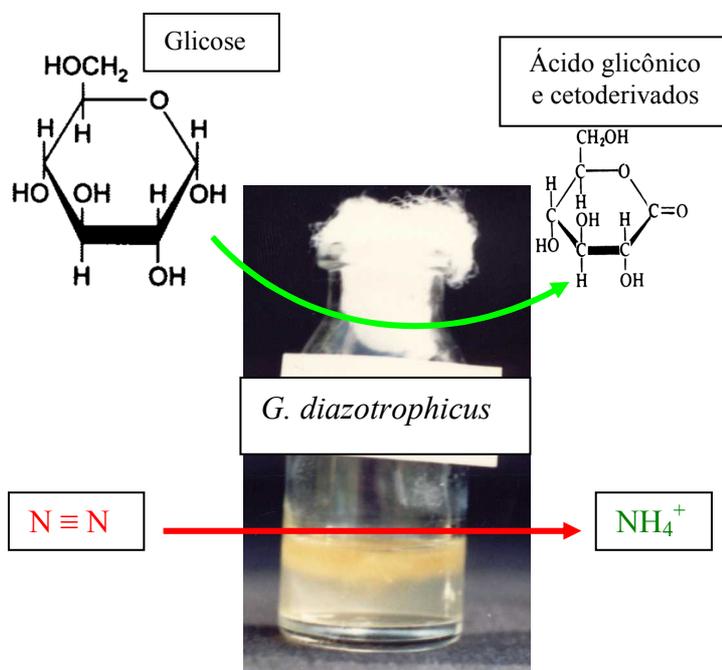


**Produção de ácidos orgânicos associada à  
fixação de nitrogênio em mutantes de  
*Gluconacetobacter diazotrophicus***







Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1676-6709

Dezembro/2009

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 53**

Produção de ácidos orgânicos associada à  
fixação de nitrogênio em mutantes de  
*Gluconacetobacter diazotrophicus*

Renata Jorge da Silva  
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy  
Jeane Santos da Rosa  
Vanessa Tavares da Silva Souza  
Marília Penteado Stephan  
Kátia Regina dos Santos Teixeira

Seropédica – RJ  
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agrobiologia**

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 3441-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: Norma Gouvea Rumjanek (Presidente)

José Ivo Baldani

Guilherme Montandon Chaer

Luis Henrique Barros Soares

Bruno José Rodrigues Alves

Ednaldo Araújo

Carmelita do Espírito Santo (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: José Ivo Baldani e Veronica Massena Reis

Normalização Bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2009): 50 exemplares

P964

Produção de ácidos orgânicos associada à fixação de nitrogênio em mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. / Renata Jorge da Silva et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 20 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento, 53).

ISSN 1676-6709

1. Bactéria diazotrófica. 2. Oxidação de glicose. I. Godoy, R. L. de O. II. Rosa, Jeane Santos da. III. Souza, Vanessa T. da Silva. IV. Stephan, M. P. V. Teixeira, Kátia Regina dos Santos. VI. Título. VII. Embrapa Agrobiologia. VIII. Série.

CDD 632.32

## **Autores**

### **Renata Jorge da Silva**

Bolsista de Iniciação Científica – Programa PIBIC/CNPq/Embrapa Agrobiologia, Graduação em Química Industrial - UFRRJ. E-mail: renata\_jsilva@yahoo.com.br

### **Ronoel Luiz de Oliveira Godoy**

Embrapa Agroindústria de Alimentos - Av. das Américas, 29501 – CEP 23020-470 - Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: ronoel@ctaa.embrapa.br

### **Jeane Santos da Rosa**

Embrapa Agroindústria de Alimentos - Av. das Américas, 29501 – CEP 23020-470 - Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: jeane@cnpab.embrapa.br

### **Vanessa Tavares da Silva Souza**

Embrapa Agroindústria de Alimentos - Av. das Américas, 29501 – CEP 23020-470 - Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: vanessatssouza@gmail.com

### **Marília Penteado Stephan**

Embrapa Agroindústria de Alimentos - Av. das Américas, 29501 – CEP 23020-470 - Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: stephan@ctaa.embrapa.br

### **Kátia Regina dos Santos Teixeira**

Embrapa Agrobiologia - BR 465, Km 7. CEP 23890-000, Seropédica, RJ. E-mail: katia@cnpab.embrapa.br

# SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução .....	9
Material e métodos.....	10
1) Microrganismos e condições de cultivo .....	10
2) Quantificação de proteínas .....	10
3) Determinação da redução de acetileno e determinação de atividade específica da nitrogenase .....	11
4) Determinação de compostos presentes nos sobrenadantes de cultivos de <i>G. diazotrophicus</i> por CLAE .....	11
5) Quantificação de glicose por método enzimático – colorimétrico .....	12
Resultados e Discussão.....	12
Conclusões .....	17
Referências Bibliográficas .....	18

# Produção de ácidos orgânicos associada à fixação de nitrogênio em mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

---

Renata Jorge da Silva  
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy  
Jeane Santos da Rosa  
Vanessa Tavares da Silva Souza  
Marília Penteado Stephan  
Kátia Regina dos Santos Teixeira

## Resumo

---

O seqüenciamento do genoma de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, bactéria fixadora de nitrogênio, e caracterização do seu proteoma em condições de excesso ou limitação de N em forma disponível para assimilação, forneceram informações gerais sobre a codificação e expressão de proteínas na estirpe PAL5. Além da fixação de nitrogênio, outra característica interessante desta bactéria é sua capacidade de realizar oxidação incompleta da glicose resultando em ácido glicônico e cetoderivados. A associação de ambos os processos pode ser explorado para aplicação biotecnológica em diversos setores industriais, inclusive na indústria alimentícia e agrária. Entretanto, para garantir a eficiência durante aplicação conjunta desses processos é necessário elucidar os mecanismos relacionados com a expressão e regulação da oxidação incompleta da glicose. A partir de uma biblioteca de mutantes construída pela inserção aleatória de transposon no genoma da estirpe PAL5, foram selecionados em condições específicas aqueles mutantes relacionados com a oxidação de glicose a ácido glicônico e/ou cetoderivados. Dos 24 mutantes obtidos, foram caracterizados aqueles relacionados com enzimas chaves para oxidação da glicose a ácido glicônico, com função da NADH-quinona oxidoreductase e com proteína transmembrana de função desconhecida em relação à capacidade destes mutantes em fixar nitrogênio e produzir ácido glicônico e/ou cetoderivados. Neste trabalho serão apresentados os resultados preliminares da associação de ambos os processos em organismos geneticamente modificados como ferramentas biotecnológicas para produção de ácido 2,5 diceto-glicônico, precursor do intermediário da vitamina C.

**Palavras-chave:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, bactéria fixadora de nitrogênio, mutantes, oxidação incompleta da glicose, produção de ácidos orgânicos, ácido glicônico e cetoderivados, FBN.

---

## Abstract

---

The sequencing of the genome of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, nitrogen-fixing bacterium and the characterization of its proteome under nitrogen excess and limitation, led to overall information about protein coding and expression of the PAL5 strain. Besides the nitrogen fixation, another interesting feature of this bacterium is the incomplete glucose oxidation resulting in gluconic acid and their keto-derivatives production. The association of both processes could be exploited for biotechnological application for several industry sectors, including the food and agroindustry. However, to guarantee efficiency during the application of them we need to elucidate the mechanisms related with the expression and regulation of the incomplete glucose oxidation. From a library of random transposon insertion mutants of PAL5 strain we screened under specific conditions leading to isolation of mutants related with the glucose oxidation to gluconic acid and/or keto-derivatives production. From 24 mutants selected, we characterized those related with key enzymes for glucose oxidation to gluconic acid, to subunit of NADH-quinone oxidoreductase and a putative transmembrane protein, whose function is unknown in relation to the capacities of these mutants to fix nitrogen and produce gluconic acid were studied. Here we report data from preliminary results of the association of both processes considering on genetically modified organisms as biotechnological tools to produce 2,5 diketogluconic acid, precursor for the intermediary of vitamin C.

**Keywords:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, nitrogen fixing bacteria, mutants, glucose incomplete oxidation, organic acid production, gluconic acid and keto-derivatives, FBN.

## Introdução

---

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria endofítica isolada de cana de açúcar cujo genoma está disponível em banco de dados públicos e cujo proteoma foi avaliado em condições de presença ou limitação de amônia no meio de cultivo (BERTALAN et al., 2009, LERY et al., 2008). Além de sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), outras características capazes de promover o crescimento vegetal sugerem papel importante para o desenvolvimento das espécies vegetais nas quais coloniza o interior do tecido vegetal (BALDANI, J. e BALDANI, V., 2005). Dentre elas está a produção de ácidos orgânicos (AOs), principalmente ácido glicônico e seus cetoderivados pelo processo de fermentação caracterizado pela oxidação incompleta da glicose (STEPHAN et al., 1991). O ácido glicônico e seus cetoderivados são de importância econômica devido a sua larga aplicação em indústrias farmacêutica, alimentícia, têxtil e como precursor de reagente quiral utilizado em processos de síntese orgânica. Além de sua importância em diversos setores da indústria química, a descrição de seu papel na solubilização de nutrientes presentes no solo também mostra o potencial de sua aplicação na agroindústria como um facilitador para a nutrição vegetal. Em geral sua aplicação na agroindústria pode ser associada à inoculação de microrganismos com capacidade de produzir estes ácidos em condições ambientais (SARAVANAN et al., 2008). A capacidade de realizar FBN simultaneamente a este processo de oxidação da glicose até mesmo em condições extremas de pH, O<sub>2</sub> e pressão osmótica (STEPHAN et al., 1991; LUNA et al., 2002, 2006) indica o potencial para a associação destes processos em indústrias de base biotecnológica.

No entanto, para garantir a eficiência desses processos biológicos é necessário entender os mecanismos envolvidos e a influência de fatores externos sobre a regulação da expressão gênica em ambos os processos. Diante disso, o presente trabalho buscou avaliar o comportamento de mutantes aleatórios de *G. diazotrophicus* com fenótipos alterados para a biossíntese de AOs em relação à fixação de nitrogênio, ao acúmulo de biomassa e a produção de ácidos orgânicos.

## Material e métodos

---

### 1) Microrganismos e condições de cultivo

A estirpe referência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5<sup>T</sup> (BR 11281, ATCC 49037) e mutantes selecionados de uma biblioteca gerada pela inserção de Tn5 no genoma de dessa bactéria (VIDAL et al., 2009) foram submetidos a cultivo para caracterização fisiológica e fenotípica. Os mutantes foram selecionados correspondem à inserção do transposon em genes que codificam uma das enzimas chave da oxidação de glicose a ácido glicônico, ou a uma das subunidades de NADH-quinona oxidoreductase, ou uma proteína transmembrana de função desconhecida. Para cultivo dos microrganismos foram utilizados dois meios, o meio M1 e o meio líquido contendo sais de LGI-P suplementado com glicose 50 g L<sup>-1</sup> e 1 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Em geral o meio M1 (GUPTA et al., 1999) foi utilizado para preparo de estoques e para multiplicação sempre que a bactéria foi retirada do estoque em glicerol 25% mantido a -20°C. Os cultivos em condições limitantes de N foram realizados em frascos de 100 mL contendo 50 mL de meio líquido. Neste estudo, parâmetros definidos de agitação orbital a 200 rpm e temperatura de 30°C foram adotados como condição de cultivo.

### 2) Quantificação de proteínas

Após incubação em agitador a 200 rpm e a 30°C, as amostras foram coletadas aos 3, 4 e 5 dias após inoculação. As células foram coletadas após centrifugação a 5000 x g utilizando uma centrífuga Eppendorf Model 5. As células foram suspensas em água milli-Q e estocadas em freezer -20°C. As proteínas foram quantificadas utilizando como referencia uma curva padrão preparada com padrão Albumina de Soro Bovina (BSA) em concentrações pré-definidas (BRADFORD, 1976).

As células foram tratadas com NaOH 1N na proporção de 1:1 e submetidas a lise alcalina a 65°C por 30 min. A dosagem de proteína foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda máximo de 595 nm.

### **3) Determinação da redução de acetileno e determinação de atividade específica da nitrogenase**

Culturas de *G. diazotrophicus*, selvagem e mutantes, foram avaliadas para a atividade da nitrogenase utilizando o método de redução de acetileno (UNKOVICH et al., 2008). A cada intervalo de 24 horas, entre o 3° e 5° dia de incubação, as rolhas de algodão dos frascos das culturas em meio líquido foram substituídas por rolhas de borracha tipo “suba-seal”. Em seguida, foram injetados 10% de gás acetileno em relação ao volume da fase gasosa do frasco contendo a cultura. Os frascos foram incubados durante 1 hora nas mesmas condições experimentais definidas para o cultivo e posteriormente amostras da fase gasosa de cada cultivo foram coletadas em triplicatas. Uma curva analítica, preparada com diferentes concentrações de gás etileno padrão, foi utilizada como referência para o cálculo da concentração de etileno produzido durante a incubação da cultura de bactérias (nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup>). A atividade específica foi estimada pela redução de acetileno por mg de proteína.

### **4) Determinação de compostos presentes nos sobrenadantes de cultivos de *G. diazotrophicus* por CLAE**

A quantificação de açúcares e ácidos orgânicos (ácido glicônico e cetoderivados) foi realizada através de técnica de cromatografia líquida utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE - Alliance 2695 da Waters) contendo um detector de Índice de Refração Waters 2410. A coluna utilizada foi uma Aminex HPX-87H (7,8 X 300 mm, Bio-Rad). A fase móvel consistiu somente de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ultra puro 0,008N e a coluna foi mantida à temperatura ambiente com vazão de 0,8 mL/min. Após descongelamento, as amostras dos sobrenadantes foram pesadas e o equivalente a 2,5 g foi diluído até o volume final de 25 mL com a solução utilizada na fase móvel e extraída em ultra-som por 10 minutos. O volume injetado foi de 20µL e a técnica de quantificação utilizada foi em relação ao uso de padrões externos (Tabela 1).

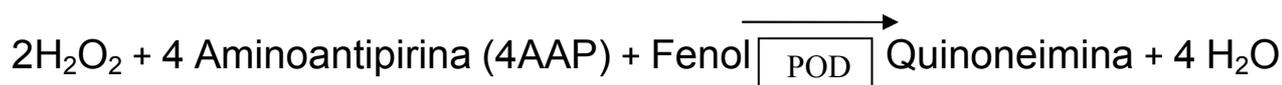
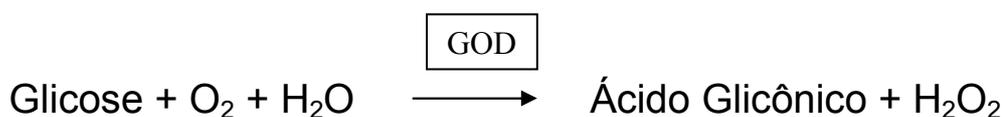
Tabela 1. Padrões de açúcares e ácidos orgânicos utilizados como referência para análise por CLAE.

Padrão	Solução estoque (mg/100 g)	RT	Área	%	Quantidade observada (mg/100 g)
Ácido glicônico	24,8				
Desconhecido		7,2755	33392,5	18,05	4,4764
Ácido glicônico		8,8305	145893,0	78,88	19,5622
Desconhecido		10,1570	5676,5	3,07	0,7613
Ácido 2 ceto-glicônico	24,8	8,3795	162411,5	100	24,8
Ácido 5 ceto-glicônico	24,8	8,4475	148753	100	24,8

RT = Retention time, ou TR em português, que significa o tempo de retenção durante passagem da amostra na coluna.

## 5) Quantificação de glicose por método enzimático – colorimétrico

A quantidade de glicose presente nos sobrenadantes das culturas foi determinada utilizando um método enzimático colorimétrico baseado na reação descrita abaixo:



Para quantificar a glicose presente nas amostras foi preparada uma curva de calibração utilizando o próprio meio de cultivo contendo glicose 50 g L<sup>-1</sup> como padrão de referência.

## Resultados e Discussão

Durante o cultivo da estirpe selvagem e de mutantes de *G. diazotrophicus* em condições limitantes de N foi evidenciado o crescimento e metabolismo de carbono em condições de limitação de nitrogênio em meio líquido (Figura 1A e B). O comportamento entre o cultivo da estirpe selvagem e os mutantes avaliados foi realizado em comparação com o metabolismo de glicose, acúmulo de biomassa e

capacidade de fixar nitrogênio (N), nas mesmas condições experimentais.

Foi possível detectar que a estirpe selvagem de *G. diazotrophicus* apresentou um metabolismo de glicose mais lento que a maioria dos mutantes avaliados (Figura 1A). Esta conclusão pode ser evidenciada pelos valores obtidos através da quantificação da glicose. Foi observado que mais do que 50% da glicose adicionada ao meio nos sobrenadantes das culturas avaliadas entre o 3° e 5° dia de iniciado o cultivo. Os mutantes K416 e 16D10 foram os que apresentaram valores mínimos de glicose nos sobrenadantes dos cultivos analisados, valores médios entre as três coletas de 1,0 g L<sup>-1</sup> e 2,4 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Este fato permite especular que altas concentrações de ácido glicônico ou cetoderivados podem estar sendo acumuladas no meio de cultura. Ao contrário da estirpe selvagem e outros mutantes, os valores de glicose presentes no sobrenadante do cultivo do mutante 16G6 sugerem que ele apresentou metabolismo de glicose contínuo ao longo dos intervalos das coletas. Concomitante com estes dados, também foi observado que a incorporação de biomassa da estirpe selvagem foi diferente a dos mutantes, como ilustrado pelo acúmulo de proteínas entre os intervalos de coleta do experimento (Figura 1B).

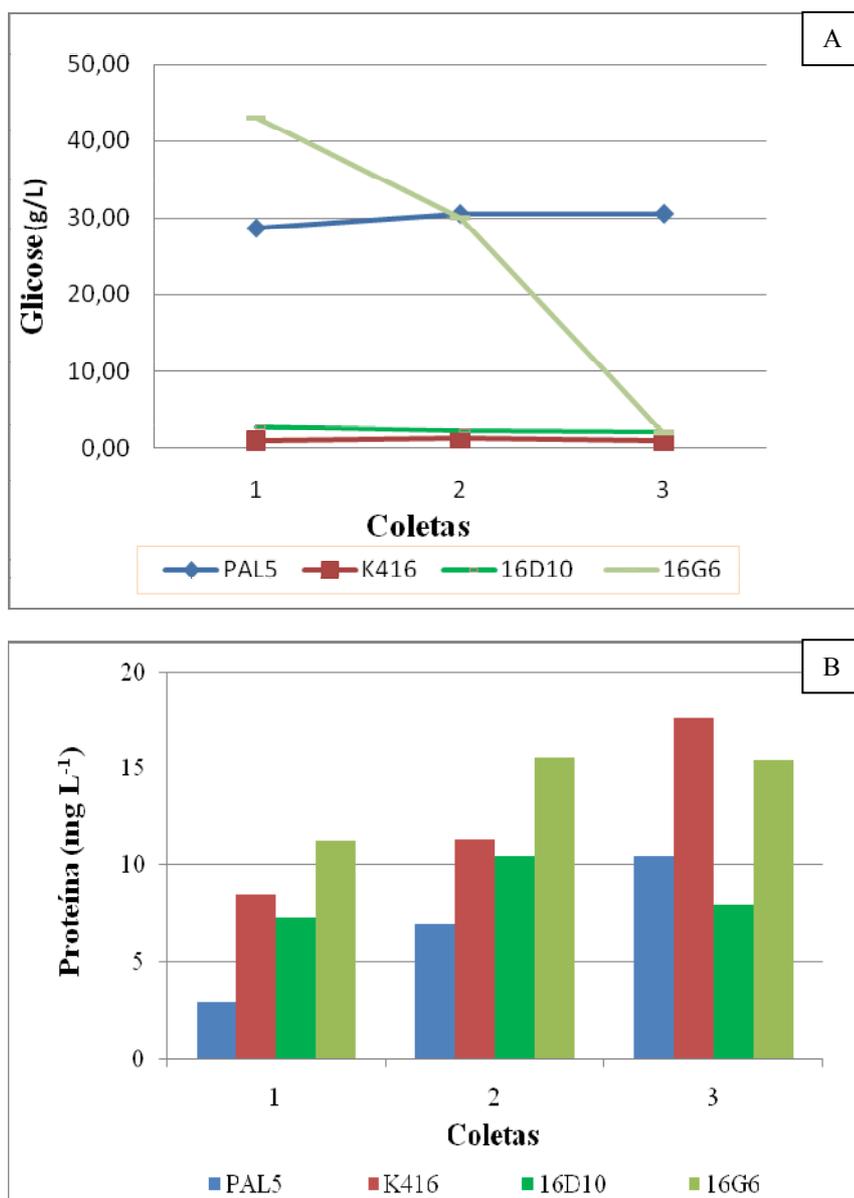


Figura 1 – Glicose remanescente nos sobrenadantes dos cultivos (A) e acúmulo de proteínas durante cultivo da estirpe selvagem e mutantes de *G. diazotrophicus* em condições limitantes de nitrogênio (B). Coletas 1, 2 e 3 correspondem a intervalos de 24 horas após o 3º dia de cultivo.

Na figura 2 está ilustrado o resultado da avaliação indireta da atividade específica da nitrogenase pela redução de acetileno a etileno em condições limitantes de N na estirpe selvagem e nos mutantes. Não foi observado atividade de redução de acetileno a etileno na estirpe selvagem e no mutante 16G6 nas condições experimentais avaliadas. A incorporação de biomassa e o metabolismo de glicose na estirpe selvagem foram menores do que as dos mutantes avaliados nas condições experimentais aplicadas. Este comportamento pode ter sido

devido à presença de amônia no meio (fornecido como dose inicial) e conseqüente inibição da ativação de genes *nif* ou indicar uma maior sensibilidade as condições de aeração adotadas durante o cultivo em meio líquido e agitação. Esta última hipótese também pode explicar o comportamento observado no mutante 16G6, considerando que este mutante apresenta alteração no fluxo de elétrons na cadeia respiratória que participa da desprotonação de  $\text{NADH}^+$ , a qual é considerada como um mecanismo de proteção da nitrogenase contra oxigênio durante oxidação de glicose em nível de membrana. Atividades da nitrogenase só foram detectadas nos cultivos dos mutantes K416 e 16D10, em nossas condições experimentais. Os resultados também sugerem que o mutante 16D10, o qual apresenta alteração no gene que codifica uma proteína transmembrana de função desconhecida, foi mais eficiente para fixar N que o mutante K416, defectivo em um dos genes codificador de enzima chave da oxidação de glicose a ácido glicônico.

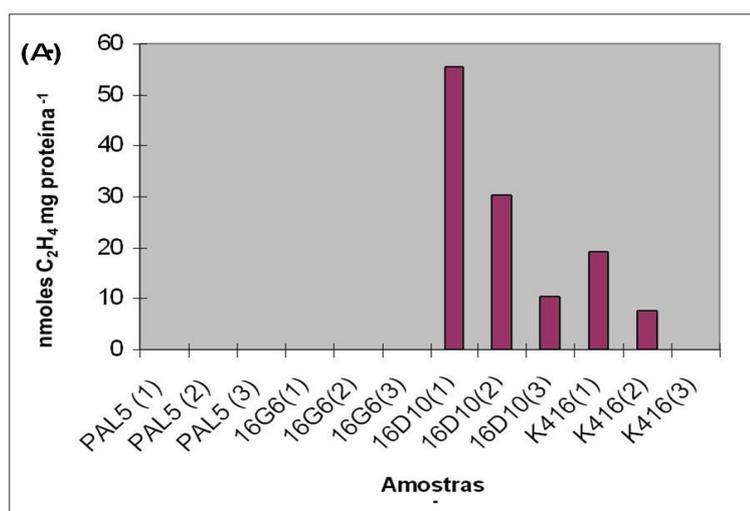


Figura 2 – Atividade da nitrogenase estimada pelo método de redução de acetileno durante cultivo da estirpe selvagem e mutantes de *G. diazotrophicus*.

Em relação à caracterização dos produtos do metabolismo de glicose por oxidação incompleta, foi possível observar padrões diferentes de acúmulo de ácido glicônico e de outro metabólito entre a estirpe selvagem e os mutantes avaliados (Figura 3 A e B). Este metabólito não identificado com os padrões de ácido 2 ou 5 ceto-glicônico utilizados para calibração externa do CLAE, apresentou tempo de retenção de 7, 25 (Tabela 1), semelhante ao TR de um contaminante presente no sal de ácido glicônico utilizado como referência (Gluconato de sódio - SIGMA). O comportamento de migração na

coluna utilizada e comparação com os padrões dos ácidos 2 ou 5 cetoglicônico (Tabela 1) sugerem que este metabólito corresponda ao ácido 2,5 diceto-glicônico. De acordo com relatos na literatura, geralmente o ácido 2,5 diceto-glicônico apresenta menor tempo de retenção em relação ao ácido 2 cetoglicônico em condições analíticas semelhantes a que foram aplicadas neste estudo (Choi et al., 1996).

Os mutantes 16D10 e K416 apresentaram acúmulo de ácido glicônico e principalmente do outro metabólito nos sobrenadantes dos cultivos, provavelmente o ácido 2,5 diceto-glicônico, que é o intermediário chave do precursor da síntese de vitamina C (Meyer & Hauer, 1994) (Figura 3A e 3B).

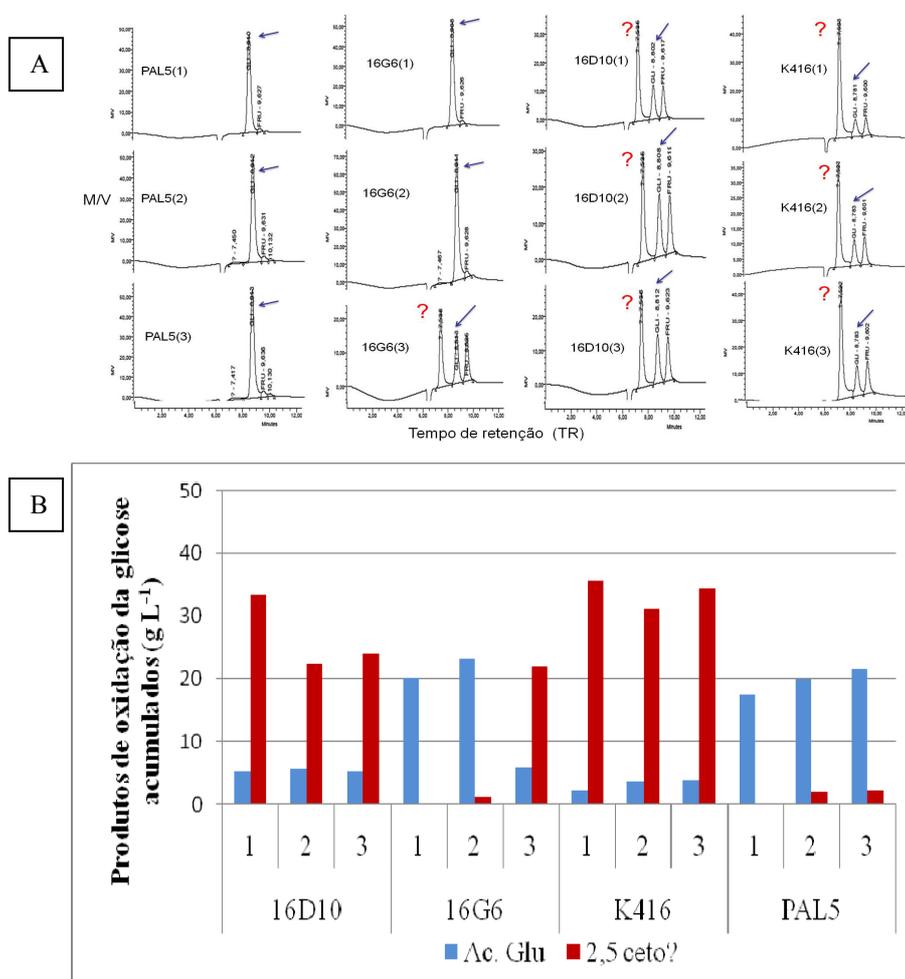


Figura 3 – Detecção (A) e quantificação por CLAE (B) de produtos da oxidação de glicose nos sobrenadantes de cultivos da estirpe selvagem e dos mutantes de *G. diazotrophicus* em condições limitantes de nitrogênio. Os números 1, 2 e 3 correspondem as coletas em intervalos de 24 horas após o 3º dia após de cultivo. Setas indicam pico do ácido glicônico e ? corresponde ao pico de composto presente no gluconato de sódio comercial (SIGMA). Barras azuis correspondem a ácido glicônico e vermelhas a 2,5 diceto?.

Foi possível observar que no caso do mutante K416 houve uma tendência de maior acúmulo do metabólito em relação ao ácido glicônico ao longo do tempo. Este fato pode ser explicado pela alteração em uma das cópias do gene responsável pelo metabolismo de glicose no espaço periplásmico. Neste caso, para ocorrer o metabolismo da glicose ela precisa ser transportada e metabolizada intracelularmente por uma Glicose desidrogenase dependente de NAD (NAD – GDH) (Luna et al., 2006), resultando nos baixos níveis de ácido glicônico acumulado fora da célula. Além disso, considerando a presença de enzimas no periplasma de *G. diazotrophicus* capaz de transformar ácido glicônico em 2,5 diceto-glicônico é possível que o produto desta enzima tenha sido em grande parte convertido ao nível de periplasma celular no cetoderivado e, posteriormente no dicetoderivado. Em relação ao mutante 16D10, verificamos que além do ácido glicônico ter sido acumulado 2x mais que o K416 em valores absolutos de quantidade, o maior valor do metabólito acumulado só foi observado na amostra após o 3º dia de inoculação, tendendo a ser manter estável entre o 4º e 5º dia. Por outro lado, a estirpe selvagem e o mutante 16G6, apresentaram maior acúmulo do ácido glicônico do que do metabólito. No entanto, o mutante 16G6 apresentou maior acúmulo de proteínas do que a estirpe selvagem (Figura 1), sugerindo que a interrupção do fluxo de NADH<sup>+</sup> na cadeia respiratória associada a membrana pode ter promovido o desvio desta substância para outro sistema de restauração desse cofator e indiretamente favorecido sua disponibilidade para a NAD – GDH. Esta hipótese pode justificar os dados experimentais obtidos, pois apesar do consumo da glicose ter sido constante, houve maior eficiência na atividade de transformação de glicose a ácido glicônico e provavelmente entrada de parte deste ácido na via das Pentose Fosfato, e conseqüentemente resultando em maior acúmulo de biomassa pelo mutante do que pela estirpe selvagem.

## Conclusões

---

1. A FBN ocorreu nos cultivos daqueles mutantes que apresentaram acúmulo do metabólito não identificado, denominado “2,5 diceto?” na figura 1B.
2. O ácido 2,5 diceto-glicônico é o produto da oxidação do ácido 2 ceto-glicônico e precursor do ácido 2 ceto-gulônico

3. O acúmulo desse ácido nos sobrenadantes de mutantes capazes de fixar nitrogênio é uma forte evidência de que eles podem ser utilizados para otimização de processos fermentativos associando ambos os processos biotecnológico para uso industrial, como por exemplo, para a produção de precursores da vitamina C.

## Referências Bibliográficas

---

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 549-579, 2005.

BERTALAN, M.; ALBANO, R. M.; PÁDUA, V. L. M.; ROUWS, L. F. M.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J. L. S. de; OLIVEIRA, A.; FRANÇA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUÉRES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVERIA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADÃO, A.; DRESCHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M. S.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C. H. S. G.; BRIOSO, P. S. T.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; CUNHA JÚNIOR, J. de O.; SOUZA FILHO, G. de; FLORES, V. M. Q.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; MACEDO, J.; FERREIRA, A.; M.; MARTINS, G.; S.; COELHO, A.; ; SANTOS, E.; ; AMARAL, G.; ; NEVES, A.; ; PACHECO, B.; A.; CARVALHO, D.; ; LERY, L.; ; BISCH, P.; ; ROSSLE C, S.; URMÉNYI, T.; PEREIRA, R, A; SILVA, R; RONDINELLI, E; KRUGER, W, V; MARTINS, O; BALDANI, J, I; FERREIRA, P, C, G Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 450, p. 1-17, 23 set. 2009.

CHOI, O-K.; KIM, C-G.; KIM, Y-D.; KIM, H.; JO, J-S. Determination of 2-keto-L-gulonic, 2-keto-D-gluconic and 2,5-diketo-D-gluconic acids by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Maryland Heights, v. 745, p. 249-254, 1996.

GUPTA, A.; FELDER, M.; VERMA, V.; CULLUM, J.; QAZI, G.N. A mutant of *Gluconobacter oxydans* deficient in gluconic acid dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, Haren, v. 179, p. 501-506, 1999.

LERY, L. M. S.; VON KRÜGER, W. M. A.; VIANA, F. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; BISCH, P. M. A comparative proteomic analysis of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 at exponential and stationary phases of cultures in the presence of high and low levels of inorganic nitrogen compound. **Biochimica et Biophysica Acta**, Maryland Height, v. 1784, n. 11, p. 1578-1589, nov. 2008.

LUNA, M. F.; BERNARDELLI, C. E.; MIGNONE, C. F.; BOIARDI, J. L. Energy generation by extracellular aldose oxidation in N<sub>2</sub>-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington-DC, v. 68, p. 2054-2057, 2002.

LUNA, M. F.; BERNARDELLI, C. E.; GALAR, M. L.; BOIARDI, J. L. Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 163–168, 2006.

BASF (Berlin, DE). MEYER, J.; HAUER, B. **Prepn. of 2,5-di:keto-gluconic acid - using a continuous fermentative oxidn. of glucose, useful as starting material for the formation of ascorbic acid.** Int Cl. C07C59/215; C12P7/58; C07C59/00; (+9). D.E. 4238905. 19. nov. 1992. 26. Maio. 1994. Berlin, 1994.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T. M. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 130-140, 2008.

STEPHAN, M. P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K. R. S.; MARTÍNEZ-DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Haren, v. 77, p. 67-72, 1991.

UNKOVICH, M. J.; HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; CADISCH, G.; BODDEY, R. M.; GILLER, K. E.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems.** Canberra: ACIAR, 2008. 258 p.

VIDAL, M. S.; SOARES, C. P.; FERNANDES, S. M. A.; SILVA, R. J.; TEIXEIRA, K. R. S. Seleção de mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos na síntese de ácidos orgânicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25., 2009, Porto de Galinhas. Anais... [São Paulo]: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2009. 1 CD-ROM.







**Embrapa**

---

**Agrobiologia**

**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

