

ALVARO LUIZ MATHIAS

METABOLISMO DA L - ARABINOSE EM  
*Herbaspirillum seropedicae*

Tese apresentada ao Departamento de  
Bioquímica da Universidade Federal do  
Paraná para obtenção do título de Mestre  
em Bioquímica.

CURITIBA  
1988

**Orientador:**

**Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa**

**Co-orientador:**

**Dra. Liu Un Rigo**

**A minha querida esposa Simone**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que supriu todas as minhas necessidades.

A minha esposa e meus familiares que entenderam minha ausência.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e à Dra. Liu Un Rigo, orientadores desta tese, pela orientação, compreensão e assistência imprescindíveis na elaboração deste trabalho.

A Dra. Glaci Therezinha Zancan, pelas sugestões recebidas, pelo fornecimento de reativos e pelo empréstimo de equipamentos.

Ao Dr. Aguinaldo J. do Nascimento, à Dra. Déa A. F. do Amaral, ao Dr. Marcello Iacomini e à Dra. Mária Lúcia W. Klupplel, coordenadores deste Curso de Pós-Graduação no período deste trabalho, pelo apoio sempre demonstrado.

Ao Dr. Shigehiro Funayama e aos amigos Emanuel M. de Souza, Jaísa S. de Souza, Hidevaldo B. Machado e Sergio P. S. Diniz, pelo apoio, amizade e companheirismo que sempre me dispensaram.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio e solidariedade demonstrados.

Aos funcionários da Biblioteca da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda na revisão bibliográfica.

Ao CNPq pelo suporte financeiro durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

## SUMARIO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
SUMARIO.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.01. Objetivos do trabalho.....	5
2. MATERIAIS E METODOS.....	6
2.01. Microrganismo.....	6
2.02. Meios de cultura.....	6
2.03. Manutenção das culturas e condições de cultivo..	8
2.04. Crescimento do inóculo.....	8
2.05. Curva de crescimento.....	8
2.06. Determinação da densidade bacteriana.....	8
2.07. Determinação do pH do meio de cultivo.....	9
2.08. Cultivo em larga escala.....	9
2.09. Extrato livre de células.....	9
2.10. Sínteses.....	10
2.10.01. Síntese química do L-arabinonato de potássio.....	10
2.10.02. Síntese química da gama-lactona do L-arabinonato.....	11

2.10.03. Síntese química do 2-ceto-3-desoxi-	
D,L-arabinonato.....	11
2.10.04. Síntese biológica do 2-ceto-3-desoxi-	
L-arabinonato.....	12
2.11. Enzimas.....	13
2.12. Reagentes químicos.....	13
2.13. Atividades enzimáticas.....	13
2.13.01. L-Arabinose desidrogenase.....	13
2.13.02. L-Arabinitol desidrogenase.....	14
2.13.03. L-Arabinose isomerase.....	14
2.13.04. L-Arabinono-gama-lactonase.....	15
2.13.05. L-Arabinonato desidratase.....	15
2.13.06. 2-Ceto-3-desoxi-L-arabinonato	
desidratase.....	16
2.13.07. Semialdeído de alfa-ceto-glutarato	
desidrogenase.....	16
2.13.08. 2-Ceto-3-Desoxi-L-arabinonato	
aldolase.....	17
2.14. Métodos analíticos complementares.....	17
2.14.01. Determinação de proteínas.....	17
2.14.02. Determinação de NAD(P)H.....	18
2.14.03. Determinação de lactonas.....	18
2.14.04. Determinação de L-KDA e D,L-KDA.....	18
2.14.05. Determinação de alfa-ceto-ácidos.....	18
2.14.06. Determinação de glicolaldeído.....	19
2.14.07. Determinação de piruvato.....	19
2.14.08. Determinação de alfa-ceto-glutarato....	19
2.14.09. Determinação de compostos carbonílicos.	19

2.14.10. Cromatografia unidimensional	
ascendente em papel.....	20
3. RESULTADOS.....	21
3.01. Efeito das fontes de carbono L-arabinose e	
D,L-lactato no crescimento de <u>H.seropedicae</u> .....	21
3.02. Determinação da via catabólica da L-arabinose	
em <u>H.seropedicae</u> .....	21
3.02.01. L-arabinose desidrogenase.....	23
3.02.02. L-arabinono-gama-lactonase.....	29
3.02.03. L-arabinonato desidratase.....	29
3.02.04. 2-Ceto-3-desoxi-L-arabinonato	
desidratase.....	29
3.02.05. Semialdeído do alfa-ceto-glutarato	
desidrogenase.....	35
3.02.06. Caracterização dos intermediários do	
catabolismo da L-arabinose.....	39
3.03. Atividade desidrogenásica sobre outros	
substratos.....	44
3.04. Metabolismo da L-arabinose em outras estirpes	
de <u>H.seropedicae</u> .....	46
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÕES.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

## LISTAS DE FIGURAS

Figura	Página
01	Efeito da fonte de carbono no crescimento de <u>H. seropedicae</u> estirpe Z-78- L-arabinose ou D,L-lactato.....22
02	Efeito do tempo na atividade da L-arabinose desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.....25
03	Efeito da concentração de enzima na atividade da L-arabinose desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.....26
04	Efeito do tempo na atividade da L-arabinose desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas em D,L-lactato.....27
05	Efeito da concentração de enzima na atividade da L-arabinose desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas em D,L-lactato.....28
06	Efeito do tempo na atividade da L-arabinono lactonase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.....30



07	Efeito da concentração de enzima na atividade da L-arabinono lactonase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.....	31
08	Efeito do tempo na atividade da L-arabinonato desidratase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose ou em D,L-lactato.....	32
09	Efeito da concentração de enzima na atividade da L-arabinonato desidratase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.....	33
10	Efeito da concentração de enzima na atividade da L-arabinonato desidratase presente em extrato livre de células crescidas em D,L-lactato.....	34
11	Estequiometria entre o consumo de D,L-KDA e a formação de um grupo carbonílico adicional relativa a atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato desidratase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.....	36
12	Efeito do tempo na atividade da semialdeído do alfa-ceto- glutarato desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.....	37

13	Efeito da concentração de enzima na atividade da semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas L-arabinose.....	38
14	Espectros de absorção dos cromóginos produzidos com 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato ou do 2-ceto-3-desoxi-D,L-arabinonato preparados segundo o método do periodato-ácido tiobarbitúrico .....	41

## LISTAS DE TABELAS

Tabela	Página
01	Origem das Estirpes de <u>Herbaspirillum seropedicae</u> .....07
02	Atividade específica das enzimas da via metabólica da L-arabinose em <u>Herbaspirillum seropedicae</u> Z-78.....24
03	Valores dos Rfs dos produtos enzimáticos da L-arabinose desidrogenase e L-arabinono-gama-lactonase presente em extrato livre de células de <u>H.seropedicae</u> Z-78 crescido em L-arabinose.....40
04	Acúmulo de alfa-ceto-glutarato em extrato livre de células de <u>H.seropedicae</u> Z-78 crescido em L-arabinose.....43
05	Atividades desidrogenásicas em extrato livre de células de <u>H.seropedicae</u> Z-78.....45
06	Atividade relativa das enzimas chaves do metabolismo da L-arabinose em Várias Estirpes de <u>H.seropedicae</u> .....47

## Lista de Abreviaturas

atm	-	Atmosfera.
ATP	-	Adenosina trifosfato.
BSA	-	Soro albumina bovina.
°C	-	Temperatura em graus Celsius
DOWEX 1-X8	-	Resina aniônica.
DOWEX 50-X8	-	Resina catiônica.
EDTA	-	Acido etilenodiamino tetraacético.
g	-	Grama.
HEPES	-	Acido N-2-Hidroxiethylpiperazina- N'-etanosulfônico.
L-KDA	-	2-Ceto-3-desoxi-L-arabinonato.
D,L-KDA	-	2-Ceto-3-desoxi-D,L-arabinonato.
l	-	Litro.
M	-	Molar.
m	-	Mili.
min	-	Minuto.
NAD <sup>+</sup>	-	Nicotinamida adenina dinucleotido oxidado.
NADH	-	Nicotinamida adenina dinucleotido reduzido.
NADP <sup>+</sup>	-	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidado.
NADPH	-	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reduzido.
Rf	-	Coeficiente de migração relativa.
rpm	-	Rotações por minuto.
u	-	Micro.
v/v	-	Volume/Volume.

## RESUMO

O metabolismo da L-arabinose foi determinada em Herbaspirillum seropedicae estirpe Z-78. Esta via envolve intermediários não fosforilados e converte a L-arabinose em alfa-ceto-glutarato. A L-arabinose é inicialmente oxidado por uma L-arabinose desidrogenase NAD(P)<sup>+</sup>-dependente a L-arabinono-gama-lactona, que é então hidrolizado em L-arabinonato por uma lactonase. O L-arabinonato é por sua vez desidratado para formar o 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato, que é posteriormente desidratado a semialdeído do alfa-ceto-glutarato pela 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato desidratase. O semialdeído é finalmente oxidado por uma semialdeído do alfa-ceto-glutarato NAD(P)<sup>+</sup>-dependente formando alfa-ceto-glutarato. A síntese das enzimas L-arabinose desidrogenase, L-arabinose desidratase, 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato desidratase e semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase é induzida pela L-arabinose. Não foram detectadas atividades significativas para outras vias de metabolização de L-arabinose. Atividades enzimáticas de L-arabinose desidrogenase e de semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase, enzimas chaves do metabolismo oxidativo com formação de alfa-ceto-glutarato, foram encontradas em várias estirpes de H.seropedicae de diversas origens.

## 1. INTRODUÇÃO

A busca de fontes alternativas de nitrogênio fixado é um dos principais desafios da agricultura moderna. A investigação das associações de bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotrofos) com raízes de gramíneas tem obtido um considerável progresso e apresenta elevado potencial como alternativa aos fertilizantes nitrogenados (04, 08, 18, 22, 41, 44). Resultados recentes indicam que 15 a 30% do nitrogênio incorporado pelas gramíneas pode ser suprido pela fixação biológica promovida pelos diazotrofos associados (02, 07, 06, 05, 48). A natureza destas associações está sendo progressivamente melhor entendida (19, 40, 41, 45, 56).

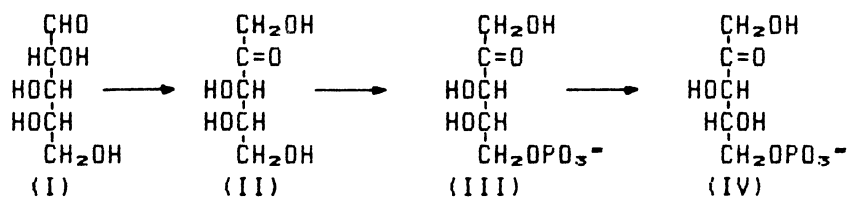
Recentemente um novo gênero de bactérias fixadoras de nitrogênio foi descrito com base em estudos microbiológicos, fisiológicos e de hibridização DNA-RNA (03, 23). Este gênero foi denominado Herbaspirillum e contém a espécie H. seropedicae. Esta espécie tem ampla ocorrência em rizosfera e raízes de gramíneas produtoras de grãos e forrageiras (03). Este diazotrofo, geralmente vibrióide e algumas vezes helicoidais, apresenta reação Gram negativa. De acordo com o meio de crescimento, seu diâmetro varia de 0,6 a 0,7 um e seu comprimento de 1,5 a 5,0 um. Pode apresentar de um a três flagelos em um ou ambos os polos. Apresenta crescimento semelhante entre pH 5,3 e 8,0 e uma temperatura ótima de crescimento de 34°C. Cresce rapidamente utilizando nitrogênio atmosférico somente em condições microaeróbicas. Possui metabolismo respiratório típico.

Utiliza malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato, alfa-ceto-glutarato e trans-aconitato como fontes de carbono tanto para crescimento diazotrófico como para meios contendo sais de amônio (03). O D-manitol, D-sorbitol, glicerol e vários açúcares, tais como D-glucose, D-galactose e L-arabinose são, também, utilizados como fonte de carbono e energia para crescimento diazotrófico e não-diazotrófico. Crescimento em D-galactose ou em D-glucose não leva à produção de ácidos orgânicos, ao contrário do que ocorre com o crescimento em L-arabinose. Além disto, não utiliza sacarose e somente cresce em D-frutose na presença de sais de amônio (03).

A D-xilose e a L-arabinose são as pentoses mais importantes quantitativamente na composição de matérias vegetais. Ambas fazem parte das estruturas dos polissacarídeos que compõem as gomas, pectinas, hemicelulose e polissacarídeos bacterianos (01, 30, 51), podendo constituir fontes de carbono e energia potenciais para crescimento microbiano. L-arabinose constitui uma boa fonte de carbono para crescimento de microorganismos em geral (28) e de diazotrofos como as Rhizobium spp. e Bradyrhizobium spp. (42) e Azospirillum spp. (35) e H. seropedicae (03). O recente impulso da Biotecnologia promoveu um novo estímulo aos estudos do metabolismo de carboidratos, para obtenção de produtos úteis a sociedade (24).

O metabolismo da L-arabinose pode ocorrer através de uma das quatro vias já descritas. Pela primeira via, a L-arabinose (I) é inicialmente isomerizada a L-ribulose (II) por ação da L-arabinose cetol-isomerase (E.C.5.3.1.4,

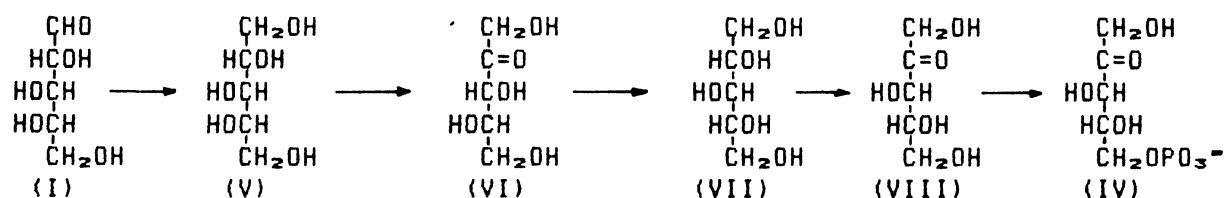
L-arabinose isomerase). O produto desta reação é por sua vez fosforilado pela ATP: L-ribulose-5-fosfo-transferase (E.C.2.7.1.16, L-ribulose quinase) a L-ribulose-5-fosfato (III), que é então epimerizada a D-xilulose-5-fosfato (IV) pela L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase (E.C.5.1.3.4), sendo posteriormente metabolizada pela via das pentoses fosfato. A utilização da L-arabinose por esta via é comum em Lactobacillus plantarum (09, 10, 26), Escherichia coli (25), Bacillus subtilis (32), Aerobacter aerógenes (49, 64), Propionibacterium pentosaceum (58).



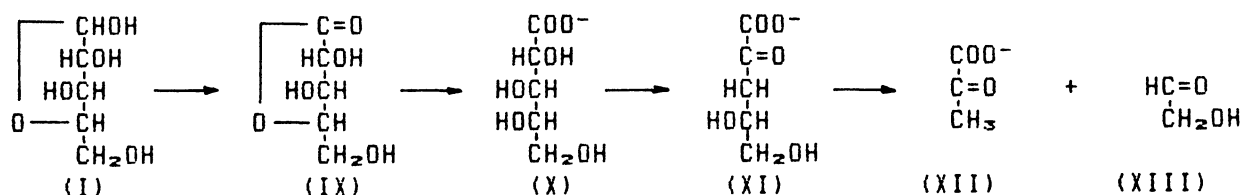
Pela segunda via, a L-arabinose é metabolizada a D-xilulose-5-fosfato por meio de reduções e oxidações sucessivas culminando na fosforilação da D-xilulose. Inicialmente a L-arabinose (I) é reduzida a L-arabinitol (V) pela alditol: NADP<sup>+</sup>-1-oxi-redutase (E.C.1.1.1.21, L-arabinitol desidrogenase NADP<sup>+</sup> dependente). O L-arabinitol é então oxidado pela L-arabinitol: NADP<sup>+</sup>-4-oxi-redutase (E.C.1.1.1.12) a L-xilulose (VI), que é reduzida a xilitol (VII) pela xilitol NADP<sup>+</sup>-4-oxi-redutase (E.C.1.1.1.10). Por ação da xilitol NADP<sup>+</sup>-2-oxi-redutase (E.C.1.1.1.9) o xilitol é oxidado à D-xilulose (VIII), que, por sua vez, é fosforilada a D-xilulose-5-fosfato (IV) pela ATP:



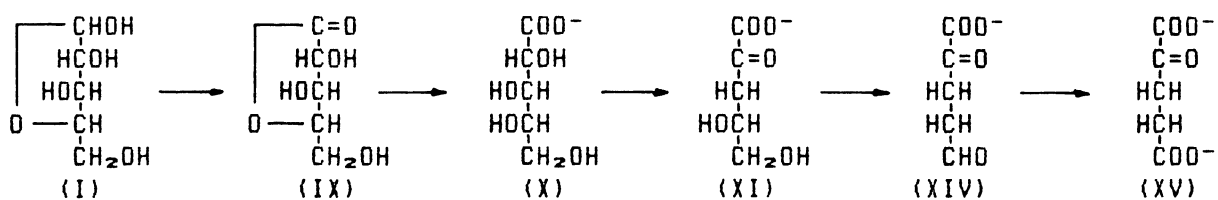
D-xilulose-5-fosfo-transferase (E.C.2.7.1.17). Esta via foi descrita em Penicillium chrysogenum (11, 12).



Nas outras duas vias ocorre a formação de um intermediário comum, o 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato. Por estas vias a L-arabinose (I) é inicialmente oxidada à L-arabinono-gama-lactona (IX) pela L-arabinose: NAD<sup>+</sup>-1-oxi-redutase (E.C.1.1.1.46, L-arabinose desidrogenase). Esta lactona é, em seguida, hidrolisada à L-arabinonato (X) pela L-arabinono-gama-lactona lactono-hidrolase (E.C. 3.1.1.15, L-arabinono lactonase) . O L-arabinonato é, então, desidratado por ação L-arabinonato hidro-liase (E.C. 4.2.1.25, L-arabinonato desidratase) a 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato (L-KDA) (XI). Esse intermediário pode ser metabolizado seguindo duas vias diferentes. Em Bradyrhizobium japonicum (20,47), Bradyrhizobium "cowpea" estirpe 32H1 (20), e em uma estirpe (MSU-1) de Pseudomonas (14), este intermediário é clivado pela 2-ceto-3-desoxi-L-pentonato glicolaldeído-liase (E.C.4.1.2.18, L-KDA aldolase) a piruvato (XII) e glicolaldeído (XIII).



Alternativamente, como ocorre em Pseudomonas spp. (13, 54, 62, 59, 60, 61), Azospirillum brasilense (38), Rhizobium spp. (20, 21) o intermediário 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato (XI) é desidratado pela 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato hidro-íase (E.C.4.2.1.43, L-KDA desidratase) a semialdeído do alfa-ceto-glutarato (XIV), que é, finalmente, oxidado a alfa-ceto-glutarato (XV) pela aldeído 2,5-di-ceto-valerato: NAD(P)<sup>+</sup> oxi-redutase (E.C.1.2.1.26, semialdeído do alfa-ceto glutarato desidrogenase).



### 1.01. Objetivos do trabalho

O presente trabalho tem por objetivos determinar a via metabólica da L-arabinose em várias estirpes de H. seropedicae através da identificação das atividades enzimáticas e dos intermediários metabólicos produzidos no processo e determinar o efeito da fonte de carbono nos níveis das enzimas envolvidas.

## 2. MATERIAIS E METODOS

### 2.01. Microrganismo

Herbaspirillum seropedicae, estirpes Z-78 (ATCC 35893) isolada de sorgo, Z-67, ZA-69, ZA-76 (ATCC 35892), ZA-95, ZM-136 e Z-152 foram gentilmente cedidas pela Dra. Johanna Dobereiner, do Programa Nacional de Pesquisas em Biologia do Solo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Seropédica, Rio de Janeiro e estão listadas na Tabela 1.

### 2.02. Meios de cultura

H. seropedicae foi cultivado e mantido em meio NFB modificado como descrito por Pedrosa *et al.* (46), de composição seguinte: em g/l  $K_2HPO_4$  6,0,  $KH_2PO_4$  4,0,  $NH_4Cl$  1,07, lactato de sódio 5,0 ou L-arabinose 5,0 e, em mg/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  200, NaCl 100, ácido nitrilo-triacético 56,  $CaCl_2$  20,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  20,  $H_3BO_3$  2,80,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  2,35,  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  2,00,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,24, biotina 0,1 e  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,08. O pH final foi de 6,8-7,0. O meio foi esterilizado a 1 atmosfera (121°C) por 20 minutos. As soluções contendo os fosfatos, o  $NH_4Cl$  e as fontes de carbono foram autoclavadas separadamente, sob as mesmas condições, e adicionadas assepticamente ao meio frio. O meio sólido continha 17,5g de ágar Oxoid nº 1 por litro. Meio semi-sólido, sem fonte de N-fixado, continha 1,75 g de ágar por litro, e foi utilizado para certificar a capacidade de fixar nitrogênio das estirpes utilizadas

**Tabela 01: Origem das Estirpes de Herbaspirillum seropedicae.**

Estirpe	Origem	A.T.C.C.*
Z-78	raiz de sorgo	35893
Z-67	raiz de arroz	
ZA-69	raiz de arroz	
ZA-76	rizosfera de arroz	35892
ZA-95	raiz de arroz	
ZM-136	-	
Z-152	-	

\*= estirpe catalogada no "American Type Culture Collection"

### 2.03. Manutenção das culturas e condições de cultivo

Culturas estoque do H. seropedicae foram armazenadas em glicerol a 50% a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou em meio sólido NFb à temperatura ambiente.

### 2.04. Crescimento do inóculo

Células de H. seropedicae foram transferidas com alça de platina para meio NFb (50 ml) contendo L-arabinose ou D,L-lactato e contido em erlenmeyer de 125 ml. O crescimento foi feito a  $30^{\circ}\text{C}$  sob agitação contínua de 140 rpm em um agitador rotativo New Brunswick modelo G 25, até que atingisse fase exponencial (cerca de 400 unidades Klett ou seja  $13 \text{ mg peso seco} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

### 2.05. Curva de crescimento

Frascos de 250 ml com tubo lateral contendo 100 ml de meio NFb foram inoculados com culturas pré-crescidas na mesma fonte de carbono e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$ , com agitação de 140 rpm. O crescimento foi acompanhado pela determinação da turbidez do meio em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro verde nº 54. O tempo de duplicação foi calculado graficamente da curva de crescimento com plote semi-log (36).

### 2.06. Determinação da densidade bacteriana

A densidade bacteriana foi avaliada a 560 nm, em espectrofotômetro Beckman DU-2 ou Gilford 252 ou em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro verde nº

54. Alternativamente determinou-se o peso seco bacteriano por unidade de volume. Neste caso, 3 ml de cultura de células foram colhidos por centrifugação em microcentrifuga Incibrás Spin I, a 12.000 rpm, e seca em estufa a 80°C por 24 horas ou até peso constante.

#### 2.07. Determinação do pH do meio de cultivo

O pH do meio de cultivo foi medido em potenciômetro Micronal modelo 222, aferido com padrão pH 7,0.

#### 2.08. Cultivo em larga escala

Para a obtenção de massa bacteriana a ser empregada no preparo de extrato livre de células, as estirpes foram cultivadas em frascos erlenmeyer de 2 l contendo 1 l de meio NFb. Após a adição de 1% v/v de inóculo crescido na mesma fonte de carbono, as culturas foram incubadas a 30°C em agitador rotativo a 140 rpm. Ao atingir cerca de 400 unidades Klett, as células foram coletadas por centrifugação a 10.000 x g por 15 min, a 6°C, em centrifuga refrigerada Beckman J-21B. A massa bacteriana foi empregada imediatamente ou armazenada em nitrogênio líquido (-196°C) para uso posterior.

#### 2.09. Extrato livre de células

Extratos livres de células foram preparados por maceração com alumina ou por rompimento das células em prensa francesa Aminco. Células de H. seropedicae (1 g) foram maceradas, com 1 g de alumina e 3 ml de tampão fosfato 0,2M (pH 7,2), contendo mercaptoetanol 1mM, por 10 min, em

gral gelado. Alternativamente, a suspensão celular (1g de células / 2 volumes de tampão contendo 0,1mM de EDTA), foi rompida em prensa francesa a 800 psig. Em ambos os casos, as suspensões de células rompidas foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 6°C. A solução sobrenadante foi utilizada imediatamente como fonte de enzima, ou congeladas como pequenas esferas e armazenadas em nitrogênio líquido, para uso posterior.

## 2.10. Sínteses

### 2.10.01. Síntese química do L-arabinonato do potássio

O L-arabinonato de potássio foi preparado por oxidação da L-arabinose com hipiodito alcalino ( $I_2$ -KOH) em metanol, segundo a técnica descrita por Moore e Link (37). L-Arabinose (10g) foi dissolvida em 18 ml de água e diluída com 147 ml de metanol. A seguir foram adicionados, 471 ml de metanol contendo 34g de  $I_2$  e a mistura foi aquecida a 40°C. Foram adicionados à mistura de reação, gota a gota, 383 ml de KOH a 4% em metanol (fluxo de 4,26 ml/min), sob agitação constante, permanecendo a mesma sob agitação por mais 20 minutos, quando então, foram adicionados mais 295 ml de KOH a 4% em metanol, sob o mesmo fluxo. A mistura de reação foi conservada em agitação por mais 10 minutos, e então foi resfriada à temperatura ambiente. O precipitado branco de L-arabinonato de potássio foi coletado por filtração em funil buchner sob vácuo suave. O precipitado foi lavado duas vezes com metanol, para remover a L-arabinose residual, antes de ser seca a 30°C em estufa.

O L-arabinonato de potássio seco foi conservado a temperatura ambiente em dessecador contendo sílica-gel. Sua pureza foi testada por cromatografia em papel Whatman nº 1, usando os solventes citados abaixo, contra padrões de L-arabinose, L-arabinonato e a gama-lactona do L-arabinonato, não sendo detectado contaminantes capazes de reagir positivamente com o reagente de Trevelyan et al. (55).

#### 2.10.02. Síntese química da gama-lactona do L-arabinonato

A síntese química desta lactona foi feita segundo a técnica descrita por Weimberg (59). A gama-lactona do L-arabinonato foi sintetizada pela fervura do L-arabinonato (0,125M) em presença de HCl 0,1M por 5 minutos.

#### 2.10.03. Síntese química do 2-ceto-3-desoxi-D,L-arabinonato

O D,L-KDA foi sintetizado quimicamente pelo método de Stoolmiller (53) modificado como descrito a seguir. Por este procedimento ocorre uma condensação aldólica entre o oxaloacetato e o glicolaldeído com desprendimento de CO<sub>2</sub>. A uma solução de oxaloacetato (7,2 mmoles dissolvido em 24 ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05M e ajustada a pH 7,2 com KOH) foi adicionado glicolaldeído (4,8 mmoles), sob agitação constante. Esta mistura foi incubada por 19 horas à temperatura ambiente. Após este período o pH da mistura de reação atingiu o valor de 8,5, sendo então ajustado para pH 7,0 pela adição de resina DOWEX 50-X8 (forma H<sup>+</sup>) 200-400 mesh, que posteriormente foi removida por filtração. O filtrado, contendo o D,L-KDA, foi aplicado em uma coluna DOWEX 1-X8



(forma  $\text{HCOO}^-$ ) de 1,7 x 18 cm e eluído com 440 ml de  $\text{HCOOH}$  0,25M e 560 ml de  $\text{HCOOH}$  0,275M, sob um fluxo de 0,43 ml/min. Frações de 10 ml foram coletadas e a presença de compostos carbonílicos foi determinada pela reação com 2,4-dinitro-fenilhidrazina (31) ou pela semicarbazida (34), que identificam grupos carbonila ou alfa-ceto-ácido, respectivamente.

Posteriormente, as frações positivas para alfa-ceto-ácidos foram ensaiadas pelo método do periodato-ácido tiobarbitúrico (63), que identifica a presença de 2-ceto-3-desoxi aldonato, no caso D,L-KDA. Frações contendo D,L-KDA foram juntadas e liofilizadas. O produto foi estocado a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 2.10.04. Síntese biológica do 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato

O L-KDA foi obtido a partir da desidratação do L-arabinonato de potássio pela L-arabinonato desidratase, por procedimento semelhante ao descrito por Stoolmiller (53). Extrato livre de células de *H. seropedicae* crescido em L-arabinose foi utilizado como fonte desta desidratase. O sistema de reação (10 ml) contendo 500 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), 1000 umoles de L-arabinonato, 45 umoles de  $\text{MgCl}_2$  e 2,92 mg de proteína (extrato livre de células), foi incubado a  $30^\circ\text{C}$ . Ao final de 24 horas de incubação, a reação foi interrompida pela adição de resina DOWEX 50-X8 (forma  $\text{H}^+$ ) 200-400 mesh. Esta mistura foi filtrada para remover proteína precipitada e o filtrado aplicado em coluna DOWEX 1-X8 (forma  $\text{HCOO}^-$ ) 200-400 mesh, com 1,7 x 15,5 cm. O material da coluna foi eluído com  $\text{HCOOH}$  0,25M sob fluxo de

0,14 ml/min. Frações (6 ml) foram coletadas e os alfa-ceto ácidos foram detectados pelo método da semicarbazida (34). Dos quatro picos obtidos, o primeiro continha o L-KDA, como posteriormente evidenciado pelo método do periodato-ácido tiobarbitúrico (63). As frações contendo L-KDA foram juntadas e a solução resultante foi estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.11. Enzimas

Lactato desidrogenase de músculo de cão foi obtida da Boehring Mannheim GmbH. L-Glutamato desidrogenase de fígado bovino tipo I foi obtida da Sigma Chemical Co, Missouri, USA.

## 2.12. Reagentes químicos

Os cofatores  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$  e  $\text{NADPH}$ , glicolaldeído, piruvato de sódio, BSA e HEPES foram obtidos da Sigma Chemical Co. L-Arabinose, EDTA, glutaraldeído, ácido alfa-ceto-glutárico,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foram obtidos da E. Merck, Darmstadt, Germany. Os demais reagentes apresentavam grau de pureza pró análise.

## 2.13. Atividades enzimáticas

### 2.13.01. L-Arabinose desidrogenase

Para a medida da atividade desta desidrogenase- $\text{NAD(P)}^+$  dependente, o sistema de incubação (3,0 ml) continha: 300 umoles de tampão glicina- $\text{NaOH}$  (pH 9,5), 30 umoles de L-arabinose, 1,5 umoles de  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$ , e enzima em quantidade apropriada. A redução de  $\text{NAD(P)}^+$  foi acompanhada

em 340 nm em espectrofotômetro Beckman DU-2 ou Gilford 252, a 26°C. A atividade específica foi expressa em nmoles de NAD(P)H formado .  $\text{min}^{-1}$  .  $\text{mg}^{-1}$  de proteína. Foram feitos controles omitindo-se NAD(P)<sup>+</sup>, L-arabinose ou enzima.

### 2.13.02.L-Arabinitol desidrogenase

Para a medida da atividade desta desidrogenase-NAD(P)<sup>+</sup> dependente o sistema de incubação (3,0 ml) continha: 300 umoles de tampão glicina-NaOH (pH 9,5), 30 umoles de L-arabinitol, 1,5 umoles de NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> e enzima em quantidade apropriada. A redução de NAD(P)<sup>+</sup> foi acompanhada em 340 nm em espectrofotômetro Gilford 252, a 26°C. Outras atividades desidrogenásicas foram testadas utilizando sistemas de incubações semelhantes a este. Os outros substratos foram adicionados nas mesmas concentração que o L-arabinitol. A atividade específica foi expressa em nmoles de NAD(P)H formado .  $\text{min}^{-1}$  .  $\text{mg}^{-1}$  de proteína. Foram feitos controles omitindo-se NAD(P)<sup>+</sup>, L-arabinitol e enzima.

### 2.13.03.L-Arabinose isomerase

A atividade da L-arabinose isomerase foi determinada no seguinte sistema de incubação (1,0 ml): 40 umoles de tampão glicil-glicina-NaOH (pH 7,4), 20 umoles de L-arabinose, 20 umoles de MgCl<sub>2</sub>, 10 umoles de cisteína-HCl e enzima em quantidade apropriada. A incubação foi feita a 30°C e a formação de ceto-pentose acompanhada pelo método da cisteína carbazol (17), usando D-frutose como padrão. Foram feitos controles omitindo-se os diversos componentes do sistema. A absorbância do cromógeno foi determinada a 560 nm

em espectrofotômetro Gilford 252. A atividade específica foi expressa em nmoles de ceto-pentose formada .  $\text{min}^{-1}$  .  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### 2.13.04.L-Arabinono-gama-lactonase

A atividade da lactonase foi determinada no seguinte sistema de incubação (0,5 ml): 25 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), 12,5 umoles de L-arabinono-gama-lactona, e enzima em quantidade apropriada. O sistema de reação foi incubado a 30°C. Nos tempos determinados, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 ml de hidroxilamina-NaOH, que reage com a lactona residual, determinada segundo a técnica de Hestrin (27). A absorbância do cromógeno foi determinada imediatamente, a 540 nm em espectrofotômetro Gilford 252. A atividade específica foi expressa em nmoles de lactona hidrolizada enzimaticamente .  $\text{min}^{-1}$  .  $\text{mg}^{-1}$  de proteína. A hidrólise enzimática foi determinada pela diferença entre a hidrólise total (espontânea + enzimática) e a hidrólise espontânea. Os controles para hidrólise espontânea continham enzima desnaturada pelo calor (banho maria fervente por 5 minutos).

#### 2.13.05.L-Arabinonato desidratase

Na determinação da atividade da L-arabinonato desidratase foi usado o seguinte sistema de incubação (0,4 ml): 20 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), 25 umoles de L-arabinonato de potássio, 2 umoles de  $\text{MgCl}_2$ , e enzima em quantidade apropriada. O sistema foi incubado a 30°C e a reação foi interrompida pela adição de 1,0 ml de

semicarbazida-HCl para a determinação de alfa-ceto-ácidos (34). A absorbância foi determinada em 250 nm em espectrofotômetro Beckman DU-2 ou Gilford 252. A atividade específica foi expressa em nmoles de alfa-ceto-ácido formado  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína. Foram feitos controles omitindo-se L-arabinonato de potássio ou enzima.

#### 2.13.06.2-Ceto-3-desoxi-L-arabinonato desidratase

A atividade desta enzima foi determinada simultaneamente pelo desaparecimento do D,L-KDA (63) e pelo aparecimento de carbonila (31). O sistema de incubação (1,0 ml) continha 50 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), 20 umoles de D,L-KDA e enzima em quantidade apropriada e foi incubado a 30°C. Nos tempos indicados, aliquotas foram removidas para as duas determinações mencionadas. A atividade específica foi expressa em nmoles de D,L-KDA consumido  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína e nmoles de carbonila adicional formada  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Foram feitos controles omitindo-se D,L-KDA ou enzima.

#### 2.13.07.Semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase

A atividade desta desidrogenase foi determinada no seguinte sistema de incubação (3,0 ml): 200 umoles de tampão fosfato (pH 7,2), 30 umoles de glutaraldeído, 1,5 umoles de NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> e enzima em quantidade apropriada. A redução de NAD(P)<sup>+</sup> foi acompanhada em 340 nm em espectrofotômetro Beckman DU-2 ou Gilford 252, a 26°C. A atividade específica foi expressa em nmoles de NAD(P)H formado  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de

proteína. Foram feitos controles omitindo-se  $\text{NAD(P)}^+$ , glutaraldeído ou enzima.

### 2.13.08.2-Ceto-3-desoxi-L-arabinonato aldolase

A atividade desta aldolase foi determinada no sentido da síntese como descrito por Pedrosa e Zancan (47). O sistema de incubação (0,35 ml) continha 10 umoles de tampão HEPES (pH 7,8), 5 umoles de piruvato de sódio, 5 umoles de glicolaldeído, 2 umoles de  $\text{MgCl}_2$  e enzima em quantidade apropriada, e foi incubado a  $30^\circ\text{C}$ . Nos tempos determinados, a reação foi interrompida por adição de resina DOWEX 50-X8 (forma  $\text{H}^+$ ) 200-400 mesh. Após remoção da resina catiônica por centrifugação em microcentrífuga Incibrás Spin I a 12.000 rpm, as concentrações do L-KDA e alfa-ceto-glutarato foram determinadas no sobrenadante pelos métodos de Weissbach e Hurwitz (63) e de Novick e Tyler (38), respectivamente.

## 2.14. Métodos analíticos complementares

### 2.14.01.Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi feita pelo método de Lowry *et al.* (33). Para os experimentos de crescimento bacteriano a concentração de proteína foi determinada após digestão das células com  $\text{NaOH}$  1M durante a noite a temperatura ambiente ou por 5 minutos a  $100^\circ\text{C}$ . Para as células digeridas ou extratos enzimáticos fez-se a determinação tendo BSA (soro albumina bovina) como padrão. O

cromógeno obtido pelo método foi determinado a 660 nm em espectrofotômetro Beckman DU-2 ou Gilford 252.

#### 2.14.02.Determinação de NAD(P)H

A concentração de NAD(P)H foi determinada espectrofotometricamente a 340 nm em Beckman DU-2 ou Gilford 252, tendo um coeficiente de extinção molar de  $6220 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$  (29).

#### 2.14.03.Determinação de lactonas

A determinação de lactonas foi feita pelo método de Hestrin (27). L-Arabinono lactona sintetizada como descrito em 2.10.02 foi empregada como padrão. O cromógeno foi determinado a 540 nm em espectrofotômetro Gilford 252, imediatamente após a reação.

#### 2.14.04.Determinação do L-KDA e D,L-KDA

A concentração do L-KDA ou do D,L-KDA foi determinada pelo método periodato-ácido tiobarbitúrico (63). O cromógeno formado apresenta absorção máxima em 549 nm e sua concentração foi determinada em espectrofotômetro Beckman DU-2 ou Gilford 252, aplicando-se o coeficiente de extinção molar de  $72000 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$  (50).

#### 2.14.05.Determinação de alfa-ceto-ácidos

A concentração de alfa-ceto-ácidos foi determinada com semicarbazida-HCl (34). O produto da reação foi determinado em 250 nm em espectrofotômetro Beckman DU-2 ou Gilford 252

e sua concentração determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $10200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.14.06. Determinação do glicolaldeído

A determinação da concentração do glicolaldeído foi feita pelo método da difenilamina (16), usando-se glicolaldeído Sigma como padrão. O cromógeno formado foi determinado em 660 nm em um espectrofotômetro Gilford 252.

#### 2.14.07. Determinação do piruvato

Piruvato foi determinado enzimaticamente pela lactato desidrogenase (52). O sistema de incubação (3,0 ml) continha 300 umoles de tampão fosfato (pH 7,2), 0,8 umoles de NADH, amostra a ser analisada, e enzima em quantidades apropriadas. A oxidação do NADH foi acompanhada em espectrofotômetro Gilford 252 a 340 nm a 26°C, até atingir o estado final de oxidação.

#### 2.14.08. Determinação do alfa-ceto-glutarato

Alfa-ceto-glutarato foi determinado enzimaticamente, pela L-glutamato desidrogenase (38). O sistema de incubação (3,0 ml) era composto por 200 umoles de tampão fosfato (pH 7,2), 0,82 umoles de NADH, 40 umoles de cloreto de amônia, amostra a ser analisada, e enzima em quantidades apropriadas. A oxidação do NADH foi acompanhada em espectrofotômetro Gilford 252 a 340 nm a 26°C, até atingir o estado final de oxidação.

#### 2.14.09. Determinação de compostos carbonílicos



A concentração de compostos carbonílicos ou de grupamentos carbonílicos foi feita através de reação com 2,4-dinitro-fenilhidrazina (31). O cromógeno foi determinado a 520 nm em espectrofotômetro Gilford 252.

#### 2.14.10. Cromatografia unidimensional ascendente em papel

O ácido L-arabinônico e sua lactona foram caracterizados por cromatografia unidimensional ascendente em papel WHATMAN nº1. Os solventes empregados nas corridas cromatográficas foram: a) n-butanol:piridina:água (6:4:3) ou b) n-propanol:ácido fórmico:água (6:3:1).

Para obtenção dos produtos da L-arabinose desidrogenase e da L-arabinono-gama-lactonase o seguinte sistema de incubação (0,46 ml) foi usado: 20 umoles de tampão fosfato (pH 7,2), 8 umoles de L-arabinose, 8 umoles de NAD<sup>+</sup>, e 4 mg de proteína de extrato livre de células crescidas em L-arabinose. Após incubação durante a noite a 30°C, a reação foi interrompida pela adição de resina DOWEX 50-X8 (forma H<sup>+</sup>) 200-400 mesh. Este sistema foi em seguida centrifugado por 5 minutos em microcentrifuga Incibrás Spin I, a 12.000 rpm, e o sobrenadante foi aplicado ao papel cromatográfico. Após a corrida cromatográfica a temperatura ambiente os cromatogramas foram revelados com nitrato de prata alcalino (55).

### 3. RESULTADOS

#### 3.01. Efeito das fontes de carbono L-arabinose e D,L-lactato no crescimento de H. seropedicae

Os perfis de crescimento da estirpe 278 de H. seropedicae em meio NFb-líquido, tendo L-arabinose ou D,L-lactato como fonte única de carbono, são mostrados na Figura 01. Após acentuada fase "lag" (0-3 h.) ou de adaptação do microrganismo ao meio, o organismo entrou em fase de crescimento exponencial regular (4-10 h.) em que apresentou os menores tempos de duplicação para ambas as fontes de carbono. Da 10<sup>a</sup> a 16<sup>a</sup> hora, a velocidade de duplicação diminuiu significativamente até atingir a fase estacionária. Convém observar que a turbidez da cultura em L-arabinose ainda era crescente, se estabilizando somente a partir da 20<sup>a</sup> hora. Por outro lado, a turbidez da cultura em meio com D,L-lactato diminuiu significativamente após a 16<sup>a</sup> hora. No final do experimento foram determinados o pH e a concentração de proteína das culturas. A cultura em L-arabinose apresentou pH de 6,18 e concentração de proteína de 1,00 mg . ml<sup>-1</sup>, enquanto a cultura em D,L-lactato apresentou pH de 7,28 e concentração de proteína de 0,77 mg . ml<sup>-1</sup>. Os menores tempos de duplicação, calculados entre a 3<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> hora, foram de 1,50 e 1,44 horas para meios contendo L-arabinose e D,L-lactato, respectivamente.

#### 3.02. Determinação da via metabólica da L-arabinose em H. seropedicae

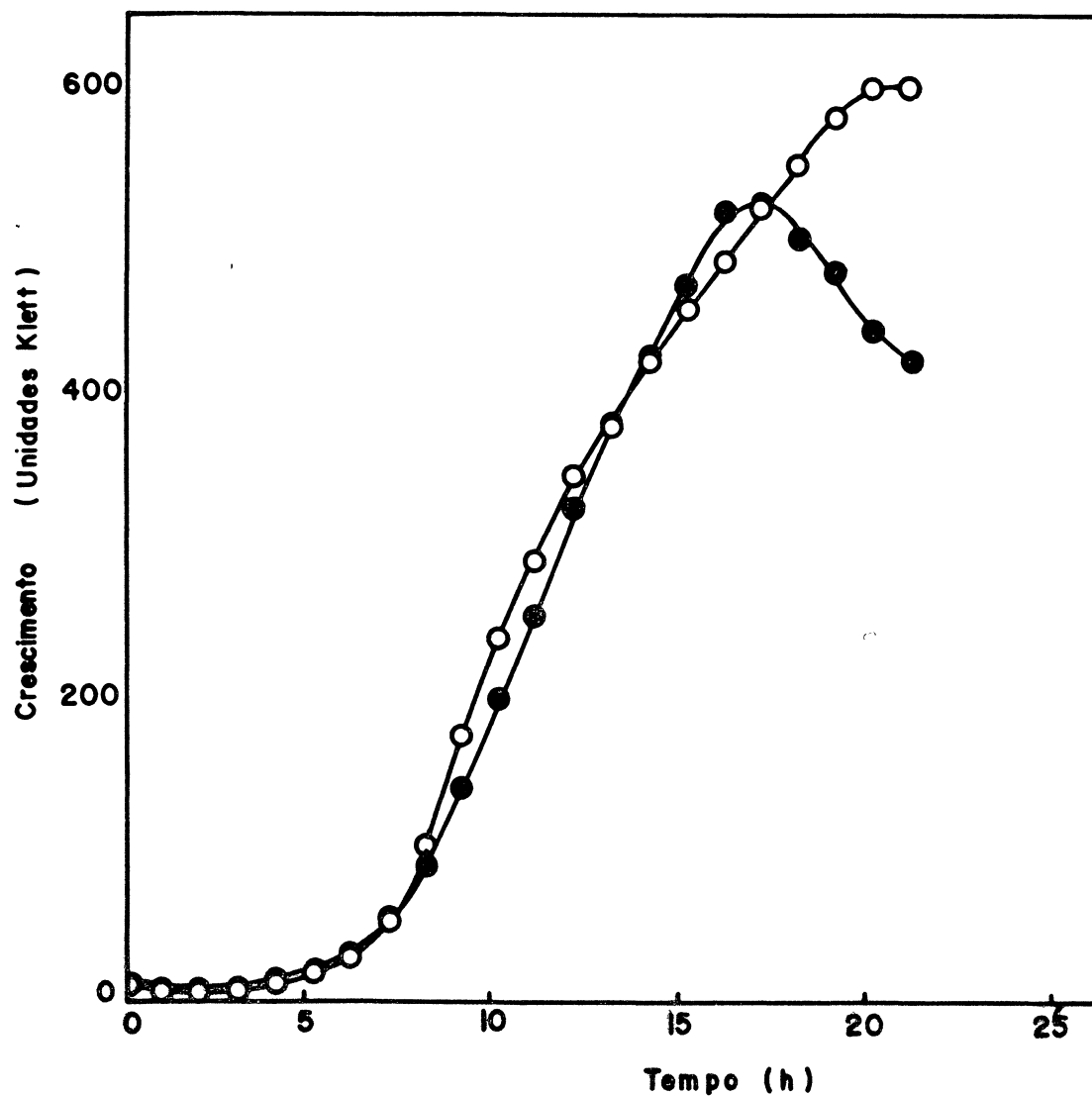


Figura 01 : Efeito da fonte de carbono no crescimento de *H. seropedicae* estirpe Z-78 - L-arabinose e D,L-lactato.

O meio NFb continha 0,5% de L-arabinose (O) ou 0,5% de D,L-lactato de sódio (●). Os tempos mínimos de duplicação foram 1,50 h e 1,44 h para L-arabinose e D,L-lactato, respectivamente.

A primeira enzima de cada uma das quatro vias de metabolismo da L-arabinose já descritas, foi ensaiada em extratos livres de células de Herbaspirillum seropedicae Z78 crescido em L-arabinose. Somente foi encontrada atividade de L-arabinose desidrogenase, da ordem de 164 e 21 nmoles . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup> para formação de NADH e NADPH , respectivamente (Tabela 02). Atividades de L-arabinose isomerase e L-arabinitol desidrogenase NADP<sup>+</sup>-dependente não foram detectadas em níveis significativos (<0.001 e <1 nmoles . min<sup>-1</sup> . mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente).

A presença de altas atividades de L-arabinose desidrogenase sugeriu que neste organismo a L-arabinose era metabolizada por uma das vias oxidativas envolvendo intermediários não fosforilados. As outras enzimas das duas vias restantes possíveis e seus intermediários foram então pesquisados em extratos livre de células crescidas em L-arabinose ou D,L-lactato.

### 3.02.01.L-Arabinose desidrogenase

Células de H. seropedicae estirpe Z-78 crescidas em D,L-lactato também apresentaram atividade de L-arabinose desidrogenase. Estas atividades foram de 11 nmoles de NADH e 27 nmoles de NADPH formado . min<sup>-1</sup> . mg<sup>-1</sup> de proteína (Tabela 02). A proporcionalidade destas atividades em relação ao tempo de incubação e à concentração de proteína, é mostrada nas Figuras 02 e 03 para células crescidas em L-arabinose e nas Figuras 04 e 05 para células crescidas em D,L-lactato.

Tabela 02 : Atividade específica das enzimas da via metabólica da L-arabinose em Herbaspirillum seropedicae Z-78.

Enzimas	cofator	Atividade Enzimática <sup>a</sup>	
		L-arabinose <sup>b</sup>	D,L-lactato <sup>b</sup>
L-arabinose desidrogenase	NAD <sup>+</sup>	164	11
	NADP <sup>+</sup>	21	27
L-arabinono-gama-lactonase		364	276
L-arabinonato desidratase		40	15
L-KDA desidratase		88	36
semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase	NAD <sup>+</sup>	74	04
	NADP <sup>+</sup>	42	18

<sup>a</sup> = atividade específica expressa em nmoles de produto formado (ou substrato consumido) . minuto<sup>-1</sup> . mg<sup>-1</sup> de proteína.

<sup>b</sup> = fonte de carbono utilizada para obtenção do extrato livre de células.

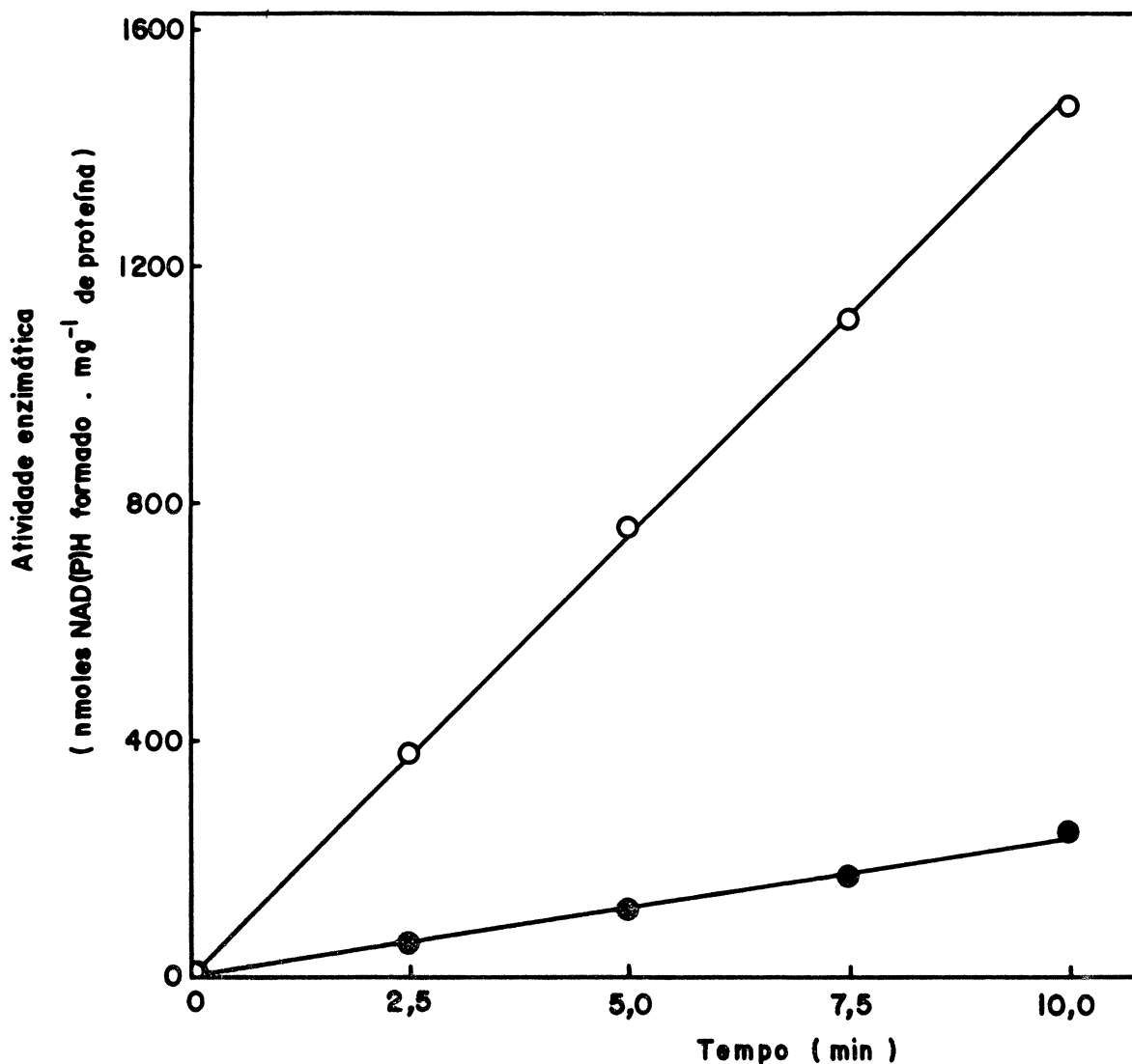


Figura 02 : Efeito do tempo na atividade da L-arabinose desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.

O sistema de incubação (3,0 ml) continha : 300 umoles de tampão glicina-NaOH (pH 9,5), 30 umoles de L-arabinose, 1,5 umoles de NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> e 1,0 mg de proteína. O tempo de incubação está especificado na Figura. A formação de NADH (O) ou NADPH (●) foi acompanhada como descrito em materiais e métodos.

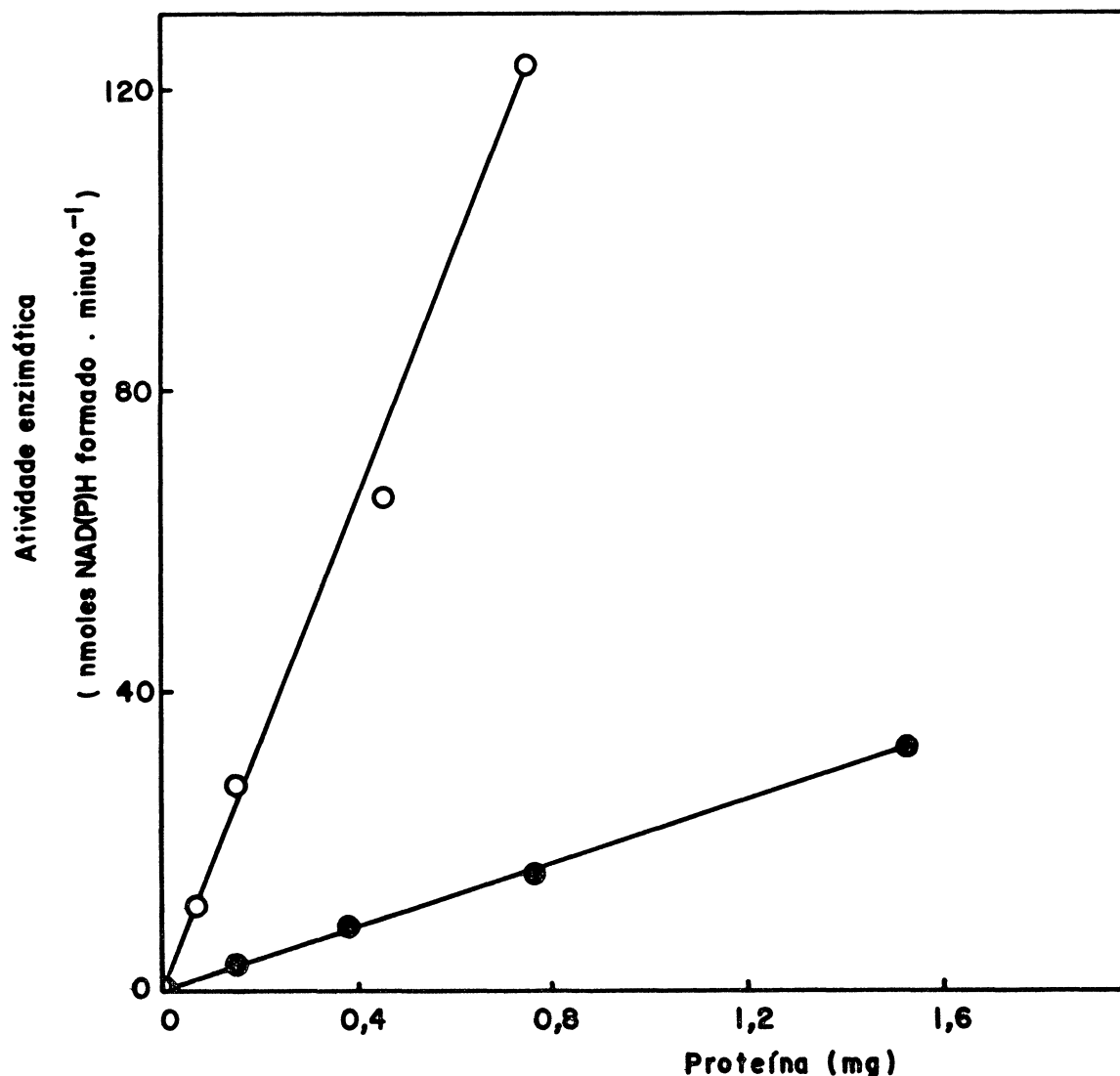


Figura 03 : Efeito da concentração de enzima na atividade da L-arabinose desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.

O sistema de incubação (3,0 ml) continha : 300  $\mu$ moles de tampão glicina-NaOH (pH 9,5), 30  $\mu$ moles de L-arabinose, 1,5  $\mu$ moles de  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$  e proteína, como especificado na Figura. A formação de NADH (O) ou NADPH (●) foi acompanhada como descrito em materiais e métodos.

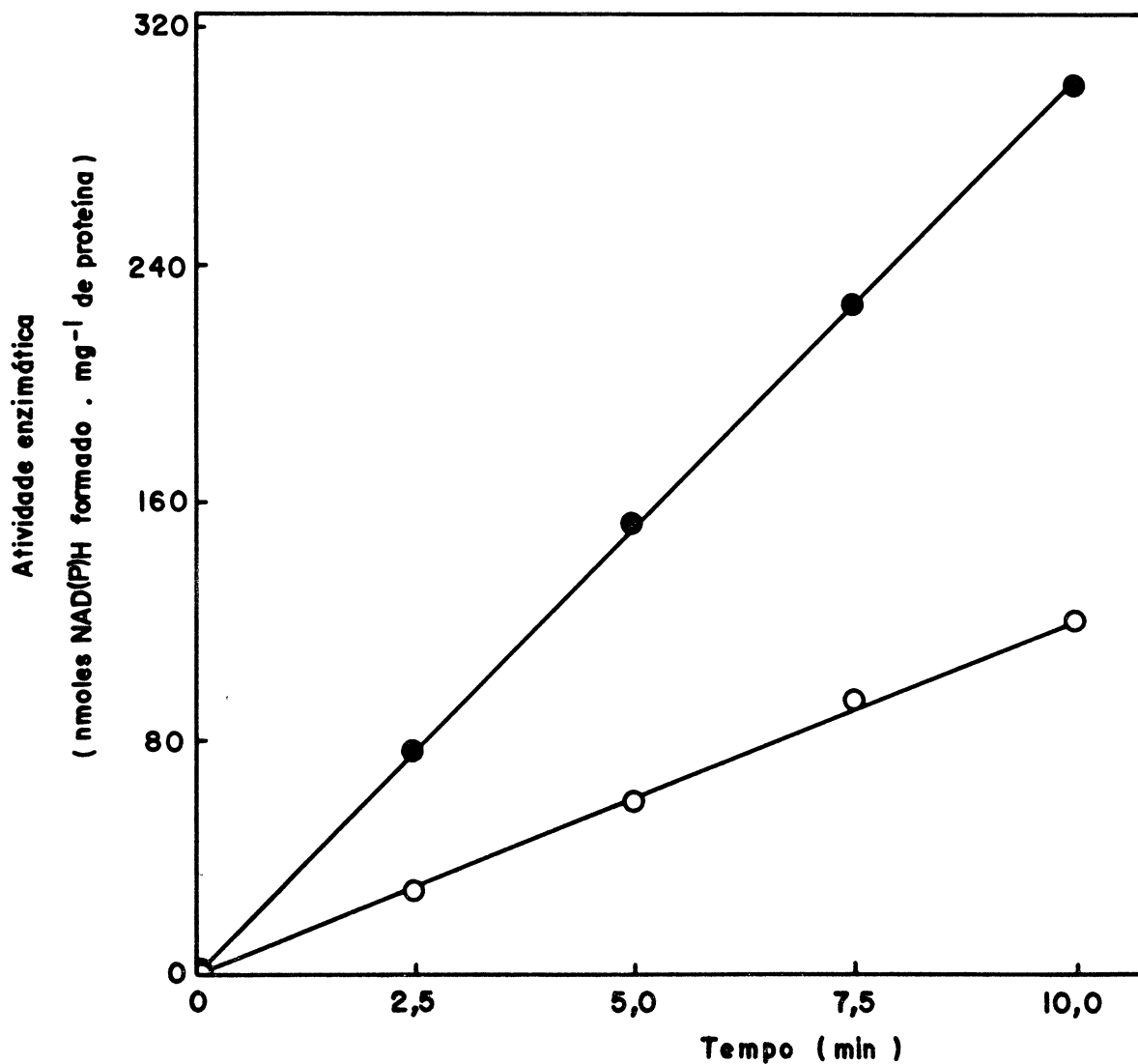


Figura 04 : Efeito do tempo na atividade da L-arabinose desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas em D,L-lactato.

O sistema de incubação (3,0 ml) continha : 300 umoles de tampão glicina-NaOH (pH 9,5), 30 umoles de L-arabinose, 1,5 umoles de NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> e 1,0 mg de proteína. O tempo de incubação está especificado na Figura. A formação de NADH (O) ou NADPH (●) foi acompanhada como descrito em materiais e métodos.



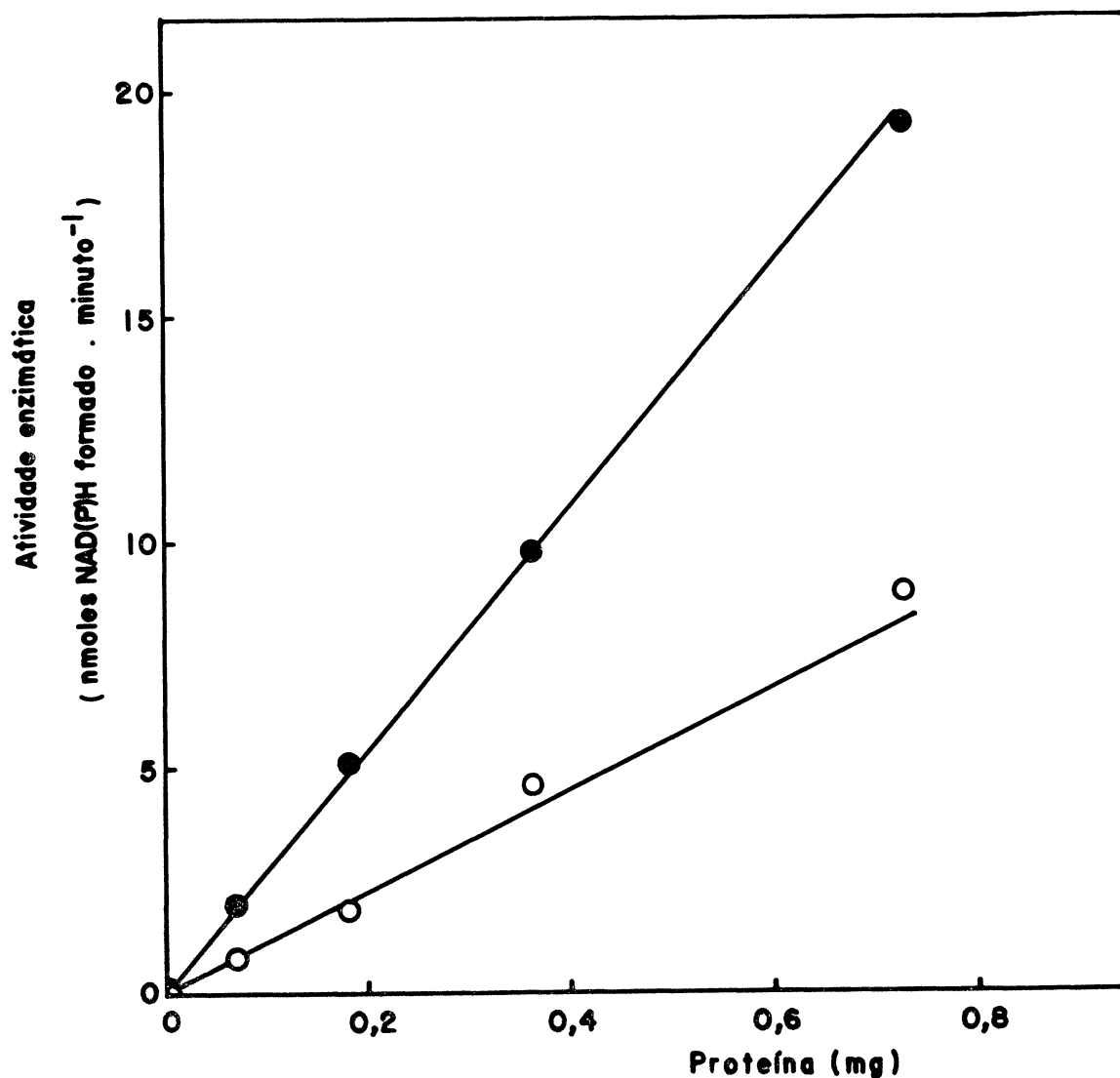


Figura 05 : Efeito da concentração de enzima na atividade da L-arabinose desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas em D,L-lactato.

O sistema de incubação (3,0 ml) continha : 300 umoles de tampão glicina-NaOH (pH 9,5), 30 umoles de L-arabinose, 1,5 umoles de  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$  e proteína, como especificado na figura. A formação de NADH (○) ou NADPH (●) foi acompanhada como descrito em materiais e métodos.

### 3.02.02.L-Arabinono-gama-lactonase

Esta enzima é responsável pela hidrólise da L-arabinono lactona e foi detectada em extratos livres de células crescidas tanto em L-arabinose como em D,L-lactato (Tabela 02). Células crescidas em D,L-lactato apresentaram 75,8 % da atividade de lactonase daquelas crescidas em L-arabinose. A atividade de lactonase presente no extrato livre de células crescidas em L-arabinose foi proporcional ao tempo de incubação (Figura 06) e à concentração de proteína (Figura 07). Os dados apresentados excluem a taxa de degradação, hidrólise espontânea da L-arabinono lactona, que foi da ordem de  $96 \text{ nmoles} \cdot \text{min}^{-1}$ , nas condições do ensaio.

### 3.02.03.L-Arabinonato desidratase

Atividade de desidratase do L-arabinonato em extrato livre de células crescidas em L-arabinose foi de  $40 \text{ nmoles}$  de alfa-ceto-ácido formado contra  $15 \text{ nmoles}$  de alfa-ceto-ácido formado  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína para células crescidas em D,L-lactato (Tabela 02). A Figura 08 apresenta a proporcionalidade entre atividade enzimática e tempo de incubação, enquanto que as Figuras 09 e 10 mostram a proporcionalidade entre a atividade de desidratase e a concentração de proteína empregada na incubação, para células crescidas em L-arabinose e D,L-lactato, respectivamente.

### 3.02.04.2-Ceto-3-desoxi-L-arabinonato desidratase

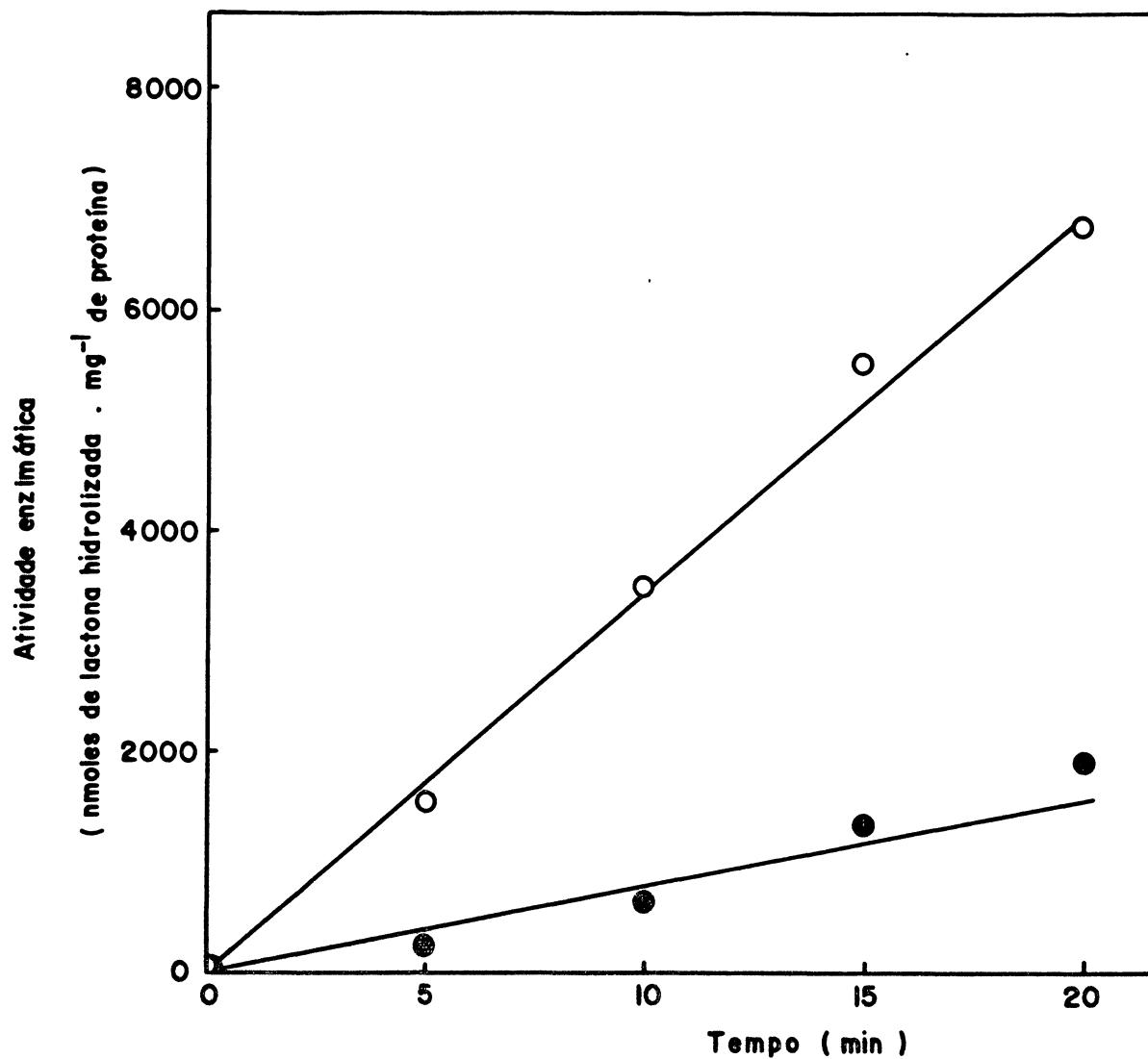


Figura 06 : Efeito do tempo na atividade da L-arabinonato lactonase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.

O sistema de incubação (0,5 ml) continha : 25 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), 12,5 umoles de L-arabinono-gama-lactona e 1 mg de proteína. O tempo de incubação está especificado na figura. A incubação foi feita a 30°C e a lactona foi dosada segundo Hestrin (27). A hidrólise enzimática (O) e a hidrólise espontânea (●) são mostradas.

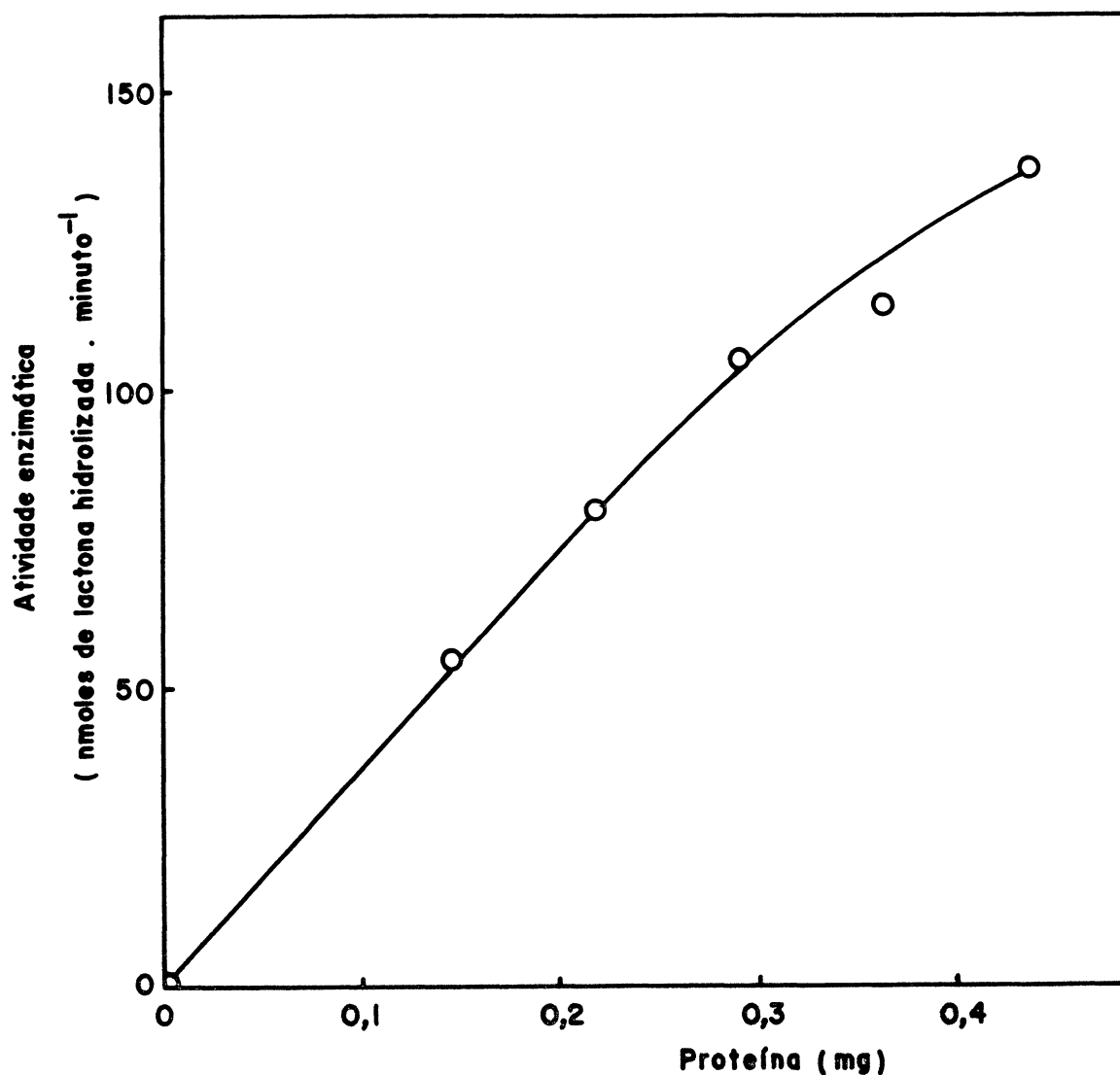


Figura 07 : Efeito da concentração de enzima na atividade da L-arabinonato lactonase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.

O sistema de incubação (0,5 ml) continha : 25 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), 12,5 umoles de L-arabinono-gama-lactona e proteína, como especificado na figura. A incubação foi feita a 30°C e a lactona foi dosada segundo Hestrin (27).

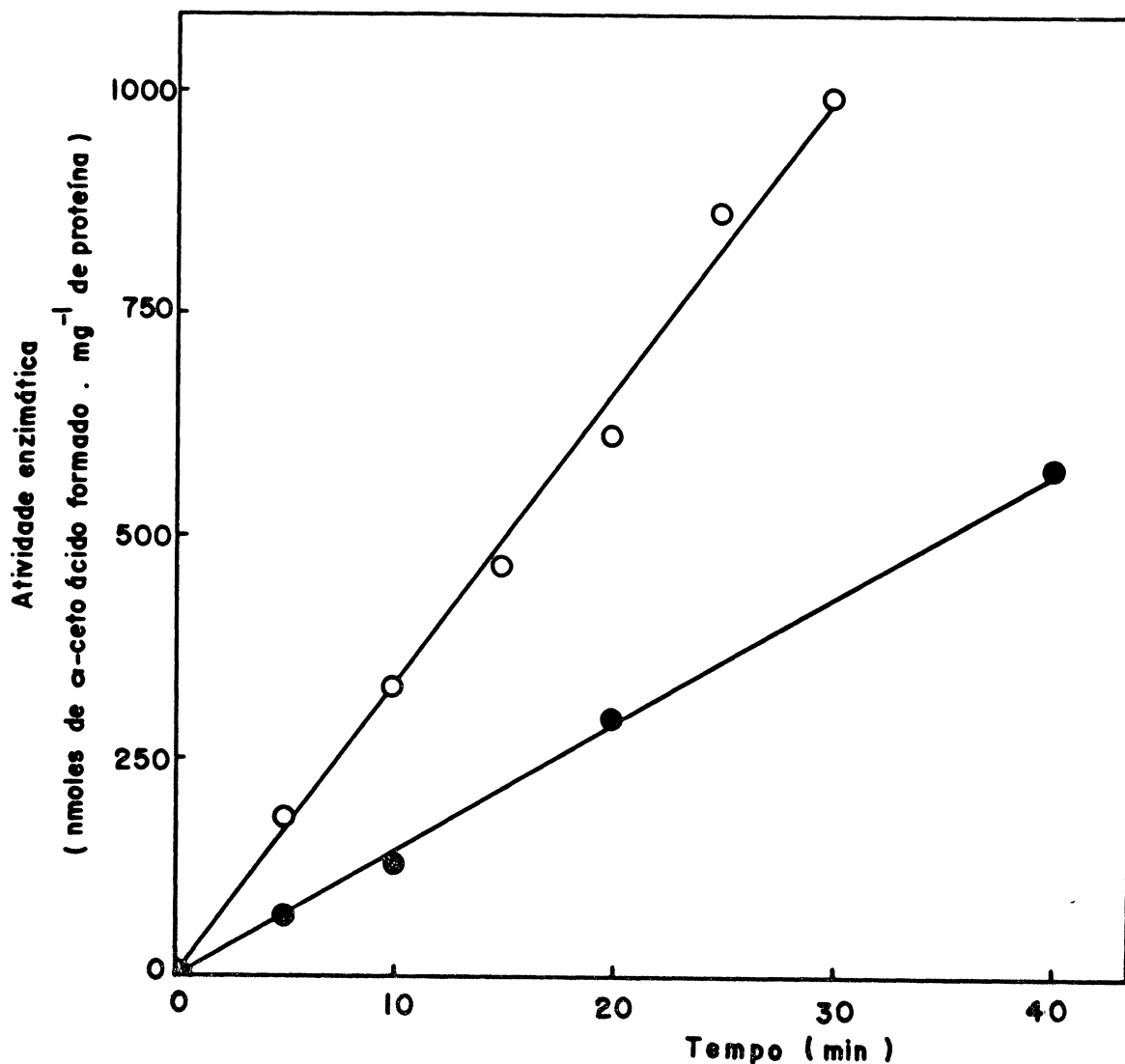


Figura 08 : Efeito do tempo na atividade da L-arabinonato desidratase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose (O) ou em D,L-lactato (●).

O sistema de incubação (0,4 ml) continha: 20 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), 25 umoles de L-arabinonato de potássio, 2 umoles de  $MgCl_2$ , e 1,0 mg de proteína. O tempo de incubação está especificado na figura. A incubação foi feita a 30°C e a formação de alfa-ceto ácido foi acompanhada pelo método da semicarbazida (34).

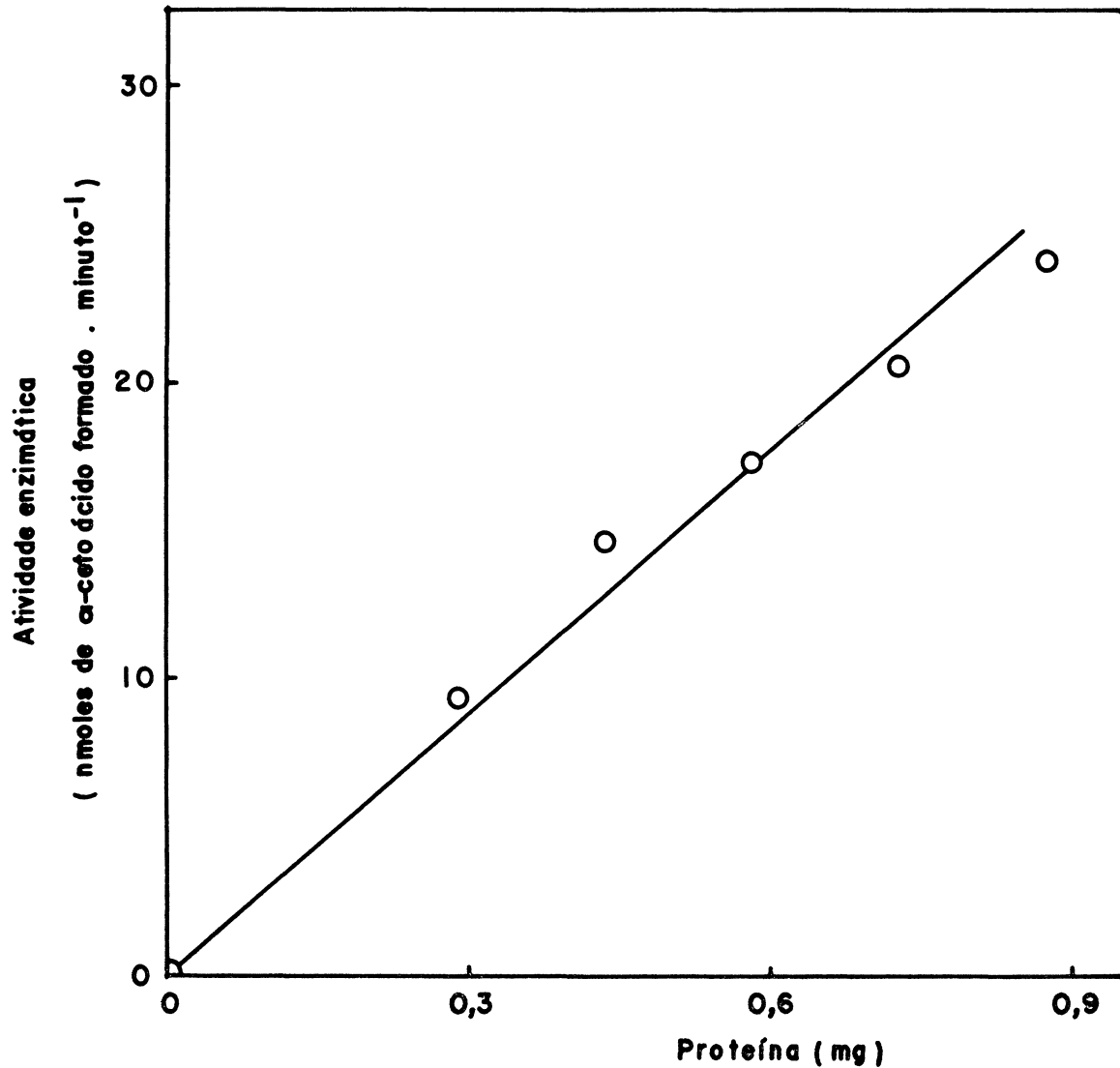


Figura 09 : Efeito da concentração de enzima na atividade da L-arabinonato desidratase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.

O sistema de incubação (0,4 ml) continha: 20 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), 25 umoles de L-arabinonato de potássio, 2 umoles de  $MgCl_2$ , e proteína, como especificado na figura. A incubação foi feita a 30°C e a formação de alfa-ceto ácido foi acompanhada pelo método da semicarbazida (34).

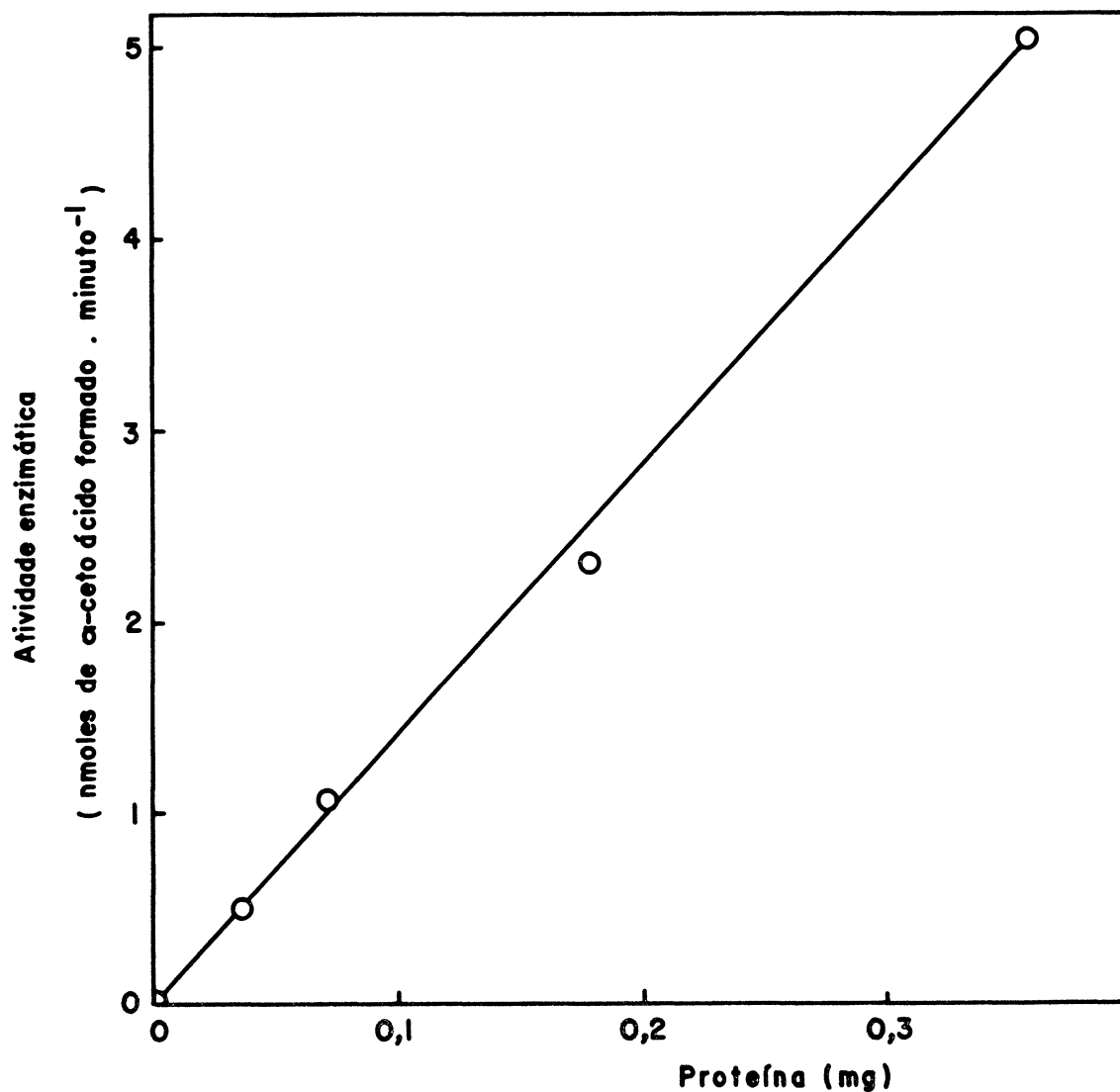


Figura 10 : Efeito da concentração de enzima na atividade da L-arabinonato desidratase presente em extrato livre de células crescidas em D,L-lactato.

O sistema de incubação (0,4 ml) continha: 20 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), 25 umoles de L-arabinonato de potássio, 2 umoles de  $MgCl_2$ , e proteína, como especificado na figura. A incubação foi feita a 30°C e a formação de alfa-ceto ácido foi acompanhada pelo método da semicarbazida (34).

A desidratação do 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato por extratos livres de células crescidas de H.seropedicae Z-78 foi comprovada. Esta atividade foi da ordem de 88 nmoles e 36 nmoles de 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato consumido  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína para células crescidas em L-arabinose e D,L-lactato, respectivamente (Tabela 02). A figura 11 mostra a estequiometria entre o consumo de D,L-KDA e o aparecimento de grupo carbonila adicional no período de 160 min.

### 3.02.05.Semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase

Os extratos livres de células de H.seropedicae apresentaram atividade de redução do  $\text{NADP}^+$  a NADPH em presença de glutaraldeído, sendo este último usado como substrato alternativo (54). Essa atividade foi também medida para  $\text{NAD}^+$  como cofator. Extratos livres de células crescidas em L-arabinose apresentaram atividades da ordem de 42 nmoles de NADPH e de 74 nmoles de NADH formados  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Para células crescidas em D,L-lactato as atividades foram da ordem de 18 nmoles de NADPH e 4 nmoles de NADH formados  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Estas atividades apresentaram declínio com o passar do tempo de incubação (Figura 12). Portanto, para a medida desta atividade foram usados apenas os tempos iniciais de reação. Como nos casos anteriores, as atividades de formação de NADPH em extrato livre de células crescidas em L-arabinose foram proporcionais ao tempo de incubação (Figura 12) e a concentração de proteína empregada na incubação (Figura 13).



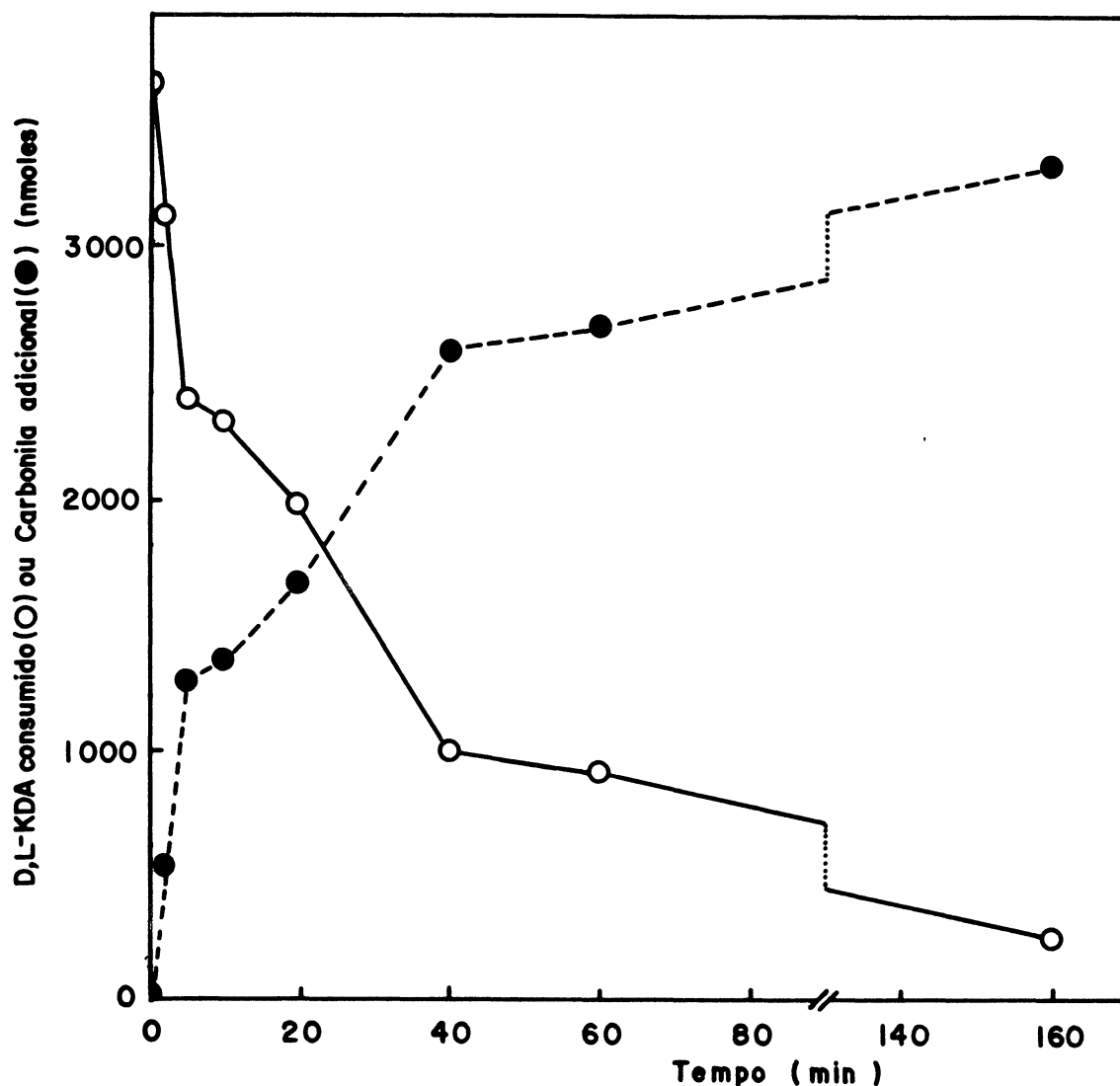


Figura 11 : Estequiometria entre o consumo de D,L-KDA e a formação de um grupo carbonílico adicional relativa a atividade da 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato desidratase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.

O sistema de incubação (4,0 ml) continha : 200 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), aproximadamente 3,6 umoles de D,L-KDA e 2,92 mg de proteína. O tempo de incubação está especificado na figura. A incubação foi feita a 30°C. O D,L-KDA foi dosado pelo método do periodato-ácido tiobarbitúrico (63) e os grupamentos carbonílicos através da 2,4-dinitro-fenilhidrazina (31).

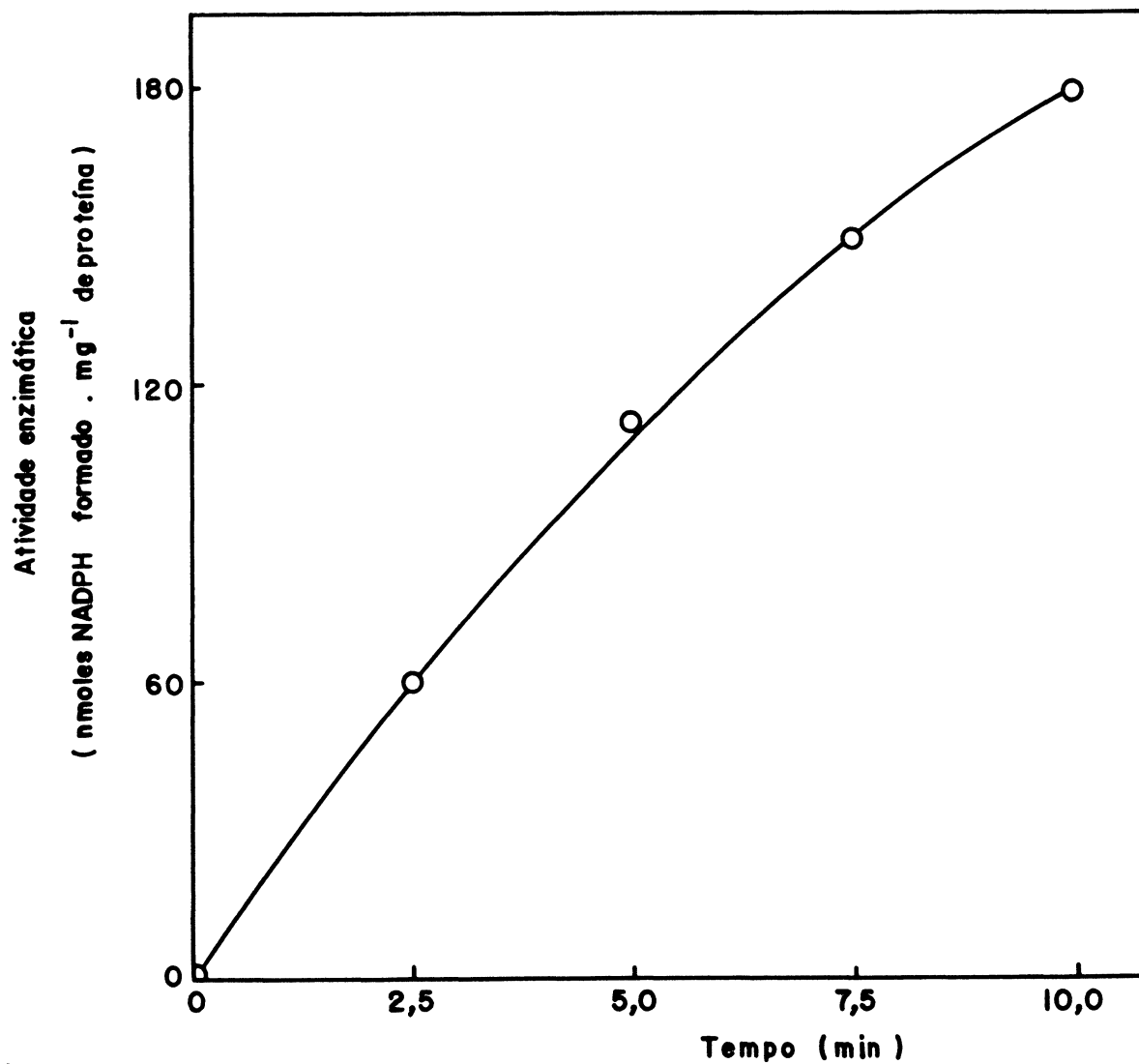


Figura 12 : Efeito do tempo na atividade da semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas em L-arabinose.

O sistema de incubação (3,0 ml) continha: 100 umoles de tampão fosfato (pH 7,2), 30 umoles de glutaraldeído, 1,5 umoles de NADP<sup>+</sup> e 1,0 mg de proteína. O tempo de incubação está especificado na figura. A temperatura de incubação foi de 26°C e a formação de NADPH foi acompanhada como descrito em materiais e métodos.

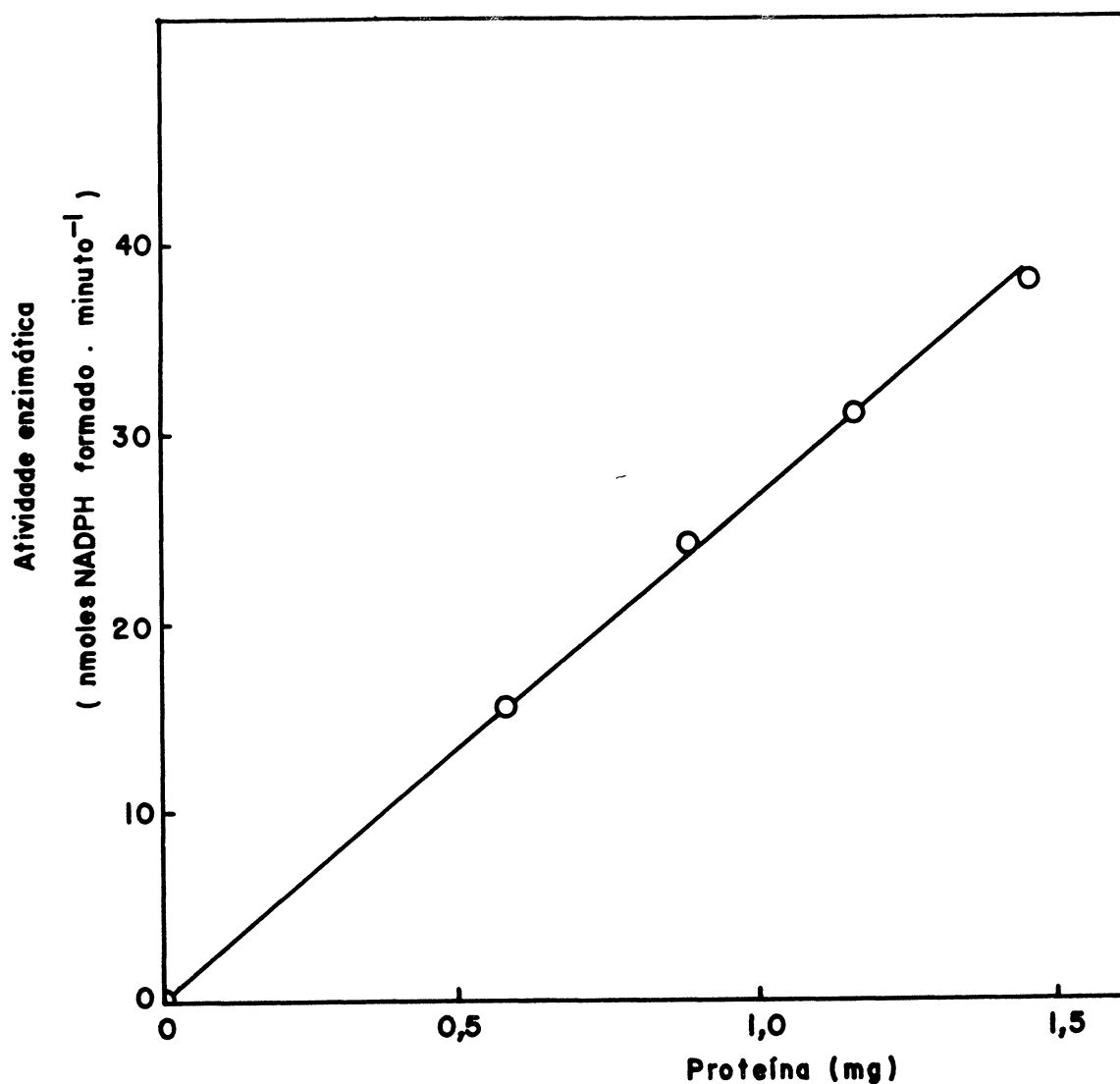


Figura 13 : Efeito da concentração de enzima na atividade da semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase presente em extrato livre de células crescidas L-arabinose.

O sistema de incubação (3,0 ml) continha: 100 umoles de tampão fosfato (pH 7,2), 30 umoles de glutaraldeído, 1,5 umoles de NADP<sup>+</sup> e proteína como especificado na figura. A formação de NADPH foi acompanhada como descrito em materiais e métodos.

### 3.02.06. Caracterização dos intermediários do metabolismo da L-arabinose

Foram pesquisados os intermediários envolvidos nas duas vias não fosforiladas, ou seja: a L-arabinonato-gama-lactona, o L-arabinonato, o 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato, o semialdeído do alfa-ceto-glutarato, o alfa-ceto-glutarato, o piruvato e o glicialdeído.

A L-arabinonato-gama-lactona e o L-arabinonato, produtos da ação do extrato livre de células sobre a L-arabinose, foram identificados por cromatografia ascendente em papel. Os coeficientes de migração relativa (Rfs) dos dois produtos iniciais do metabolismo da L-arabinose e das amostras padrão, cromatografados em dois sistemas de solventes distintos, apresentaram valores semelhantes (Tabela 03). Quando o extrato foi incubado na ausência de L-arabinose não houve formação de produtos com Rfs semelhantes (dados não mostrados).

O 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato (L-KDA), produto da desidratação do L-arabinonato, foi identificado pelo espectro de absorção do cromógeno obtido pelo método do periodato-ácido tiobarbitúrico, que foi semelhante ao espectro obtido como D,L-KDA padrão (Figura 14).

Tabela 03 : Valores dos Rfs dos produtos enzimáticos da L-arabinose desidrogenase e L-arabinono-gama-lactonase presente em extrato livre de células de H.seropedicae Z-78 crescido em L-arabinose.

Composto	Valores dos Rfs	
	Solvente I	Solvente II
L-arabinose	0,42	0,32
L-arabinono-gama-lactona	0,71	0,50
L-arabinonato	0,10	0,37
produto da desidrogenase	0,71	0,50
produto da lactonase	0,10	0,37

O sistema de incubação (0,46 ml) continha: 20 umoles de tampão fosfato (pH 7,2), 8 umoles de NAD<sup>+</sup>, 1 umol de EDTA e 4 mg de proteína. O sistema foi incubada por 19 horas a 30°C. A mistura foi desproteïnizada e aplicada em papel cromatográfico Whatman nº 1, conforme materiais e métodos. Após corrida cromatográfica nos solventes I) n-butanol:piridina: água (6:4:3) ou II) n-propanol:ácido fórmico:água (6:3:1), os cromatogramas foram revelados segundo a técnica de Trevelian et al. (55).

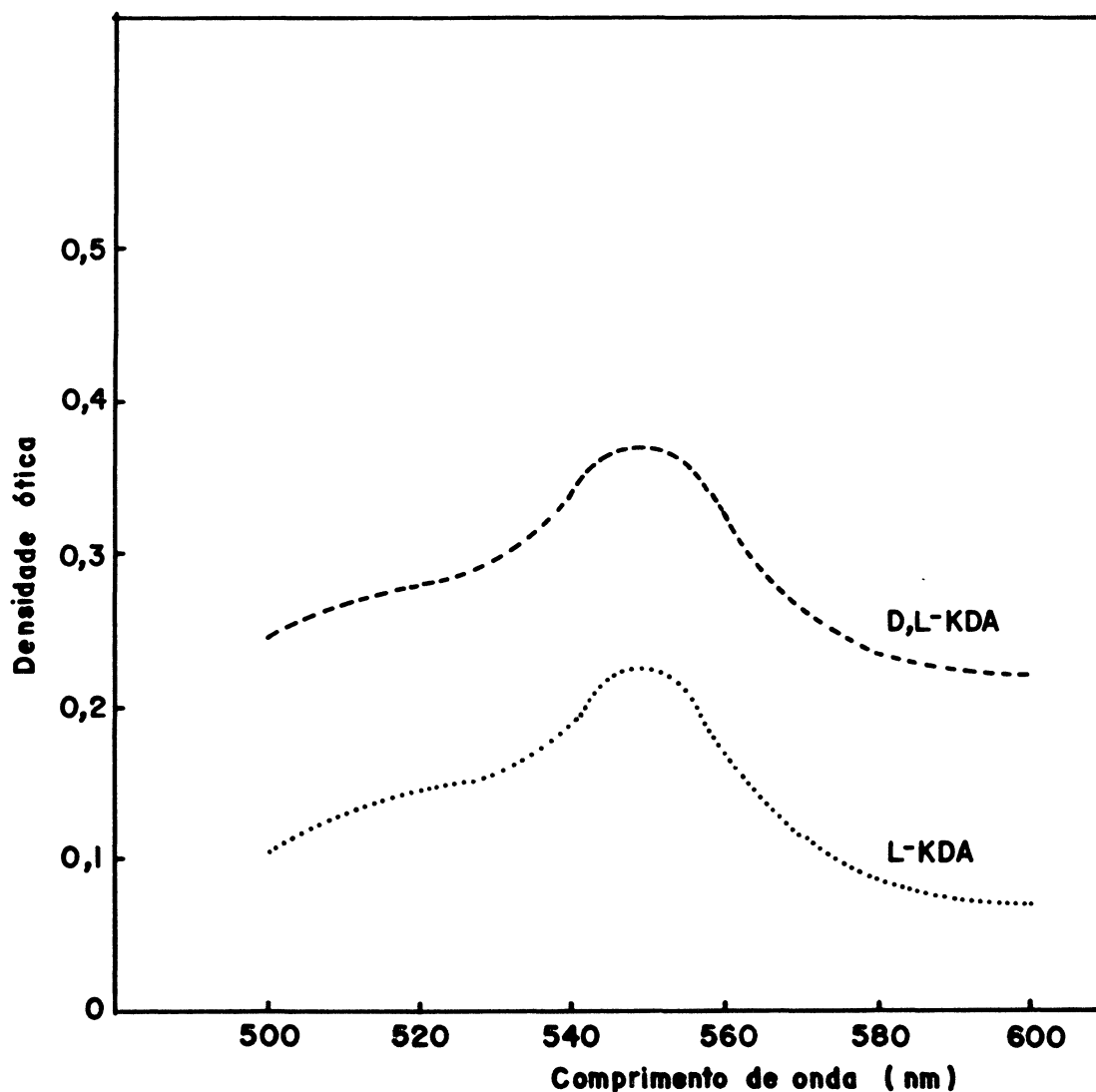


Figura 14 : Espectros de absorção dos cromógenos produzidos com 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato ou do 2-ceto-3-desoxi-D,L-arabinonato preparados segundo o método do periodato-ácido tiobarbitúrico (63).

O 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato foi obtido por síntese biológica e o 2-ceto-3-desoxi-D,L-arabinonato foi obtido por síntese química (53). A absorbância dos cromógenos foi determinada contra água em espectrofotômetro.

A desidratação do L-KDA pela L-KDA desidratase leva à formação do semialdeído do alfa-ceto-glutarato. Este intermediário não foi pesquisado devido à ausência de composto padrão e de dificuldades técnicas em sua síntese química. Entretanto sua síntese pode ser inferida pela formação de carbonila adicional com consumo estequiométrico de D,L-KDA na ausência de  $\text{NAD}^+$  (Figura 11). Do mesmo modo, a formação de alfa-ceto-glutarato dependente de  $\text{NAD}^+$  (Tabela 04) sugere a formação do semialdeído como intermediário entre L-KDA e alfa-cetogutarato.

O alfa-ceto-glutarato, produto da oxidação do semialdeído do alfa-ceto-glutarato, foi pesquisado em um sistema de incubação contendo D,L-KDA em presença de  $\text{NAD}^+$  e extrato livre de células. A formação de alfa-ceto-glutarato foi identificada e quantificada pela ação da L-glutamato desidrogenase. O consumo do D,L-KDA na presença de  $\text{NAD}^+$  foi compatível com o aparecimento de alfa-ceto-glutarato (Tabela 4). Na ausência de  $\text{NAD}^+$  não houve formação de alfa-ceto-glutarato em níveis detectáveis pela glutamato desidrogenase. Por outro lado, na presença de arsenito, que inibe a alfa-ceto glutarato desidrogenase (60) houve maior acúmulo de alfa-ceto-glutarato (Tabela 04).

A presença de piruvato e glicolaldeído, eventuais produtos de clivagem do L-KDA, foi também pesquisada nestes mesmos sistemas de incubação (Figura 11 e Tabela 04). Os sistemas de incubação desproteinizados foram ensaiados para a presença de piruvato com a desidrogenase láctica e para glicolaldeído com difenilamina. Nenhum destes produtos foi detectado, excluindo assim a presença da L-KDA aldolase. A

**Tabela 04 : Acúmulo de alfa-ceto-glutarato em extrato livre de células de *H.seropedicae* Z-78 crescido em L-arabinose.**

Adições	D,L-KDA Residual (nmoles)	Alfa-ceto- glutarato acumulado (nmoles)
nenhuma	996	0
+ NAD <sup>+</sup>	1017	351
+ arsenito + NAD <sup>+</sup>	693	604

O sistema de incubação (0,3 ml) continha 20 umoles de tampão HEPES (pH 7,2), 1,6 umoles de 2-ceto-3-desoxi-D,L-arabinonato (D,L-KDA), 0,87 umoles de NAD<sup>+</sup> (ou água), 0,86 umoles de arsenito de sódio (ou água) e 88 ug de proteína. A incubação foi feita a 30°C por 60 minutos. O D,L-KDA foi dosado pelo método periodato-tiobarbitúrico (63) e o alfa-ceto-glutarato foi dosado enzimaticamente pela L-glutamato desidrogenase.



atividade desta enzima foi também ensaiada no sentido da condensação do piruvato com o gliceraldeído e formação do L-KDA. Nenhuma atividade de formação de L-KDA ou de alfa-ceto glutarato foi detectada.

### 3.03. Atividades desidrogenásicas sobre outros substratos

A Tabela 05 mostra que extratos livre de células crescidas em L-arabinose apresentaram atividades desidrogenásicas sobre outros substratos. D-Fucose e D-galactose apresentaram altos níveis de oxidação, na presença de ambos os cofatores,  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$ , por extratos livres de células crescidas em L-arabinose. No caso de células crescidas em D,L-lactato somente o  $\text{NADP}^+$  foi utilizado como cofator. Atividade de D-xilose desidrogenase com rápida redução de  $\text{NAD}^+$ , mas não de  $\text{NADP}^+$ , foi também detectada em células crescidas em L-arabinose. Células crescidas em D,L-lactato apresentaram cerca de 15% da atividade de D-xilose desidrogenase presente nas células cultivadas em L-arabinose. Para células crescidas em D,L-lactato somente o cofator  $\text{NAD}^+$  foi reduzido na presença de D-glucose.

L-Arabinitol foi lentamente oxidado na presença de  $\text{NAD}^+$  por extratos livres de células crescidas em L-arabinose. Resultados semelhantes foram encontrados nas estirpes Z-67, ZA-69, ZA-76, ZA-95, ZM-136 e Z-152 (dados não apresentados).

Atividade de gliceraldeído desidrogenase  $\text{NAD(P)}^+$  dependente foi encontrada em níveis semelhantes em células de H.seropedicae cultivadas em L-arabinose ou D,L-lactato.

Tabela 05 : Atividades desidrogenásicas em extrato livre de células de Herbaspirillum seropedicae Z-78.

Substratos	Atividade enzimática <sup>a</sup>			
	L-arabinose <sup>b</sup>		D,L-lactato <sup>b</sup>	
	NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>
L-arabinose	164	21	27	11
D,L-lactato	12	0	17	0
D-fucose	40	69	0	77
D-galactose	81	42	0	47
D-glucose	1	0	60	0
D-xilose	124	0	18	0
L-arabinitol	7	0	2	0
D,L-KDA	151	42	124	9
glicocaldeído	22	3	18	17

<sup>a</sup> = atividade específica expressa em nmoles de produto formado . minuto<sup>-1</sup> . mg<sup>-1</sup> de proteína.

<sup>b</sup> = fonte de carbono utilizada para obtenção do extrato enzimático.

Baixa atividade da enzima, entretanto, foi encontrada nos extratos de células crescidas em L-arabinose quando NADP<sup>+</sup> foi empregado como cofator.

D,L-Lactato é oxidado praticamente com a mesma velocidade pelos extratos livres de células crescidas em L-arabinose e D,L-lactato, mas somente com NAD<sup>+</sup> como cofator (Tabela 05).

#### 3.04. Metabolismo da L-arabinose em outras estirpes de H.seropedicae

As atividades desidrogenásicas para L-arabinose, substrato da primeira enzima, e para glutaraldeído, substrato alternativo da última enzima da via de metabolismo da L-arabinose na estirpe Z-78 de H.seropedicae foram pesquisadas em outras estirpes. As atividades enzimáticas destas estirpes, em comparação àquelas da estirpe Z-78, são apresentadas na Tabela 06. Em nenhuma das estirpes testadas foi detectada atividade de L-KDA aldolase (Tabela 06).

**Tabela 06: Atividade relativa das enzimas chaves do metabolismo da L-arabinose em várias estirpes de H. seropedicae.**

Estirpe	L-arabinose		semialdeído do alfa-	
	desidrogenase		glutarato desidrogenase	
	NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>
	(%)	(%)	(%)	(%)
Z-78	100	100	100	100
Z-67	93	79	80	72
ZA-69	78	98	80	100
ZA-76	89	74	76	141
ZA-95	95	76	92	103
ZM-136	81	75	92	41
Z-152	76	62	84	76

#### 4. DISCUSSÃO

Estudos sobre o metabolismo da L-arabinose em microrganismos demonstraram quatro vias possíveis, duas vias não fosforilativa (13, 14, 20, 38, 47, 54, 59, 60, 61, 62) e duas fosforilativas (9, 10, 11, 12, 25, 26, 32, 49, 64, 58). As características gerais da via oxidativa da L-arabinose por H. seropedicae, são relatadas no presente trabalho.

O perfil de crescimento do H. seropedicae (Figura 01) tem aspecto típico de crescimento microbiano e demonstra a similar eficiência de utilização da L-arabinose e do D,L-lactato. Esta semelhança de crescimento, como refletida pelos tempos de duplicação bastante próximos, já era esperada, pois o microrganismo apresenta ótimo crescimento em L-arabinose e em ácidos orgânicos tais como malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato, alfa-ceto-glutarato, e trans-aconitato (03), embora esses autores não tenham testado o lactato como fonte única de carbono.

A via de metabolismo da L-arabinose aqui demonstrada em H. seropedicae envolve a participação de intermediários não fosforilados e leva à formação de alfa-ceto-glutarato. Esta via foi observada inicialmente em Pseudomonas saccharophila por Weimberg e Doudoroff (62), que demonstraram a oxidação da L-arabinose a alfa-ceto-glutarato por extratos livre de células desse microrganismo, tendo L-arabinonato e sua gama-lactona como intermediários. Mais tarde o 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato (59) e o semialdeído do alfa-ceto-glutarato (13, 54) foram identificados como

participantes desta via . Estes intermediários, com exceção do último, são análogos aos descritos para o metabolismo da D-arabinose, que forma piruvato e glicolaldeído oxidativamente (28, 43). Até o início dos anos 60 acreditava-se que essa seria a diferença entre o metabolismo das formas D- e L- da arabinose, ou seja, o isômero D seria oxidado e clivado enquanto que o isômero L seria oxidado sem quebra da cadeia carbônica até a formação de alfa-ceto-glutarato (28, 59, 62). Posteriormente, foi constatado que não se tratava de regra absoluta e que o isômero L poderia também ser clivado a piruvato e glicolaldeído (14, 20, 47).

Extratos livres de células de H.seropedicae estirpe Z-78 crescidas em L-arabinose não apresentaram atividades de L-arabinose isomerase nem de L-arabinose redutase dependente de NADH ou NADPH. Ao contrário, adição de L-arabinose reverteu o consumo de NADH ou NADPH pelos substratos endógenos ou pela própria cadeia respiratória. A primeira enzima que participa do metabolismo da L-arabinose através da via fosforilativa descrita por Chiang e Knight (11, 12), L-arabinose redutase, não foi encontrada mesmo quando ensaiada na presença de NADP<sup>+</sup> e L-arabinitol (57) . Foi encontrada apenas atividade de L-arabinose desidrogenase NAD<sup>+</sup> e NADP<sup>+</sup>- dependente em extratos livre de células crescidas em L-arabinose ou D,L-lactato (Tabela 02). O H.seropedicae crescido em L-arabinose apresentou esta atividade para NAD<sup>+</sup> cerca de oito vezes superior ao nível encontrado com D,L-lactato (Tabela 02). Convém observar que a L-arabinose desidrogenase não foi encontrada em

Azospirillum brasilense crescido em malato ou succinato, ácidos orgânicos, como fonte única de carbono (38).

Os níveis de atividade da L-arabinose desidrogenase de H.seropedicae são dependentes do piridinonucleotídeo utilizado, como observado para as desidrogenases de Pseudomonas saccharophila (62) e de Azospirillum brasilense (38). Ao contrário, a L-arabino-aldose desidrogenase de Pseudomonad MSU-1 (15) e a L-arabinose desidrogenase de Bradyrhizobium japonicum (47) apresentaram a mesma atividade específica para NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>. As atividades específicas da L-arabinose desidrogenase em extratos livres de células de H.seropedicae, frente ao NAD<sup>+</sup> e ao NADP<sup>+</sup>, são comparáveis às atividades encontradas para as isoenzimas de Bradyrhizobium japonicum (47), Rhizobium spp. (20), "Pseudomonad" (15) e Azospirillum brasilense (38).

A L-arabinose desidrogenase purificada de Azospirillum brasilense apresenta especificidade somente para substratos tendo configuração igual à L-arabinose nos carbonos 2, 3 e 4 (L-arabino-configuração) (39). Extratos livres de células de H.seropedicae crescidas em L-arabinose também apresentaram atividades desidrogenásicas para D-galactose e D-fucose, açúcares com L-arabino-configuração, na presença de NAD<sup>+</sup> e de NADP<sup>+</sup> (Tabela 05). Os dados apresentados não são suficientes para se concluir sobre a existência de uma ou mais desidrogenases com especificidade para açúcares com L-arabino-configuração. Entretanto, células crescidas em D,L-lactato apresentaram atividade de D-galactose e D-fucose desidrogenase apenas com NADP<sup>+</sup> como cofator, o que sugere a presença de pelo menos duas enzimas. Estudos adicionais

envolvendo purificação e caracterização destas enzimas permitirão esclarecer este ponto. O produto enzimático da L-arabinose desidrogenase foi caracterizado cromatograficamente como sendo a gama-lactona do L-arabinonato (Tabela 03).

A presença da L-arabinono- gama- lactonase foi comprovada comparando-se o desaparecimento de lactona em presença de enzima ativa com a hidrólise espontânea (Figura 06). Esta enzima apresenta níveis de atividade semelhantes tanto para células crescidas em L-arabinose quanto para D,L-lactato (Tabela 02). O L-arabinonato, produto formado pela hidrólise espontânea e enzimática da L-arabinono- gama-lactona foi identificado como tal por cromatografia ascendente de papel em dois sistemas diferentes de solventes (Tabela 03).

Foi constatada a presença de uma L-arabinonato desidratase em células de H.seropedicae crescidas em L-arabinose ou em D,L-lactato (Tabela 02). A atividade desta desidratase se mostrou proporcional ao tempo e à quantidade de proteína (Figuras 08, 09 e 10). Os níveis desta enzima foram induzidos por L-arabinose (Tabela 02) e são semelhantes aqueles descritos para Bradyrhizobium japonicum (47) e para Azospirillum brasilense (38). O produto da desidratação do L-arabinonato por uma desidratase, o 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato (L-KDA), foi obtido por incubação do L-arabinonato com extrato livre de células de H.seropedicae. Este intermediário (L-KDA) foi isolado e caracterizado pelo método de Weissbach e Hurwitz (63). Por esta reação, que é específica para ácidos 2-ceto-3-desoxi-



aldônicos (63), o L-KDA é oxidado com periodato produzindo beta-formil-piruvato que reage com 2-tiobarbiturato formando um cromógeno que apresenta espectro de absorção característico. Os espectros de D,L-KDA sintético e do produto biológico são mostrados na Figura 14.

O próximo passo da via metabólica seria a formação de um grupo carbonílico adicional (Figura 11), quer tivéssemos a via que forma o piruvato e o glicolaldeído, quer a via que forma o semialdeído do alfa-ceto-glutarato, além da possível existência das duas vias simultaneamente.

Uma atividade enzimática capaz de degradar o D,L-KDA, com produção simultânea de uma carbonila adicional, foi detectada em extratos livres de células de H.seropedicae crescidos em L-arabinose ou D,L-lactato (Tabela 02 e Figura 11). Os níveis enzimáticos observados foram semelhantes aos observados para a desidratase de Pseudomonas saccharophila (54). O consumo de 2-ceto-3-desoxi- D,L-arabinonato (Figura 11) foi proporcional ao tempo e, embora a velocidade de reação diminua, prosseguiu até o consumo quase total do mesmo. Simultaneamente ao consumo do D,L-KDA ocorreu a formação estequiométrica de grupo carbonílico adicional como revelado pela reação com 2,4-dinitro-fenilhidrazina (31). O consumo do isômero D- do KDA foi inesperado já que se tratava do metabolismo da L-arabinose. Essa estequiometria sugere a existência de uma desidratase não específica ou de duas desidratase uma para cada isômero do KDA. Não se pode descartar ainda a existência de uma isomerização química ou enzimática entre as formas D- e L- do KDA. A atividade desta

desidratase também é induzida por L-arabinose ao se comparar com células crescidas em D,L-lactato (Tabela 02).

Extratos livres de células de H.seropedicae são também capazes de desidrogenar o D,L-KDA na presença de piridinonucleotídeos, sugerindo sua oxidação direta ou de um seu intermediário (Tabela 05). A estequiometria das reações que envolvem a 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato desidratase e a semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase é mostrado na Tabela 04, onde a formação de alfa-ceto-glutarato foi comprovada enzimaticamente pela L-glutamato desidrogenase. Este experimento mostrou o requerimento de  $\text{NAD}^+$  para a formação de alfa-ceto-glutarato (Tabela 04), como relatado para a semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase de P.saccharophila (54). A presença de arsenito, um inibidor da alfa-ceto-glutarato desidrogenase (60), levou a um aumento do acúmulo de alfa-ceto-glutarato como descrito para A.brasilense (38).

Atividades de semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ -dependente foram encontradas em extratos livres de células de H.seropedicae (Tabelas 02 e 06). Estas atividades foram determinadas usando-se glutaraldeído como substrato alternativo ao semialdeído do alfa-cetoglutarato (54). Stoolmiller e Abeles demonstraram que a atividade de aldeído desidrogenase frente a ambos substratos era semelhante quando o  $\text{NADP}^+$  era empregado como cofator. Em H.seropedicae, esta atividade de glutaraldeído desidrogenase se mostrou proporcional ao tempo de incubação (Figura 12) e à concentração de proteínas (Figura 13) para células crescidas em L-arabinose.

O alfa-ceto-glutarato, formado nesta última reação, pode então ser metabolizado pelo ciclo de Krebs (ou do ácido cítrico) ou pode ser usado como um substrato para incorporação do nitrogênio fixado através da glutamina sintetase. A utilização de uma série de ácidos orgânicos como fonte única de carbono para crescimento de H.seropedicae (03) sugere que o ciclo de Krebs seja operante neste microorganismo.

A presença da via metabólica de formação de piruvato e gliccoaldeído em H.seropedicae a partir da L-arabinose foi descartada já que não se conseguiu detectar estes compostos como produtos da utilização do D,L-KDA (Figura 11). Além disto não foi detectada atividade de L-KDA aldolase quando esta foi ensaiada no sentido de síntese.

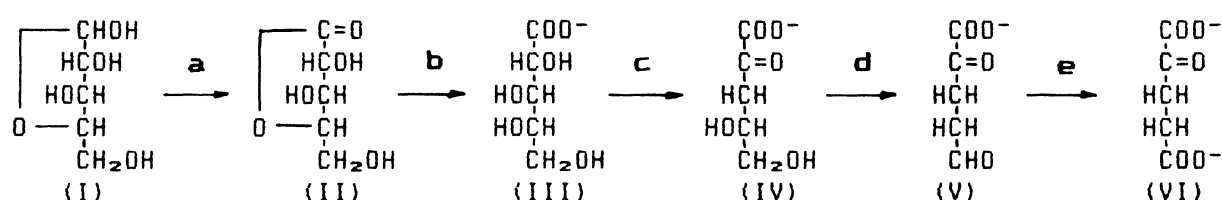
Células de H.seropedicae Z-78 crescidas em L-arabinose ou D,L-lactato apresentaram atividades desidrogenásicas para outros monossacarídeos, poliois e ácidos orgânicos (Tabela 05). Gliccoaldeído desidrogenase em níveis significativos foram encontrados embora não apresentasse L-KDA aldolase (20). Uma lactato desidrogenase NAD<sup>+</sup> dependente foi encontrada em extratos de células crescidas em ambas fontes de carbono. Somente extratos de células cultivadas em D,L-lactato apresentaram redução do cofator NAD<sup>+</sup> na presença de D-glucose, sugerindo indução de desidrogenase NAD<sup>+</sup>-dependente para metabolização desse açúcar. Atividade de D-xilose desidrogenase dependente exclusivamente de NAD<sup>+</sup> foi induzida por L-arabinose. Baixos níveis de L-arabinitol desidrogenase NAD<sup>+</sup> dependente foram também detectados em H.seropedicae.

A via de metabolismo da L-arabinose por H.seropedicae envolve os intermediários não-fosforilados L-arabinono-gama-lactona, L-arabinonato, 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato, semialdeido do alfa-ceto-glutarato e, finalmente alfa-ceto-glutarato, formados pelas ação das enzimas L-arabinose desidrogenase, L-arabinono-gama-lactonase, L-arabinonato desidratase, 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato desidratase e a semialdeido do alfa-ceto-glutarato desidrogenase.

A presença das enzimas chaves desta via, a L-arabinose desidrogenase e a semialdeido do alfa cetoglutarato desidrogenase foi constatada em outras estirpes de H.seropedicae de diversas origens, demonstrando o carácter universal desta via nesta espécie de diazotrofo.

## CONCLUSÕES

1. A L-arabinose (I) é metabolizada oxidativamente por Herbaspirillum seropedicae através da formação de L-arabinono-gama-lactona (II), L-arabinonato (III), 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato (IV), semialdeído do alfa-ceto-glutarato (V) e alfa-ceto-glutarato (VI).



2. A L-arabinose desidrogenase (a), L-arabinonato-gama-lactonase (b), L-arabinose desidratase (c), 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato desidratase (d), semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase (e) estão presentes em extrato livre de células da estirpe Z-78 de H.seropedicae.

3. A primeira enzima da via de degradação da L-arabinose, L-arabinose desidrogenase, é  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  dependente. Esta enzima e a L-arabinonato-gama-lactonase produzem, respectivamente, a gama-lactona do L-arabinonato e o L-arabinonato.

4. Extrato livre de células de H.seropedicae consomem D- e L-KDA, na ausência de  $\text{NAD}^+$ , com a formação simultânea de um grupo carbonílico adicional. Na presença de  $\text{NAD}^+$ , este substrato ou possivelmente seu produto é oxidado a alfa-ceto-glutarato.

5. A L-arabinose induz a síntese da L-arabinose desidrogenase, L-arabinose desidratase, 2-ceto-3-desoxi-L-arabinonato desidratase e semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase.

6. Todas as estirpes testadas apresentam atividades de L-arabinose desidrogenase e semialdeído do alfa-ceto-glutarato desidrogenase, enzimas chaves do metabolismo oxidativo com formação de alfa-ceto-glutarato.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ø1. ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. Sci. Am., 232(4): 81-94, 1975.
- Ø2. APP, A.; SANTIAGO, R.; DAEZ, C.; MENGUITO, C.; VENTURA, W.; TIROL, A.; PO, J.; WATANABE, I.; DATTA, S. K; ROGER, P. Estimation of the nitrogen balance for irrigated rice and the contribution of phototrophic nitrogen fixation. Field Crops Res., 9: 17-28, 1984.
- Ø3. BALDANI, J. I. ; BALDANI, V. L. D. ; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol., 36: 86-93, 1986.
- Ø4. BERKUM, P. van e BOHLOOL, B. B. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. Microbiol. Rev., 44(3): 491-517, 1980.
- Ø5. BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Effect of inoculation of Azospirillum spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. Plant Soil., 95: 109-21, 1986.

06. BODDEY, R. M.; CHALK, P. M. The  $^{15}\text{N}$ -isotope dilution applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with Paspalum notatum cv. batatais in the field. Soil Biol. Biochem., 15(1): 25-32, 1983.
07. BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E.; DOBEREINER, J. The use of  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of Paspalum notatum cv. batatais. Can. J. Microbiol., 29: 1036-45, 1983.
08. BODDEY, R. M. e DOBEREINER, J. Association of Azospirillum and other diazotrophs with tropical gramineae. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 12. New Deli, India. 1982. Non-symbiotic nitrogen fixation and organic matter in the tropics. p.28-47.
09. BURMA, D. P. e HORECKER, B. L. Pentose fermentation by Lactobacillus plantarum. III-L-Ribulokinase. J. Biol. Chem., 231: 1039-51, 1958.
10. BURMA, D. P. e HORECKER, B. L. Pentose fermentation by Lactobacillus plantarum. IV- L-Ribulose- 5-phosphate-4-epimerase. J. Biol. Chem., 231: 1053-64, 1958.
11. CHIANG, C. e KNIGHT, S. G. A new pathway of pentose metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun., 3: 554-9, 1960.



12. CHIANG, C. & KNIGHT, S. G. L-Arabinose metabolism by cell free extracts of Penicillium chrysogenum. Biochem. Biophys. Acta., 46: 271-8, 1961.
13. DAGLEY, S. & TRUDGILL, P. W. The metabolism of galactarate, D-glucarate and various pentoses by species of Pseudomonas. Biochem. J., 95(1): 48-58, 1965.
14. DAHMS, A. S. & ANDERSON, R. L. 2-Keto-3-deoxy-L-arabonate aldolase and its role in a new pathway of L-arabinose degradation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 36(2): 809-14, 1969.
15. DAHMS, A. S. & ANDERSON, R. L. D-Fucose metabolism in a Pseudomonad. II- Oxidation of D-fucose to D-fucono- gamma- lactone by an L-arabino- aldose dehydrogenase and hydrolyses of the lactone by a lactonase. J. Biol. Chem., 247: 2228-32, 1972.
16. DISCHE, Z. & BORENFREUND, E. A specific color reaction of glycolic aldehyde. J. Biol. Chem., 180: 1297-1300, 1949.
17. DISCHE, Z. & BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for detection and determination of keto sugars and trioses. J. Biol. Chem., 192: 582-7, 1951.

18. DOBEREINER, J. Ten years Azospirillum. In: KLINGMILLER, W. ed. Azospirillum II; genetics, physiology, ecology. Basel, Birkhauser-Verlag, 1983. p.9-23. (Experientia supplementum, 48)
19. DOBEREINER, J. e PEDROSA, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Madison, Science Tech, 1987. 155p.
20. DUNCAN, M. J. L-arabinose metabolism in Rhizobia. J. Gen. Microbiol., 113: 177-79, 1979.
21. DUNCAN, M. J. e FRAENKEL, D. G. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase mutant of Rhizobium meliloti. J. Bacteriol., 137:(1): 415-419, 1978.
22. ELMERICH, C. Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. Bio-Technol., 11: 967-78, 1984.
23. FALK, E. C.; JOHNSON, J. L.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J.; KRIEG, N. R. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of genera Azospirillum and Conglomeromonas. Int. J. Syst. Bacteriol., 36: 80-5, 1986.
24. FIECHTER, A. Advances in biochemical engineering/biotechnology. New York, Springer-Verlag, 1983. v.27. 186p.

25. GROSS, J. & ENGLESBERG, E. Determination of the order of mutational sites governing L-arabinose utilization in E. coli B/r by transduction with phage PLbt. Virology., 9: 314-31, 1959.
26. HEATH; E. C; HORECKER, B. L.; SMYRNIOTIS, P. Z.; TAKAGI, Y. Pentose fermentation by Lactobacillus plantarum. II- L-arabinose isomerase. J. Biol. Chem., 231: 1031-37, 1958.
27. HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivates with hidroxyamine, and its analitical application. J. Biol. Chem., 180: 249-261, 1949.
28. HORECKER, B. L. Pentose metabolism in bacteria. New York. John Wiley & Sons, 1962. 100p.
29. HORECKER, B. L. & KORNBERG, A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J. Biol. Chem., 175: 385-90, 1948.
30. HOUGH, L. & RICHARDSON, A. C. The monossaccharides: pentoses, hexoses, heptoses and higher sugars. In: COFFEY, S. Rodd's Chemistry of Carbon Compounds. 2<sup>a</sup> ed. Amsterdam, Elsevier, 1967. v. 1. p.67-595.
31. LELOIR, L. F. & GOLDEMBERG, S. H. Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver. J. Biol. Chem., 235: 919-923, 1960.

32. LEPESANT, J. A. & DEDONDER, R. Métabolisme du L-arabinose chez Bacillus subtilis Marburg Ind. C. R. Acad. Sc. Paris., 264: 2683-6, Ser. D, 1967.
33. LOWRY, O. M.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-75, 1951.
34. MacGEE, J. & DOUDOROFF, M. A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. J. Biol. Chem., 210: 617-26, 1954.
35. MARTINEZ-DRETZ, G.; DEL GALLO, M.; BURPEE, C.; BURRIS, R. H. Catabolism of carbohydrates and organic acids and expression of nitrogenase by Azospirilla. J. Bacteriol., 159(1): 80-5, 1984.
36. MILLER, J. H. Determination of viable cell counts: Bacterial growth curves. In: \_\_\_\_\_. Experiments in molecular genetics. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. p. 31-6.
37. MOORE, S. & LINK, K. P. Carbohydrate characterization. J. Biol. Chem., 123: 293-311, 1940.
38. NOVICK, N. J. & TYLER, M. E. L-arabinose metabolism in Azospirillum brasilense. J. Bacteriol., 149(1): 364-7, 1982.

39. NOVICK, N. J. & TYLER, M. E. Partial purification and properties of an L-arabinose dehydrogenase from Azospirillum brasiliense. Can. J. Microbiol., 29(2): 242-6, 1983.
40. OKON, Y. Response of cereal and forage grasses to inoculation with N<sup>2</sup>-fixing bacteria. Adv. nitrogen fixation Research. Hague, :303-9, 1984.
41. OKON, Y. Azospirillum as a potencial inoculant for agriculture. Trends Biotechnol., 3: 223-8, 1985.
42. PAGAN, J. B.; CHILD, J.J.; SCOWCROFT, W.R.; GIBSON, A. H. Nitrogen fixation by Rhizobium cultured on a defined medium. Nature (London), 256: 406-7, 1975.
43. PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M. Metabolism of carbohydrates by Pseudomonas saccharophila. III-Oxidation of D-arabinose. J. Bacteriol., 74: 180-5, 1957.
44. PATRIQUIN, D. G. New developments in grass-bacteria associations. Adv. Agric. Microbiol., New Delhi, :139-90, 1982.
45. PEDROSA, F. O. Physiology, biochemistry, and genetics of Azospirillum and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. Crit. Rev. Plant Sci., 4: 345-84, 1988.

46. PEDROSA, F. O.; DOBEREINER, J.; YATES, M. G. Hydrogen-dependent growth and autotrophic carbon dioxide fixation in Derxia. J. Gen. Microbiol., 119: 547-51, 1980.
47. PEDROSA, F. O. & ZANCAN, G. T. L-arabinose metabolism in Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 119: 336-8, 1974.
48. RENNIE, R. J. & LARSON, R. I. Dinitrogen fixation associated with disomic chromosome substitution lines of spring wheat. Can. J. Bot., 57: 2771-4, 1979.
49. SIMPSON, F. J.; WOLIN, M. J.; WOOD W. A. Degradation of L-arabinose by Aerobacter aerogenes. I- A pathway involving phosphorylated intermediates. J. Biol. Chem., 230: 457-72, 1958.
50. SRINIVASAN, P. R. & SPRINSON, D. B. 2-Keto-3-deoxy-D-arabono-heptonic acid-7-phosphate synthetase. J. Biol. Chem., 234: 716-22, 1959.
51. STEPHEN, A. M. L-Arabinans, D-Galactans and L-arabino-D-galactans. In: ASPINALL, G. O. The polysaccharides. New York, Academic, 1983. v. 2. p. 122-153.
52. STOLZENBACH, F. Lactic dehydrogenase (crystalline). Methods Enzymol., New York, 9: 278-88, 1966.
53. STOOLMILLER, A. C. DL- and L-2-Keto-3-deoxyarabonate. Methods Enzymol., New York, 41: 101-3, 1975.

54. STOOLMILLER, A. C. & ABELES, R. H. Formation of alpha-ketoglutaric semialdehyde from L-2-keto-3-deoxy-arabonic acid and isolation of L-2-keto-3-deoxy-arabonate dehydratase from Pseudomonas saccharophila. J. Biol. Chem., 241: 5764-71, 1966.
55. TREVELYAN, W. E.; PROCTOR, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature (London), 166: 444-5, 1950.
56. UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D. H.; GASKINS, M. H.; DAZZO, F. B. Association of Azospirillum with grass roots. Appl. Environ. Microbiol., 39(1): 219-26, 1980.
57. VEIGA, L. A. Polyol dehydrogenases in Candida albicans. I- Reduction of D-xilose to xilitol. J. Gen. Appl. Microbiol. 14: 65-78, 1968.
58. VOLK, W. A. The enzymatic formation of D-arabinose-5-phosphate from L-arabinose and ATP by Propionibacterium pentosaceum. J. Biol. Chem., 234 (8): 1931-6, 1959.
59. WEIMBERG, R. L-Keto-4,5-dihydroxyvaleric acid : an intermediate in the oxidation of L-arabinose by Pseudomonas saccharophila. J. Biol. Chem., 234: 727-32, 1959.
60. WEIMBERG, R. Pentose oxidation by Pseudomonas fragi. J. Biol. Chem., 236: 629-35, 1961.

61. WEIMBERG, R. Studies with a constitutive aldose dehydrogenase in Pseudomonas fragi. Biochim. Biophys. Acta, 67: 349-58, 1963.
62. WEIMBERG, R. e DOUDOROFF, M. The oxidation of L-arabinose by Pseudomonas saccharophila. J. Biol. Chem., 217: 607-24, 1955.
63. WEISSBACH, A. e HURWITZ, J. The formation of 2-Keto-3-deoxy-heptonic acid in extracts of E. coli. J. Biol. Chem., 234: 705-9, 1959.
64. WOOD, W. A. Carbohydrate metabolism. Ann. Rev. Biochem., 35: 521-558. 1966.