerimento nutricional

A bactéria foi cultivada em MM, adicionando-se glicose como única fonte de carbono e vitaminas pertencentes ao complexo B (tiamina, 50; riboflavina, 50; piridoxina, 100; pantotenato de cálcio, 50; niacinamida, 50; e a mistura destes — composição em mg por litro), sempre na ausência de extrato de levedura.

Paenibacillus amylolyticus foi cultivado em MM, adicionando-se glicose como única fonte de carbono e diferentes combinações de tiamina 50 mg L⁻¹ e sulfato de amônio 1,0 g L⁻¹ (presença de tiamina e de sulfato de amônio, presença de tiamina e ausência de sulfato de amônio, ausência de tiamina e presença de sulfato de amônio e ausência de tiamina e ausência de sulfato de amônio), sempre na ausência de extrato de levedura. Averigou-se a turbidez do meio após crescimento por 24 horas a 150 rpm e a 25 °C.

Paenibacillus amylolyticus foi cultivado em MM adicionado de glicose como fonte de carbono, na presença de sulfato de amônio, e em diferentes concentrações de tiamina (50,5; 0,5; 5x10⁻²; 5x10⁻³; 5x10⁻⁴; 5x10⁻⁵; 5x10⁻⁶ — composição em mg por litro), sempre na ausência de extrato de levedura, para se estimar a concentração mínima requerida de tiamina para crescimento. A turbidez da cultura foi determinada (DO₆₀₀) após 24 horas de crescimento a 25 °C e 150 rpm.

3.4.4. Dependência de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na presença de tiamina como promotor de crescimento

Paenibacillus amylolyticus foi cultivado em meio mineral adicionado de glicose como fonte de carbono, na presença e na ausência de nitrogênio fixado (sulfato de amônio), ausência de extrato de levedura e sempre na presença de tiamina como fator de crescimento na concentração final de 50 mg L^{-1} .

O crescimento foi acompanhado pela turbidez da cultura (DO_{600}), sendo os dados utilizados na construção da curva de crescimento e determinação da velocidade de crescimento, como descritos previamente.

3.4.5. Averiguação da fixação de nitrogênio

Paenibacillus amylolyticus foi cultivado em glicose 0,3% (p/v) como única fonte de carbono em fermentadores de 500 mL, sem a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e com borbulhamento de nitrogênio gasoso por 10 min, para obtenção da anaerobiose. Tiamina, na concentração de 50 mg L^{-1} , foi adicionado ao meio como fator de crescimento, e não se utilizou extrato de levedura. As culturas foram incubadas a 25°C por 72 horas, sem agitação.

3.5. Ensaio enzimáticos

O sobrenadante das culturas em meio mineral com pectina 0,3% (p/v) e extrato de levedura 0,06% (p/v), obtido após centrifugação a 8.000 g por 10 min; e a cultura não-centrifugada foram utilizados para dosagem da atividade das pectinases. Todos os ensaios enzimáticos foram dosados por espectrofotometria.

A atividade de pectina liase (PL) foi determinada espectrofotometricamente a 235 nm , como descrito por ALBERSHEIM e KILLIAS (1962). A mistura da reação consistiu de 1 mL de pectina (Sigma P9135) como substrato, na concentração final de 1,0% (p/v), em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 80 mM e pH 6,8, adicionando-se 1,5 mL do sobrenadante da

cultura ou da cultura mantidos a 25 °C e 40 °C por 20 min. Aliquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 20 min de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 N, para interromper a reação. Uma unidade de atividade de PL foi definida como nanomoles de produto insaturado produzido por mililitro da amostra por minuto, utilizando-se para cálculo a absorvidade molar do produto insaturado de 5.550 L cm⁻¹ mol⁻¹ (ALBERSHEIM e KILLIAS, 1962).

A atividade de poligalacturonase (PG) foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm, usando-se ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Ácido D(+) galacturônico, neutralizado com NaOH, foi usado como padrão. A mistura de reação constituiu-se de 0,5 mL do sobrenadante da cultura e 1,5 mL de solução de ácido poligalacturônico (Sigma) como substrato, numa concentração final de 0,6% (p/v), preparada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e NaCl 0,1 M. Aliquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram retiradas após 0 e 20 min de incubação a 25 e 40 °C, respectivamente, e adicionadas a um tubo de ensaio contendo 1,5 mL: de DNS 1 mL e de água 0,5 mL, onde o fenol e metabissulfito de sódio foram adicionados no momento de se realizar a reação. Uma unidade de atividade de PG foi definida como µmoles de ácido galacturônico liberado por mililitro de filtrado por minuto.

A atividade de pectato liase (PAL) foi determinada espectrofotometricamente pela formação de produtos insaturados a partir de ácido poligalacturônico (PGA) a 230 nm. A mistura de reação-padrão constituiu-se de 3 mL de PGA (Sigma), 1,0% (p/v) em tampão Tris/HCl 0,1 M, pH 8,5 e 0,5 mL do sobrenadante da cultura. A reação processou-se a 25 e 40 °C por um período de 40 min. Aliquotas 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, interrompendo, assim, a reação. Uma unidade de atividade de PAL foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1 µmol de produtos insaturados por mililitro da cultura por minuto, utilizando-se para cálculo o coeficiente de absorção molar do produto insaturado como sendo de 5.200 L cm⁻¹ mol⁻¹ (MORAN et al., 1968).

Foram realizadas três repetições para cada análise enzimática.

3.6. Caracterização da pectina liase

O sobrenadante da cultura obtido por centrifugação a 8.000 g por 10 min foi utilizado nos experimentos de caracterização da enzima, sendo obtido do crescimento em 50 mL de meio mineral, em f Erlenmeyers de 125 mL por 21 horas, a 25 °C, e 150 rpm em “Incubator Shaker Series” 25 D "New Brunswick Scientific CO., INC.," em que pectina Sigma (P-9135), na concentração final de 0,3% (p/v), foi utilizada como única fonte de carbono, acrescido de extrato de levedura na concentração final de 0,06% (p/v). A dispersão do erro nas três repetições de cada análise enzimática foi determinada, estatisticamente, pelo cálculo do desvio-padrão da média.

3.6.1. Curva de tempo de reação

Medidas de atividade de pectina liase foram tomadas a cada 5 min de reação, nos primeiros 60 min, e a cada 30 min nos posteriores 120 min, totalizando 180 min, nas condições-padrão de análise, visando otimizar o método de ensaio enzimático e a caracterização físico-química da enzima.

3.6.2. Especificidade ao substrato

Para este propósito, o sobrenadante da cultura foi incubado com substâncias pécticas diferentes, como ácido poligalacturônico, pectina cítrica e pectina de maçã, todas na concentração final de 1,0% (p/v), na mistura de reação; os produtos formados foram quantificados.

3.6.3. Curva de produção de pectina liase

Com as finalidades de acompanhar o crescimento de *P. amylolyticus* e averiguar como ocorre a indução da enzima no decorrer do tempo de crescimento da bactéria, foi feita uma curva de crescimento acompanhada da produção de pectina liase.

3.6.4. Temperatura ótima de atividade da pectina liase

As misturas de reação contendo a enzima foram incubadas em diferentes temperaturas (0 a 70 °C), variando de 5 em 5 °C, e submetidas à análise de atividade, de acordo com os métodos-padrão de análise.

3.6.5. Estabilidade térmica da pectina liase

O sobrenadante da cultura, obtido no final da fase log de crescimento bacteriano, foi incubado por uma hora em temperaturas no intervalo entre 0 e 70 °C, variando de 5 em 5 °C. Em seguida, a atividade de pectina liase foi determinada conforme descrito anteriormente.

3.6.6. pH ótimo de atividade

Para avaliar o efeito do pH sobre a atividade de PL, a reação foi conduzida em tampão acetato de sódio/fosfato de potássio monobásico/Tris (ARAÚJO et al., 1983). Os valores de pH do substrato foram ajustados com NaOH ou HCl concentrado. Os valores testados de pH foram de 3,8 a 10,8, com intervalos de 0,2 unidade de pH. O sobrenadante da cultura obtido por centrifugação foi dialisado em membrana de diálise MWCO 12–14.000 Thomas Scientific, sendo a determinação da atividade enzimática realizada como descrito anteriormente.

3.6.7. Efeito de EDTA e íons na atividade

O efeito de EDTA e íons sobre a atividade enzimática foi determinado, incubando-se a mistura de reação na presença das seguintes substâncias, nas concentrações finais especificadas (mM): nenhum, EDTA (2), CaCl₂ (2, 10, 50 e 100), CuSO₄ (2), ZnSO₄ (2), MgSO₄ (2), MnSO₄ (2) e CoSO₄ (2) e a mistura de todos eles (2). A determinação da atividade enzimática foi realizada como descrito anteriormente, sendo, nesse caso, o sobrenadante da cultura obtido por centrifugação e dialisado em membrana de diálise MWCO 12 – 14.000 Thomas Scientific.

3.6.8. Determinação dos valores de Km e Vmax aparentes

Os valores de Km e Vmax aparentes foram determinados com os dados da dosagem e da atividade de PL obtido de reações contendo as seguintes concentrações finais de substrato na mistura de reação: 0,04%; 0,05%; 0,06%; 0,07%; 0,08%; 0,12%; 0,24%; e 0,4% (p/v). O programa de computador SIGMA PLOT ("Scientific Graphing Software" – Versão 4.0, para Windows 95) foi utilizado para cálculo da Constante de Michaelis aparente (K_m^{app}) e de velocidade máxima aparente (V_{max}^{app}), por ajuste hiperbólico dos dados de velocidade inicial de Lox obtidos conforme as concentrações de substrato (dados experimentais). As velocidades iniciais de reação (V_o) correspondente a cada concentração do substrato pectina cítrica ([S]) foram calculadas pela equação hiperbólica

$$V_o = (V_{max}^{app} \times [S] / K_m^{app} + [S])$$

utilizando os valores de velocidade máxima aparente e de Constante de Michaelis aparente ajustados pelos dados experimentais.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação das condições nutricionais mínimas

4.1.1. Fonte de carbono para crescimento

Paenibacillus amylolyticus, quando crescido em diferentes fontes de carbono, apresentou maior velocidade de crescimento em amido ($\mu_{\max} = 0,32 \text{ h}^{-1}$) e menores velocidades de crescimento em frutose e pectina, $\mu_{\max} = 0,14$ e $0,16$, respectivamente (Figura 2 e Tabela 1). O microrganismo apenas não apresentou crescimento quando foi cultivado em caseína e caseína hidrolisada como fontes de carbono e na ausência de fonte de carbono. *P. amylolyticus* também apresentou crescimento quando se utilizou celulose como fonte de carbono (dados não mostrados). SHIDA et al. (1997) determinaram, entre outros, o crescimento de *P. amylolyticus* em diferentes fontes de carbono. Esses autores relataram que, em caseína, a bactéria apresenta fraco crescimento.

4.1.2. Efeito da agitação no crescimento

A velocidade de crescimento ($0,35 \text{ h}^{-1}$) de *P. amylolyticus* quando cultivado em MM e glicose sob agitação (150 rpm) foi duas vezes superior à da cultivada sem nenhuma agitação ($0,17 \text{ h}^{-1}$) (Figura 3). A agitação não apresentou

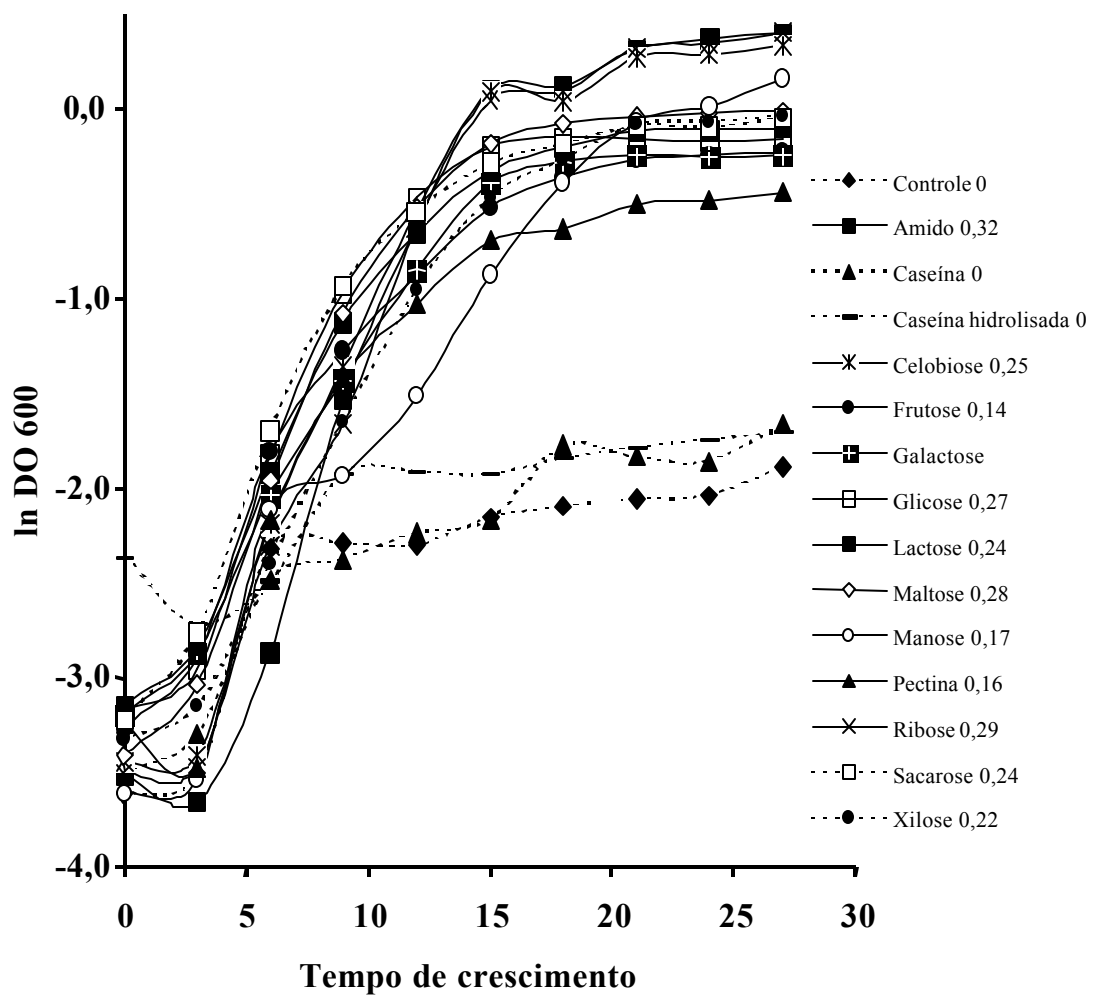


Figura 2 – Crescimento de *Paenibacillus amylolyticus* em meio mineral com diferentes fontes de carbono 0,3% (p/v) e extrato de levedura 0,06% (p/v).

Tabela 1 – Valores de velocidade de crescimento (μ_{\max}) e densidade ótica máxima (DO_{\max}) das diferentes fontes de carbono estudadas no crescimento de *P. amylolyticus*

| Fontes de Carbono | μ_{\max} | $DO_{\max600}$ |
|---------------------|--------------|----------------|
| Controle | 0 | 0,151 |
| Amido | 0,32 | 1,488 |
| Caseína | 0 | 0,190 |
| Caseína hidrolisada | 0 | 0,182 |
| Celobiose | 0,25 | 1,390 |
| Frutose | 0,14 | 0,793 |
| Galactose | 0,20 | 0,784 |
| Glicose | 0,27 | 0,855 |
| Lactose | 0,24 | 0,903 |
| Maltose | 0,28 | 0,986 |
| Manose | 0,17 | 1,172 |
| Pectina | 0,16 | 0,641 |
| Ribose | 0,29 | 1,499 |
| Sacarose | 0,24 | 0,956 |
| Xilose | 0,22 | 0,967 |

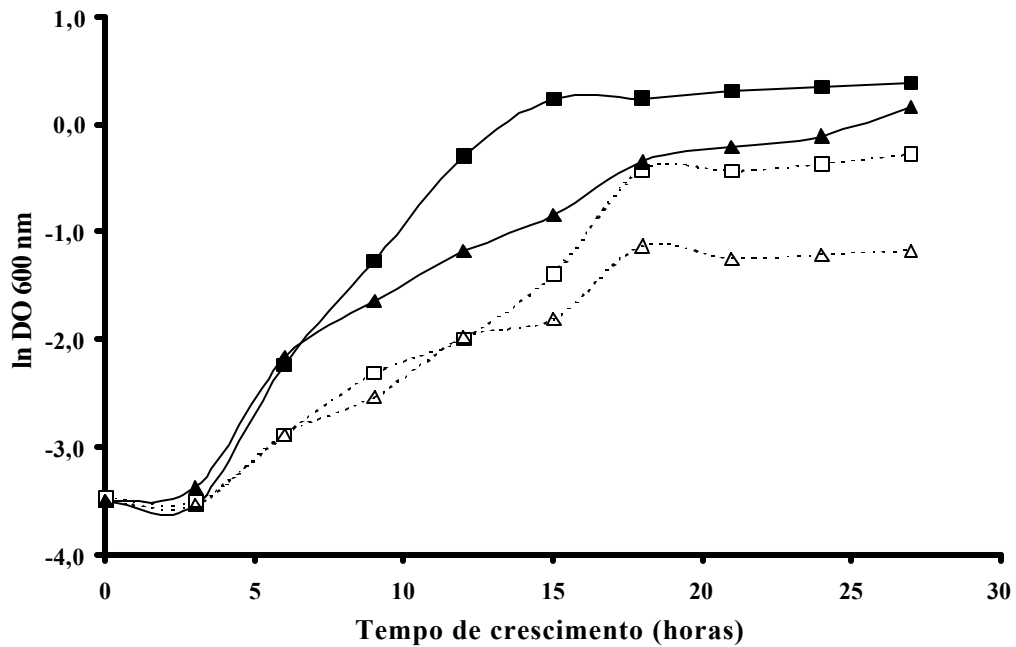


Figura 3 – Efeito da agitação no crescimento de *P. amylolyticus*. A bactéria foi cultivada em meio mineral, extrato de levedura 0,06% e glicose 0,3%, sob agitação de 150 rpm (●) sem agitação (■), ou em pectina 0,3%, sob agitação de 150 rpm (σ) e sem agitação (Δ).

efeito algum sobre a velocidade de crescimento da bactéria quando esta foi cultivada em pectina como fonte de carbono (0,15 e 0,15 h⁻¹, com e sem agitação, respectivamente). A população final, nos dois substratos, foi superior quando a cultura foi agitada. A bactéria *Klebsiella oxytoca*, isolada de frutos de café, também não diferiu significativamente quando cultivada em pectina com e sem agitação, indicando que o crescimento em pectina não foi limitado pelo oxigênio presente no meio líquido (GENARI, 1999).

4.1.3. Requerimento nutricional

Para realizar esta etapa, cujo objetivo principal foi averiguar a capacidade de *P. amylolyticus* de crescer em anaerobiose provocada por nitrogênio e, ao mesmo tempo, a sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, retirou-se todo o nitrogênio do MM de que a bactéria necessitava para seu crescimento, inclusive o

extrato de levedura. Portanto, fez-se necessária a complementação de um fator de crescimento, em substituição ao extrato de levedura, no qual o nitrogênio não estivesse disponível.

Algumas vitaminas pertencentes ao complexo B, como tiamina 50 mg L⁻¹, riboflavina 50, piridoxina 100, pantotenato de cálcio 50, niacinamida 50 e a mistura destas, na presença de sulfato de amônio e ausência de extrato de levedura, induziram o crescimento de *P. amylolyticus* (resultados não apresentados).

Paenibacillus amylolyticus apresentou crescimento em meio mineral e glicose como fonte de carbono quando tiamina (50 mg L⁻¹) e sulfato de amônio (1,0 g L⁻¹) foram adicionados. Ausência de tiamina ou de sulfato de amônio inibe o crescimento. Não houve crescimento também quando se adicionou tiamina e substituiu o sulfato de amônio por nitrogênio elementar (resultados não apresentados).

Baixas concentrações de tiamina não são suficientes para que ocorra o crescimento de *Paenibacillus amylolyticus*. A concentração de 50 mg L⁻¹, ou seja, 0,005% (p/v), apresentou-se como a melhor para o crescimento dentre as concentrações testadas (Figura 4).

4.1.4. Dependência de (NH₄)₂SO₄ na presença de tiamina como promotor de crescimento

A Figura 5 mostra o crescimento de *P. amylolyticus* na ausência e presença de sulfato de amônio, utilizando-se tiamina como fator de crescimento. Apenas quando os dois nutrientes, sulfato de amônio e tiamina, estavam juntos foi observado crescimento, com velocidade específica igual a 0,30 h⁻¹.

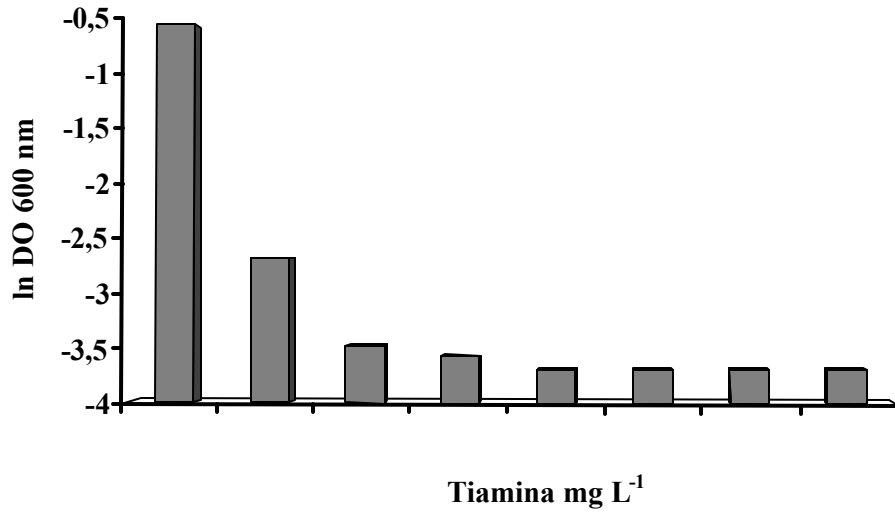


Figura 4 – Efeito de tiamina no crescimento de *Paenibacillus amylolyticus* em meio mineral, glicose 0,3% (p/v) como fonte de carbono, sulfato de amônio 1,0 g L⁻¹ e ausência de extrato de levedura.

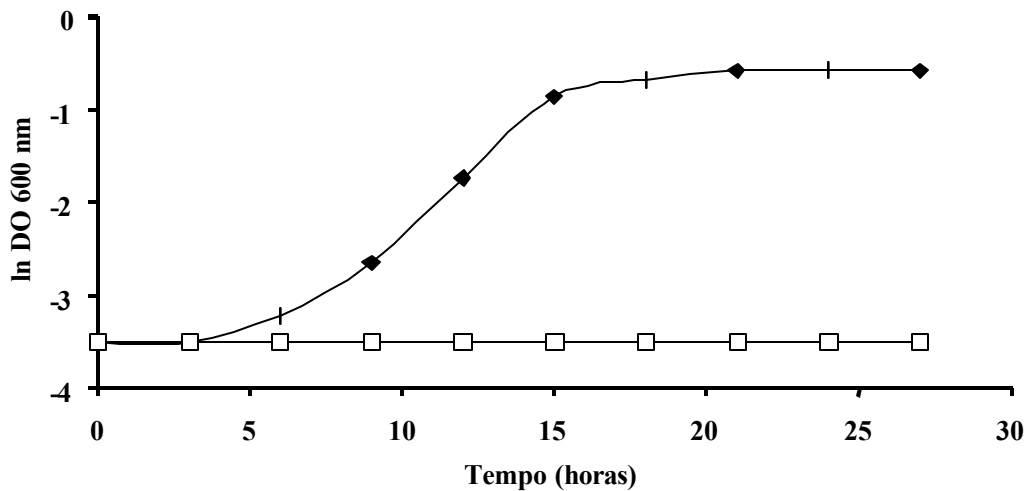


Figura 5 – Curva de crescimento de *Paenibacillus amylolyticus* em meio mineral, glicose 0,3% (p/v), presença de tiamina 50 mg L⁻¹ e ausência de extrato de levedura. Presença (♦) e ausência (□) de sulfato de amônio 1,0 g L⁻¹.

4.1.5. Averiguação da fixação de nitrogênio

Paenibacillus amylolyticus não cresce na ausência de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em atmosfera de nitrogênio, indicando sua incapacidade de fixar nitrogênio. Outra bactéria pertencente aos gêneros *Paenibacillus* e *P. azotofixans* foi isolada em associações agrícolas e estudada quanto à capacidade de fixar nitrogênio (SELDIN et al., 1998; ROSADO et al., 1998). Microrganismos endofíticos possuem, entre seus atributos, a capacidade de colonizar a planta hospedeira e fixar nitrogênio (SPRENT e FARIA et al., 1988); um exemplo é a bactéria *Azoarcus* sp., que coloniza plantas de arroz (HUREK et al., 1994).

4.2. Produção de pectinases

Paenibacillus amylolyticus isolada de frutos de café demonstrou ser capaz de utilizar pectina como única fonte de carbono. Portanto, investigou-se a produção de enzimas pectinolíticas, sendo o desafio saber quantas e quais pectinases estavam sendo produzidas. Dentre as enzimas avaliadas, apenas a atividade de pectina liase foi detectada. A averiguação foi realizada na cultura e no sobrenadante da cultura obtido por centrifugação. Mesmo a atividade tendo sido maior quando dosada com o sobrenadante da cultura nas células íntegras, optou-se por trabalhar com o sobrenadante centrifugado, pois, dessa forma, a presença de interferentes é diminuída.

4.3. Caracterização da pectina liase

4.3.1. Curva de tempo de reação

A avaliação do tempo de reação ideal para se dosar a atividade da enzima indicou que intervalos entre 5 e 30 min de reação são confiáveis para PL de *P. amylolyticus*, pois são pontos crescentes proporcionais de atividade (Figura 6).

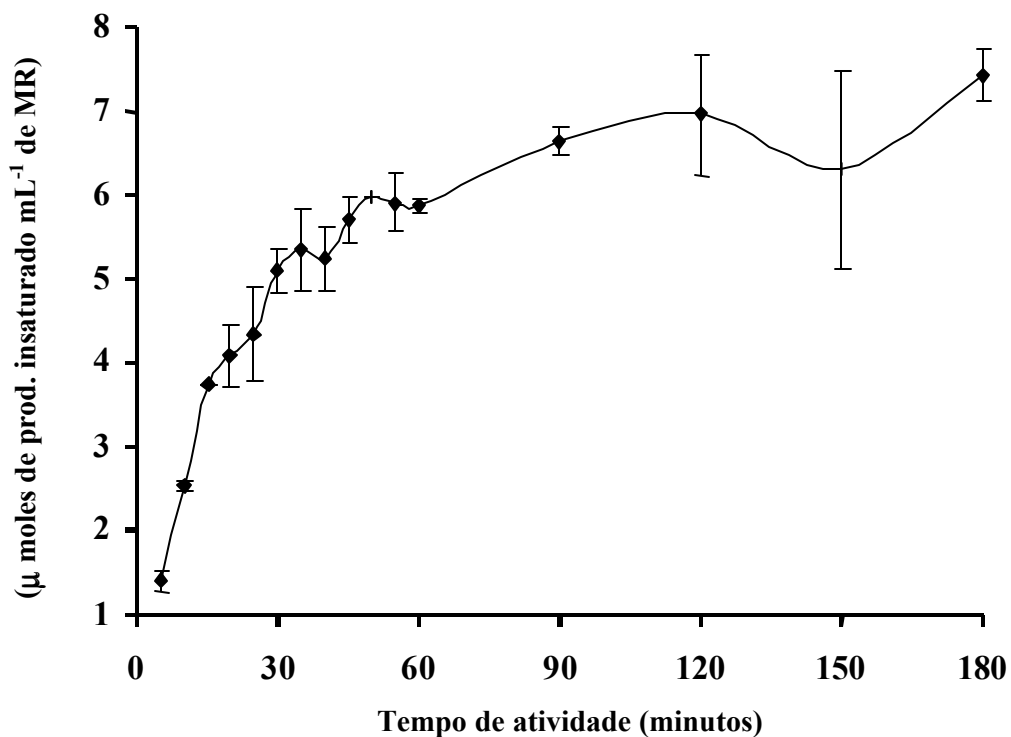


Figura 6 – Atividade da pectina liase em função do tempo de reação.

4.3.2. Especificidade ao substrato

Dos diferentes substratos avaliados para determinação da afinidade enzima-substrato, a pectina cítrica demonstrou maior afinidade, seguida da pectina de maçã e ácido poligalacturônico; este último praticamente não apresentou atividade (Tabela 2). Resultados semelhantes a estes foram encontrados por SILVA et al. (1993) na caracterização de pectina liase produzida pelo fungo *Penicillium expansum*. ITOH et al. (1982) estudaram as propriedades da PL de quatro estirpes bacterianas de *Erwinia carotovora*, e nenhuma delas atuou sobre o ácido poligalacturônico.

Tabela 2 – Especificidade do substrato de pectina liase de *P. amylolyticus*

| Substrato 1,0% (p/v) | Atividade Relativa (%) |
|---|------------------------|
| Pectina (cítrica) | 100 |
| Pectina (maçã) | 39 |
| Ácido poligalacturônico | 4 |
| Tampão fosfato, pH 6,8. | |
| 100% atividade = 197,09 unidades mL ⁻¹ | |

4.3.3. Curva de produção da pectina liase

Houve aumento da atividade da pectina liase até transcorrerem 24 horas de crescimento de *P. amylolyticus*, pouco depois do final da fase log de crescimento e início da fase estacionária de crescimento. A velocidade específica de crescimento foi de 0,14 h⁻¹ (Figura 7).

4.3.4. Temperatura ótima de atividade e termoestabilidade da pectina liase

A PL produzida por *P. amylolyticus* apresentou maior atividade quando avaliada na temperatura de 40 °C. A enzima teve atividade reduzida abaixo de 20 °C e acima de 60 °C (Figura 8). Resultado semelhante foi encontrado em PL produzida por *Penicillium expansum*, com faixa de temperatura ótima de atividade entre 40 e 45 °C (SILVA et al., 1993). Também, em *Aureobasidium pullulans* LV 10 (PARINI et al., 1988), atividade enzimática máxima foi observada a 40 °C. Na bactéria *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* linhagem SCRI 1043, a temperatura ótima de atividade foi de 35 °C (GODFREY et al., 1994). TSUYUMU e FUNAKUBO (1985) determinaram a temperatura ótima de atividade de 33 °C para PL de *Erwinia chrysanthemi* linhagem EC 183.

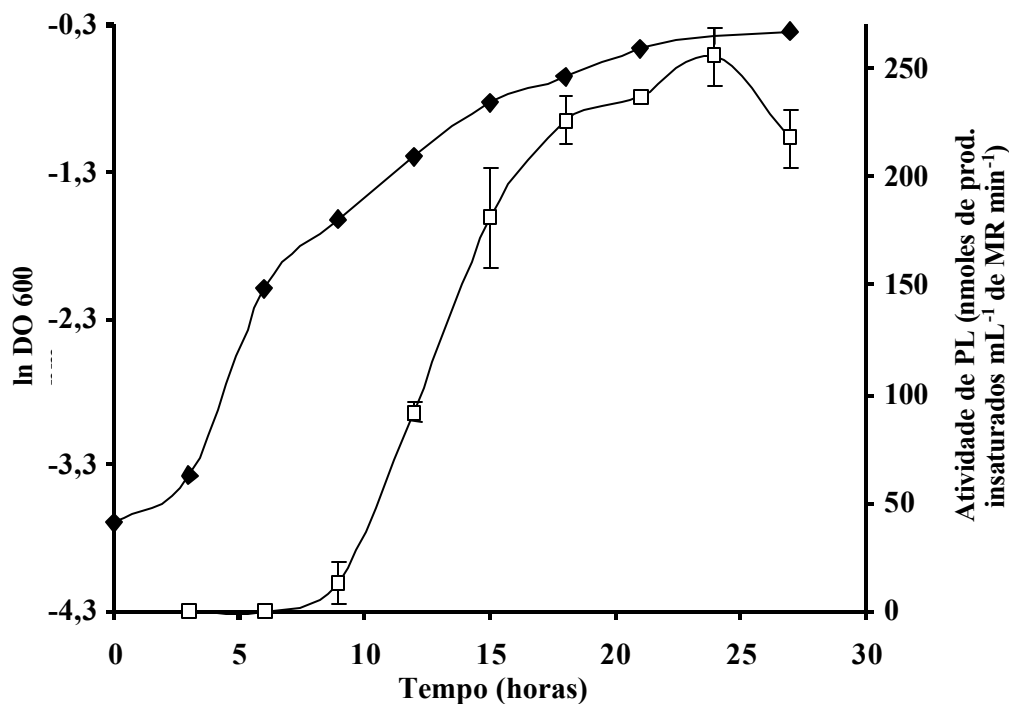


Figura 7 – Crescimento (◆) de *Paenibacillus amylolyticus* e produção de pectina liase (◻) em meio mineral com pectina 0,3% (p/v) como única fonte de carbono e 0,06% (p/v) de extrato de levedura.

Pectina liase é estável quando armazenada durante 60 min em intervalos de temperatura variando de 0 a 45 °C e com posterior avaliação da atividade enzimática a 40 °C. Em temperaturas superiores a 45 °C, a atividade enzimática decresce rapidamente (Figura 8). A avaliação quanto à termoestabilidade de PL produzida por *Penicillium expansum* apresentou resultados semelhantes (SILVA et al., 1993). Resultado similar mostrou a PL do fungo *P. griseoroseum*, que foi estável até 40 °C, mas perdeu totalmente sua atividade quando mantida a 55 °C durante uma hora (MENEZES, 1997).

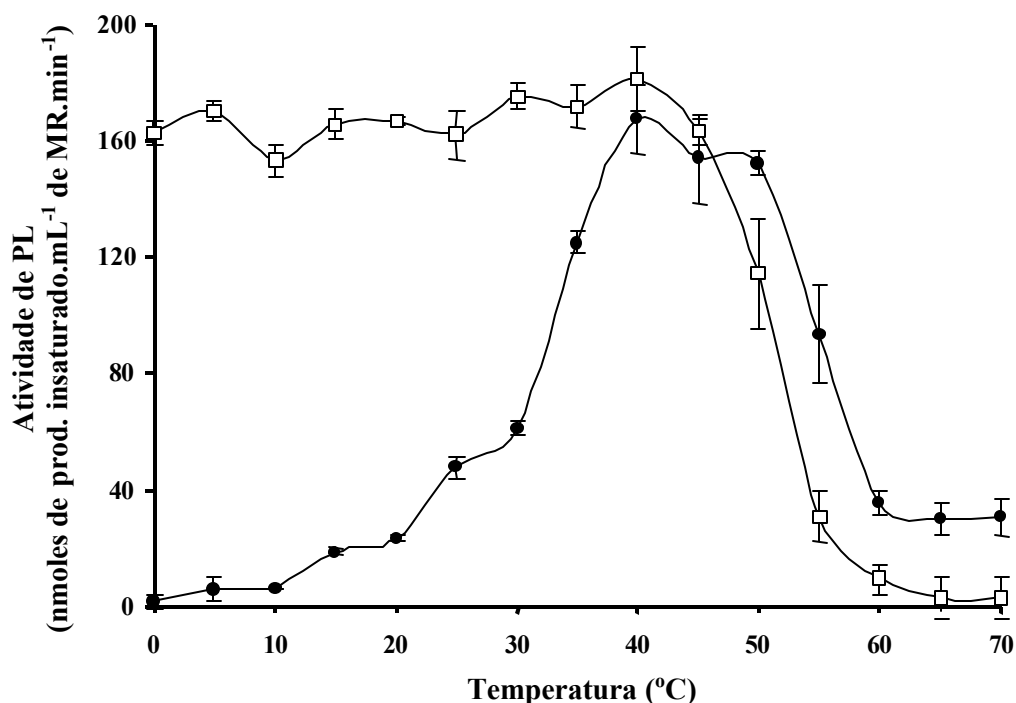


Figura 8 – Efeito da temperatura sobre a atividade (♦) e termoestabilidade (□) de pectina liase produzida por *P. amylolyticus* em meio mineral e 0,3% (p/v) de pectina como única fonte de carbono e 0,06% (p/v) de extrato de levedura. Para termoestabilidade, o sobrenadante foi submetido à exposição prévia de uma hora, a cada uma das diferentes temperaturas, sendo a dosagem enzimática de acordo com a metodologia-padrão.

4.3.5. pH ótimo de atividade

A enzima PL apresentou atividade em uma ampla faixa de pH, sendo o ótimo de atividade para a PL de *P. amylolyticus* o valor de 7,9 (Figura 9). Na avaliação do pH ótimo, para PL da bactéria *Erwinia carotovora*, ITOH et al. (1982) observaram o valor de pH 8,0. Também, a PL produzida por *Neocallimastix* sp. LM1 apresentou atividade máxima quando medida em valor de pH 8,0 (GORDON et al., 1992). O pH ótimo também foi de 8,0 para *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* linhagem SCRI 1043 (GODFREY et al., 1994). Valor mais elevado de pH ótimo (8,3) foi encontrado na atividade da PL produzida por *Erwinia chrysanthemi* linhagem EC 183 (TSUYUMU e FUNAKUBO, 1985).



Figura 9 – Efeito do pH sobre a atividade de pectina lise de *P. amylolyticus*. O sobrenadante da cultura foi intensivamente dialisado em membrana de diálise (MWCO 12 – 14.000 Thomas Scientific) por 24 horas a 4°C.

4.3.6. Efeito de EDTA e íons na atividade

O agente EDTA, na concentração de 2 mM, não inibiu a atividade da PL de *P. amylolyticus* (Tabela 3). A adição de CaCl₂ nas concentrações de 2, 10, 50 e 100 mM à mistura de reação produziu diminuição máxima de 24% na atividade da enzima. Os demais íons testados e a mistura deles, na concentração de 2 mM, não interferiram na atividade de PL de *P. amylolyticus* (Tabela 3). SILVA et al. (1993) obtiveram resultados semelhantes em *Penicillium expansum*. Em PL de *Erwinia chrysanthemi* linhagem EC 183 (TSUYUMU e FUNAKUBO, 1985), MgCl₂ proporcionou aumento de 24% quando adicionado de 1,0 mM, enquanto EDTA aumentou 18% a atividade da enzima quando adicionado de 1,0 mM; os demais íons não apresentaram influência. A atividade enzimática de PL foi

Tabela 3 – Efeito do EDTA e íons na atividade da pectina liase de *P. amylolyticus*

| Composto | Concentração Final (mM) | Atividade Relativa de PL (%) |
|--------------------|-------------------------|------------------------------|
| None | - | 100 |
| EDTA | 2 | 107 |
| CaCl ₂ | 2 | 97 |
| | 10 | 97 |
| | 50 | 84 |
| | 100 | 76 |
| Cu SO ₄ | 2 | 95 |
| ZnSO ₄ | 2 | 95 |
| MgSO ₄ | 2 | 99 |
| MnCl ₂ | 2 | 102 |
| CoSO ₄ | 2 | 97 |
| Mistura* | 2 | 95 |

*Cada íon metálico em 2 mM.

100% de atividade = 226,75 unidades mL⁻¹.

estimulada na presença de cátions como Ca²⁺ e Mg²⁺ adicionados de 1,37 mmol L⁻¹ (GODFREY et al., 1994). Cu²⁺ e Co²⁺ foram os únicos cátions a estimular a atividade de PL produzida pelo fungo *Penicillium griseoroseum* em 19 e 22%, respectivamente (MENEZES, 1997).

4.3.7. Determinação dos valores de Km e Vmax aparentes

A velocidade máxima aparente de reação da PL de *P. amylolyticus* encontrada foi de $1,24 \times 10^{-7}$ mol min⁻¹ mL⁻¹, e o valor de Km aparente foi de 6,61 mg mL⁻¹, utilizando pectina cítrica como substrato, segundo o ajuste equacional hiperbólico retangular diretamente sobre o "plot" de Michaelis-Mentel (Figura 10).

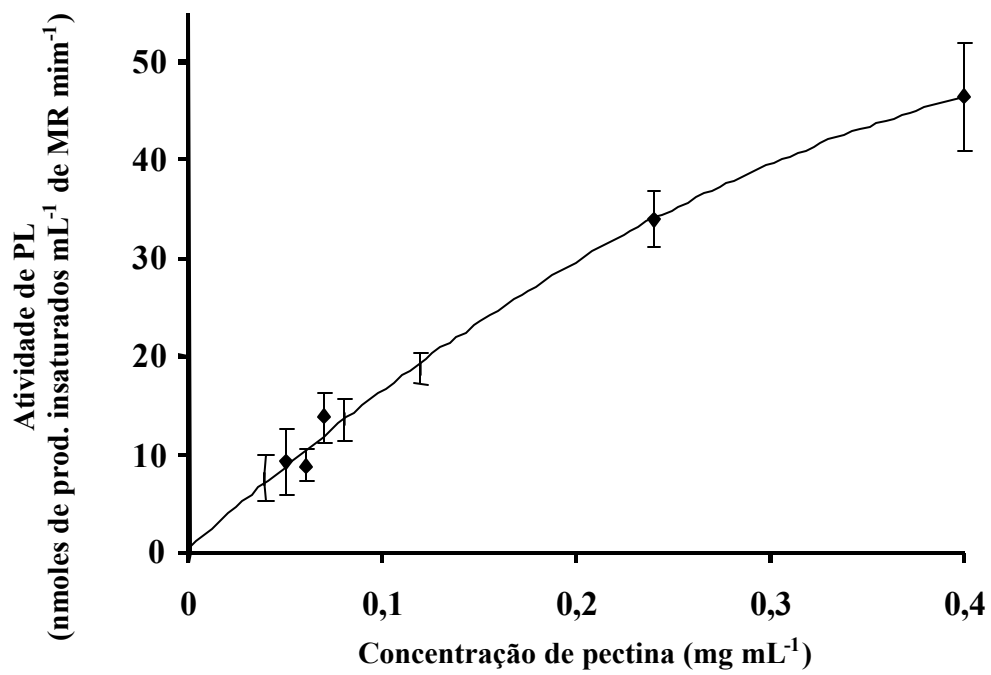


Figura 10 – Curva de saturação da pectina liase de *P. amylolyticus* com o substrato pectina cítrica.

5. DISCUSSÃO

Paenibacillus amylolyticus foi capaz de crescer em diferentes fontes de carbono, não utilizando a caseína não-hidrolisada. Posteriormente, a caseína previamente hidrolisada também não foi utilizada, indicando que esse microrganismo não realiza a gliconeogênese a partir de aminoácidos, o que evidencia a ausência de atividade de enzimas para degradação dos aminoácidos. SHIDA et al. (1997) relataram que a hidrólise da caseína em *P. amylolyticus* é fracamente positiva. O fato de o melhor crescimento ter ocorrido em amido como única fonte de carbono justifica o termo “amylolyticus”, nome dado a este *Paenibacillus* e originado do latim amido (NAKAMURA, 1984).

A agitação durante o crescimento do microrganismo promoveu maior aeração, o que, provavelmente, contribuiu para aumento da população final. Considerando a fonte de carbono utilizada e a velocidade de crescimento determinada em cada uma dessas fontes, provavelmente o oxigênio imerso no meio mineral se dissolve com maior facilidade quando a fonte de carbono for um monossacarídeo, como a glicose, e com menor intensidade quando este carboidrato for um polissacarídeo, como a pectina. No entanto, maiores estudos merecem ser realizados, para que se possa determinar a concentração de oxigênio no meio mineral, nessas diferentes situações.

A bactéria *P. amylolyticus* isolada de frutos de café, cujas substâncias pécnicas correspondam a 33% do total da mucilagem (WOOTTON, 1963), ou seja, no seu habitat há pectina em abundância, bem como diversos compostos, como carboidratos, aminoácidos, proteínas, vitaminas e minerais, constituindo local onde todos os requerimentos necessários para o seu crescimento são encontrados, à exceção da aeração. Os requerimentos nutricionais para o crescimento de *P. amylolyticus* foram avaliados pela adição de algumas vitaminas do complexo B ao meio mineral, sendo este considerado um meio pobre quando comparado com outros meios sintéticos utilizados para crescimento bacteriano. O estudo desses requerimentos se fez necessário para substituição do extrato de levedura, que estava sendo utilizado como requerimento de crescimento e que atuaria como fonte de nitrogênio no estudo de fixação de nitrogênio, em que não poderia ser adicionado nenhum nitrogênio fixo (sulfato de amônio), apenas o nitrogênio atmosférico. Como havia sido realizada uma avaliação preliminar no crescimento bacteriano com as vitaminas anteriormente citadas, adotou-se, então, a tiamina para melhor caracterização da bactéria em substituição ao extrato de levedura, construindo, assim, a curva de crescimento e de crescimento na ausência de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

A velocidade de crescimento de *P. amylolyticus* em MM, utilizando-se tiamina como promotor de crescimento, não diferiu da taxa de crescimento quando se utilizou extrato de levedura como promotor ou requerimento do crescimento. É curiosa a observação de que qualquer vitamina do complexo B testada favoreceu a utilização do nitrogênio, indicando que não foram usadas, então, como co-enzimas, mas alguma participação deve ter nas atividades de glutamato desidrogenase e, ou, glutamina sintetase. MOAT e FOSTER (1995) afirmaram que muitos organismos organotróficos requerem uma ou mais vitaminas do complexo B para seu crescimento.

Paenibacillus amylolyticus é conhecido na literatura como anaeróbio facultativo (SHIDA et al., 1997), com capacidade de reduzir nitrato a nitrito (NAKAMURA, 1984; SHIDA et al., 1997). Entretanto, nas condições testadas, não houve crescimento de *P. amylolyticus* em anaerobiose mesmo quando

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ estava presente. A fixação de nitrogênio só ocorreria com o crescimento em anaerobiose, já que a ação da nitrogenase, enzima responsável pelo processo de fixação de nitrogênio, ocorre apenas em anaerobiose (MADIGAN et al., 1997).

Paenibacillus amylolyticus foi capaz de crescer em MM com pectina como única fonte de carbono. Para isso, ocorreu a produção de enzimas pectinolíticas para a lise desse carboidrato, bem como a utilização dos seus derivados. A indução de pectinases normalmente ocorre pela presença de substâncias pécticas, como observado em diferentes microrganismos, como *Rhizoctonia solani* (RAMALINGAM, 1986), *Saccharomyces cerevisiae* (GAINVORS et al., 1994) e *Ralstonia solanacearum* (TANS-KERSTEN et al., 1998). O fenômeno de indução foi verificado com agentes que danificam o DNA (mitomicina C, ácido nalidíxico, bleomicina e luz UV), em *Erwinia chrysanthemi* (TSUYUMU e CHANTTERJEE, 1984; TSUYUMU e FUNAKUBO, 1985), *Pseudomonas marginalis* (SONE et al., 1988) e *Erwinia carotovora* (GODFREY et al., 1994). No entanto, o fungo *Penicillium griseoroseum* produz pectina liase e poligalacturonase, independentemente da presença de substâncias pécticas ou de agentes que danificam o DNA (MINUSSI et al., 1996; MINUSSI et al., 1997).

A diferença de atividade da enzima em diferentes substratos comprova que a pectinase caracterizada é a pectina liase, pelo comportamento em não lisar o ácido poligalacturônico. Outros trabalhos (SILVA et al., 1993) evidenciaram essa semelhança, pois se sabe que do complexo pectinolítico, formado por quatro enzimas, apenas a pectina liase e a pectina metilesterase são capazes de atuar sobre substâncias pécticas metiladas e apenas a pectina liase lisa a pectina metilada. A pectina metilesterase desmetila a pectina, transformando-a em ácido poligalacturônico, para posterior ação da pectato liase e da poligalacturonase (HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT et al., 1996; PRADE et al., 1999).

Componentes celulares como as enzimas apresentam menor atividade em baixas temperaturas, diminuindo a velocidade de reação normal que ocorre nas temperaturas mais elevadas, embora temperaturas extremamente elevadas

possam danificar a estrutura da enzima pela desnaturação. No teste de termoestabilidade, a enzima não perdeu atividade após a pré-incubação na dada temperatura e na atividade à temperatura ótima. Após esta temperatura, a atividade enzimática diminuiu e a termoestabilidade caiu, indicando que a enzima não atuou mais sobre o substrato, provavelmente por estar sendo desnaturada nessas temperaturas.

A PL secretada pela bactéria *P. amylolyticus* apresentou maior atividade, em valores de pH levemente alcalinos, assim como a PL produzida por outras bactérias, como *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* linhagem SCRI 1043, pH 8,0 (GODFREY et al., 1994), *E. chrysanthemi* linhagem EC 183, pH 8,3 (TSUYUMU e FUNAKUBO, 1985) e *E. carotovora*, pH 8,0 (ITHO et al., 1982). Já a PL secretada pelo fungo *Penicillium expansum* possui melhor atividade em pH neutro (SILVA et al., 1993). Tal afirmativa pode ser característica atribuída à enzima PL produzida por bactérias e fungos, embora pelo menos uma exceção foi registrada em *Neocallimastix* sp., que produziu PL com maior atividade em pH 8,0 (GORDON et al., 1992). Na análise do efeito do pH sobre a atividade da PL, também se pôde verificar que, em pH 8,5, ocorre pequeno aumento na atividade da enzima, que se mostra decrescente após o pH ótimo, possivelmente indicando uma isoforma da enzima que atua nesse valor, com pH 8,5.

EDTA é conhecido como agente quelante, ou seja, se complexa com íons, tornando-os indisponíveis. Íons podem interferir na atividade de uma enzima, tanto positiva quanto negativamente. Íons como o Ca^{+2} se aderem à estrutura da pectina, geleificando-a e não deixando o substrato disponível para a reação, ou seja, Ca^{+2} é responsável por mudanças negativas na substância pectina (TANABE e KOBAYASHI, 1987). Porém, outros íons promoveram aumento da atividade da enzima (TSUYUMU e FUNAKUBO et al., 1985).

A pectina é um substrato viscoso, não sendo solubilizado quando preparado com concentrações superiores a 2,5% (p/v). Resultados semelhantes ao obtido em PL de *P. amylolyticus* Km aparente de $6,61 \text{ mg mL}^{-1}$ e V_{max} aparente de $1,24 \times 10^7 \text{ mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ têm sido encontrados na literatura, como de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* linhagem SCRI 1043, cojos valores de

Km e Vmax aparentes foram de 0,96 mg mL⁻¹ e 2,14 x 10⁻⁷ mol min⁻¹ mL⁻¹, respectivamente (GODFREY et al., 1994). Em PL de *Erwinia chrysanthemi* linhagem EC 183, os valores de Km e Vmax aparentes foram de 7,3 ± 2,0 mg mL⁻¹ e 47,6 x 10⁻⁷ mol min⁻¹ mL⁻¹ (TSUYUMU e FUNAKUBO et al., 1985), enquanto em PL de *Penicillium expansum* (SILVA et al., 1993) Km e Vmax aparentes foram de 9,0 mg mL⁻¹ e 105 unidades mL⁻¹, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

O microrganismo isolado de frutos de café que tiveram suas superfícies devidamente esterilizadas foi identificado como *Paenibacillus amylolyticus*, que utilizou como fonte de carbono amido, celobiose, celulose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, pectina, ribose, sacarose e xilose, mas não caseína e caseína hidrolisada. O efeito da agitação do meio de crescimento provocou aumento na população final bacteriana em relação ao meio não-agitado, mas a taxa específica de crescimento bacteriano pode ter sido influenciada tanto pelo aumento da aeração provocada pela agitação quanto pela fonte de carbono utilizada para crescimento. Diferentes vitaminas do complexo B, como tiamina, riboflavina, piridoxina e pantotenato de cálcio, foram utilizadas por *P. amylolyticus* como fator de crescimento, em substituição ao extrato de levedura. Nas condições testadas, *P. amylolyticus* não foi capaz de crescer em anaerobiose e, conseqüentemente, fixar nitrogênio.

Paenibacillus amylolyticus produz pectina liase quando crescido em pectina como única fonte de carbono. Essa PL se acumula no meio de cultura mais eficientemente após 24 horas de crescimento, apresentando maior afinidade ou especificidade por pectina cítrica quando utilizada como substrato enzimático. A atividade ótima de PL ocorreu a 40 °C, e a enzima foi termoestável até 45 °C. A PL apresentou atividade entre valores de pH 5,6 e 8,6, sendo 7,9 o valor de pH

ótimo. A adição de EDTA e íons metálicos na mistura de reação apresentou pequeno efeito na atividade de PL. A enzima segue a cinética de Michaelis-Menten, e os valores de K_m e V_{max} aparentes foram, respectivamente, de $6,61 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,24 \times 10^{-7} \text{ mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, utilizando-se pectina cítrica como substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERSHEIM, P., KILLIAS, U. Studies relating to the publication and properties of pectin transeliminase. **Arch. Biochem. Biophys**, v.97, p.107-115, 1962.
- ASH, C., PRIEST, F. G., COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks, and Collins) using a PCR probe test. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.64, p.253-260, 1993.
- ARAÚJO, E. F., BARROS, E. G., CALDAS, R. A., SILVA, D. O. Beta-glucosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus, *Humicola* sp. **Biotechnology Letters**, v.5, p. 781-784, 1983.
- BACON, W.C., HINTON, D. M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: HURST, C. et al. (Eds.). **Manual of environmental microbiology**. [S.l.: s.n.t.], 1997. p.413-421.
- 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., RICHARD, R. B., TIMOTHY, C. P. Pre-inoculation of Ri T-DNA-transformed pes roots with *Pseudomonas flurescens* inhibits colonization by *Pythium ultimum* trow: an ultrastructural and cytochemical study. **Planta**, v.199, p.105-117, 1996.

- BUDI, S. W., van TUINEN, D., MARTINOTTI, G., GIANINAZZI, S. Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.5148-5150, 1999.
- CHATTERJEE, A., CUI, Y., LIU, Y., DUMENYO, C. K., CHATTERJEE, A. K. Inactivation of *rmsA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1959-1967, 1995.
- COLLMER, A., RIED, J. L., BROOKS, A. D., HE, Y. S. Pectin enzyme production and *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. In: KEEN, N. T., KOSUGE, T., WALLING, L. L. (Eds.). Physiology and biochemistry of plant-microbial interactions. **The American Society of Plant Physiologists**. [S.l.: s.n.t.], 1988. p. 76-82.
- FRANK, H. A., DELA CRUZ, A. S. Role of incidental microflora in natural decomposition of mucilage layer in kona coffee cherries. **Journal Food Sci.**, v.29, p.850-853, 1964
- FROMMEL, M. I., NOWAK, J., LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiol.**, v.96, p.928-936, 1991.
- GAINVORS, A., FRÉZIER, V., LEMARESQUIER, H., LEQUART, C., AIGLE, M., BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v.10, p.1311-1319, 1994.
- GENARI, R. **Características de crescimento e produção de pectinases por *Klebsiella oxytoca* isolada de frutos de café**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 90p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa.
- GODFREY, V., HYMAN, L. J., McMILLAN, G. P., PÉROMBELON, M. C. M. Purification and characterization of mitomycin C-induced pectin lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* strain SCRI 1043. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.13-21, 1994.
- GORDON, G. L. R., PHILLIPS, M. W. Extracellular pectin lyase produced by *Neocallimastix* sp. LM1, a rumen anaerobic fungus. **Letters in Applied Microbiology**, v.15, p.113-115, 1992.

- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W.F., KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol**, v.43, p.895-914, 1997.
- HAYASHI, K., INOUE, Y., SHIGA, M., SATO, S., TAKANO, R., HIRAYAE, K., HIBI, T., HARA, S. Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis* MAFF 03-01173. **Phytochemistry**, v.45, p.1359-1363, 1997.
- HUANG, J. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. **Ann. Ver. Phytopathol**, v. 24, p.141-157, 1986.
- HUGOUVIEUX-COTTE-PATTA, N., CONDEMINE, G., NASSER, W., REVERCHON, S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.50, p.213-257, 1996.
- 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.
- ITHO, Y., SUGIURA, J., IZAKI, K. Enzymological and immunological properties of pectin lyases from bacteriocinogenic strains of *Erwinia carotovora*. **Agric. Biol. Chem.**, v.46, p.199-205, 1982.
- 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, p.3676-3683, 1997.
- KNOSEL, D., GARBER, E. D. Pektolytische und cellulolytische enzyme bei *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. **Phytopathologische zeitschrift**, v.59, p.194-202, 1967.
- KHAMMAS, K.M., KAISER, P. Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. **Plant Soil**, v.137, p 75-79, 1991.
- LIU, Y., JIANG, G., CUI, Y., MUKHERJEE, A., MA, W. L., CHATTERJEE, A. KdgR_{Ecc} negatively regulates genes for pectinases, cellulases, proteases, harpin_{Ecc}, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.2411-2422, 1999.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. Metabolic diversity among the microorganisms. In: BRAKE, D. K., EDWARDS, L. J., WECHSLER, D. A. (Eds.). **Biology of microorganisms**, v.8, p.473-531, 1997.

- MENEZES, C. S. **Purificação e caracterização parciais de pectina liase de *Penicillium griseoroseum***. Viçosa, MG: UFV, 1997. 30p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MINUSSI, R. C., COELHO, J. L. C., BARACAT-PEREIRA, M. C., SILVA, D. O. Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*: effect of tea extract, caffeine, yeast extract, and pectin. **Biotechnology Letters**, v.18, p.1283-1286, 1996.
- MINUSSI, R. C., BARACAT-PEREIRA, M. C., COELHO, J. L. C., SILVA, D. O. Methylxanthines as inducers of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.369-372, 1997.
- MOAT, A. G., FOSTER, J. W. Carbohydrate metabolism and energy production. In: **Microbial Physiology**, v.3, p.305-409, 1995.
- MORAN, F., NASUNO, S., STAN, M.P. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans eliminase of *Erwinia carotovora*. **Arch. Biochem. Biophysic**, v.123, p.298-306, 1968.
- NAKAMURA, L. K. *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.224-226, 1984.
- NASSAR, A., DARRASSE, A., LEMATTRE, M., KOTOUJANSKY, A., DERVIN, C., VEDEL, R., BERTHEAU, Y. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2228-2235, 1996.
- NELSON, D. L., COX, M. M. Enzymes. In: RYAN, M., STRANGE, L., NEAL, V. (Eds.). **Principles of Biochemistry**, v.3, p.243-292, 2000.
- PARINI, C., FORTINA, M. G., MANACHINI, P. L. Properties of two pectin lyases produced by *Aureobasidium pullulans* LV 10. **Journal of Applied Bacteriology**, v.65, p.477-481, 1988.
- PRADE, R. A., ZHAN, D., AYOUBI, P., MORT, A. J. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.16, p.361-391, 1999.

- PRENT, J. I., FARIA, S. M., Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. **Plant and Soil**, v.110, p.157-165, 1988.
- QUADT-HALLMANN, A., BENHAMOU, N., KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal Microbiology**, v.43, p.577-582, 1997.
- RAMALINGAM, P. Pectin lyase and pectin methyl esterase production by *Rhizoctonia solani* kuhn. **J. Indian Bot. Soc.**, v.65, p. 301-303, 1986.
- ROSADO, A. S., AZEVEDO, F. S., CRUZ, D. W., Van ELSAS, J. D., SELDIN, L. Phenotypic and genetic diversity of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from the rhizoplane or rhizosphere soil of different grasses. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.1998.
- ROSADO, A. S., DUARTE, G. F., SELDIN, L., Van ELSAS, J. D. Genetic diversity of nifH gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strain and soil sample analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2770-2779, 1998.
- SCHLEMMER, A. F., WARE, C. F., KEEN, N. T. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Pseudomonas fluorescens* W 51. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.4493-4498, 1987.
- SELDIN, L., ROSADO, A. S., CRUZ, D. W., NOBREGA, A., Van ELSAS, J. D., PAIVA, E. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different brazilian soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3860-3868, 1998.
- SILVA, D.O., ATTWOOD, M.M., TEMPEST, D.W. Partial purification and properties of pectin lyase from *Penicillium expansum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.9, p.574-578, 1993.
- SHIDA, O., TAKAGI, H., KADOWAKI, K., NAKAMURA, L.K., KOGAMATA, K. Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. Nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.47, p.299-306, 1997.
- SONE, H., SUGIURA, J., ITOH, Y., IZAKI, K., TAKAHASHI, H. Production and properties of pectin lyase in *Pseudomonas marginalis* induced by mitomycin C. **Agric. Biol. Chem.**, v. 52, p.3205-3207, 1988.

- SORIANO, M., BLANCO, A., DÍAZ, P., PASTOR, F. I. J. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. **Microbiology**, v.146, p.89-95, 2000.
- SPAGNA, G., PIFFERI, P. G., TRAMONTINI, M., ALBERTINI, A. Pectinlyase immobilization on polyamides for application in the food processing industry. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v.59, p.341-348, 1994.
- SPRENT, J. I., FARIA, S. M., Mechanismos of infection of plants by nitrogen fixing organisms. **Plant and Soil**, v.110, p.157-165, 1988.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. Plant and architecture. In: BRADY, E. B., DONOHOE, L. (Eds.). **Plant Physiology**, p.3-27, 1991.
- TANABE, H., KOBAYASHI, Y. Pectin lyase originating from *Erwinia chrysanthemi* with a low maceration potential. **Agric. Biol. Chem.**, v.51, p.779-783, 1987.
- TANS-KERSTEN, J., GUAN, Y., ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* pectin methylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4918-4923, 1998.
- TSUYUMU, S., CHATTERJEE, A. K. Pectin lyase production in *Erwinia chrysanthemi* and other soft-rot *Erwinia* species. **Physiological Plant Pathology**, v.24, p.291-302, 1984.
- TSUYUMU, S., MIYAMOTO, Y. Effective production of bacterial pectinases. **Symbiosis**, v.2, p.103-110, 1986.
- TSUYUMU, S., FUNAKUBO, T. Purification and partial characterization of a mitomycin C-induced pectin lyase of *Erwinia chrysanthemi* strain EC 183. **Physiological Plant Pathology**, v.27, p.119-130, 1985.
- VAN PEE, W., CASTELEIN, J. M. Study of pectinolytic microflora, particularly the enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. **Journal of Food Science**, v.37, p.171-174, 1972.
- Wootton, A. E. **The fermentation of coffee**. Nairobi: East African Industrial Research Organization, 1963. (Report n.12).
- YIM, D. G., SATO, H. H., PARK, Y. H., PARK, Y. H. Production of cyclodextrin from starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.402-405, 1997.