

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POLÍSSACARÍDEO LIASE – PL 8: FERRAMENTA NA
MODIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Rhizobium*
sp.**

Bruna Fernanda Silva de Sousa
Engenheira Agrônoma

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POLÍSSACARÍDEO LIASE – PL 8: FERRAMENTA NA
MODIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Rhizobium*
sp.**

Bruna Fernanda Silva de Sousa

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientadora: Dra. Tereza Cristina Luque Castellane

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2018

S725p Sousa, Bruna Fernanda Silva de
Polissacarídeo Liase – PL 8: ferramenta na modificação de
exopolissacarídeos de *Rhizobium* sp. / Bruna Fernanda Silva de
Sousa. – – Jaboticabal, 2018
v, 74 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Coorientadora: Tereza Cristina Luque Castellane
Banca examinadora: João Martins Pizauro Júnior, Rubens
Bernardes Filho
Bibliografia

1. Prospecção. 2. Enzima recombinante. 3. Xantana Liase. 4.
Estirpes rizobianas. 5. Estruturas de EPS. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POLISSACARÍDEO LIASE - PL 8: FERRAMENTA NA MODIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Rhizobium* sp.

AUTORA: BRUNA FERNANDA SILVA DE SOUSA
ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS
COORIENTADORA: TEREZA CRISTINA LUQUE CASTELLANE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pesquisador Dr. RUBENS BERNARDES FILHO
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA / São Carlos - SP

Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JÚNIOR
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de agosto de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRUNA FERNANDA SILVA DE SOUSA – nascida na cidade de São Luís (MA), em 03 de abril de 1992. Graduiu-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Cidade Universitária campus Paulo IV – São Luís (MA), no ano de 2016. Durante a graduação foi agraciada com o prêmio de 1º lugar ao projeto de pesquisa “Análises microbiológicas do mel produzido no município de Santa Luzia do Paruá, região do Alto Turi, Amazônia maranhense” em 2011 sob a orientação da Profa. Dra. Maria Célia Pires Costa. cursou um ano da graduação na *Universidad Politécnica de Madrid* (Espanha) e realizou estágio no Centro de Biotecnologia e Genômica de Plantas (Madri, Espanha) sob a supervisão do Prof. e Pesquisador Dr. Luis Rey Navarro, com bolsa de graduação sanduíche CNPq – Programa Ciências Sem Fronteiras (2013-2014). Possui dois pedidos nacionais de patentes registrados no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e um registro internacional depositado no *World Intellectual Property Organization* (WIPO). Em agosto de 2016 ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) campus Jaboticabal, desenvolvendo sua dissertação junto ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) sob a orientação da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e coorientação da Dra. Tereza Cristina Luque Castellalne. Durante o curso de pós-graduação participou do Curso de Inverno *Escuela de Doctorado em Bioquímica* na *Universidad de Chile* (Santiago, Chile) em 2017 e realizou estágio de pesquisa no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior com auxílio da Pro-Reitoria de Pós-Graduação UNESP (CONVÊNIO Nº 817737/2015) visando a aplicação biotecnológica de polímero rizobiano.

“Sejamos bons e depois seremos felizes. Ninguém recebe o prêmio sem primeiro fazer por isso.”

Jean Jacques Rousseau

DEDICO

Ao meu pai, **Fernando Rodrigues de Souza** (*in memoriam*) pela figura de pai que representou em minha vida, pelo direcionamento ao caminho do bem, da dignidade e respeito com o próximo.

A minha mãe, **Marly Marques da Silva de Souza**, exemplo de determinação e luta diária, enfrentando cada adversidade para criar as filhas com amor e carinho.

As minhas irmãs, **Iarla Sousa** e **Brena Souza**, vocês são parte de mim, com quem desejo sempre caminhar lado a lado.

A minha sobrinha, **Yana Sousa**, que desde tão jovem aprenda a valorizar o poder transformador do conhecimento
Com vocês e para vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre me guia com seu infinito amor e misericórdia.

Agradeço profundamente a minha orientadora, Profa. Eliana Lemos, que me recebeu em sua equipe, que confiou no meu trabalho, tive a oportunidade de aprender a cada dia com sua experiência, conselhos e talento.

A minha querida coorientadora, Dra. Tereza Castellane pela atenção, incentivo nos momentos de fraqueza, comemorações com as conquistas, suas contribuições para execução deste trabalho foram sempre muito valiosas, obrigada.

A Dra. Elisângela Soares Gomes-Pepe, sempre disposta a ajudar e colaborar com sua experiência em todos os momentos solicitados.

Às amigas que fizeram a diferença no meu dia-a-dia de trabalho bem como fora dele, obrigada Natália, Pâmela, Gabriela, Bárbara, Michelli, Milena e Joana.

A equipe do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, João Campanharo, Renato Farinácio, Tatiane, Luciano e Érica, dentre outros que aqui passaram.

A técnica responsável pelo LMSeq, Dra. Camila Fernandes pelo auxílio nas análises de sequenciamento.

Aos meus amigos de Jaboticabal, estiveram comigo sendo uma extensão da minha família nesta cidade fazendo parte dessa história, obrigada.

A Universidade Estadual Paulista, FCAV – Jaboticabal, por dar suporte na minha formação acadêmica.

Ao pesquisador Dr. Luiz Alberto Colnago, da EMBRAPA Instrumentação pelo auxílio nas análises espectroscópicas, muito obrigada.

A técnica Juliana Oliveira Pereira, responsável pela análise de Termogravimetria no LAPIN 1 (IMA/UFRJ).

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa (Processo CNPq 401886/2016-6).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram de alguma forma com a minha formação, meu muito obrigada.

Sumário

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Contextualização Geral	2
2.2. Exopolissacarídeos microbianos	5
2.3. EPS rizobianos.....	6
2.4. Modificação de Exopolissacarídeos	9
2.5. Políssacarídeo Liases.....	10
2.5.1. Hialuronato Liase	12
2.5.2. Condroitina Liase	12
2.5.3. Xantana Liase	13
3. REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO 2 – Clonagem e expressão heteróloga de uma enzima Polissacarídeo Liase, família 8 isolada de consórcio microbiano	21
RESUMO.....	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. Prospecção de Genes das Famílias das Polissacarídeos Liases e análise das sequências	23
2.2. Amplificação do gene potencialmente codificador da PL - 8.....	24
2.3. Preparo do DNA plasmidial	26
2.4. Digestão do fragmento amplificado e do vetor	26
2.5. Ligação do Inserto ao Vetor	26
2.6. Transformação de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	27
2.7. Coleta, estoque dos clones e confirmação da clonagem	28
2.8. Sequenciamento dos clones	28
2.9. Expressão e extração da proteína recombinante	29
2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31

3.1. Prospecção de ORFs codificadoras de PL em bancos de dados genômicos e metagenômicos	31
3.2. Análise <i>in silico</i> das sequências prospectadas	33
3.3. Obtenção da potencial enzima PL 8.....	38
3.3.1. Amplificação da ORF CB10 80.2961	38
3.3.2. Obtenção dos clones.....	39
3.4. Expressão enzimática	40
4. CONCLUSÃO.....	42
5. REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 3 – Produção de Exopolissacarídeos de <i>Rhizobium</i> sp. e aplicação da enzima Xantana Liase em sua modificação estrutural	44
RESUMO.....	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Caracterização do crescimento e produção de EPS pelas estirpes de <i>Rhizobium</i> sp.	46
2.1.1. Estirpes, estoque e meios de cultivo	46
2.1.2. Pré-Inóculo e Condições de Cultivo	47
2.1.3. Caracterização Fenotípica.....	48
2.1.4. Curva de Crescimento Celular	48
2.1.5. Quantificação Biomassa.....	48
2.1.6. Produção e extração de EPS	48
2.2. Efeito da enzima xantana liase na estrutura de EPS rizobianos	49
2.2.1. Preparo da enzima xantana liase comercial e dos EPS.....	49
2.2.1.1. Ensaio enzimático da xantana liase e tratamento dos EPS	49
2.3.1. Composição e estrutura dos EPS nativos e tratados com xantana liase	50
2.3.1.1. Composição em monossacarídeo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	50
2.3.1.2. Análise espectroscópica de FTIR.....	51
2.3.1.3. Análise espectroscópica de RMN.....	51
2.4. Análise Termogravimétrica.....	51
2.5. Análises Estatísticas	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.1. Caracterização fenotípica das estirpes.....	52
3.2. Curvas de Crescimento	53

3.3. Biomassa e pH.....	56
3.4. Produção de EPS.....	58
3.5. Atividade enzimática	59
3.5.1. Atividade da enzima xantana liase comercial.....	59
3.6. Características químicas e estruturais dos EPS nativos e modificados com xantana liase	61
3.6.1. Composição de monossacarídeos	61
3.6.2. Estrutura parcial FTIR	64
3.6.3. Estrutura parcial RMN	65
3.7. Termogravimetria	67
4. CONCLUSÃO.....	69
5. REFERÊNCIAS.....	69

POLISSACARÍDEO LIASE – PL 8: FERRAMENTA NA MODIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Rhizobium* sp.

RESUMO - A produção de biopolímeros modificados é uma alternativa que vem sendo desenvolvida há pouco tempo com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos exopolissacarídeos (EPS) nativos, e assim, aumentar a utilidade destes polímeros nas aplicações industriais. A descoberta de enzimas que atuam em exopolissacarídeo rizobianos a partir do sequenciamento de genomas e metagenomas é uma atividade recente. Tais enzimas podem ser utilizadas na preparação de EPS modificado com novas propriedades físico-químicas que resultem em novas aplicações na indústria de biopolímeros. Este trabalho teve como objetivo obter uma enzima polissacarídeo liase (PL) da família 8 a partir de prospecção em bancos de sequências do LBMP (FCAV/UNESP), além avaliar, a produção de EPS pelas diferentes estirpes rizobianas, aplicação da enzima xantana liase comercial bem como seu efeito na modificação da estrutura desses EPS, em comparação com a goma xantana. Foi possível obter uma enzima PL recombinante, com domínios conservados compartilhados entre membros da família PL 8. As estirpes avaliadas produziram quantidades significativas de EPS, e a partir dos resultados das técnicas aplicadas neste estudo, pode-se notar que todos os polímeros são heteropolissacarídeos específicos de rizóbios nativos, sendo compostos principalmente por galactose e glicose, enquanto a goma xantana comercial tem a manose como o principal monômero. Tanto os EPS de origem rizobiana como a goma xantana tiveram suas estruturas modificadas pela ação da enzima xantana liase e remoção de grupos funcionais, quando avaliados através de técnicas espectroscópicas FTIR e RMN. Além do aumento resistência a elevadas temperaturas dos EPS modificados LMG 8819, H152 e SEMIA 4077 não alterados pelo tratamento. O conhecimento da composição dos EPS modificados agora facilitará futuras investigações relacionando a estrutura e a dinâmica do polissacarídeo frente às propriedades reológicas.

Palavras-chave: Prospecção, enzima recombinante, xantana liase, estirpes rizobianas, estruturas de EPS.

Polysaccharide Lyase – PL 8: tool in the modification of exopolysaccharides of *Rhizobium* sp.

ABSTRACT - The production of modified biopolymers is an alternative that has recently been developed with the objective of overcoming one or more limitations of native exopolysaccharides (EPS), and thus, to increase the usefulness of these polymers in industrial applications. The discovery of enzymes that act on exopolysaccharide rhizobians from the sequencing of genomes and metagenomics is a recent activity. Such enzymes we used in the preparation of modified EPS with novel physicochemical properties that result in new applications in the biopolymer industry. The objective of this study was to obtain a polysaccharide lyase (PL) enzyme from family 8 from LBMP (FCAV / UNESP) sequencing banks, in addition to evaluating EPS production by the different rhizobia strains, commercial xanthan lyase enzyme as well as its effect on modifying the structure of these EPS compared to xanthan gum. It was possible to obtain a recombinant PL enzyme, with conserved domains shared between PL 8 family members. The evaluated strains produced significant amounts of EPS, and from the results of the techniques applied in this study, it we noticed that all the polymers are specific heteropolysaccharides of native rhizobia, being composed mainly by galactose and glucose, whereas the commercial xanthan gum has the mannose as the main monomer. Both rhizobial EPS and xanthan gum had their structures modified by the action of the xanthan lyase enzyme on glycosidic β bonds (1 \rightarrow 4) and functional groups were removed when evaluated by FTIR and RMN spectroscopic techniques. In addition to the increased resistance to high temperatures of modified EPS (LMG 8819, H152) and SEMIA 4077 unaltered by the treatment. The knowledge of the composition of the modified EPS will now facilitate future investigations relating the structure and dynamics of the polysaccharide against rheological properties.

Keywords: Prospection, recombinant enzyme, xanthan lyase, rhizobial strains, EPS structures.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Recentemente, os polissacarídeos extracelulares (EPS) microbianos, têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial uso em uma ampla variedade de áreas industriais e suas propriedades funcionais, incluindo produtos alimentícios, farmacêuticos, bioemulsificantes (FREITAS et al., 2014), biofloculantes (SATHIYANARAYANAN; SEGHAL KIRAN; SELVIN, 2013), produtos químicos (SHAH et al., 2008) e agentes antibiofilme (RENDUELES; KAPLAN; GHIGO, 2013), perfuração de petróleo e tintas, entre outros (FREITAS et al., 2014; SALAH et al., 2011). Mesmo em concentrações inferiores a 1%, polissacarídeos podem ter uma influência significativa sobre as propriedades de textura dos produtos (PHILLIPS; WILLIAMS, 2009).

Dentre os polímeros microbianos mais utilizados, a goma xantana é um EPS produzido pela bactéria patogênica *Xantomonas campestris*, sendo utilizada em diversos setores industriais. Possui elevada massa molecular, geralmente composta de repetidas unidades de glicose, manose e ácido glicurônico com proporção de 2:2:1 em ligações glicosídicas (FREITAS et al., 2014). Possui boa solubilidade em água, aumento de viscosidade, espessamento, estabilizante, emulsificante e agente de suspensão nas indústrias alimentícias, o que confere excelente biocompatibilidade (BECKER et al., 1998; SALAH et al., 2011).

Bactérias do gênero *Rhizobium* sp. também são capazes de produzir EPS que possuem elevada massa molecular, compostos geralmente de monômeros como, glicose, galactose, manose e ácidos glicurônico e galacturônico concentrados através de ligações β -glicosídicas, similares a composição da goma xantana (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014; CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015; CASTELLANE et al., 2017). Apresentam boa solubilidade em água, pseudoplasticidade e tem capacidade bioemulsificante e adsorção de metais (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2018, 2014; MORETTO et al., 2015).

Dentre os métodos existentes atualmente utilizados na modificação de EPS e obtenção de polímeros de baixo peso molecular, o uso de enzimas se comparado aos

métodos físicos e químicos, direciona o local da modificação, com o controle da reação e não são gerados resíduos (RIGOUIN et al., 2009; ZOU et al., 2016).

Visando explorar a aplicação industrial de EPS rizobianos, a modificação em sua estrutura se constitui em uma alternativa a ser utilizada na preparação de EPS modificados com novas propriedades físico-químicas desse biopolímero.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Contextualização Geral

O setor agropecuário no contexto da exportação brasileira entre janeiro a abril de 2018 movimentou cerca de 12,66 bilhões de dólares, que representa 17% do valor total movimentado no país, seguido da indústria de alimentos com 11 bilhões de dólares e mineradoras com US\$ 6,98 bilhões (BRASIL, 2018a).

Os polímeros são moléculas exploradas na agricultura, como o látex e amido, na indústria alimentícia, e na base para fabricação de plásticos como Policloreto de Vinila (PVC) e Politereftalato de Etileno (PET) (SHAH et al., 2008). São classificados em sintéticos, aqueles obtidos a partir de fontes não renováveis, e naturais, oriundos das plantas ou microrganismos, mais conhecidos como biopolímeros, pois são obtidos de organismos (BORSCHIVER; ALMEIDA; ROITMAN, 2008).

Dentre os polímeros de origem microbiana, a goma xantana produzida pela bactéria patogênica *Xanthomonas campestris* é um dos mais explorados e aplicados em diversas finalidades. Está presente em condimentos alimentícios, produtos farmacêuticos, cosméticos e na indústria petrolífera (FREITAS; ALVES; REIS, 2011; MENEZES et al., 2012).

O Brasil gastou em média 13 milhões de dólares para importar 4458 toneladas de goma xantana em 2017, (Figura 1). Dentre os principais países exportadores estão China, França, Estados Unidos e Áustria, onde a China foi o principal país exportador para o Brasil, e responsável pela movimentação nos últimos dez anos de aproximadamente em média 11 milhões de dólares (BRASIL, 2018b). Atualmente toda goma consumida no país na sua forma primária, principalmente pelas indústrias de

petróleo, é proveniente da China, com uma média de 3,5 toneladas/ano entre 2010 a 2017 (Figura 1) (BRASIL, 2018b).

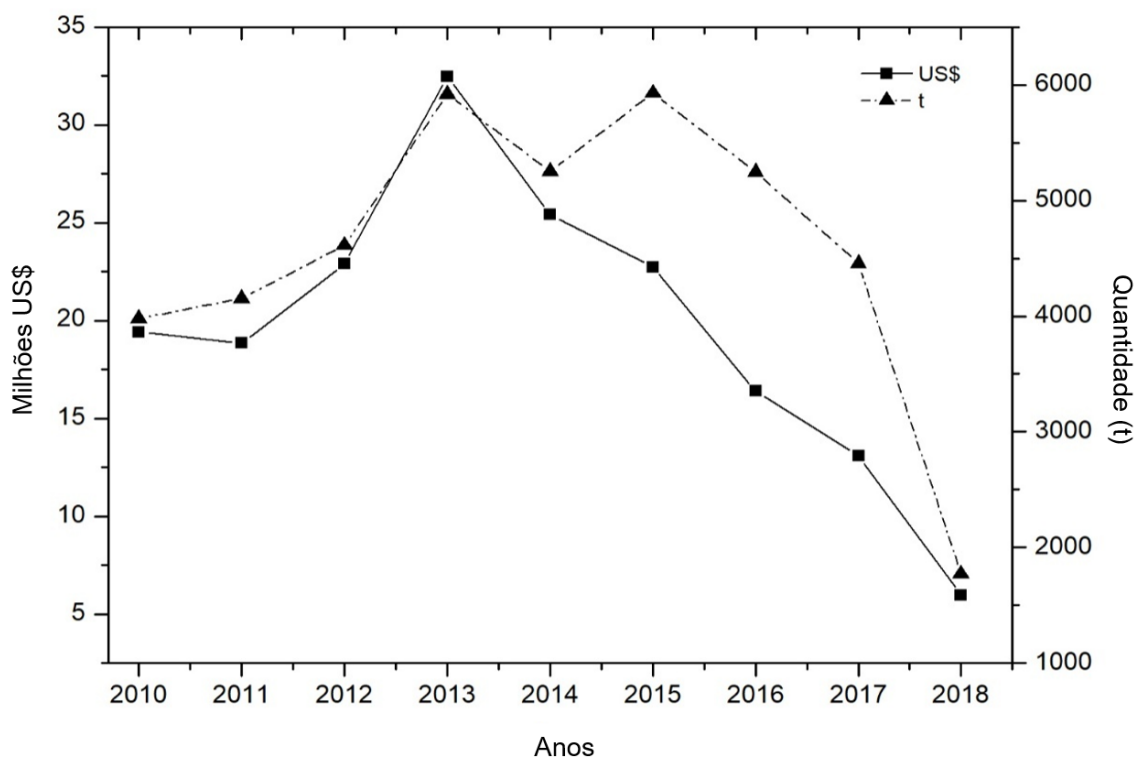


Figura 1. Custo e quantidade anual relacionados à importação brasileira de goma xantana em formas primárias, a partir dos principais países produtores, China, França, Estados Unidos e Áustria, segundo dados obtidos no Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior (BRASIL, 2018b).

Contudo o Brasil também produz e exporta a goma xantana, onde os principais importadores são os países do Mercosul: Argentina, Chile, Colômbia, Paraguai e Uruguai. Sendo a Argentina o principal consumidor que, em 2016 investiu cerca de 250 mil dólares em importação da goma brasileira, contudo no ano seguinte reduziu em 35% a importação (BRASIL, 2018b). De acordo com a Figura 2, em 2018 o consumo da goma nacional entre os principais países consumidores entre os meses de janeiro a abril somou em média 31 toneladas, que rendeu aos cofres brasileiros em média 264 mil dólares, isto representa 85% do valor recebido em 2017 (Figura 2).

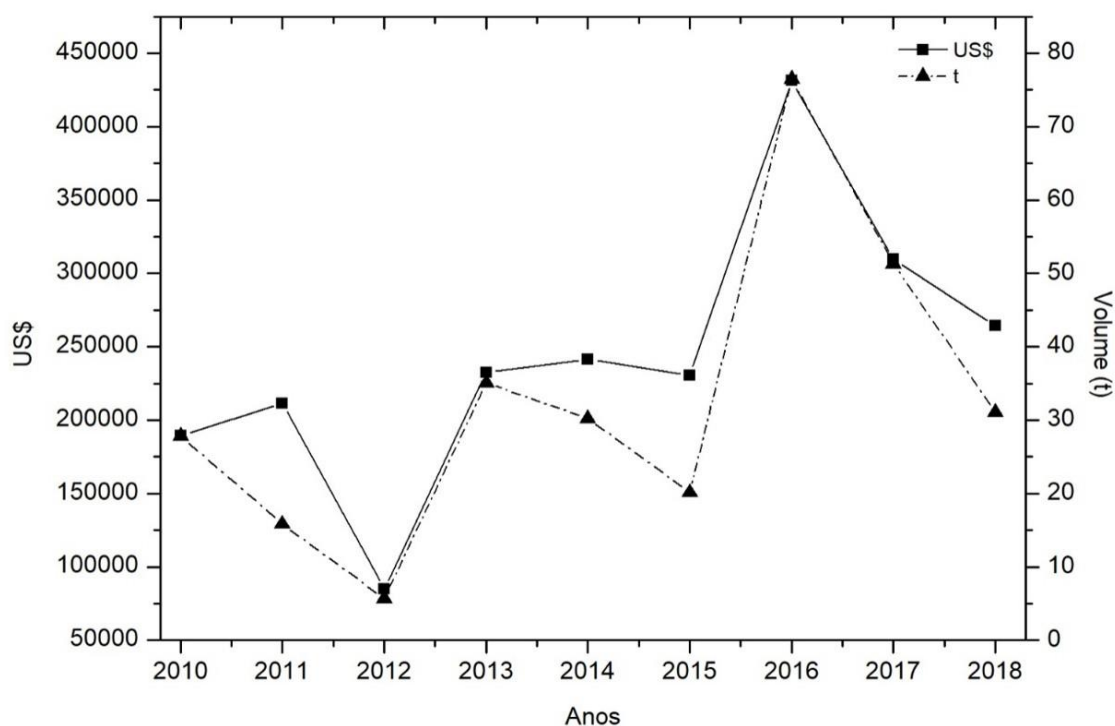


Figura 2. Custo e quantidade anual relacionados à exportação dos principais países consumidores da goma xantana brasileira, em formas primárias segundo dados obtidos no Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior (BRASIL, 2018b).

A característica mais interessante do ponto de vista industrial dos biopolímeros, como é o caso da goma xantana é a viscosidade elevada em distintas temperaturas e pH (BORGES et al., 2004). Estes possuem características próprias como espessantes, estabilizantes, emulsificantes e gelificantes (SUTHERLAND, 2001a). Geralmente, as substâncias com comportamento pseudoplásticos são apontadas como potenciais bioemulsificantes (DI DONATO et al., 2016).

As propriedades dos polímeros dependem das características intrínsecas de cada polímero, que por sua vez podem direcionar quais serão suas aplicações biotecnológicas (SILVA et al., 2006; STEWART et al., 2013). Propriedades aniônicas dos EPS permitem prender poluentes, inorgânicos e orgânicos, carregados positivamente, por interação eletrostática. Este fato faz com que os EPS tenham função como biossorventes para remediação e recuperação de metais (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2018; SHENG; YU; LI, 2010).

2.2. Exopolissacarídeos microbianos

Os microrganismos são atualmente os organismos mais atrativos no setor biotecnológico e são utilizados em variadas aplicações, na indústria de alimentos (BARBA et al., 2011; BOUQUERAND et al., 2015; FEDERHEN, 2016), no setor agropecuário (ZHANG et al., 2010; SOLIMAN et al., 2012; MOLINA et al., 2013), cosmético (NOVAK, 2013), médico e farmacêutico (AMJRES et al., 2010) e ambiental, na biorremediação (MAJEAU et al., 2010; KHALIL; MOHAMED, 2012; MENDES, 2016).

A medida que as bactérias investem na produção do polímero diminuem a taxa de crescimento, sugerindo assim a regulação entre o metabolismo bacteriano em detrimento ao catabolismo (RAMOS et al., 2001). O desafio é encontrar espécies que produzam de modo eficiente compostos de interesse da indústria, uma vez que o EPS varia muito em sua composição, conseqüentemente, varia em suas propriedades físicas, químicas e estruturais (SUTHERLAND, 2001a).

Os polissacarídeos podem ser classificados de acordo com a sua localização na célula em polissacarídeos do citosol, os quais fazem parte os peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (LPS), da parede celular que se enquadram os polissacarídeos capsulares (CPS) e aqueles que estão no ambiente extracelular, os EPS (DONOT et al., 2012).

É um processo bioquimicamente complexo, regulado por muitos genes como *Exo*, *Pss*, *Syr*, *ChvI*, *Pho*, *Sin*, *Muc*, os quais relacionam-se a síntese de dois tipos de EPS, os succinoglucanos (EPS I) e galactoglucanos (EPS II), onde o gene *exoX* influenciou negativamente a quantidade sintetizada de EPS I em *Sinorhizobium meliloti* (DOWNIE, 2010; SKORUPSKA et al., 2006).

A produção de EPS em *Shinorhizobium fredii* HH103 foi reduzida parcialmente, e está relacionada com uma diminuição no nível de transcritos dos genes *exoY2* e *exoK*, que são genes ativados na fase estacionária do crescimento microbiano, no entanto a forma exata em que esta expressão foi modulada ainda não foram completamente elucidados (ACOSTA-JURADO, SEBASTIAN NAVARRO-GOMEZ et al., 2016).

Em relação aos EPS, podem ser formados por um único monossacarídeo, mais conhecidos como homopolissacarídeos. Já os heteropolissacarídeos são aqueles formados por diferentes monômeros, a exemplo os EPS rizobianos e a goma xantana (DONOT et al., 2012; PETRI, 2015; VOET; VOET, 2013).

2.3. EPS rizobianos

A sistemática é uma ferramenta que auxilia na classificação baseada em filogenia e, para tanto, foi utilizada com frequência em bactérias, os genes relativos ao RNA ribossomal, especialmente à pequena subunidade 16S (RAMÍREZ-BABENA et al., 2008; SHAMSELDIN et al., 2005). O sequenciamento em ampla escala desse trecho do DNA permitiu a reclassificação dos rizóbios em distintos gêneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Neorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (= *Ensifer*) (ROSENBERG, 2013).

Em bactérias, é comum encontrar produção variável de EPS, mesmo em bactérias do mesmo gênero cultivadas nas mesmas condições, conforme demonstrado em *Rhizobium* (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2018, 2014; CASTELLANE; LEMOS, 2007) assim como em outras bactérias produtoras de EPS como *Xanthomonas* (ROTTAVA et al., 2009) e *Sphingomonas* (BERWANGER et al., 2007).

Existem vários trabalhos na literatura que elucidam a composição química de diversos biopolímeros extracelulares produzidos pelo gênero *Rhizobium* (BECKER et al., 1998; CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2018, 2014; CASTELLANE; LEMOS, 2007; CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015; CASTELLANE et al., 2015; GUENTAS et al., 2001; HISAMATSU et al., 1997; MORETTO et al., 2015; ROBERTSEN et al., 1981; WIELBO et al., 2004). Os EPS de rizóbios são constituídos em sua maioria de glicose e galactose e em menor proporção de manose, ramnose e ácido glicurônico, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Condições de cultivo, produção, composição química e propriedades de EPS de *Rhizobium* sp.

Microrganismo	Condições de Cultivo	Produção EPS (g.L⁻¹)	Composição Química	Propriedades	Referência
<i>R. tropici</i> SEMIA 4080 e mutante MUTZC3	PSYL - fonte de carbono sacarose 10 g.L ⁻¹	5,52	Manose, ramnose, ácido galacturônico e traços de ácido glicurônico	Comportamento pseudoplástico e bioemulsificante	(CASTELLANE et al., 2017)
<i>R. tropici</i> SEMIA 4077	PSYL - fonte de carbono sacarose 10 g.L ⁻¹	7,45	Manose; ramnose; ácido glicurônico; glicose; galactose e traços de ácido galacturônico	Comportamento não newtoniano (pseudoplasticidade)	(CASTELLANE et al., 2015)
<i>Rhizobium</i> sp. PRIM-18	Meio Líquido de Extrato de levedura manitol (YMB)	2,1	Glicose, galactose, e manose	Comportamento pseudoplástico atividade emulsionante	(PRIYANKA et al., 2015)
<i>Rhizobium</i> sp. LBMP-C04	PGYL e PSYL	6,63	Ramnose, glicose, galactose, manose, ácido glicurônico, ácido galacturônico	Comportamento pseudoplástico e atividade emulsificante	(MORETTO et al., 2015)
<i>R. tropici</i> Isolado JAB1	PSYL- fonte de carbono sacarose 10 g.L ⁻¹	3,75	Manose, ramnose, ácido glicurônico e traços de ácido galacturônico	Comportamento pseudoplástico	(CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014)
<i>R. tropici</i> Isolado JAB6	PSYL- fonte de carbono sacarose 10 g.L ⁻¹	5,06	Manose, ramnose, ácido glicurônico e traços de ácido galacturônico	Comportamento pseudoplástico	(CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014)
<i>R. tropici</i> (SEMIA 4080 - MUTPA7)	PSYL- fonte de carbono sacarose 10 g.L ⁻¹	3,94	Manose, ramnose, ácido galacturônico e traços de ácido glicurônico	Comportamento pseudoplástico	(CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014)
<i>R. radiobacter</i> S10	Soro de leite reconstituído e ácido tricloroacético (TCA) - concentração final de 5% (w/w)	2,83	Glicose e galactose	Comportamento pseudoplástico típico	(ZHOU et al., 2014)
<i>R. tropici</i> CIAT899	Meio líquido mínimo (LMM) dois substratos D - glicose e L - arabinose (55 mM)	4,08	Glicose, galactose, glicano, ramnose, resíduos de xilose	-	(STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012)

Adaptado de (RIBEIRO; BURKERT, 2016).

O gênero *Rhizobium* engloba o maior número de espécies e no entanto poucos são os estudos envolvendo estirpes selecionadas para a produção de biopolímero de interesse industrial. Na literatura destacam-se as estirpes SEMIA 4080 e SEMIA 4077 de *R. tropici*, onde sua produção chegou a 5,52 e 7,45 g.L⁻¹ de cultivo, em condições laboratoriais de caldo fermentado contendo sacarose (CASTELLANE et al., 2015, 2017). Consideradas as mais altas se comparadas a outras estirpes rizobianas em diferentes fontes de cultivo como, *R. tropici* CIAT899, que produziu 4,08 g.L⁻¹ cultivado meio contendo glicose e arabinose (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012), *R. radiobacter* S10 com produção de 2,83 g.L⁻¹ fermentado em soro de leite (ZHOU et al., 2014) e uma espécie de *Rhizobium* sp. PRIM-18 com produção de 2,1 g.L⁻¹ em meio contendo extrato de levedura e manitol (PRIYANKA et al., 2015).

Campanharo (2006) comparou a produção de goma utilizando sacarose como fonte de carbono em um meio definido como PSYL, em que as diferentes estirpes rizobianas foram submetidas as mesmas condições de cultivo e proporção de inóculo, onde as espécies de *Mesorhizobium* sp. e *Rhizobium tropici* sp. e apresentaram quantidades consideradas elevadas de EPS, 15,80 g.L⁻¹ e 5,85 g.L⁻¹, respectivamente. No entanto quando cultivada em meio definido de *Rhizobium* (RDM) contendo glicerol como fonte de carbono, *M. loti* apresentou produção de EPS em quantidade inferior, 3,10 g.L⁻¹. (CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015) e em *R. tropici* CIAT899 produziu 4,08 g.L⁻¹, quando cultivado em meio líquido mínimo (LMM) suplementado com sacarose (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012).

Castellane e colaboradores (2014) em estudos sobre a composição química de EPS produzido por *R. tropici* estirpe SEMIA 4080 e mutantes MUTZC3 e MUTPA7, encontraram maiores proporções de galactose (32,47 a 40,52%) e glicose (53,53 a 55,48%), menores percentuais de ramnose (2,31 a 2,60), manose (0,74% a 1,15%), traços de ácido glicurônico nos mutantes, 8,6% na estirpe, vestígios de ácido galacturônico na estirpe selvagem e 2,60% no mutante MUTZC3 e 2,70% no MUTPA7.

Em estudos com EPS sintetizados por espécies de *Rhizobium*, estes apresentaram comportamento reológico característico de polissacarídeos produzidos por microrganismos, caráter pseudoplástico com um leve aumento da viscosidade

aparente de dois isolados e uma estirpe padrão, estirpe CIAT 899 (BARRETO et al., 2011).

No trabalho realizado por Aranda-Selveiro e colaboradores (2010) foram avaliadas três diferentes linhagens de *Rhizobium* sp. utilizadas na produção de EPS, estas produziram soluções polissacarídicas com propriedades reológicas distintas, os autores sugeriram que o ácido urônico tenha sido um dos fatores responsáveis (ARANDA-SELVERIO et al., 2010).

Moretto e colaboradores (2015) trabalharam com quatro isolados de *Rhizobium* e obtiveram resultados onde todos os polímeros mostraram um comportamento de fluido não-newtoniano pseudoplástico em soluções aquosas e, um isolado, LBMP-C04 apresentou capacidade ótima de emulsificação em condições de pH 10 ($E_{24} = 53\%$) e em 30% de salinidade ($E_{24} = 27\%$). Castellane (2014), a partir dos resultados de seus estudos sugere o microrganismo *R. tropici*, estirpe SEMIA 4080, como um modelo de organismo celular promissor para a produção de EPS microbiano.

2.4. Modificação de Exopolissacarídeos

Os EPS microbianos tais como a goma xantana e o alginato bacteriano, podem ser utilizados como uma fonte alternativa de biopolímeros, devido sua composição e propriedades físico-químicas similares a dos polímeros vegetais (LUNA, 2016). Além do que a sua produção em larga escala não é dependente das variações sazonais (PRADELLA, 2015). Estes biopolímeros são de grande importância comercial e biotecnológica, pois apresentam potencial de aplicação em diferentes setores e baixo custo para sua produção.

A viscosidade é a principal característica avaliada quanto à utilização de polímeros em formulações de modo geral. Os polímeros de baixo peso molecular (LMW) são facilmente solúveis em soluções aquosas, se destacam devido as suas propriedades biológicas melhoradas a nível celular e molecular (SALAH et al., 2013; ZOU et al., 2016). Como exemplo, EPS marinho sulfatado produzido por *Alteromonas* inibiu *in vitro* a migração de células cancerígenas de osteossarcoma (HEYMANN et al., 2016). Enquanto, o elevado peso molecular (HMW) confere baixa solubilidade, assim como ocorre em goma xantana (MILAS; RINAUDO; TINLAND, 1986).

Dentre os métodos existentes utilizados na modificação e obtenção de polímeros de baixa massa molecular (LMW), estão aqueles aplicando força física, compostos químicos e enzimas. No entanto, o uso de enzimas, se comparado aos demais métodos, direciona o local da modificação, têm-se controle da reação e não são gerados resíduos (RIGOUIN et al., 2009; ZOU et al., 2016).

Os biopolímeros podem despolimerizados totalmente ou parcial por enzimas da família das Polissacarídeo Liases (MICHAUD et al., 2003), assim, a descoberta de bactérias produtoras de enzimas que atuem em EPS poderia ser útil, pois poderiam ser utilizadas na alteração da sua estrutura que resulte em compostos menores com propriedades físico-químicas e biológicas interessantes e desejáveis na indústria de biopolímeros (NANKAI et al., 1999).

O tratamento enzimático surge como alternativa interessante e favorável na modificação de EPS, este tipo de tratamento teve seu primeiro relato em *Bacillus* sp. GL1 que apresentavam a incidência da enzima xantana liase, responsável por mudanças das cadeias laterais destes polímeros (SUTHERLAND, 2001a).

2.5. Políssacarídeo Liases

As Polissacarídeo Liases (PL) (EC 4.2.2.-) são enzimas importantes na degradação de carboidratos através do mecanismo de β -eliminação liberando grupos laterais, da cadeia de carbono em polissacarídeos (LINHARDT; GALLIHER; COONEY, 1987; LOMBARD et al., 2010, 2014; MICHAUD et al., 2003). São classificadas em vinte e oito famílias, sendo 14.219 módulos classificados e 1.344 que ainda precisam de caracterização (Base de Dados de Carboidratos "CAZy" disponível em <<http://www.cazy.org/>>, acesso em 14/04/2018).

A família PL 8 é uma das mais importantes na atuação em polímeros de carboidratos e tem papel fundamental na modificação das cadeias laterais do ácido hialurônico, condroitina e xantana (LOMBARD et al., 2014). É formada pelas enzimas hialuronato liase (EC 4.2.2.1), condroitina AC liase (EC 4.2.2.5), xantana liase (EC 4.2.2.12) e condroitina ABC liase (EC 4.2.2.20) onde existem apenas vinte e sete enzimas caracterizadas. Estas enzimas reconhecem resíduos de ácido urônico em polissacarídeos, em ligações glicosídicas e atuam liberando oligossacarídeos com

duplas ligações C=C nos resíduos terminais não redutores, de acordo com a Figura 3 (HASHIMOTO et al., 2003).

A atividade das PL em sua maioria é monitorada através das ligações duplas geradas (SUTHERLAND, 1995) e que podem ser avaliadas através da absorbância em 232 nm. Contudo devido às diferenças consideráveis na estrutura dos substratos, no grau de polimerização, de substituição, na diversidade de fontes e atividades enzimáticas, é necessário identificar o melhor método adaptado, com a melhor sensibilidade, proporcionando um baixo custo e permitindo uma alta triagem de produção (RIGOUIN et al., 2009).

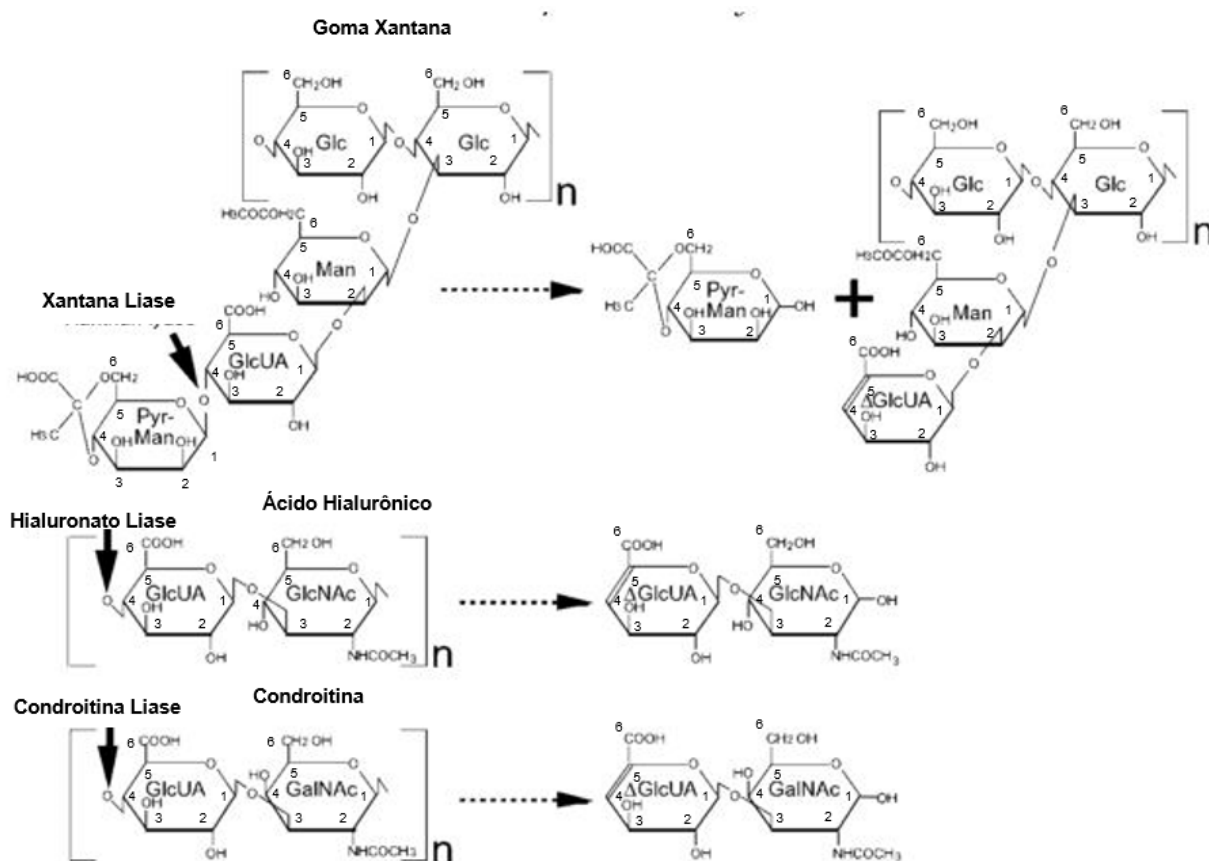


Figura 3. Estruturas de polissacarídeos e modos de ação de polissacarídeo liases (PL 8). Setas contínuas (→) indicam os locais de clivagem das polissacarídeo liases e setas pontilhadas (...→), as reações de degradação dos polissacarídeos em dupla ligações (HASHIMOTO et al., 2003).

2.5.1. Hialuronato Liase

A enzima hialuronato liase cliva ligações glicosídicas de ácido hialurônico (HA) e libera como produtos contendo várias unidades de 4,5-oligossacarídeos insaturados que podem ser tão pequenos quanto os dissacarídeos de HA (AKHTAR; BHAKUNI, 2004; BERRY et al., 1994).

Atualmente existem oito hialuronato liases caracterizadas no Cazy, (Disponível em <<http://www.cazy.org/>>, acesso em 02/05/2018), isoladas de *Bacillus* sp., *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus constellatus*, *S. intermedius*, *S. pneumoniae*, *S. coelicolor*. Destas, uma enzima comercial foi isolada de *Streptococcus hyalurolyticus*, que não apresenta atividade em outros glicosaminoglicanos (GAGs), como heparina e queratina (AKHTAR; BHAKUNI, 2004). Os GAGs são polissacarídeos com grupo sulfato, lineares e aniônicos composto por unidades dissacarídicas repetidas de hexosamina e resíduos de ácido urônico (RYE; WITHERS, 2002).

Contudo algumas hialuronato liases bacterianas podem apresentar atividade em condroitina sulfatada, que resulta em oligossacarídeos com resíduos de ácido hexurônicos insaturados (AKHTAR; BHAKUNI, 2004). A hialuronato liase de *S. pneumoniae* (SpnHL) apresenta homologia de 21,3% com a condroitina AC liase, que é membro do grupo das enzimas de degradação dos GAGs (AKHTAR; BHAKUNI, 2004).

A atividade da hialuronato liase foi definida como sua capacidade de clivar HA em unidades dissacarídicas insaturadas, que é monitorada por um aumento da absorvância em 232 nm a 25 °C (AKHTAR; BHAKUNI, 2004; RIGOUIN et al., 2009).

2.5.2. Condroitina Liase

A condroitina sulfatada (CS) é constituída de N-acetil-galactosamina com sulfato em C4 e C6 ligada ao ácido glicurônico e dois dissacarídeos através de uma ligação glicosídica. Existem duas enzimas condroitina liases que atuam em substrato de condroitina sulfatadas.

A enzima condroitina AC liase, que atua sobre condroitina 4-sulfato e condroitina 6-sulfato, cliva a ligação glicosídica entre a hexosamina e o resíduo de ácido glicurônico liberando oligossacarídeos insaturados, que são detectados em uma absorvância máxima a 232 nm, assim como a maioria das PL (GU et al., 1995; RANI et al., 2018; RYE; WITHERS, 2002).

Enquanto que a condroitina ABC sulfato liase atua de forma exolítica na condroitina A (sulfato de condroitina C-4), condroitina B (sulfato de dermatan) e condroitina C (sulfato de condroitina C-6) (POJASEK et al., 2001).

De acordo com o Cazy (Disponível em <<http://www.cazy.org/>>, acesso em 02/05/2018), existem sete condroitina liases caracterizadas, isoladas de bactérias como *Bacteriodes stercoris*, *B. Thetaiotaomicron*, *Flavobacterium columnare*, *Pedobacter heparinus*, *P. saltans* e *Proteus vulgaris*.

2.5.3. Xantana Liase

Dentre as enzimas da via de despolimerização de polissacarídeos, a xantana liase se destaca, pois até o momento, é a primeira da via de despolimerização (NANKAI et al., 1999) e tem papel fundamental na modificação das cadeias laterais da goma xantana.

Atua na cadeia da goma xantana através da β -eliminação entre a manose e o ácido glicurônico, diminuindo a viscosidade do polímero sem destruir sua cadeia principal e afetando suas propriedades reológicas essenciais (HASHIMOTO et al., 1998; NANKAI et al., 1999; SUTHERLAND, 1987, 1995). A xantana liase é a única polissacarídeo liase exo atuante, libera o terminal manosil da estrutura principal (Figura 4), a ausência dos resíduos de manose na cadeia lateral e ácido glucurônico resultam no aumento da viscosidade da goma xantana, sendo assim pode ser utilizada menor quantidade do polímero para atingir maior viscosidade (HASHIMOTO et al., 2001; KHALIL; JAN, 2012; RUIJSSENAARS; DE BONT; HARTMANS, 1999).

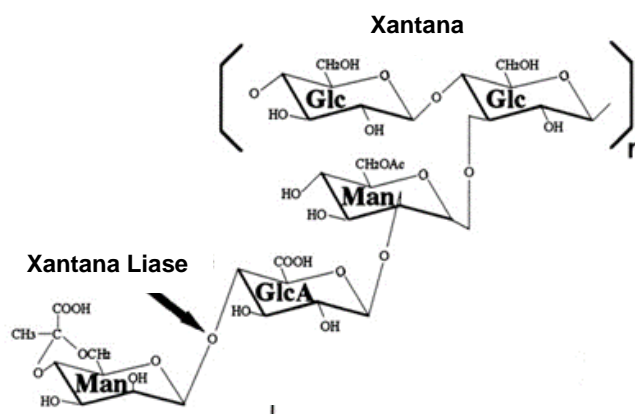


Figura 4. Modelo proposto de clivagem da cadeia lateral da goma xantana pela enzima xantana liase. (NANKAI et al., 1999).

Atualmente existem duas enzimas caracterizadas depositadas no Cazy, uma isolada do cultivo de *Bacillus* sp. (HASHIMOTO et al., 1998) e outra isolada de *Paenibacillus* (RUIJSSENAARS; HARTMANS; VERDOES, 2000). Posteriormente foi clonada uma enzima xantana liase recombinante (HASHIMOTO et al., 2001) e mais recente foi caracterizada uma xantana liase isolada de *Microbacterium* sp. que não está disponível no Cazy (YANG et al., 2014).

A enzima isolada de *Bacillus* sp. estirpe GL1, é um monômero com massa molecular de 75 kDa, mais ativa em pH 5,5 a 50 °C, a indução da sua produção em *Bacillus* sp. foi identificada após adição de goma xantana ao meio de cultura, como única fonte de carbono (HASHIMOTO et al., 1998). Posteriormente essa enzima foi clonada em *Escherichia coli* e sua estrutura foi avaliada para compreender melhor seu mecanismo de ação e sítio catalítico em comparação com outras PL (HASHIMOTO et al., 2001; MARUYAMA et al., 2007). A homologia da xantana liase com outras PL é menor do que 30% (HASHIMOTO et al., 2003) e têm como principal produto, oligossacarídeos insaturados (MICHAUD et al., 2003).

3. REFERÊNCIAS

- ACOSTA-JURADO, SEBASTIAN NAVARRO-GOMEZ, P. et al. Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–16, 2016.
- AKHTAR, M. S.; BHAKUNI, V. *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase: an overview. **Current Science**, v. 86, p. 285–295, 2004.

ARANDA-SELVERIO, G. et al. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 895–899, 2010.

BARRETO, M. DO C. S. et al. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira de Agrocência**, v. 17, n. 2-4, p. 221–227, 2011.

BECKER, A. et al. Xanthan gum biosynthesis and application: A biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 145–152, 1998.

BERRY, A. M. et al. Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, 1994.

BERWANGER, A. L. DA S. et al. Produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* a partir de meios industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 177–183, 2007.

BORGES, C. D. et al. Caracterização de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia sp* . 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 327–332, 2004.

BORSCHIVER, S.; ALMEIDA, L. F. M.; ROITMAN, T. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. **Polímeros**, v. 18, p. 256–261, 2008.

BRASIL. **Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio**. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/comex-vis/frame-siit>>. Acesso em: 9 maio. 2018a.

BRASIL. **Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio. Exportação e Importação Geral**. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br>>. Acesso em: 9 maio. 2018b.

CASTELLANE, L. C. T.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. DE M. Exploring and Utilization of Some Bacterial Exopolysaccharide. **Biopolymers Research**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2018.

CASTELLANE, T. C. L. et al. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515–522, 2015.

CASTELLANE, T. C. L. et al. Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 361–369, 2017.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. D. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1503–1506, 2007.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. D. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191–197, 2014.

CASTELLANE, T. C. L.; OTOBONI, A. M. M. B.; LEMOS, E. G. DE M. Characterization of exopolysaccharides produced by Rhizobia species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1566–1575, 2015.

DI DONATO, P. et al. Recent advances in the study of marine microbial biofilm: from the involvement of Quorum Sensing in its production up to biotechnological application of the polysaccharide fractions. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 4, n. 2, p. 34, 2016.

DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012.

DOWNIE, J. A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 150–170, 2010.

FREITAS, F. et al. Controlled production of exopolysaccharides from enterobacter A47 as a function of carbon source with demonstration of their film and emulsifying abilities. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 641–657, 2014.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388–398, 2011.

GU, K. et al. Purification, characterization and specificity of chondroitin lyases and glycuronidase from *Flavobacterium heparinum*. **The Biochemical journal**, v. 312 (Pt 2, p. 569–577, 1995.

GUENTAS, L. et al. Structure of a polysaccharide from a *Rhizobium* species containing 2-deoxy- β -D-arabino-hexuronic acid. **Carbohydrate Research**, v. 332, n. 2, p. 167–173, 2001.

HASHIMOTO, W. et al. Xanthan lyase of *Bacillus* sp. strain GL1 liberates pyruvylated mannose from xanthan side chains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3765–3768, 1998.

HASHIMOTO, W. et al. Polysaccharide Lyase : molecular cloning , sequencing , and overexpression of the xanthan lyase gene of *Bacillus* sp . strain GL1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 713–720, 2001.

HASHIMOTO, W. et al. Crystal structure of *Bacillus* sp. GL1 xanthan lyase, which acts on the side chains of xanthan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7663–7673, 2003.

HEYMANN, D. et al. Anti-metastatic properties of a marine bacterial

exopolysaccharide-based derivative designed to mimic glycosaminoglycans. **Molecules**, v. 21, n. 3, 2016.

HISAMATSU, M. et al. Structural characterization of a new acidic exopolysaccharide and cyclic (1→2) β -glucan produced by *Rhizobium huakuii* forming nodules on *Astragalus sinicus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 315–320, 1997.

KHALIL, M.; JAN, B. M. Herschel-Bulkley rheological parameters of a novel environmentally friendly lightweight biopolymer drilling fluid from xanthan gum and starch munawar. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 595–606, 2012.

LINHARDT, R. J.; GALLIHER, P. M.; COONEY, C. L. Polysaccharide lyases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 135–176, 1987.

LOMBARD, V. et al. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. **Biochemical Journal**, v. 432, n. 3, p. 437–444, 2010.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014.

LUNA, W. N. S. **Acetilação do exopolissacarídeo (1→6)- β -D-glucana (Iasiodiplodana): derivatização química e caracterização**. 2016. 64f. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

MARUYAMA, Y. et al. A structural factor responsible for substrate recognition by *Bacillus* sp. GL1 xanthan lyase that acts specifically on pyruvated side chains of xanthan. **Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 781–791, 2007.

MENEZES, D. D. S. et al. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, Caracterização e aplicações. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 8, n. 8, p. 1761–1776, 2012.

MICHAUD, P. et al. Polysaccharide lyases: Recent developments as biotechnological tools. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 233–266, 2003.

MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. Comparative depolymerization of xanthan gum by ultrasonic and enzymic treatments. Rheological and structural properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 6, n. 2, p. 95–107, 1986.

MORETTO, C. et al. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 291–298, 2015.

NANKAI, H. et al. Microbial system for polysaccharide depolymerisation: enzymatic route for xanthan depolymerisation by *Bacillus* sp. strain GL1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2520–2526, 1999.

PETRI, D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological

applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 23, 2015.

PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of hydrocolloids**. Boca Raton (FL), USA: CRC Press, 2000; 1-19

POJASEK, K. et al. Recombinant expression, purification, and kinetic characterization of chondroitinase AC and chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, n. 2, p. 343–351, ago. 2001.

PRADELLA, C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, n. October, p. 120, 2015.

PRIYANKA, P. et al. Versatile properties of an exopolysaccharide R-PS18 produced by *Rhizobium* sp. PRIM-18. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 215–221, 2015.

RAMÍREZ-BABENA, M. H. et al. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 2484–2490, 2008.

RAMOS, A. et al. Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 2001.

RANI, A. et al. Insights into the structural characteristics and substrate binding analysis of chondroitin AC lyase (PsPL8A) from *Pedobacter saltans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 980–991, 2018.

RENDUELES, O.; KAPLAN, J. B.; GHIGO, J. M. Antibiofilm polysaccharides. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 334–346, 2013.

RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium*: production, composition and rheological properties. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2016.

RIGOUIN, C. et al. Assessment of biochemical methods to detect enzymatic depolymerization of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 279–284, 2009.

ROBERTSEN, B. K. et al. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. **Plant physiology**, v. 67, n. 3, p. 389–400, 1981.

ROSENBERG, E. **The prokaryotes: Alphaproteobacteria and betaproteobacteria**.

ROTTAVA, I. et al. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, 2009.

RUIJSSENAARS, H. J.; DE BONT, J. A. M.; HARTMANS, S. A pyruvated mannose-

specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2446–2452, 1999.

RUIJSSENAARS, H. J.; HARTMANS, S.; VERDOES, J. C. A novel gene encoding xanthan lyase of *Paenibacillus alginolyticus* strain XL-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3945–3950, 2000.

RYE, C. S.; WITHERS, S. G. Elucidation of the mechanism of polysaccharide cleavage by Chondroitin AC Lyase from *Flavobacterium heparinum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 33, p. 9756–9767, ago. 2002.

SALAH, R. BEN et al. Production of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 by fermentation of date juice palm by-products (*Phoenix dactylifera* L.). **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 2, p. 457–474, 2011.

SALAH, R. et al. Anticancer activity of chemically prepared shrimp low molecular weight chitin evaluation with the human monocyte leukaemia cell line, THP-1. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, n. 1, p. 333–339, 2013.

SATHIYANARAYANAN, G.; SEGHAL KIRAN, G.; SELVIN, J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine *Bacillus subtilis* MSBN17. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 13–20, 2013.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 882–894, 2010.

SILVA, M. D. L. C. DA et al. Caracterização química de glucanas fungicas e suas aplicações biotecnológicas. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 85–92, 2006.

SKORUPSKA, A. et al. Rhizobial exopolysaccharides: Genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 1–19, 2006.

STAUDT, A. K.; WOLFE, L. G.; SHROUT, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 3, p. 197–206, 2012.

STEWART, T. J. et al. Characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from periphyton using liquid chromatography-organic carbon detection-organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). **Environmental Science and Pollution Research**, 2013.

SUTHERLAND, I. W. Xanthan Lyases--Novel Enzymes Found in Various Bacterial Species. **Journal Gen Microbiol**, v. 133, n. 11, p. 3129–3134, 1987.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharide lyases. **Thesis Polysaccharide Lyases**, v. 16, n. 4, p. 323–347, 1995.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 663–674, 2001a.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: [s.n.].

WIELBO, J. et al. Complexity of phenotypes and symbiotic behaviour of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* exopolysaccharide mutants. **Archives of Microbiology**, v. 182, n. 4, p. 331–336, 2004.

YANG, F. et al. Production and purification of a novel xanthan lyase from a xanthan-degrading *Microbacterium* sp. Strain XT11. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

ZHOU, F. et al. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 362–368, 2014.

ZOU, P. et al. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, n. 12, p. 1174–1181, 2016.

CAPÍTULO 2 – Clonagem e expressão heteróloga de uma enzima Polissacarídeo Liase, família 8 isolada de consórcio microbiano

RESUMO

Atualmente o sequenciamento de organismos e comunidades tem contribuído para a descoberta de novas moléculas com diferentes aplicações. O grupo de enzimas Polissacarídeos Liases (PL) pertencente à família 8 atua em ligações glicosídicas de polissacarídeos ácido resultando em oligossacarídeos insaturados, que apresentam propriedades melhoradas, como o ácido hialurônico obtido a partir de hialuronato liase. Logo o objetivo deste trabalho foi obter através de clonagem e expressão uma enzima PL. Em bancos de dados genômicos e metagenômicos foram encontradas três sequências que apresentaram similaridade de sequência com PL da família 8. A ORF CB10 80.2961 possui 2777 pb, e foi selecionada quando foi analisada a partir do BLATp com a base de proteínas PDB, por apresentar maior índice de similaridade com PL que as outras ORF, apresentando respectivamente identidades de 41% (68% de cobertura) com uma enzima condroitina AC liase de *Pedobacter heparinum* (1HMW) e de 29% (48% de cobertura) com uma xantana liase de *Bacillus* sp. GL1 (1J0M). As análises do ProtParam indicaram que a proteína recombinante possui tamanho de 106 kDa, como esperado de sua sequência de aminoácidos. Com base nas análises de modelagem molecular e inferência de função por homologia, foi possível sugerir que a ORF CB10 80.2961 é potencialmente um novo membro da família PL 8, enzima que exibe estrutura e motivos conservados N-terminal, C-terminal e domínios central β . O gene CB10 80.2961 foi clonado em pET28a e a proteína recombinante expressa em células de *E. coli* BL21(DE3). Essas descobertas levantam a possibilidade de mais estudos em sua purificação e aplicação em políssacarídeos com diferentes propriedades.

Palavras-chave: Prospecção de genes, predição estrutural, enzima recombinante, expressão em *E. coli*.

1. INTRODUÇÃO

Enzimas Polissacarídeo Liases (PL) (EC 4.2.2.-) atuam em biopolímeros, através do mecanismo de β -eliminação (MICHAUD et al., 2003), são classificadas em vinte e oito famílias, destas 14.219 apresentam módulos classificados e 1.344 não-classificados que precisam de caracterização (Base de Dados de Carboidratos “CAZy” disponível em <<http://www.cazy.org/>>, acesso em 14/04/2018). Dentre elas, a família PL 8 é uma das mais importantes do ponto de vista biotecnológico, e possui atividade conhecida nos biopolímeros hialuronato, condroitina e goma xantana (LOMBARD et al., 2014), liberando oligossacarídeos insaturados que podem conferir novas propriedades físico-químicas e biológicas a estes polímeros.

Dentre as enzimas classificadas como PL8, a xantana liase atua de forma específica na goma xantana, usualmente utilizada na indústria, nas ligações glicosídicas entre a manose e o ácido glicurônico, modificando-a e conferindo novas propriedades físico-químicas a este biopolímero, tais como aumento da viscosidade e solubilidade. Os polímeros produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium* sp. também possuem estas ligações D-glicosídicas e estrutura monomérica similares a goma xantana, desta forma possivelmente se constituem em substrato alternativo para a ação desta enzima, que possivelmente cause modificação em sua estrutura (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014; CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015; PETRI, 2015; XU et al., 2013).

Foram prospectadas ORFs (Open Reading Frame) oriundas de Bancos de Dados Genômicos e Metagenômicos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) pertencente à FCAV/UNESP, sequências potencialmente codificadoras de enzimas com similaridade com polissacarídeo liases da família 8, sobretudo as que apresentassem similaridade com sequências de xantana liase previamente caracterizadas e com estrutura protéica elucidada (Base de dados PDB). Assim, a descoberta de sequências codificadoras de enzimas que potencialmente atuem em polissacarídeos poderia ser útil, pois tais enzimas poderiam ser utilizadas na modificação de biopolímeros com propriedades físico-químicas desejáveis na indústria de biopolímeros (NANKAI et al., 1999). Portanto o objetivo

desse trabalho foi obter através da clonagem e expressão uma enzima polissacarídeo liase recombinante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Prospecção de Genes das Famílias das Polissacarídeos Lases e análise das sequências

A busca foi feita a partir da estratégia de triagem de famílias entre as PL 1 a PL 27 de enzimas caracterizadas disponíveis no Cazy, em comparação com as ORFs anotadas nos Bancos de Dados do LBMP oriundas de diversos habitats: Consórcio degradador de material lignocelulósico (CB10) (KISHI et al., 2017), metagenomas dos ambientes Cerrado (CE), Capim (CP), Canga (CG), Mata Eucalipto (ME) Mata Floresta (MF) (FERNANDES et al., 2018; KISHI et al., 2017) e da bactéria *Mesorhizobium* (J5). Os metagenomas e genomas do LBMP foram anotados a partir de HMMs (Modelos ocultos de Markov) da base dbCAN (Disponível em <<http://cys.bios.niu.edu/dbCAN/>>, acesso em 30/03/2017), e assim as ORFs selecionadas foram anotadas para a família das PLs e triadas individualmente para avaliar tamanho e cobertura dos genes, posteriormente as ORFs positivas foram contadas individualmente das famílias e tiveram sua abundância representada pelo programa Circos (Disponível em <<http://circos.ca/>>).

A árvore fenética das sequências escolhidas com enzimas caracterizadas da família 8 foi gerada no programa Mega utilizando o teste “Neighbor-Joining”. Os domínios conservados compartilhados entre as sequências prospectadas e PL 8 caracterizadas foi observado utilizando o programa Domosaicos (Disponível em <<http://www.domosaics.net/>>).

Utilizando o BLASTp (“Basic Local Alignment Search Tool” para proteínas) foi realizado alinhamento da sequência de interesse com o Banco de Dados não redundante (nr) do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) e para a busca por estruturas similares utilizou-se o Banco de Dados de Proteínas (PDB) (SIERRA et al., 2017). O modelo estrutural da ORF selecionada foi gerado no programa Swissmodel (Disponível em: <<https://www.swissmodel.expasy.org/>>) e modelado utilizando o software Pymol (Disponível em: <<https://pymol.org/2/>>). Foram

levados em consideração os seguintes critérios de seleção na busca da base de dados: E-value $<1e^{-4}$, limite esse restrito para garantir a alta cobertura e baixos índices de falso positivos; identidade $\geq 30\%$, cobertura $\geq 60\%$.

Os dados físico-químicos teóricos da enzima foram gerados a partir do ProtParam ExPASy (Disponível em <http://www.expasy.org/>) e análise com o servidor SignalP 4.1 (Disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), com o intuito de se identificar possíveis peptídeos sinais.

2.2. Amplificação do gene potencialmente codificador da PL - 8

Uma vez identificada e escolhida a ORF CB10_80.2961, potencialmente codificadora da enzima PL 8 do Genoma do Consórcio Microbiano (CB10) conforme resultados de inferência de homologia por similaridade de sequência, procedeu-se a clonagem da sequência em vetor de expressão pET28a (Novagen, Gibbstown, New Jersey, USA) visto que o sistema pET foi desenvolvido para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*, apresentando: duas sequências codificadoras de cauda de histidina, tanto no N-terminal, quanto no C-terminal da proteína; a sequência referente ao operon da lactose, *lacI*; o gene que confere resistência à canamicina; e uma região com múltiplos sítios de clonagem (Figura 1).

Foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) *forward* 5' TATATGGATCCTACGTCACCATCATGGACCGTATC 3' e *reverse* 3' ATAAAGCTTCTATATCTTCACAATCTTCCGCACC 5' em que nos sítios de restrição foram utilizadas as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, respectivamente. A escolha foi baseada nos resultados gerados pela ferramenta *Sequence Manipulation Suite* (Disponível em: <http://www.bioinformatics.org/>).

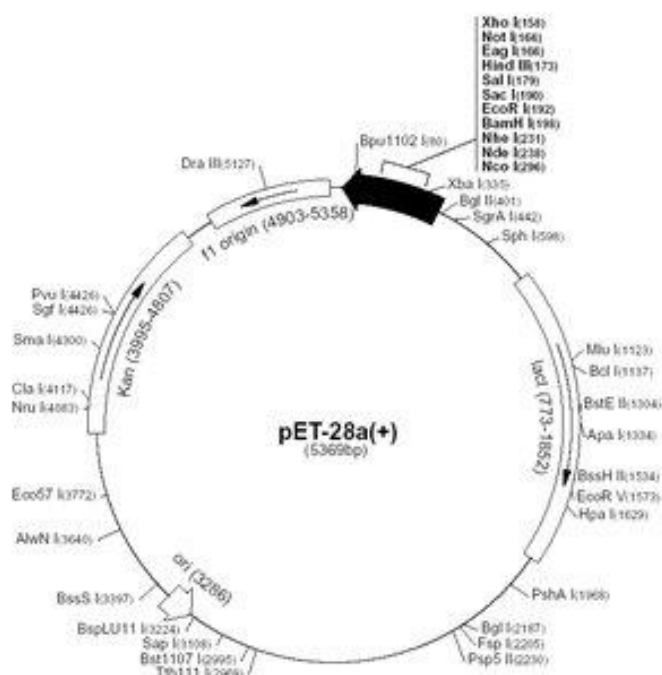


Figura 1. Ilustração das características do vetor de clonagem pET28a utilizado (Novagem).

O DNA total do consórcio bacteriano CB10 utilizado foi gentilmente extraído pela doutoranda Gabriela Cabral Fernandes com o kit *Wizard genomic DNA purification* (Promega), na concentração de 50 ng/μL, seguindo as recomendações do fabricante. Os componentes utilizados na *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para o volume final de 50 μL estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes utilizados na PCR da amplificação do gene de polissacarídeo liase PL 8.

Componentes	Volume
DNA polimerase Platinum™ PCR Super Mix <i>High Fidelity</i> (Invitrogen)	45 μL
<i>Primer F</i> (25,0 μmol) (Sigma)	0,5 μL
<i>Primer R</i> (25,0 μmol) (Sigma)	0,5 μL
DNA total CB10 (50 ng/μL)	3,0 μL
Água ultrapura (q.s.p)	1,0 μL
Volume Final	50 μL

A amplificação do gene foi realizada seguindo o programa: 30 ciclos de 95 °C por 2 min; 95 °C por 25 s; 64 °C durante 30 s, 72 °C por 3 min e 10 min a 72 °C em termociclador. Após o término da reação uma alíquota de 2 µL da reação de PCR foi aplicada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (0,5 mg/µL), a fim de se visualizar a amplificação dos produtos de PCR e revelado em um fotodocumentador Geo-Doc™ (Bio-Rad).

O kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research) foi utilizado na purificação do produto de PCR de acordo com as recomendações do fabricante. O fragmento de DNA amplificado foi quantificado em NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific) e a qualidade do DNA e a presença de proteínas contaminantes foi verificada pela relação 260/280nm.

2.3. Preparo do DNA plasmidial

Na extração do DNA plasmidial do pET28a foi utilizado o kit Wizard Plus SV (Promega), a amostra foi quantificada em aparelho espectrofotométrico Nanodrop e a qualidade do DNA e a presença de proteínas contaminantes foi verificada pela relação 260/280nm.

2.4. Digestão do fragmento amplificado e do vetor

O DNA amplificado do inserto e do vetor foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Na reação de restrição do vetor foi adicionada conjuntamente a enzima FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) para a desfosforilação. Foi utilizado o programa: 37 °C por 10 min e 80 °C durante 20 min, segundo instruções do fabricante. Foi realizada a purificação com o kit Zymoclean Gel DNA Recovery, conforme o item 2.1.2.

2.5. Ligação do Inserto ao Vetor

O vetor pET28a foi digerido com as mesmas enzimas de restrição do inserto de modo a apresentar extremidades compatíveis, de acordo com o descrito na Figura

1. Assim o vetor restrito, desfosforilado, purificado e o inserto restrito e purificado foram submetidos a uma reação de ligação para a produção de DNA recombinante a 16 °C durante 16 horas, cujos componentes e volumes estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Componentes utilizados na reação 1X de ligação do inserto ao vetor.

Componentes	Volume
T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)	1,5 µL
Tampão T4 DNA Ligase (Biolabs)	2,0 µL
Inserto	3,0 µL
Vetor	2,3 µL
Água ultrapura (q.s.p)	11,2 µL
Volume Final	20 µL

2.6. Transformação de células de *E. coli* BL21(DE3)

A transformação foi realizada com células competentes de *E. coli* BL21(DE3), doadas pelo Dr. Manoel Victor Lemos responsável pelo Laboratório de Genética Molecular (FCAV). Foram descongeladas em banho de gelo por aproximadamente 5 min. Na reação foram utilizados 10 µL do DNA ligado (construção pET28a+ORF cb10 80.2961) e 200 µL da célula competente BL21(DE3). A transformação foi feita por choque térmico e, para isso, a reação foi colocada durante 20 min. em banho de gelo e logo em seguida, submetida a 42°C, por 90 s, posteriormente sendo recolocada no banho de gelo por mais 2 min.

Após a transformação, foram adicionados 790 µL de meio SOC [2% de triptona (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v), 1 mL de NaCl 1 M, 0,25 mL de KCl 1 M, 1 mL de Mg²⁺ 2 M filtrado a 0,22 µm e 1 mL de glicose 2 M filtrada sob as mesmas condições] para propiciar o desenvolvimento das células transformadas, sendo as mesmas submetidas a agitação orbital de 200 rpm, a 37°C por 120 min. Após incubação das células transformadas, alíquotas de 100 µL da cultura foram distribuídas em placas de petri, contendo o meio Luria Bertani (LB) sólido [10 g/L de Triptona; 5 g/L de Extrato de Levedura; 10 g/L de NaCl; 9 g/L de ágar pH 7,0] com

canamicina (50 µg/mL), onde as células transformadas foram incubadas a 37°C por 16 h.

2.7. Coleta, estoque dos clones e confirmação da clonagem

A coleta dos clones foi realizada com palitos de madeira estéril, os mesmos foram colocados em 5 mL de meio LB suplementado com canamicina (50 µg/mL). Os tubos foram incubados sob agitação orbital constante a 200 rpm, 37°C, por 16 h. Após este período, uma alíquota de 800 µL da cultura foi transferida para tubo contendo 200 µL de glicerol esterilizado e congelados com nitrogênio líquido e estocados a -80°C (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

A confirmação preliminar da clonagem foi realizada através da reação de PCR em colônias. Os clones coletados foram depositados em microtubos de 0,25 mL estéreis e adicionados 20 µL de tampão de lise celular (KCl 50 mM, Tween 20 0,1% e Tris-HCl 10 mM, pH 8,3), sendo estes submetidos a temperatura de 99°C durante 30 min para a lise celular. Após, 4 µL do sobrenadante que foi utilizado para a reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores e a visualização do resultado foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 1%, de acordo com o item 2.1.2.

2.8. Sequenciamento dos clones

Após a PCR das colônias com os clones positivos como medida preliminar, foi realizada extração de DNA plasmidial conforme o item 2.1.2 para posterior sequenciamento e confirmação da inserção do fragmento no vetor e a visualização do resultado foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 1%. As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Sequenciamento LMSeq da FCAV.

Para a reação de sequenciamento o DNA plasmidiais foram amplificados em microplacas nas seguintes condições: 100 ng de DNA plasmidial, 3.0 µL de tampão de sequenciamento 5X v3.1, 1.0 µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems Carlsbad, Califórnia, USA), 10 pmol dos *primers* utilizados no item 2.1.2., sendo que as reações foram feitas separadamente para *Forward* e *Reverse*, sendo que foi usada água

deionizada estéril para completar o volume de 10 μ L. As placas foram levadas ao termociclador, com os seguintes ciclos: desnaturação a 96°C por 1 min; 39 ciclos de 96°C por 15 s; 65°C por 15 s, 60°C por 4 min e ciclo final a 4°C até serem retiradas.

Após a reação de sequenciamento procedeu-se com a lavagem da placa, o DNA amplificado foi precipitado com 80 μ L de isopropanol 75%, incubando-se em temperatura ambiente por 15 min, sendo posteriormente centrifugadas a 4.000 x g por 45 min a 15°C, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas duas vezes com 180 μ L de etanol 70%, e centrifugadas a 4.000 x g rpm por 5 min a 15°C. O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol foi retirado a vácuo por 5 min. As amostras foram ressuspensas em 10 μ L de formamida e incubadas por 5 min a 95°C, a fim de obter o DNA em fita simples e aplicadas no sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguindo recomendações do fabricante.

2.9. Expressão e extração da proteína recombinante

Inicialmente foi realizado o teste de expressão da proteína de interesse. Para isso, uma colônia isolada de *E. coli* BL21(DE3) transformada foi inoculada em 50 mL de meio de cultura LB com canamicina (50 μ g/mL), que permaneceu sob agitação durante 16 h, 200 rpm a 37°C. Alíquotas de 2 mL foram inoculadas em frascos contendo 200 mL de meio LB com canamicina, que permaneceram sob agitação de 200 rpm, 37°C, até atingir a fase logarítmica de crescimento, com D_{600nm} entre 0,4 e 0,6.

Para os ensaios de expressão foram utilizadas as temperaturas 30 °C e 37 °C em diferentes concentrações de isopropil- β -D-thiogalactoporanósido (IPTG): 0,4; 0,6, 0,8 mM e 1,0 M avaliados antes da indução e após 0, 2, 4 e 6 e 22 horas. A menor concentração com bom resultado de expressão e a melhor temperatura foram escolhidas para ensaios de super expressão da proteína em 1 L de LB com canamicina e foram incubadas com agitação de 200 rpm durante 22 h.

Após esse período, as células foram centrifugadas em 10.000 x g a 4 °C e ressuspensas em tampão fosfato de sódio pH 7,5 e incubadas a 4 °C com 1 mg/mL de lisozima durante 1 h. O rompimento das células foi realizado utilizando ultrassom

Brason Sonifier 250 (Brason, Connecticut, USA) com razão cíclica de 20%, 10 ciclos de 10 pulsos e intervalos de 10 segundos durante 10 minutos com adição do detergente Triton X-100 0,2%. As células lisadas foram centrifugadas por 30 min a 10.000 rpm a 4 °C para obtenção dos extratos proteicos.

O extrato solúvel foi incubado durante 1 h sob agitação orbital, a 15 °C em 3,5 mL de resina Ni²⁺NTA (Qiagen, Hilden, Germany) equilibrada com tampão fosfato de sódio com 20 mM de imidazol.

Após o período, o material incubado foi colocado em uma coluna "Poly-Prep Chromatography Columns 9 cm" (Bio-Rad) e a fração não complexada foi coletada ("flow-through"). À coluna foi adicionado o tampão de eluição, o mesmo usado para equilibrar a resina, com gradiente na concentração final do imidazol de 5 mM até 1 M. As frações foram coletadas e estocadas a 4°C para análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Foi realizada eletroforese desnaturante em gel vertical de poliacrilamida SDS-PAGE 10% para o gel de separação e 5% para o empilhamento em um sistema mini-protean (Bio-Rad). As amostras foram preparadas com adição de tampão de amostra (glicerol, 20%; SDS, 4%; β-mercaptoetanol, 5%; azul de bromofenol, 0,02%; Tris-HCl, 0,062 M, pH 6,8) e fervura a 99 °C durante 5 min. O gel foi corado pelo método Azul de Comassie (0,2% Azul de Comassie, 10% de ácido acético, 40% Metanol). N eletroforese foi utilizado o tampão SDS Tris-HCl, em voltagem entre 80-100V, durante aproximadamente 3 horas. O marcador padrão de proteínas utilizado foi o Precision Plus Protein Standards de 250 kDa (Bio-Rad).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Prospecção de ORFs codificadoras de PL em bancos de dados genômicos e metagenômicos

De acordo com a Figura 2, as sequências putativas de Polissacarídeo Liases apresentaram ampla ocorrência na base de dados do LBMP, distribuídas em todos os ambientes do metagenoma, no consórcio CB10 e genoma de *Mesorhizobium* sp., onde se destacaram as famílias PL 22, 12 e 1 que foram mais abundantes e apareceram na maioria dos ambientes.

A família PL 22 é formada pelas enzimas oligogalactunato liase (EC 4.2.2.6), onde foram caracterizadas apenas duas enzimas que catalizam a conversão de digalacturonato saturado e insaturado em monogalacturonato (ABBOTT; GILBERT; BORASTON, 2010). A família PL 12 é formada por enzimas pectato liases (EC 4.2.2.2), exopectato liase (EC 4.2.2.9) e pectina liase (EC 4.2.2.10), que atuam na pectina que é um complexo estrutural presente na estrutura de vegetais (ADETUNJI et al., 2017). Esses polissacarídeos estão presentes na estrutura das plantas, e muito provavelmente por isso foram encontradas com maior abundância nos metagenomas dos ambientes de floresta (MF), eucalipto (ME) e canga (CG).

Foram prospectadas três sequências da família PL 8, sendo duas, CG 174558.273638 e CG 19964.56732 encontradas em metagenomas de solos de mineração, nomeado como ambiente Canga (FERNANDES et al., 2018). A terceira ORF, CB10 80.2961, foi obtida do sequenciamento de um consórcio degradador de material lignocelulósico e foi predita e relacionada ao metabolismo de polissacarídeos (KISHI et al., 2017), demonstrando assim que esses ambientes apresentam potencial para busca de enzimas com aplicação em polissacarídeos. Considerando o papel de enzimas da família PL 8 atuante em polímeros com aplicação conhecida na indústria, como é o caso da xantana liase atuante na goma xantana, a família PL 8 foi escolhida como alvo deste estudo.

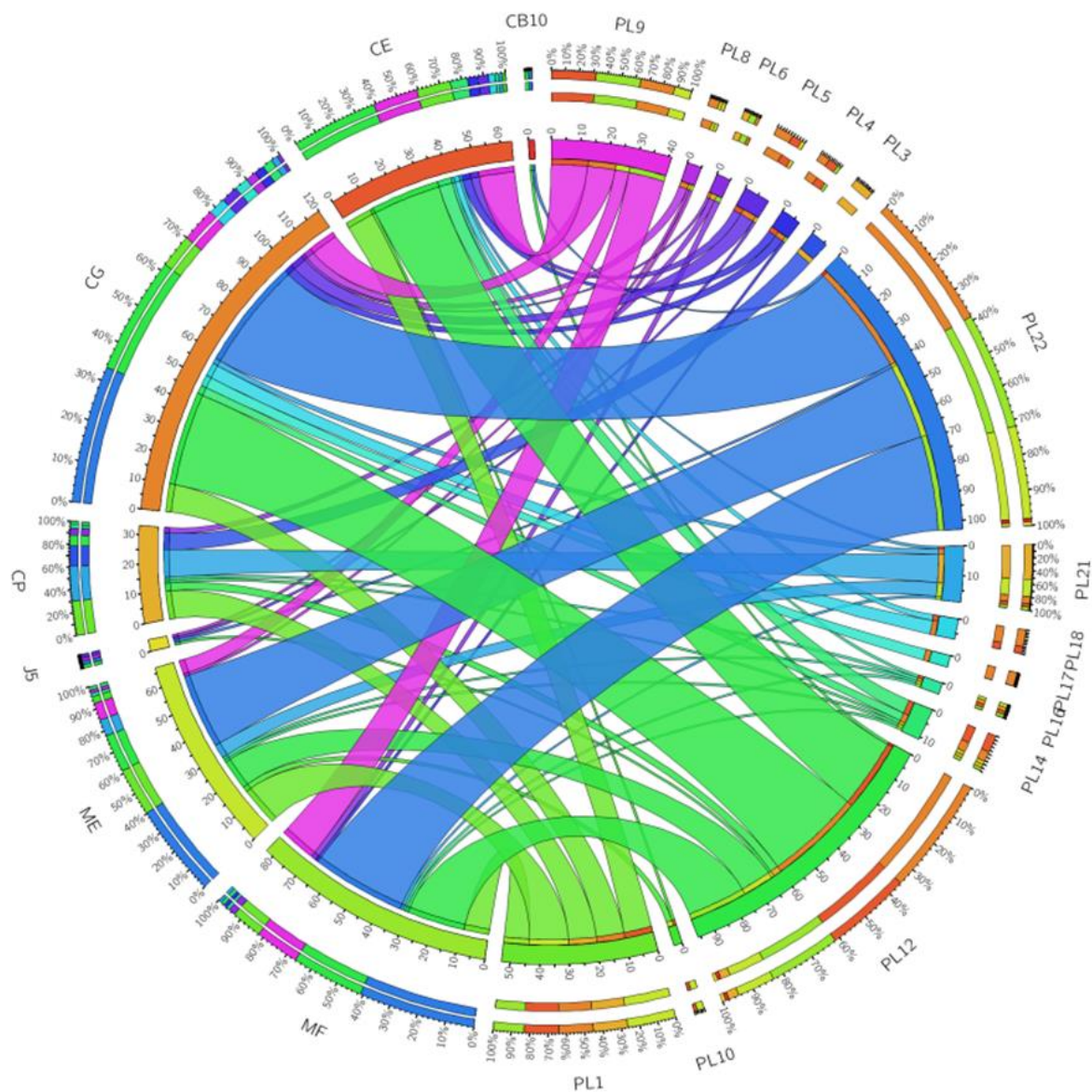


Figura 2. Distribuição de ORFs e famílias de polissacarídeos liases nos cinco ambientes: Cerrado (CE), Capim (CP), Canga (CG), Mata Eucalipto (ME) Mata Floresta (MF), *Mezorhizobium* sp. (J5) e Consórcio (CB10). Os dados foram visualizados através do software *Circos*, onde o comprimento das barras tal como no anel exterior representa sua abundância relativa nos genomas e metagenomas.

3.2. Análise *in silico* das sequências prospectadas

Buscando prever os mecanismos de atuação da enzima codificada a partir das ORFs obtidas para PL8, foi realizado um dendrograma fenético das sequências dos Metagenomas e Genomas do LBMP em comparação com as enzimas caracterizadas do Banco de Dados Cazy, família PL 8 de xantana liase (XL), condroitina AC/ABC liase (CL) e hialuronato liase (HL), onde as 20 sequências analisadas da família 8 foram agrupadas na árvore fenética de acordo com a Figura 3. As três sequências prospectadas foram agrupadas juntamente com as sequências de condroitina AC/ABC liases.

O Cazy agrupa as enzimas em famílias de acordo com os domínios estruturais, compartilhado entre as enzimas, em PL 8 que atuam na goma xantana, hialuronato e a condroitina AC, os domínios compartilhados são alfa-hélice, barril B (HASHIMOTO et al., 2003). A ORF CB10 80.2961 foi considerada a mais completa quanto ao tamanho esperado para enzimas desta família, com identidade de 41% e cobertura de 68% com condroitina AC liase de *Flavobacterium heparinum* (1CB8A) e 27% de identidade e 66% de cobertura com uma enzima mutante de xantana liase (R612a) (2E24A). A ORF 19964.56732 apresentou identidade de 44 % e cobertura de 75% com uma condroitina AC liase isolada de *Flavobacterium heparinum* (1CB8A) e 32% de identidade e 85% de cobertura com xantana liase mutante (2E24A). Enquanto que a ORF CG 174558.273638 apresentou identidade de 41 % e cobertura de 63% com uma condroitina AC liase mutante (1HM2A) e uma isolada de *Flavobacterium heparinum* (1CB8A) Além da presença de domínios conservados, assim como apresentou maior identidade e cobertura com PL 8 caracterizadas e foi selecionada para as demais análises.

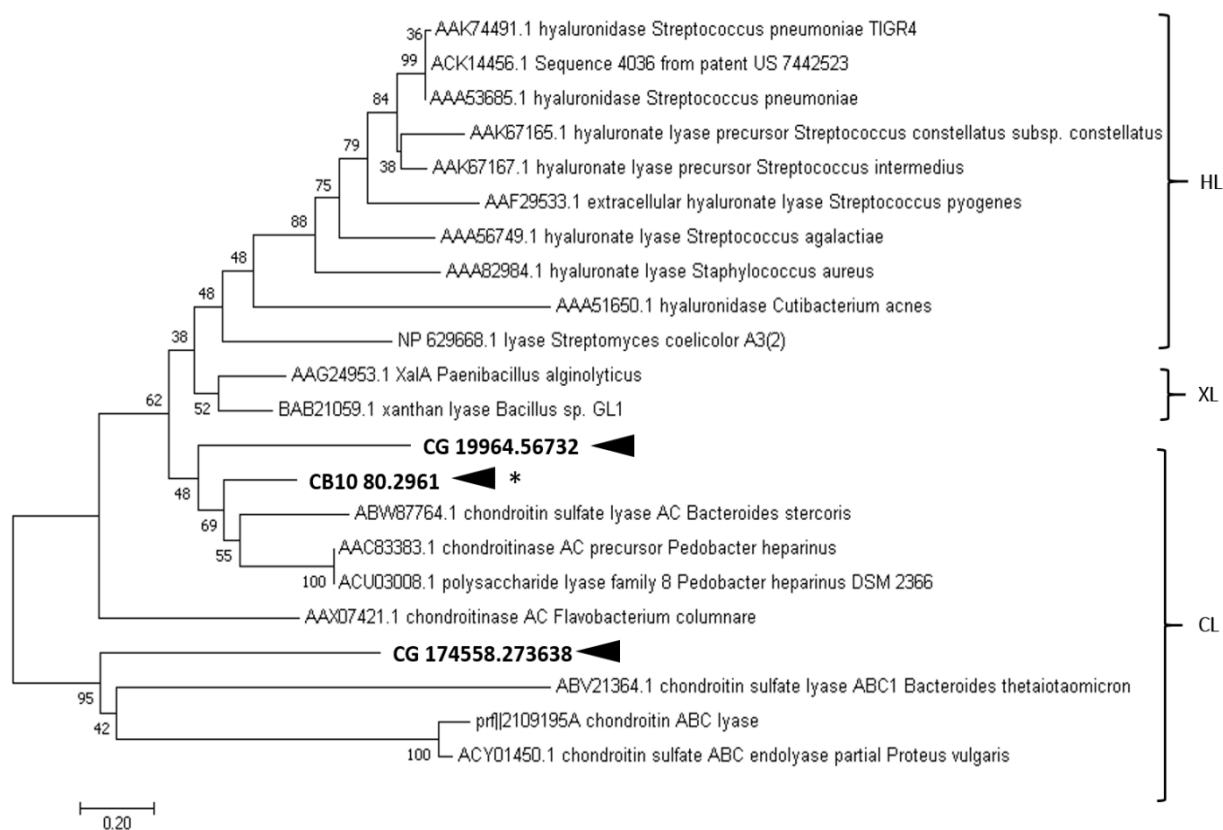


Figura 3. Dendrograma fenético de comparação entre as sequências prospectadas do Banco de Dados genômicos e metagenômicos do LBMP (◄) e enzimas caracterizadas da família PL 8 depositadas do Cazy. Foi utilizado o método de otimização para vizinhos próximos (Neighbor Joining), bootstrap de 1000, obtido no programa Mega . HL: Hialuronato Liase; XL: Xantana Liase; CL: Condroitina AC/ABC Liase. (*) ORF escolhida para amplificação.

Com relação a presença e arquitetura de domínios, as sequências analisadas, contendo PL da família 8 se agruparam em dois grupos, um contendo três domínios e outro contendo quatro domínios (Figura 4). A sequência CB10 80.2961 apresenta três domínios conservados entre essa família (HUANG et al., 2001), onde esta representado em azul o domínio N-terminal formado de α -hélices, em roxo um domínio de folha β no C-terminal e em verde o domínio central, que apresenta uma topologia em sanduíche com folhas β . Outras enzimas bacterianas que apresentam essa estrutura incluem o domínio central da condroitina AC liase (HUANG et al., 2001), da xantana liase (HASHIMOTO et al., 2003) e hialuronato liase (RIGDEN; JEDRZEJAS,

2003) e por isso foram agrupadas na mesma família de acordo com a classificação no Cazy.

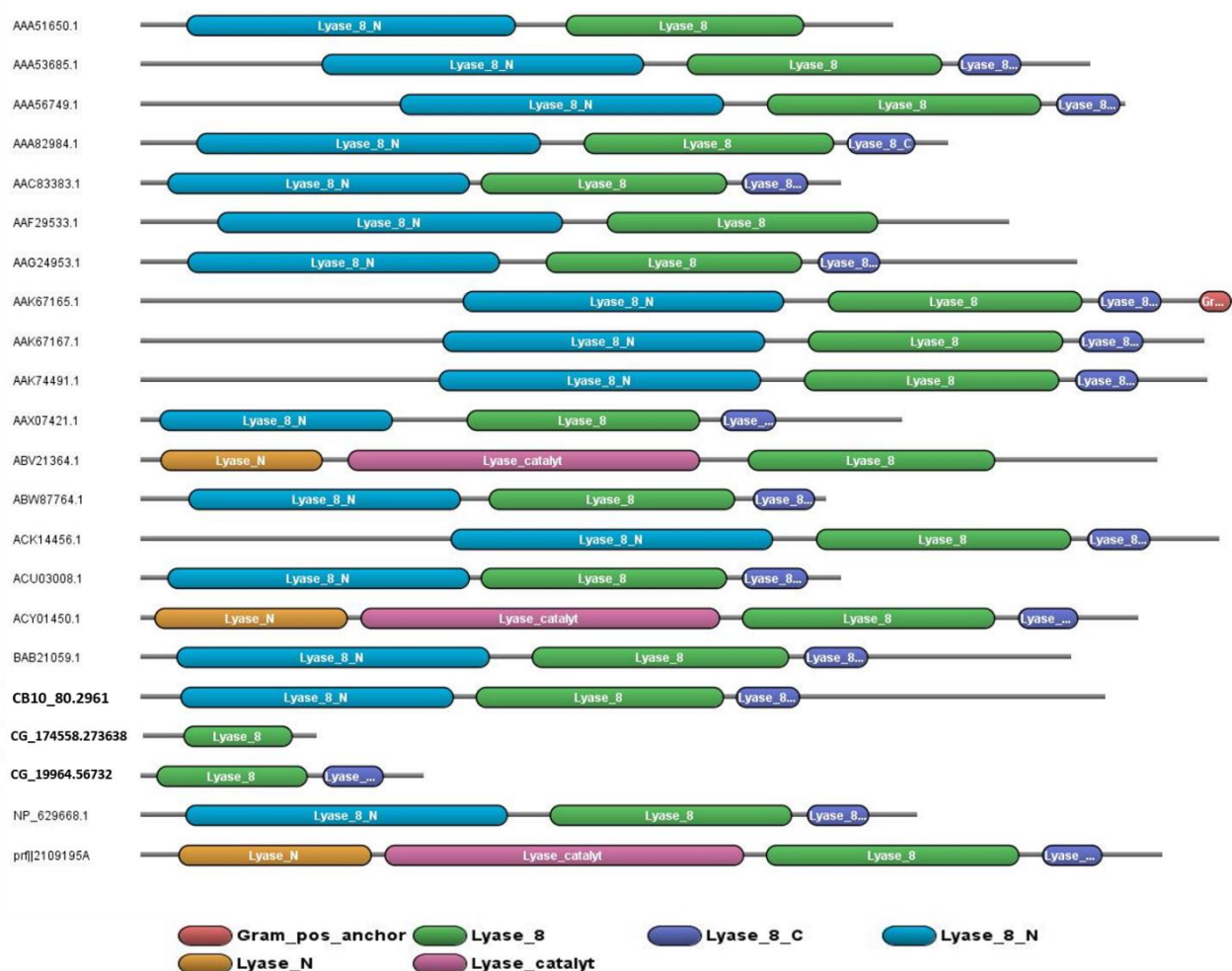


Figura 4. Domínios hierárquicos conservados entre as enzimas Polissacarídeo Liase, Família 8 caracterizadas do Cazy e seqüências prospectadas do Banco de Dados genômicos e metagenômicos do LBMP.

A seqüência de CB10 80.2961 consiste em 2.777 pb e codifica uma proteína com 975 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 106 kDa e ponto isoeletrico 8.8, baseado nos dados físico-químicos teóricos obtidos no ProtParam.

A seqüência de aminoácidos da putativa PL 8 foi submetida a uma análise de similaridade com outras seqüências disponíveis em bancos públicos de seqüências através do algoritmo BLASTp do NCBI, foi usado o parâmetro de proteína não redundante (nr), e os resultados indicaram que a seqüência possui 92% de identidade e 96% de cobertura (*query coverage*) com uma condroitina AC liase

(WP_083549607.1), 91% de identidade e 96% de cobertura com uma proteína de sistema de secreção do tipo 9 (T9SS) (SHL39315.1), ambas de *Chitinophaga jiangningensis*.

Foi realizado também o alinhamento da sequência CB10 80.2961 junto ao banco de proteínas (PDB) que exibiu 41% de identidade e 68% de cobertura com uma enzima condroitina AC liase de *Pedobacter heparinum* (1HMW) e 29% de identidade e 48% de cobertura com uma xantana liase de *Bacillus* sp. GL1 (1J0M). De acordo com a Figura 5, podem ser observados os modelos propostos pelo Swismodel e modelado no programa Pymol da ORF CB10 80.2961 baseado no alinhamento com a condroitina AC liase (1HMW) e a estrutura cristalográfica da xantana liase (1J0M), onde foram destacadas as cores azul, verde e roxo os domínios conservados entre elas, N terminal família 8 formado por um barril de alfa hélices, domínio central β e C terminal em formato de folha β , respectivamente.

Buscando identificar o quanto a estrutura da sequência CB10 80.2961 demonstrou similaridade com a enzima condroitina AC liase foi representado na Figura 6 o alinhamento entre elas no programa Pymol. Também foi demonstrado os quatro resíduos conservados de aminoácidos Histina (His221), Tirosina (Tyr230), Arginina (Arg284) e Ácido Glutâmico (Glu366) do sítio catalítico conservado entre estas sequências que foram alinhadas (HUANG et al., 2001) com um desvio de média quadrática mínima (RMSD) de 0,25. Esta medida representa o desvio médio dos átomos de uma estrutura em relação a outra, utilizada em comparação, que já foi utilizado na análise prévia de sequência prospectada em banco de dados (SIERRA et al., 2017). Não foi possível o alinhamento estrutural entre o modelo predito para CB10 80.2961 e xantana liase (RMSD de 3,5) conforme observado pelo ângulo de visão da figura 5, a distribuição dos domínios se dá na forma que se assemelha a um “S”.

Estas são análises prévias que direcionam a possível função de sequências prospectadas, contudo são necessárias análises direcionadas, como a caracterização enzimática em substratos específicos para comprovar a função da enzima em estudo.

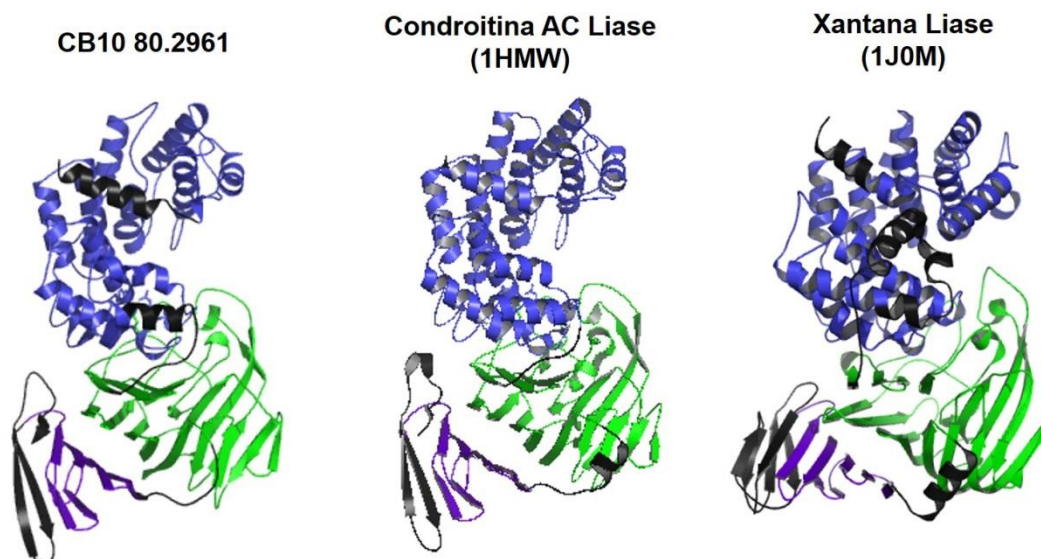


Figura 5. Comparação entre modelo e Estruturas cristalográficas resolvidas experimentalmente usadas para a construção do modelo tridimensional da ORF CB10 80.2961. 1HMW: modelo de Condroitina Liase de *Pedobacter heparinus*, PDB1J0M: Xantana Liase de *Bacillus* sp. GL1.

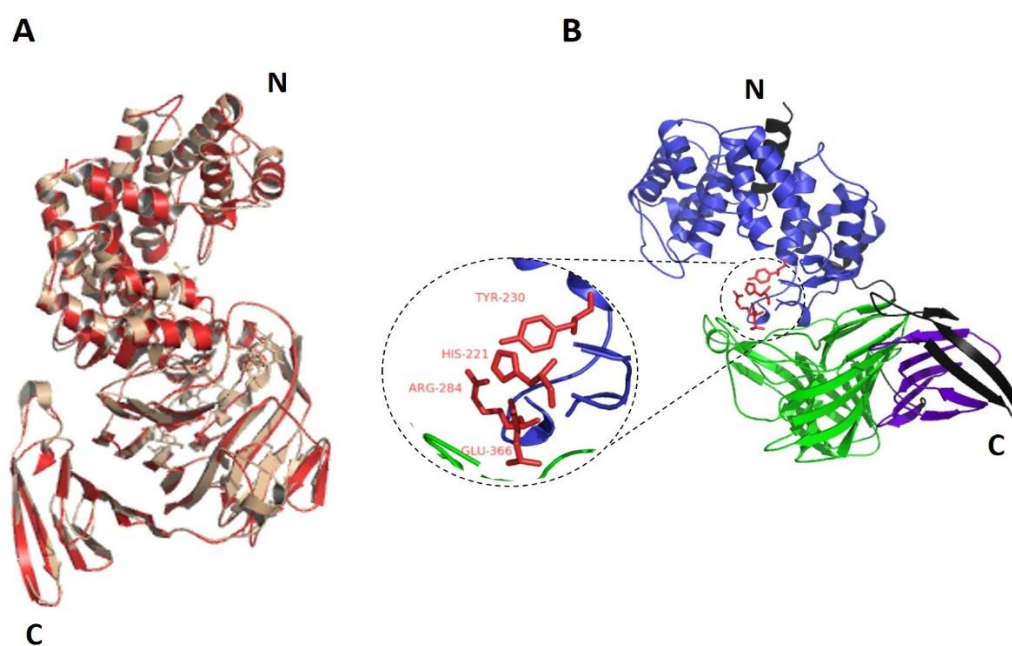


Figura 6. Características estruturais do modelo CB10 80.2961. **(A)** Alinhamento da estrutura cristalográfica resolvida experimentalmente usada para a construção do modelo tridimensional CB10 80.2961 (vermelho) com a estrutura de uma Condroitina AC Liase (dourado) - 1HMW. **(B)** Sítio catalítico do modelo tridimensional da ORF CB10 80.2961.

3.3. Obtenção da potencial enzima PL 8

3.3.1. Amplificação da ORF CB10 80.2961

Os pares oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados baseados na sequência da ORF CB10 80.2961 e através da reação de amplificação por PCR foi amplificada a sequência da políssacarídeo liase PL8 putativa, conforme pode ser observado na Figura 7. O fragmento amplificado correspondeu ao tamanho de aproximadamente 2777 pb conforme foi predito na anotação desta ORF. O DNA após a restrição com as enzimas (*Bam*HI e *Hind*III) e purificação apresentou concentração de 69 ng/ μ L e uma relação 260/280 de 1,93 e relação 260/230 de 1,86.

Segundo informações contidas no manual instrumental do fabricante, preparações puras de DNA normalmente produzem uma relação de 260/280 de aproximadamente 1,8. Esta relação é dependente do pH e força iônica do tampão usado para fazer o branco e as medições da amostra.

Soluções ácidas são sub-representadas na relação em 0,2-0,3, enquanto uma solução básica representa valores superiores na ordem de 0,2-0,3. Relações de pureza significativamente diferentes destes valores podem indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem luz no comprimento de onda próximo a 280 nm.

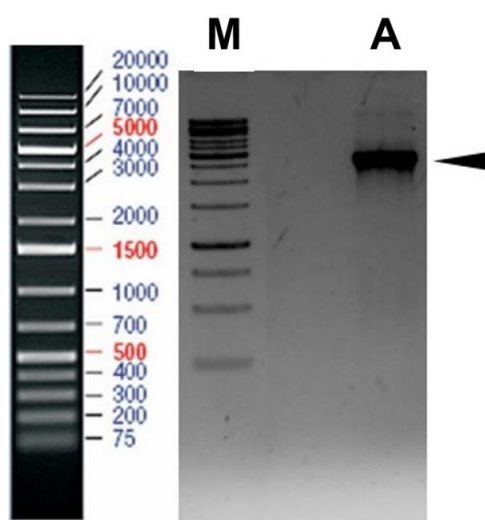


Figura 7. Amplificação por PCR da ORF CB10 80.2961 (**A**) que apresenta 2777 pb (\blacktriangleleft) e Marcador de massa molecular 1kb *Plus*, Fermentas (**M**).

3.3.2. Obtenção dos clones

O DNA plasmidial do vetor pet28a após a restrição, desfosforilação e purificação apresentou concentração de 43 ng/ μ L e relação 260/280 de 1,72 e relação 260/230 de 1,15. Na ligação do inserto ao vetor foi utilizado 3,04 μ L do inserto e 2,32 μ L do vetor. Após a transformação de células competentes BL21 (DE3) e inserção do vetor pet28+CB10 80.2961, foram coletados alguns clones da placa, foi extraído o DNA plasmidial e realizada a PCR, o resultado dos clones pode ser observado abaixo, na Figura 8.

Os clones positivos 1, 5, 6, 9 e 10 foram sequenciados e suas sequências conferidas, individualmente e alinhadas no programa Bioedit, onde foi possível confirmar a clonagem do inserto contendo a sequência que codifica a ORF CB10 802961 no vetor pet28a.

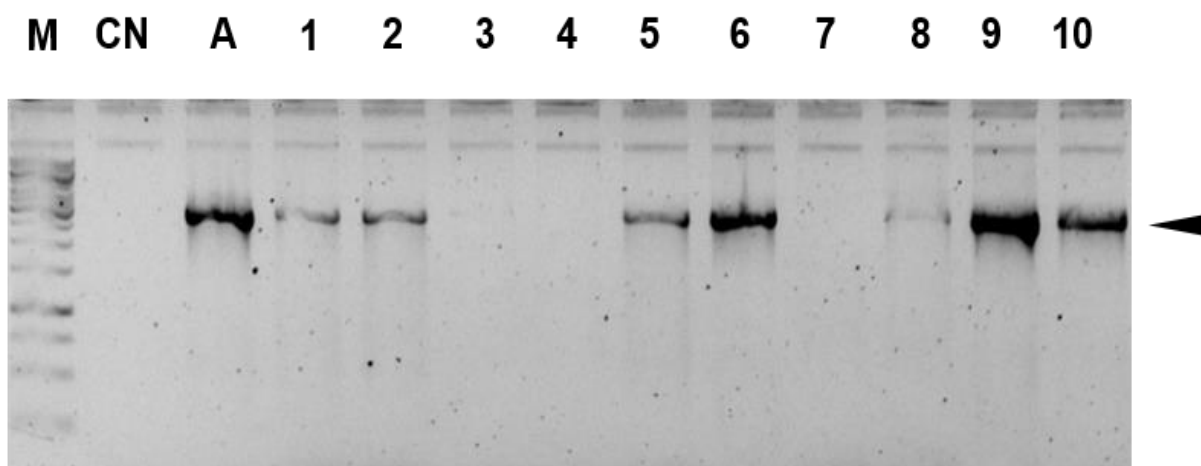


Figura 8. Eletroforograma do DNA plasmidial extraído de alguns clones para confirmar a clonagem da construção pET28-CB10 80.2961 que apresenta tamanho de 2777 pb (\blacktriangleleft) (**M**) Marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Fermentas); (**CN**) Controle negativo; canaleta (**A**) Amplificação por PCR do DNA genômico. Canaletas: 1-10 amplificação por PCR dos clones com a construção pET28-CB10 80.2961.

3.4. Expressão enzimática

Conforme pode ser observado nas Figuras 9 e 10, foi possível obter a expressão para a enzima PL 8 em vetor pet 28^a do clone 9, que foi utilizado, em duas temperaturas, 30 °C e 37 °C e diferentes concentrações de IPTG,

De acordo com a análise teórica obtida no programa ProtParam, a enzima obtida a partir da ORF CB10 80.2961 possui tamanho molecular de aproximadamente 106 kDa.

Para super expressão e extração da proteína foi escolhida a concentração de 0,4 mM de IPTG, após 22 horas de indução a uma temperatura de 37 °C, como pode ser observada na Figura 11.

Como pode ser observado nas Figuras 9, 10 e 11 houve a expressão da enzima de interesse, solúvel nos extratos proteicos e uma parte insolúvel no “pellet”. Uma análise da sequência PL 8 em suas extremidades foi possível verificar que a região N-terminal não apresenta peptídeo sinal, o qual devido a suas características frequentemente hidrofóbicas e presença de sítio para proteólise potencialmente poderia afetar a habilidade de recuperar a proteína através da purificação em coluna de interação iônica da cauda de histidina ao níquel.

Descartada a presença de peptídeo sinal, a purificação foi realizada em diferentes concentrações de imizadol em tampão fosfato a pH 7,5, entretanto não foi possível realizar a purificação da candidata a enzima PL 8 obtida a partir da ORF CB10 80.2961 pelas metodologias utilizadas. Sendo proposta como abordagens futuras a construção de um novo vetor contendo a proteína de fusão com histidina C-terminal, utilização de outros tampões que proporcionem pH alcalino, além de outras metodologias de purificação em estado desnaturante, alternativas que visam a obtenção da enzima oriunda da ORF CB10 802961, caracterizá-la e avaliar sua aplicação em polímeros de interesse industrial

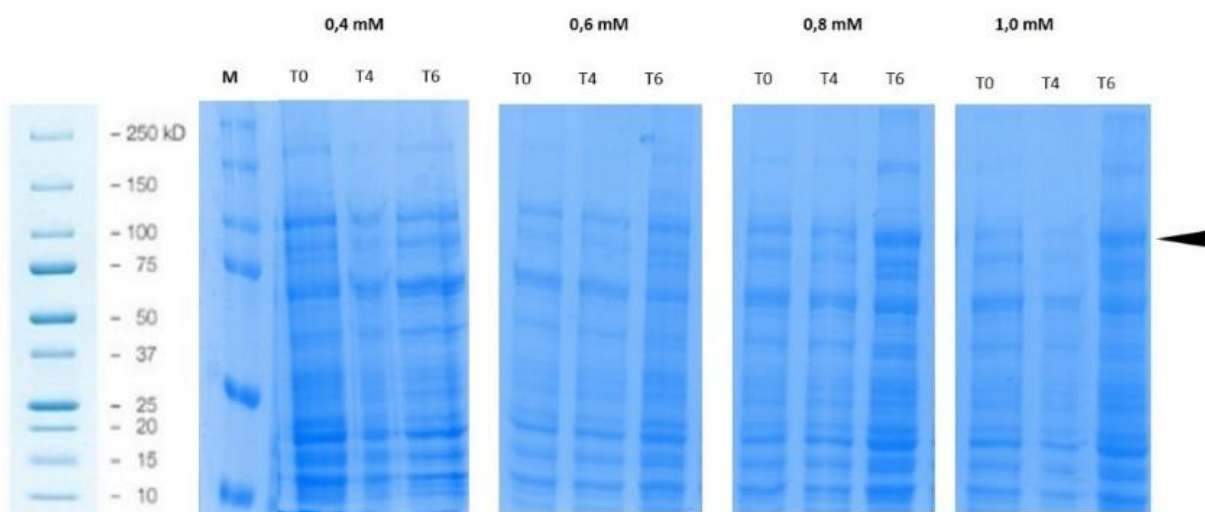


Figura 9. Eletroforograma em gel de poliacrilamida 12% com SDS (SDS-Page) do extrato celular total da bactéria *E. coli* BL21 transformada como pET28-CB10 80.2961 a 30 °C com diferentes concentrações de IPTG. Canaletas: **(M)** Marcador *Precision Plus Protein Standards color* de 250 kDa (Bio-Rad); T0 a T6: representam o tempo (h) após a indução com IPTG; A seta da direita (◄) sinaliza a banda de proteína expressa com uma massa molecular compatível.

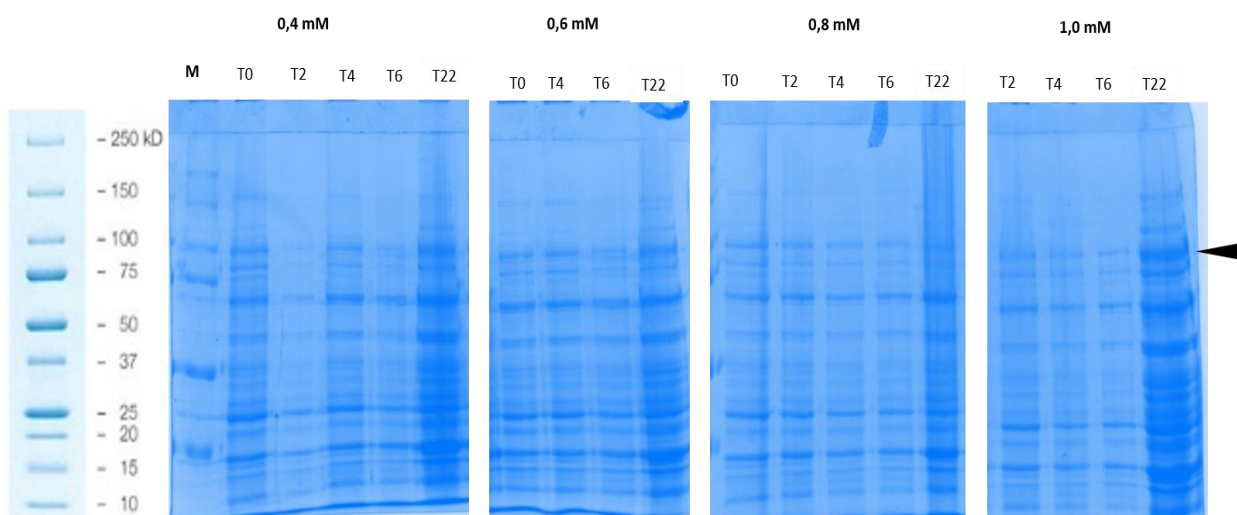


Figura 10. Eletroforograma em gel de poliacrilamida 12% com SDS (SDS-Page) do extrato celular total da bactéria *E. coli* BL21 transformada como pET28-CB10 80.2961 a 37 °C com diferentes concentrações de IPTG. Canaletas: **(M)** Marcador *Precision Plus Protein Standards color* de 250 kDa (Bio-Rad); T0 a T22: representam o tempo (h) após a indução com IPTG; A seta da direita (◄) sinaliza a banda de proteína expressa com uma massa molecular compatível.

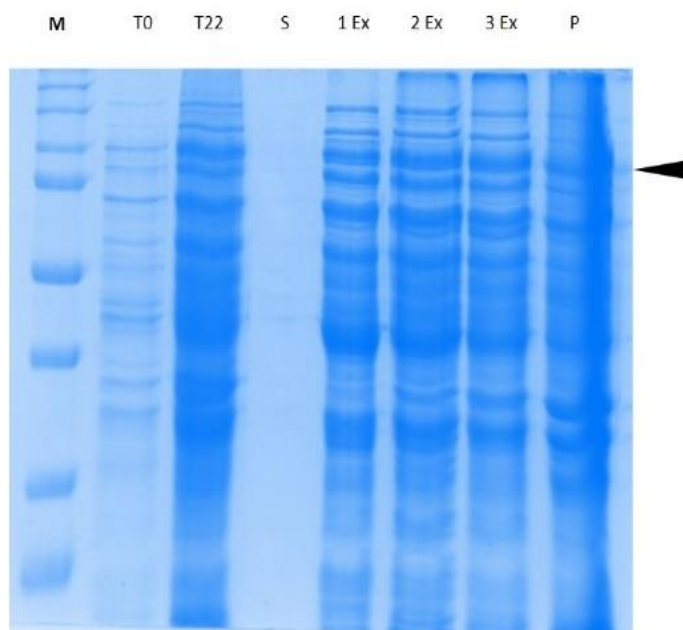


Figura 11. Eletroforograma em gel de poliacrilamida 12% com SDS (SDS-Page) da extração da PL 8 a 37 °C com 0,4 mM de IPTG. Canaletas: (M) Marcador *Precision Plus Protein Standards color* de 250 kDa (Bio-Rad); T0: antes da indução; T22: tempo (h) após a indução com IPTG; 1-3 Ex: extratos proteicos; P: pellet celular. A seta da direita (◄) sinaliza a banda de proteína expressa com uma massa molecular compatível.

4. CONCLUSÃO

Utilizando ferramentas de bioinformática para análises *in silico* foi possível prever a estrutura de uma PL membro da família 8, utilizando a modelagem proteica, identificou-se a tétrede catalítica e domínios conservados. Estes resultados indicam que a ORF CB10 80.2961 oriunda de consórcio microbiano degradador de biomassa codifica uma proteína com potencial para aplicações em polissacarídeos.

5. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D. W.; GILBERT, H. J.; BORASTON, A. B. The active site of oligogalacturonate lyase provides unique insights into cytoplasmic oligogalacturonate β -elimination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 50, p. 39029–39038, 2010.
- ADETUNJI, L. R. et al. Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 239–250, 2017.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. D. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191–197, 2014.

CASTELLANE, T. C. L.; OTOBONI, A. M. M. B.; LEMOS, E. G. DE M. Characterization of exopolysaccharides produced by Rhizobia species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1566–1575, 2015.

FERNANDES, C. C. et al. Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. February, 2018.

HASHIMOTO, W. et al. Crystal structure of *Bacillus* sp. GL1 xanthan lyase, which acts on the side chains of xanthan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7663–7673, 2003.

HUANG, W. et al. Active Site of Chondroitin AC Lyase Revealed by the Structure of Enzyme - Oligosaccharide Complexes and Mutagenesis †,‡. **Biochemistry**, v. 40, p. 2359–2372, 2001.

KISHI, L. T. et al. Draft Genome sequence of a *Chitinophaga* strain isolated from a lignocellulose biomass-degrading consortium. v. 5, n. 33, p. 4–5, 2017.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014.

MICHAUD, P. et al. Polysaccharide lyases: recent developments as biotechnological tools. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 233–266, 2003.

NANKAI, H. et al. Microbial system for polysaccharide depolymerisation: enzymatic route for xanthan depolymerisation by *Bacillus* sp. strain GL1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2520–2526, 1999.

PETRI, D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 23, 2015.

RIGDEN, D. J.; JEDRZEJAS, M. J. Structures of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase in complex with chondroitin and chondroitin sulfate disaccharides: Insights into specificity and mechanism of action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 50596–50606, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. A generalized godel of plasmid replication. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 33, p. 1135, 1989.

SIERRA, E. M. et al. Halotolerant aminopeptidase M29 from *Mesorhizobium* SEMIA 3007 with biotechnological potential and its impact on biofilm synthesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

XU, L. et al. The comparison of rheological properties of aqueous welan gum and xanthan gum solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 516–522, 2013.

CAPÍTULO 3 – Produção de Exopolissacarídeos de *Rhizobium* sp. e aplicação da enzima Xantana Liase em sua modificação estrutural

RESUMO

A maioria dos microorganismos possui a habilidade de sintetizar uma matriz constituída de substâncias poliméricas extracelulares hidratadas, denominadas de exopolissacarídeos (EPS). Nas últimas décadas, o interesse na utilização e produção de EPS é cada vez mais crescente, sendo considerada alternativa viável na substituição de polímeros mais onerosos e com propriedades menos atraentes. A ação da enzima xantana liase como ferramenta na modificação da estrutura de EPS de três estirpes de rizóbios (H152, LMG 8819 e SEMIA 4077) foram estudadas. A partir dos resultados das técnicas aplicadas neste estudo, pode-se notar que todos os polímeros são heteropolissacarídeos específicos de rizóbios nativos, sendo compostos principalmente por galactose e glicose, enquanto a goma xantana comercial teve a manose como o principal monômero. Tanto os EPS de origem rizobiana como a goma xantana tiveram suas estruturas modificadas pela ação da enzima xantana liase e remoção de grupos funcionais. O conhecimento da composição do EPS modificado agora facilitará futuras investigações relacionando a estrutura e a dinâmica do polissacarídeo frente às propriedades reológicas.

Palavras chaves: estirpes de rizóbios, EPS, Polissacarídeo Liase, Biopolímeros, Espectroscopia de Infravermelho.

1. INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são considerados excelentes macromoléculas com potencial uso em várias áreas industriais devido seu comportamento não newtoniano e alta viscosidade em meio aquoso que conferem a esses biopolímeros propriedades espessantes, bioemulsificantes (DI DONATO et al., 2016; FREITAS et al., 2014; MORETTO et al., 2015), biofloculantes (SATHIYANARAYANAN; SEGHAL KIRAN; SELVIN, 2013), agentes antibiofilme (RENDUELES; KAPLAN; GHIGO, 2013) antioxidantes e imunomoduladores (LIU et al., 2011; VIDHYALAKSHMI et al., 2016), nanomaterial antimicrobiano (SIVASANKAR et al., 2018) e estabilizante de enzimas (OSIŃSKA-JAROSZUK et al., 2018).

Podem ser formados por um único monossacarídeo conhecidos como homopolissacarídeos, enquanto que os heteropolissacarídeos são aqueles formados por distintos oligossacarídeos (DONOT et al., 2012). Dentre os mais explorados são aqueles produzidos pelas bactérias como a *Xanthomonas campestris* (xantana) (PETRI, 2015; SUTHERLAND, 2001b), *Pseudomonas* e *Azotobacter* (alginato bacteriano) (MALEKI et al., 2016; MÜLLER; SANTOS; BRIGIDO, 2011; NISHITANI et al., 2012), *Sphingomonas* (gelana) (NAMPOOTHIRI et al., 2003), *Lactobacillus*, e *Leuconostoc* (dextrana) (LIU et al., 2011; NÁCHER-VÁZQUEZ et al., 2017).

A composição química, viscosidade e peso molecular de muitos EPS produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium* sp. já foi elucidada e podem ser constituídos de diferentes unidades repetidas de monossacarídeos como: manose, ramnose, glicose, galactose, ácido glicurônico, galacturônico e glicurônico e resíduos de xilose (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014; CASTELLANE et al., 2015, 2017; MORETTO et al., 2015; STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012; ZHOU et al., 2014).

Os polímeros de baixo peso molecular se destacam devido suas propriedades biológicas melhoradas, a exemplo os oligossacarídeos de quitosana como atividade antitumoral (SALAH et al., 2013; ZOU et al., 2016) e derivados de EPS marinho sulfatado produzido por *Alteromonas* inibiram *in vitro* a migração de células cancerígenas de osteossarcoma (HEYMANN et al., 2016).

Dentre os métodos existentes atualmente utilizados na modificação de EPS e obtenção de polímeros de baixo peso molecular, o uso de enzimas se comparado aos

métodos físicos e químicos, direciona o local da modificação, se tem controle da reação e não são gerados resíduos (RIGOUIN et al., 2009; ZOU et al., 2016).

A aplicação de Polissacarídeo Liases, por exemplo, xantana liase (EC 4.2.2.12), na despolimerização, de forma específica em goma xantana, é uma prática fácil e direcionada para a obtenção de EPS rizobianos com novas propriedades e que já foi avaliado em goma xantana, que possui similar composição química de monômeros conectados através de ligações glicosídicas (KOOL, 2014; MILAS; RINAUDO; TINLAND, 1986; NANKAI et al., 1999; PETRI, 2015).

A xantana liase, considerada uma das principais enzimas responsáveis pela despolimerização da goma xantana, apresenta atividade específica neste substrato atuando em sua cadeia lateral, entre a manose e o ácido glicurônico. Existem três enzimas que foram isoladas e caracterizadas de *Paenibacillus alginolyticus* (RUIJSSENAARS; HARTMANS; VERDOES, 2000), de *Microbacterium* sp. (YANG et al., 2014) e a comercial recombinante isolada de *Bacillus* sp. GL1 (HASHIMOTO et al., 1998; MARUYAMA et al., 2005).

No entanto, o uso dessa enzima, isoladas de outros microrganismos, aplicada ao tratamento de EPS rizobiano é uma proposta pioneira para obtenção de biopolímeros modificados, liberando moléculas com propriedades biológicas possivelmente melhoradas, sendo assim, este trabalho teve como objetivo aplicação de xantana liase comercial e avaliação na modificação de EPS produzidos por estirpes de *Rhizobium* sp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do crescimento e produção de EPS pelas estirpes de *Rhizobium* sp.

2.1.1. Estirpes, estoque e meios de cultivo

Neste estudo foram utilizadas três estirpes, *R. leguminosarum* bv. *plaseoli* (LMG 8819) obtida no *Laboratorium voor Microbiologie da Universiteit Gent* (Bélgica), *R. giardini* bv. *giardini* (H152) adquirida do *Laboratoire de Microbiologie de Soils* –

INRA (França) e *R. tropici* (SEMIA 4077) pertencente a Seção de Microbiologia Agrícola da Secretária da Agricultura do Rio Grande do Sul, foi obtida na Fepagro. Todas foram cultivadas e fazem parte da coleção do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP).

A partir do estoque as bactérias foram cultivadas em meio sólido YMA (VINCENT, 1970) e incubadas a 28 ± 2 °C durante 48 horas. Uma amostra foi retirada com uma alça e inoculada em 300 mL de YMB (VINCENT, 1970), com agitação de 150 rpm a 28 ± 2 °C durante 24 h. Uma alíquota de 1 mL do cultivo em meio YMB foi inoculada em 100 mL de meio líquido PGY com agitação de 150 rpm a 28 ± 2 °C durante 24 h para a estirpe SEMIA 4077 e 48 h para as estirpes LMG 8819 e H152. A Densidade Ótica (DO) foi medida em biofotômetro (Plus Eppendorf), no comprimento de onda 600 nm. Em seguida foi retirada uma alíquota de 800 µL deste meio de cultivo, adicionada em 200 µL de glicerol autoclavado, congeladas rapidamente com nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C, sendo esse o estoque definitivo.

As bactérias retiradas do estoque foram cultivadas em meio PGY composto em g L⁻¹: 1,4 K₂HPO₄; 1,0 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄.7 H₂O; 10,0 de glicerol; 3,0 de extrato de levedura; pH 6,9) obtendo-se o pré-inóculo, que foi adicionado 10% (v/v) ao meio líquido PSY em g L⁻¹: 1,2 K₂HPO₄; 0,8 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄.7 H₂O; 30,0 de sacarose; 1,0 de extrato de levedura em pH 6,9), sua composição detalhada e fórmula estão sob restrição de patente (registro PI0304053-4).

2.1.2. Pré-Inóculo e Condições de Cultivo

Os pré-inóculos foram preparados, em duplicata a partir do estoque de cada bactéria, e inoculadas concentrações de 200 a 300 µL, para atingir uma DO₆₀₀ de 0,03 a 0,05, em 50 mL de meio líquido contendo glicerol (PGYL). Para o estudo do desenvolvimento celular do pré-inóculo neste meio de cultura, foi medida a DO em tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação, com agitação de 140 rpm e 28 ± 2 °C.

2.1.3. Caracterização Fenotípica

Uma alíquota de 5 μ L de pré-inóculo em meio PGYL, conforme descrito no item 2.1.2., foi inoculada em placa de Petri contendo meio sólido contendo sacarose (PSYA) e incubadas a 28 ± 2 °C. Após 96 horas de cultivo as placas foram fotografadas.

2.1.4. Curva de Crescimento Celular

Para o estudo do crescimento celular em meio líquido contendo sacarose (PSYL), onde foram utilizados pré-inóculos cultivados em meio PGYL. Foi estabelecido que o tempo de cultivo em que as estirpes atingiram o pico da fase log (DO ~ 2.0), de 24 h para a estirpe SEMIA 4077 e 48 horas para as estirpes LMG 8819 e H152. Alíquotas de 10% (v/v) do pré-inóculo foram transferidas para frascos tipos erlenmeyer contendo 100 mL meio PSYL e incubadas com agitação a 140 rpm, 28 ± 2 °C, em triplicata. O crescimento microbiano foi avaliado mediante determinação da densidade óptica (DO), medida nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de incubação. Além disso, cada amostra foi analisada quanto ao pH e pela contagem em placas de petri de Unidade Formadora de Colônias em UFC mL⁻¹.

2.1.5. Quantificação Biomassa

As culturas a partir de 24 h foram submetidas à centrifugação (10621 g, a 4 °C, por 40 minutos), separando as células do sobrenadante até 144 h. As células foram lavadas com água ultrapura, centrifugadas novamente e secas em estufa a 50 °C até obterem o peso constante, aproximadamente 5 dias. A biomassa seca em g L⁻¹ foi avaliada por gravimetria, através de sua pesagem da biomassa celular produzida em diferentes tempos.

2.1.6. Produção e extração de EPS

Para a avaliação da produção de EPS foi escolhido o tempo de 96 horas de cultivo. Para isto, o pré-inóculo foi obtido conforme descrito no item 2.1.2. Posteriormente, alíquotas de 10% (v/v) foram transferidas para erlenmeyer de 1000 mL contendo 50 mL do meio líquido PSYL, incubadas por 96 h a 140 rpm e $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (CASTELLANE et al., 2017). O cultivo foi submetido à centrifugação a 2838 g (Centrifuga Sorvall RCSC) a 4°C por 30 minutos (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014).

Ao sobrenadante, resultante da centrifugação foi adicionado álcool etílico 96° gelado (1:3 v/v) para a precipitação do EPS. A mistura foi armazenada sob refrigeração a 10°C durante 24 h. Após esse período a mistura foi centrifugada (2838 g), a 4°C , por 30 min) para a recuperação do EPS. O EPS precipitado foi lavado uma vez com álcool etílico (80%) e durante 4 dias foram secos em temperatura ambiente (30°C). O EPS foi pesado em balança analítica de precisão, onde o resultado foi apresentado em gramas de EPS por litro de cultura (g L^{-1}), e foram armazenados em temperatura ambiente para as análises posteriores. Para a análise de atividade enzimática, o EPS foi dialisado em membrana de celulose (Sigma) durante 48 horas a 4°C em água ultrapura.

2.2. Efeito da enzima xantana liase na estrutura de EPS rizobianos

2.2.1. Preparo da enzima xantana liase comercial e dos EPS

A enzima comercial Xantana Liase isolada de *Bacillus* GL1 (Lot 110201b), foi diluída em tampão HEPES (100mM; pH 6) adicionado $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de Albumina de Soro Bovina (BSA) de acordo com recomendações do fabricante. A enzima contendo $3,2 \text{ mg mL}^{-1}$ foi preparada em diluições seriadas 1:100, 1:10 e 1:1, de modo que foi utilizada na reação a última diluição com 1 U. Os EPS secos e a goma xantana (como controle) (Sigma) foram diluídos em tampão HEPES (100mM; pH 6,0) em uma concentração de 13 mg.mL^{-1} (HASHIMOTO et al., 1998).

2.2.1.1. Ensaio enzimático da xantana liase e tratamento dos EPS

A cada reação foi utilizado 800 µL do tampão HEPES (100 mM; pH 6,0), 200 µL dos EPS e goma xantana e 100 µL da enzima em gelo. Essa mistura foi homogeneizada cuidadosamente e incubada a 40°C durante 10 minutos (HASHIMOTO et al., 1998; YANG et al., 2014). Os tempos de incubação 30 min, 24 h, 48 h e 72 h também foram avaliados. A atividade enzimática foi determinada através do monitoramento do aumento da absorbância a 232 nm, decorrente da ligação dupla no produto (HASHIMOTO et al., 1998). Os resultados foram expressos em atividade relativa (%) da absorbância em relação ao substrato específico, a goma xantana no tempo 10 min que foi considerada 100%.

2.3.1. Composição e estrutura dos EPS nativos e tratados com xantana liase

Uma vez que, a goma xantana é considerada um substrato padrão para ensaio de atividade da enzima xantana liase, deste modo ela também foi utilizada como controle para as demais análises: composição química por cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase reversa (CLAE) e estrutura parcial dos EPS nativos e modificados por espectroscopias de infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de ¹³C).

2.3.1.1. Composição em monossacarídeo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação da composição química do EPS nativo e modificado foi realizada por CLAE de fase reversa, usando o método de identificação química de monômero de 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP) descrito (FU; O'NEILL, 1995) e modificado (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014).

Os monossacarídeos marcados com PMP foram analisados usando as condições descritas (CASTELLANE; LEMOS, 2007) e um sistema de HPLC equipado com um espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu, modelo SPD-M10A). Também foram marcadas com PMP e analisadas amostras de EPS modificados sem a hidrólise ácida e básica. O comprimento de onda de detecção foi de 245 nm. Os monossacarídeos glicose, manose, ramnose, galactose, ácido glicurônico e ácido galacturônico foram

utilizados como padrões nas seguintes concentrações: 12,50, 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O volume de cada amostra injetada no espectrofotômetro foi de 20 μL .

2.3.1.2. Análise espectroscópica de FTIR

O infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é um instrumento capaz de detectar os grupos funcionais de EPS purificados. Amostras em formato de pastilhas foram preparadas para análise de infravermelho EPS com 100 mg de brometo de potássio seco, e a mistura foi prensada em um molde de 16 mm de diâmetro. Os espectros de FTIR foram registados num espectrômetro Paragon 1000, Perkin-Elmer ($4\ 000\text{-}400\ \text{cm}^{-1}$, $2\ \text{cm}^{-1}$ de resolução espectral e 32 varrimentos). Os espectros foram corrigidos da linha de base de 3.900 para $2.800\ \text{cm}^{-1}$ e de 1.800 para $900\ \text{cm}^{-1}$ e normalizados na intensidade de pico de 1.050 conforme descrito (CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015; CASTELLANE et al., 2017).

2.3.1.3. Análise espectroscópica de RMN

Os espectros de RMN ^{13}C de estado sólido foram adquiridos utilizando um espectrômetro Varian Inova 400 a 9,4 T utilizando uma sequência de *Spinning* de Amostra de Ângulo Mágico de Polarização de Amplitude Variável (VACP-MAS). O pulso $1\text{H } \pi / 2$ foi $\text{pw} = 4\ \text{ms}$; tempo de contato, $\text{ct} = 1\ \text{ms}$; tempo de aquisição, $\text{em} = 13,8\ \text{ms}$; tempo de reciclagem, $\text{rt} = 3\ \text{s}$; largura de banda de desacoplamento, $\text{db} = 60\ \text{KHz}$; largura espectral, $\text{sw} = 40\ \text{KHz}$. As amostras (200 mg) foram empacotadas em um rotor de zircônia de 5 mm e giradas em um ângulo mágico a 9 KHz. Os desvios químicos são indicados em ppm, e o número de varreduras acumuladas era 10000, filtrado por uma função exponencial (fator de amplificação de linha de 20 Hz).

2.4. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada usando instrumentos DSC 2910 TA e a perda de massa foi registrada em uma faixa de temperatura de 25 a 700 $^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. As análises das amostras de EPS nativos e

tratados com a enzima xantana liase foram realizadas em atmosfera de nitrogênio a vazão de 60 mL/min de acordo com (DUTA et al., 2004) com modificações.

2.5. Análises Estatísticas

Os experimentos neste trabalho foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em valores médios. As diferenças nas médias de produção de EPS e Biomassa entre as diferentes estirpes foram submetidas à análise de variância e aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização fenotípica das estirpes

As características morfológicas das estirpes em estudo estão apresentadas na Figura 1, onde verificou-se fenótipos semelhantes entre as três estirpes, apresentando colônias redondas com diâmetros variando de 2 a 4 mm e boa produção de goma, quando cultivadas em meio PSYA, contendo sacarose, como fonte de carbono. Entretanto, mesmo que cultivadas nas mesmas condições de fonte de carbono e temperatura, foi possível observar uma pequena diferença entre as bactérias, uma vez que duas estirpes, LMG 8819 e H152, apresentaram maior diâmetro da colônia, cor branca translúcida, consistência mucoide e viscosa. Enquanto que, a estirpe SEMIA 4077 apresentou menor diâmetro da colônia, cor translúcida, pouco mucosa e viscosa após 96 horas de inoculação em meio PSYA.

Em estudos de caracterização morfológica de rizóbios, utilizaram *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a estirpe BR 10052 como referência, onde foi isolado em meio YMA e também apresentou as mesmas características das estirpes neste estudo (CHAGAS; DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2010).

Muitos autores descrevem que a característica de alta produção de muco está relacionada ao desenvolvimento de mecanismo de adaptação na superfície das células e sobrevivência a condições edafoclimáticas, como por exemplo, a dessecação (BOURASSA et al., 2017). Tais adaptações tratam-se da síntese de

componentes presentes no invólucro da célula bacteriana responsáveis pelos mecanismos de resistência a fatores de estresse e envolvem a expressão de múltiplos genes (BOURASSA et al., 2017). Dentre estes temos os EPS, que podem formar uma capa protetora à colônia de rizóbio no ambiente natural. Deste modo a bactéria produz essa substância com a finalidade de proteger a planta destes estresses, beneficiando o seu crescimento e desenvolvimento, principalmente em solos salinos (SKORUPSKA et al., 2006). No entanto, neste trabalho todas as estirpes (100%) apresentaram tamanho da colônia maior que 2 mm e produção de muco variando de moderado a abundante. A partir do cultivo em meio contendo alguma fonte de carbono é possível a identificação de bactérias produtoras de goma (CHAGAS; DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2010).

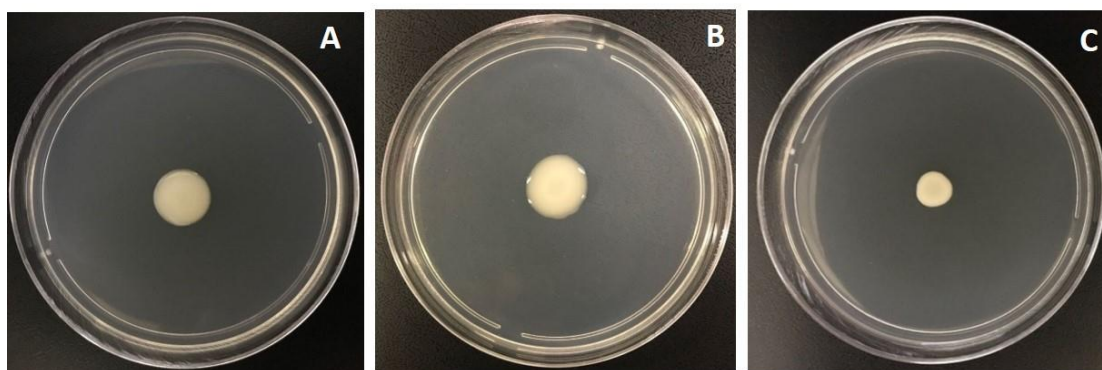


Figura. 1. Fenótipos de *Rhizobium* sp. cultivados em placas de Petri com meio PSYA, contendo sacarose como única fonte de carbono. As estirpes produtoras de exopolissacarídeos foram cultivadas até uma DO600 ~ 1.0 em meio PGYL e, posteriormente 5 μ L de cultura foram inoculados em placas com meio sólido PSY. As placas foram incubadas a 28 °C durante 4 dias. Onde: (A) H152, (B) LMG 8819 e (C) SEMIA 4077.

3.2. Curvas de Crescimento

Conforme podemos observar na Figura 2, a estirpe SEMIA 4077, logo após a inoculação em novo meio de cultivo (PSYL) se divide imediatamente, ou seja, o cultivo se ajustou ao novo ambiente (fase lag) nas primeiras horas. Enquanto que, de acordo com os dados da DO, no tempo 0 as estirpes H152 (Figura. 2. A) e LMG 8819 (Figura.

2. B) e iniciaram a fase log a partir de 24 h, demonstrando que requerem um intervalo de tempo para sem adaptarem ao novo meio, e chegaram a fase estacionária em 72 h, com medidas em 6,91 e 5,59, respectivamente, superiores a densidade de SEMIA 4077 de 2,79.

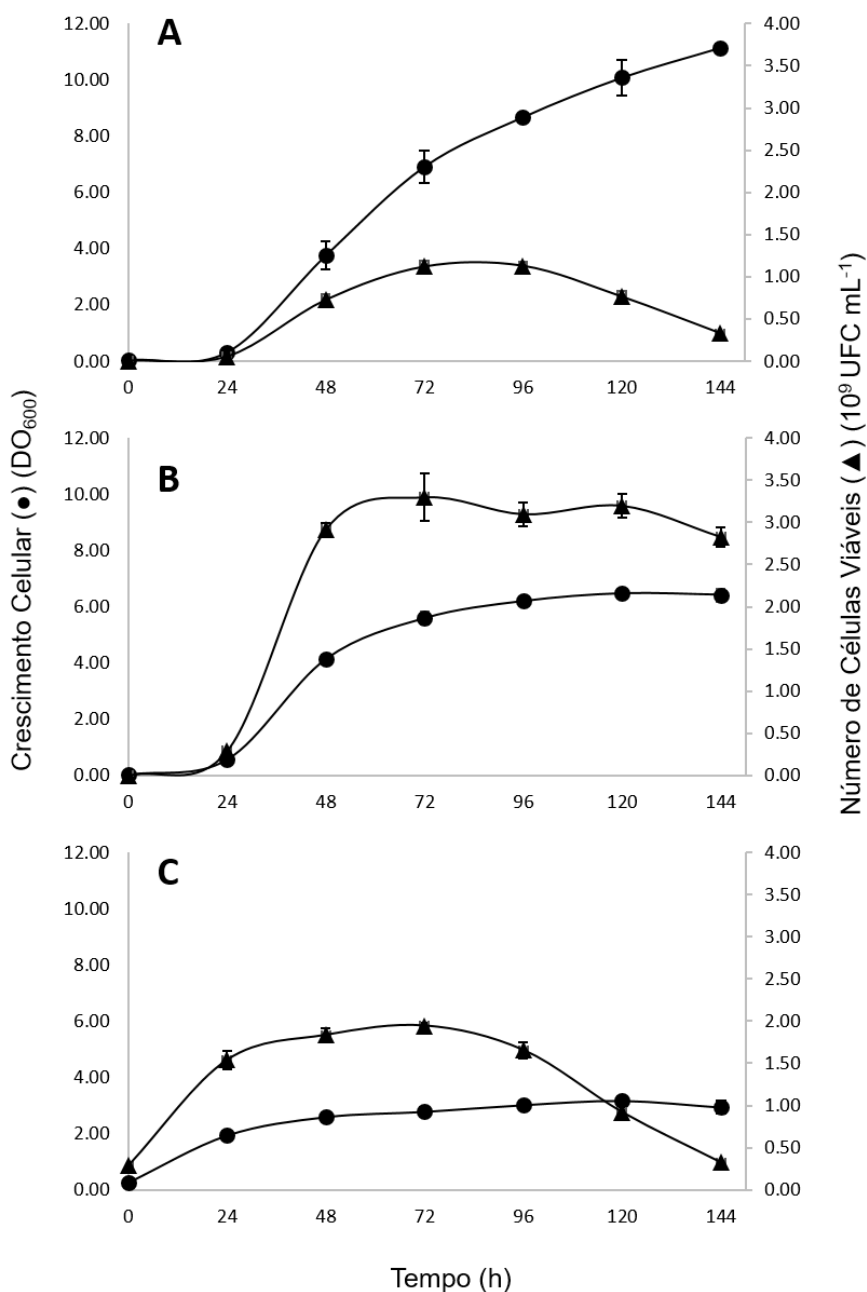


Figura. 2. Curva de Crescimento DO₆₀₀ (●) e Número de Células Viáveis em 10⁹ UFC mL⁻¹ (▲) das estirpes (A) H152, (B) LMG 8819, e (C) SEMIA 4077 em meio PSYL (pH 6.9) a 28 ± 2 °C durante 144 h de cultivo sob agitação.

Em relação à estirpe H152, esta apresentou comportamento de crescimento logarítmico até o final do experimento, contudo ao analisarmos a contagem de células viáveis o seu crescimento inicia a fase estacionária em 48 h e declínio celular em 96 h. Nesta fase final do crescimento bacteriano ocorre uma escassez de nutrientes e a célula inicia o processo de liberação de enzimas líticas, podendo ocasionar a despolimerização de EPS, consequentemente, aumentando a turbidez no meio (VIDHYALAKSHMI et al., 2016).

Em estudos avaliando diferentes fontes de carbono em *R. tropici* utilizando sacarose, aumentos na DO continuaram por várias horas além da fase exponencial de crescimento, superior a 10, após 70 horas de cultivo (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012). Entretanto, como ressaltado acima, a DO e o número de células viáveis (UFC) não são correspondentes. Dados similares foram encontrados em nosso estudo, em que a partir de 72 h, a estirpe H152 apresentou aumento de DO, com valor de 6.91 atingindo 11,14 após 144 h de inoculação e UFC de $1,1 \times 10^9$ e $0,33 \times 10^9$.

A estirpe LMG 8819 (Figura 2. B) apresentou maior número de células viáveis de 3.3×10^9 UFC mL⁻¹ em 72 h de cultivo, atingindo o platô da fase logarítmica, diferindo das outras estirpes no mesmo intervalo de tempo, apesar de iniciar o crescimento no tempo 0 com o menor valor de $1,3 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, valor esse diferindo das demais estirpes, o que pode ser devido a eficiência metabólica na conversão de sacarose dessa estirpe em componentes celulares.

Em experimento avaliando o número de células viáveis em diferentes fontes de carbono após 96 h de cultivo, foram obtidos melhores resultados em glicose e glicerol para *R. tropici* e *R. freirei* que cresceu em todas as fontes de carbono testadas e utilizando sacarose foram obtidas contagens em 96 h de até $1,5 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ em *R. tropici* e $7,78 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ em *R. freirei* que são estirpes padrões usadas na inoculação de leguminosas (GUNDI et al., 2018), enquanto que a estirpe SEMIA 4077 em apenas 24 h apresentou valor superior de $1,54 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ (Figura 2C).

3.3. Biomassa e pH

O meio PSY é um meio que utiliza a sacarose como fonte de carbono e apresenta pH inicial 6,9. De acordo com as Figura 3. as estirpes H152 e LMG 8819, apresentaram perfil ácido (pH 5,74 e 5,12), respectivamente ao longo de 144 h, enquanto, a estirpe SEMIA 4077 (Figura 3. C) manteve-se próximo a neutralidade, o pH diminuiu de $7,01 \pm 0,05$ com a adição do pré-inóculo (0 h) e chegou a 144 h com $7,88 \pm 0,01$.

Na fase final do crescimento bacteriano podem ser liberados metabólitos, como os grupos acetil, piruvil e succinil no meio extracelular através de ação de enzimas despolimerizantes e provavelmente são responsáveis pelo caráter ácido ao cultivo (JANCZAREK, 2011; SKORUPSKA et al., 2006).

Em estudos de crescimento celular em diferentes fontes de carbono de *R. radiobacter* SZ4S7S14, o pH inicial partiu de 7,3 e após 72 h de cultivo da cepa a 30 °C e 150 rpm caiu para 5,1 (RASULOV et al., 2017), enquanto que, nesse estudo as estirpes LMG 8819 e H152 atingiram pH 5.12 e 5.74 em 144 h.

As estirpes H152 (Figura 3. A) e SEMIA 4077 (Figura. 3. C) atingiram a máxima produção de biomassa em 120 h com $2,43 \pm 0,52 \text{ g L}^{-1}$ e $2,58 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Enquanto que a estirpe LMG 8819 chegou a $1,640 \text{ g L}^{-1}$ em 96 h. Bactérias do mesmo gênero podem acumular biomassa de forma distinta quando crescidas em diferentes fontes de carbono o que é diretamente influenciado pelo seu metabolismo. No estudo utilizando a bactéria *Bacillus licheniformis*, que foi cultivada em meios distintos, um contendo minerais e extrato de levedura e ao outro foi acrescentado succinato, o efeito da adição de succinato foi a redução do tempo em 100 horas para atingir a máxima produção de biomassa de $90,44 \text{ g L}^{-1}$ (MALICK et al., 2017).

Em estudos avaliando-se efeitos de pH e temperatura na produção de biomassa e EPS de *Enterobacter* A47, foi observado que a síntese máxima de polímero foi a 30 °C na faixa de pH 5.6 a 7.0 enquanto temperaturas acima ou abaixo diminuíram a produção de EPS independente do pH (TORRES et al., 2012). No entanto em *R. radiobacter* a alteração do pH, abaixo de 3,5, foi crucial tanto no rendimento da biomassa quanto na obtenção de EPS como biofloculante (RASULOV

et al., 2017), enquanto em nossos estudos a máxima obtenção de biomassa ocorreu em uma faixa de pH entre 6 e 8.

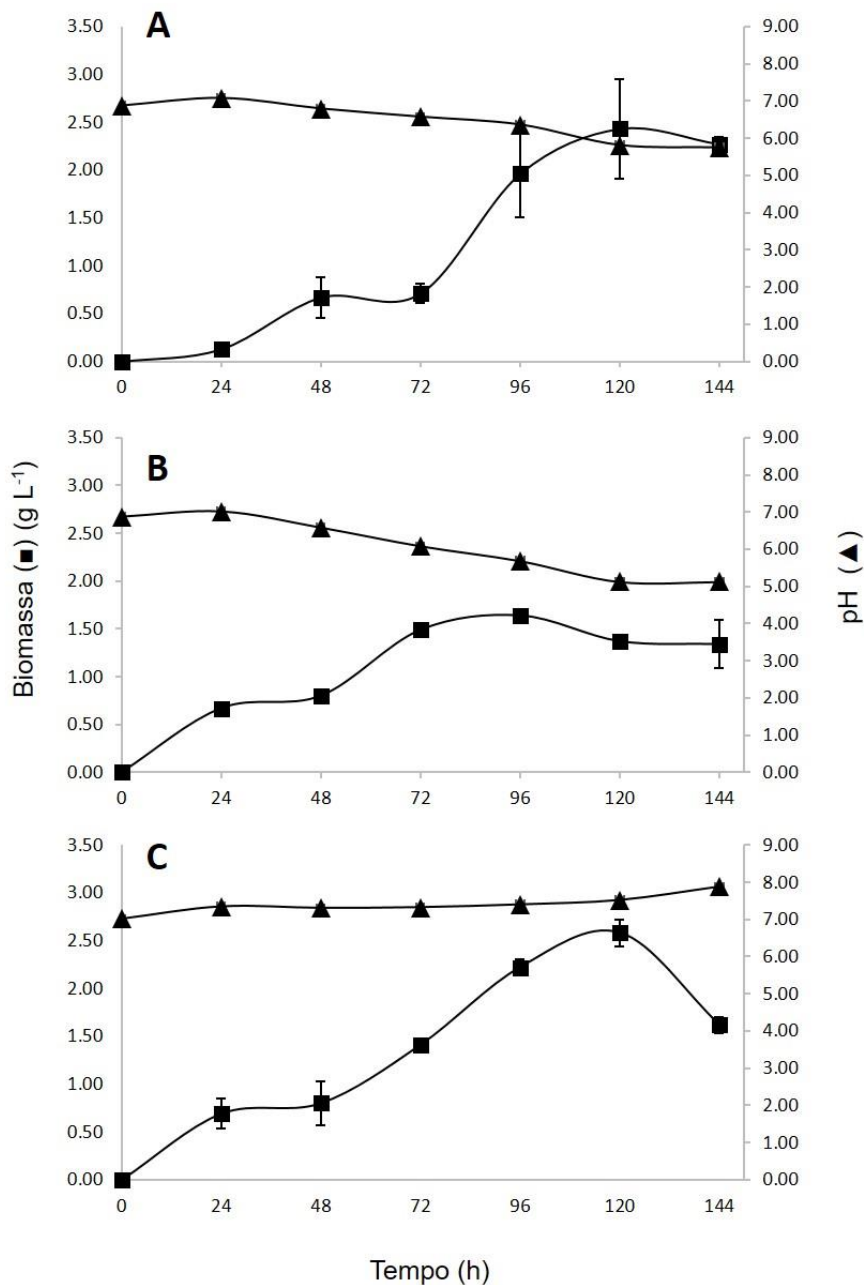


Figura 3. Produção de biomassa (■) em g L⁻¹ e pH (▲) das estirpes de *Rhizobium* sp. (A) H152, (B) LMG 8819 e (C) SEMIA 4077 em meio PSYL (pH 6,9) a 28 ± 2 °C durante 144 h de cultivo sob agitação.

3.4. Produção de EPS

Os resultados obtidos indicaram que a produtividade e o rendimento de EPS foram satisfatórios quando a sacarose foi utilizada como fonte de carbono (Tabela 1).

No presente estudo, as estirpes LMG 8819 e H152 produziram 2,04 e 2,01 g L⁻¹ EPS após 96 h de cultivo, respectivamente, não diferindo estatisticamente como também a eficiência relativa na produção de EPS, 1,24 e 1,03 respectivamente. Isto é significativamente alto quando comparado à estirpe SEMIA 4077, onde a produtividade foi de apenas 1,06 g L⁻¹ EPS e eficiência 0,47. Em outros estudos a produção de EPS foi avaliada em espécies de *Rhizobium* sp. que produziram entre 0,098 e 0,145 g.L⁻¹, valores muito abaixo daqueles encontrados neste estudo (FERNANDES JÚNIOR et al., 2010).

Castellane, Otoboni e Lemos (2015) avaliaram o acúmulo de polímero da estirpe *R. giardini* bv. *giardini* (H152) sendo utilizado o meio RDM (BISHOP et al., 1976) durante 144 h, 160 rpm e 30 °C, a produção de EPS foi de 1,33 g.L⁻¹, inferior ao encontrado neste estudo com menor tempo, demonstrando assim que o meio PSYL favoreceu o aumento da produção de polímero desta estirpe.

Tabela 1. Produção de exopolissacarídeos (EPS) e de biomassa celular em meio PSYL após o cultivo 96 h de diferentes estirpes de *Rhizobium* sp. e eficiência relativa de produção de EPS.*

Estirpes	pH ^f	Produção (g L ⁻¹)		Eficiência Relativa (EPS/Biomassa)
		EPS	Biomassa	
H152	6.36 b	2.01 a	1.96 a	1.03 a
LMG 8819	5.68 a	2.04 a	1.64 a	1.24 a
SEMIA 4077	7.39 c	1.06 b	2.22 a	0.47 b

pH^f = pH final (pH inicial 6.9); * Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No entanto, a produção de EPS obtida após 96 h de cultivo foi sugerida devido a estudos anteriores em meio PSYL, o mesmo deste estudo com *R. tropici* estirpe SEMIA 4080, o melhor tempo de produção, em que não ocorre lise celular e não são

liberadas para o meio enzimas despolimerizantes que podem afetar a estrutura do EPS (CASTELLANE et al., 2017). A diminuição na produção de EPS durante a fase estacionária também foi observado em *Bacillus circulans*, onde após em 96 h a produção do polímero iniciou declínio acentuado, isto foi atribuído à produção de glicohidrolases por esse microrganismo (VIDHYALAKSHMI et al., 2016).

Em estudos anteriores a obtenção de EPS da estirpe SEMIA 4077 foi realizada em 72 h e 144 h e produziu maiores quantidades do polímero, 7,45 g.L⁻¹ e 8,10 g.L⁻¹, respectivamente (CASTELLANE et al., 2015), superiores aos encontrados neste estudo, contudo nosso objetivo foi comparar a produção de polímero sob as mesmas condições de diferentes espécies além de produzir EPS livre de células e proteínas para que não interferir nas análises de espectroscopia.

Uma vez que meios contendo elevado teor de fonte de carbono e baixo teor de nitrogênio favorecem o acúmulo de polímero (SUTHERLAND, 2001a). Onde além de escolher fontes de carbono que favoreçam bom rendimento na produção de EPS estas devem apresentar baixo custo na sua obtenção, logo se faz necessário identificar e selecionar estirpes com boa produtividade e eficientes na conversão de carbono em polímeros.

3.5. Atividade enzimática

3.5.1. Atividade da enzima xantana liase comercial

Após 10 minutos de incubação de amostras de EPS (goma xantana, EPS H152, EPS 8819 e EPS 4077), como substratos com a enzima xantana liase recombinante a uma temperatura de 40 °C foi possível quantificar a atividade relativa devido à despolimerização detectada através de duplas ligações, que aparecem nos produtos de degradação. Conforme observamos na Figura 4, no ensaio com a amostra EPS H152, como substrato, a atividade relativa foi 22,8% superior ao controle com goma xantana nativa e mantendo esse perfil até o final do experimento com mais tempo de incubação seguindo as mesmas condições. Enquanto que o EPS 8819 apresentou superioridade apenas após 72 h de incubação em condições ótimas com 125,3%, superior ao substrato padrão.

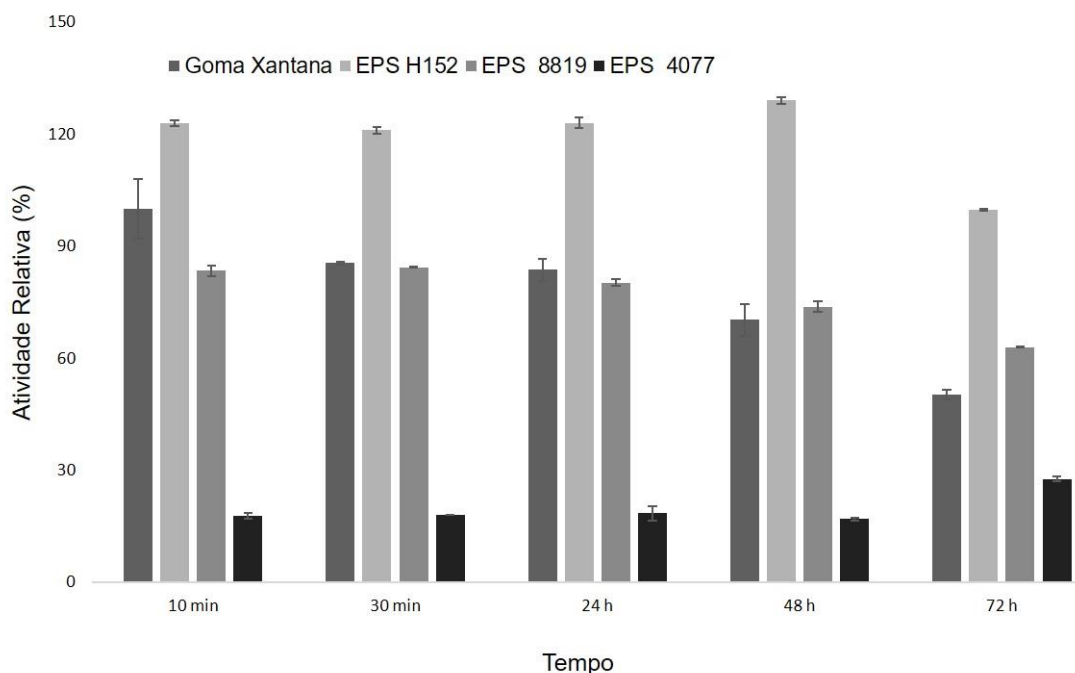


Figura 4. Atividade Relativa (%) da xantana liase em seu substrato padrão, a goma xantana (considerada 100%), em comparação com EPS produzidos por diferentes estirpes de *Rhizobium* sp. na absorbância a 232 nm em diferentes tempos.

É possível a utilização de substratos alternativos em estudos envolvendo a atividade enzimática (GOMES-PEPE et al., 2016; NANKAI et al., 1999), atualmente têm-se buscado por enzimas que utilizam vários substratos. Yang e colaboradores (2014) avaliaram a atividade de uma xantana liase isolada de *Microbacterium* sp. XT11, como substratos alternativos a xantana nativa (considerada 100%), xantana desprovida de acetato, desprovida de piruvato e desprovida de ambos os grupos funcionais (acetato e piruvato) (Tabela 2.), os resultados evidenciaram que todos os tratamentos foram inferiores ao substrato padrão, goma xantana nativa devido a retirada do sítio de ação da enzima. O que difere do nosso estudo, em que o exopolissacarídeo rizobiano EPS H52 foi superior, atingindo 122,8% em comparação com a xantana liase nativa após 10 minutos de tratamento enzimático.

Tabela. 2. Comparação da atividade relativa (%) da enzima xantana liase isolada de *Microbacterium* sp. (YANG et al., 2014) com diferentes substratos de xantana em comparação a enzima xantana liase comercial utilizando como substrato EPS produzidos por estirpes de *Rhizobium* sp.

Substrato	Condições	Atividade Relativa (%)	Referência
Xantana Nativa		100	
Xantana sem acetato		94,5	
Xantana sem piruvato	Fosfato de Potássio 100 mM pH 6,0 40 °C/10 min	48,8	(YANG et al., 2014)
Xantana sem acetato/piruvato		47,9	
EPS H152	HEPES 100 mM	122,8	
EPS 8819	pH 6,0	83,4	Neste estudo
EPS 4077	40 °C/10 min	17,7	

3.6. Características químicas e estruturais dos EPS nativos e modificados com xantana liase

3.6.1. Composição de monossacarídeos

Através das análises por CLAE de fase reversa verificou-se a presença de glicose, galactose, manose, ramnose, ácido galacturônico e ácido glicurônico na composição dos EPS rizobianos (Tabela 3).

Resultados semelhantes aos relatados com a bactéria *R. tropici*, que teve seu EPS caracterizado como um heteropolissacarídeo formado de seis unidades repetidas de monossacarídeos e ácido urônico, metil e ésteres, possuindo massa molecular superior a $1,4 \times 10^6$ Da e comportamento pseudoplástico (BECKER et al., 1998; CASTELLANE; LEMOS, 2007; CASTELLANE et al., 2015; MORETTO et al., 2015; MUSZYŃSKI et al., 2016). Enquanto que, os heteropolímeros produzidos por *R. leguminosarum* são constituídos por glicose, ácido glicurônico e galactose enquanto que *R. bv. trifolii* 4S tem sua cadeia principal formada de quatro monossacarídeos

glicose, ácido glicurônico ligado a um grupo acetil e a cadeia lateral composta de glicose e galactose (SKORUPSKA et al., 2006). O polissacarídeo rizobiano, produzido por diferentes espécies de *Rhizobium*, contém normalmente glicose, galactose, manose e ácidos urônicos. Entretanto, a ocorrência de outros monossacarídeos tem sido relatada.

Tabela 3. Composição de monossacarídeos presentes nas amostras de exopolissacarídeos produzidos pelas estirpes de Rizóbios e Goma Xantana.

Amostras	Tratamentos	Manose	Ramnose	Ácido Glicurônico (mg mL ⁻¹)	Ácido Galacturônico	Glicose	Galactose
GX		0,03	0,029	0,001	ND	0,039	ND
EPS H152	Hidrolisados	0,002	0,002	0,004	Tr	0,043	0,015
EPS 8819	(A)	0,002	Tr	0,005	0,004	0,036	0,013
EPS 4077		0,011	0,001	0,001	Tr	0,061	0,025
GX		Tr	ND	ND	ND	ND	ND
EPS H152	Não hidrolisados	ND	ND	Tr	ND	ND	ND
EPS 8819	(B)	ND	ND	Tr	ND	ND	ND
EPS 4077		ND	ND	Tr	ND	ND	ND

A: EPS sem tratamento enzimático; B: EPS tratado com enzima; ND = não detectado; Tr = traços; GX: goma xantana;

Do mesmo modo, a goma xantana comercial, produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris*, apresenta estrutura composta de repetidas unidades pentassacarídicas conforme descrito na literatura. Primeiramente, o polímero produzido pela bactéria *Xanthomonas phaseoli* foi analisado, sendo composto de D-glicose, D-manose e D-ácido glicurônico na proporção de 1:1:1 (SUTHERLAND, 2001b). A goma xantana é constituída, normalmente, de unidades de β -D-glicose unidas por ligação 1-4 glicosídicas, formando a cadeia principal celulósica; na posição C(3) de cada resíduo de glicose alternada existe uma cadeia lateral trissacarídica contendo unidades de β -D-manose-1,4- β -D-ácido glicurônico-1,2- α -D-manose, podendo apresentar na posição C(6) da α -D-manose interna grupos O-acetil e na β -D-manose terminal substituinte 4,6-ácido pirúvico (SUTHERLAND, 2001a).

Neste estudo os EPS nativos como os tratados pela ação da enzima xantana liase foram primeiro hidrolisado usando um método bastante relatado na literatura

para fornecer os monossacarídeos constituintes, que são subsequentemente marcados com 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP) como descrito no item 2.3.1.1.

Testes de marcação com PMP foram realizados em amostras não hidrolisadas, com o intuito de observar eventuais monômeros liberados pela ação enzimática e, foi possível observar traços de ácido glicurônico nos EPS rizobianos tratados, enquanto, na goma xantana observou a liberação de manose. Entretanto, os perfis cromatográficos representativos de todas as amostras hidrolisadas e tratadas com a enzima marcadas com PMP (dados não mostrados), relevaram a ineficiência deste método, provavelmente devido a eventuais grupos funcionais removidos de sua estrutura, conseqüentemente afetando sua solubilidade.

Foram observadas também diferenças na coloração após a hidrólise dos EPS nativos e modificados (Figura 5), onde as amostras de EPS nativo e goma xantana (A), sem uso da enzima, apresentaram coloração característica de hidrólise química e liberação dos monômeros, enquanto que as amostras tratadas com a enzima (B) apresentaram coloração mais clara, representando resistência em sua estrutura e ação dessa etapa da metodologia aplicada.

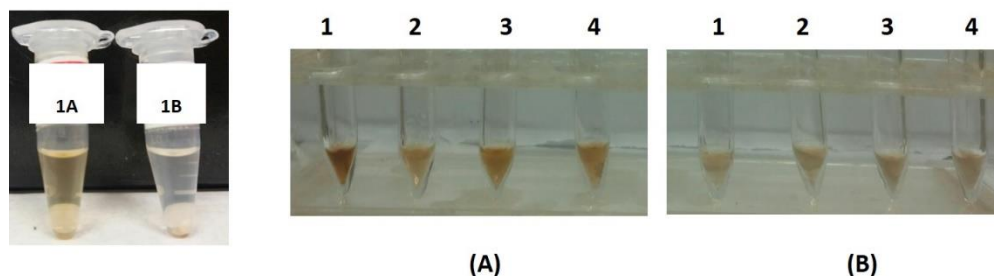


Figura 5. Perfil das amostras de EPS e goma xantana nativos (A) e tratados com xantana liase (B) após a hidrólise para análise de monossacarídeos. 1: goma xantana; 2: H152; 3: 8819; 4: 4077.

Os EPS podem ser modificados pela ação de transferases e hidrolases que adicionam ou removem grupos tais como acetil, piruvil (MARZOCCA et al., 1991), succinil (REUBER; WALKER, 1993), lactila terminais (MAALEJ et al., 2017), ou uma combinação destes, levando a variações na eletrostática da superfície do polímero e na solubilidade. Fato que se comprova com os resultados da análise por espectroscopia de FTIR e RMN de ^{13}C .

3.6.2. Estrutura parcial FTIR

O espectro de infravermelho com Transformada de Fourier permitiu detectar similaridades ou pequenas diferenças na estrutura química das diversas amostras. De modo geral, os espectros dos EPS foram estudados na região entre 400 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} (Figura 7) e picos obtidos na região de 3450 cm^{-1} , 2927.5 cm^{-1} , 1639 a 1643 cm^{-1} , 985 cm^{-1} , 1170 a 1184 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} e 1030 a 1041 cm^{-1} representam a presença da hidroxila (pico I), alongamento da vibração da hidroxila do EPS, vibração de alongamento de C – H (pico II), grupo carboxilo (pico III), ligação glicosídica, vibração covalente de C-O-C ligação e ponte glicosídica (pico V), vibração da ligação C-O na posição C-4 de D-glicose e flexibilidade da cadeia polimérica (pico VI), respectivamente. Entretanto, podemos observar que nos EPS nativos (Figura 6. A), o formato da banda de deformação angular no plano é intenso na região de $1400 - 1300\text{ cm}^{-1}$, enquanto em amostras de goma xantana nativa (Figura 6. 1A) e modificada (Figura 6. 1B) bem como EPS rizobianos modificados (Figura 6. 2B, 3B, 4B), esta banda é pouco aguda.

Compostos com absorções devidas a vibrações de estiramento C-H e C-C (Figura 6. I) e vibrações de deformação angular C-C-C e H-C-H (pico IV), as bandas mais relevantes situam-se nas regiões de $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ e de $1450-1365\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Semelhantes aos picos encontrados em outras estirpes de *Rhizobium* sp. (CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015; CASTELLANE et al., 2017).

Contudo a espectroscopia de infravermelho apenas não representa uma análise conclusiva da elucidação da estrutura de polímeros, logo foi utilizada outra metodologia complementar, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

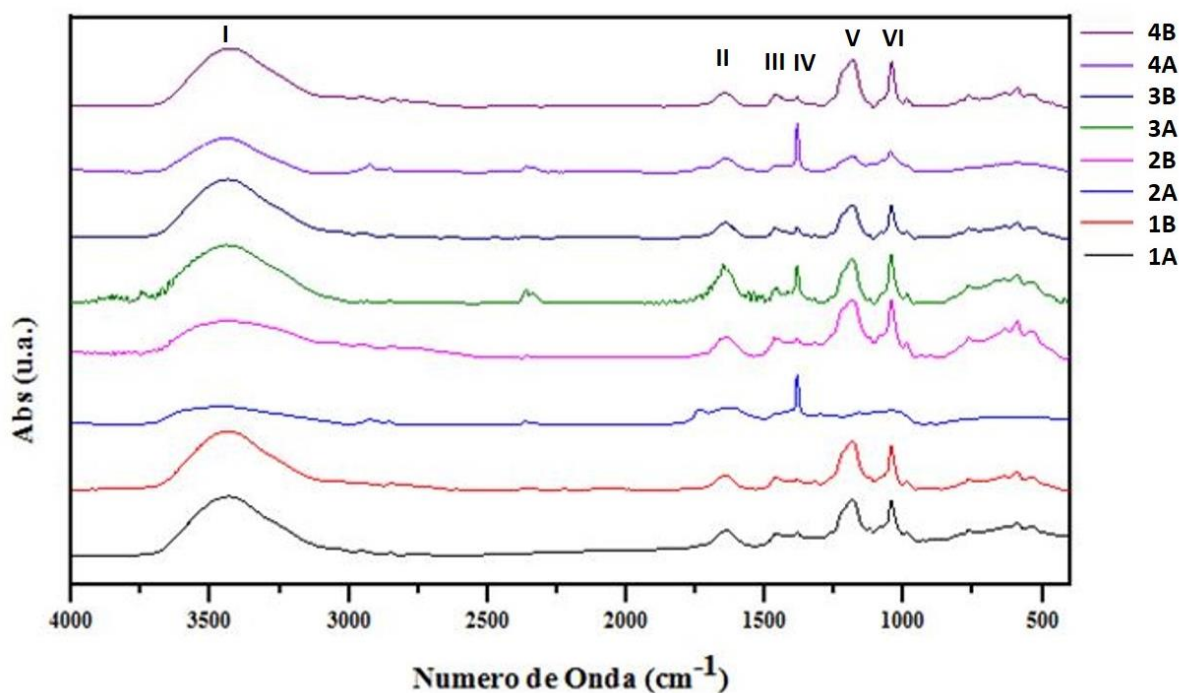


Figura 6. Espectro infravermelho das amostras de EPS nativos (A) e tratados com a enzima xantana liase (B) após 10 min de incubação a 40 °C. 1: Goma Xantana; 2: EPS H152; 3: EPS 8819 e 4: EPS 4077. I a VI: vibrações características de grupos funcionais componentes da estrutura de EPS rizobianos e goma xantana.

3.6.3. Estrutura parcial RMN

Os espectros ^{13}C NMR de EPS estão ilustrados na Figura 7, onde os principais sinais nos EPS foram atribuídos a ppm 102,16 para C1 (pico II), ppm 74 para C3 (pico III), ppm 66 para C5 (pico IV) e ppm 62 para C6 (pico V), semelhante ao dos carbonos para β -D-glicopiranosose (ZHAO et al., 2010). Além disso, o sinal em ppm 174 (pico I) é correspondente às carboxilas do ácido glicurônico, ácido galacturônico e dos grupos acetato e piruvato, enquanto que o sinal em ppm 26 (pico VI) a os carbonos de metila dos grupos O-acetila semelhante aos encontrados em outros trabalhos com EPS rizobianos (CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015; CASTELLANE et al., 2017).

De acordo com o espectro da goma xantana nativa (Figura 7. 1A), o sinal em ppm 85 (pico III) indica a presença do terminal C3 do ramo (1 \rightarrow 6)-Glc ligado por grupos O-acetil.

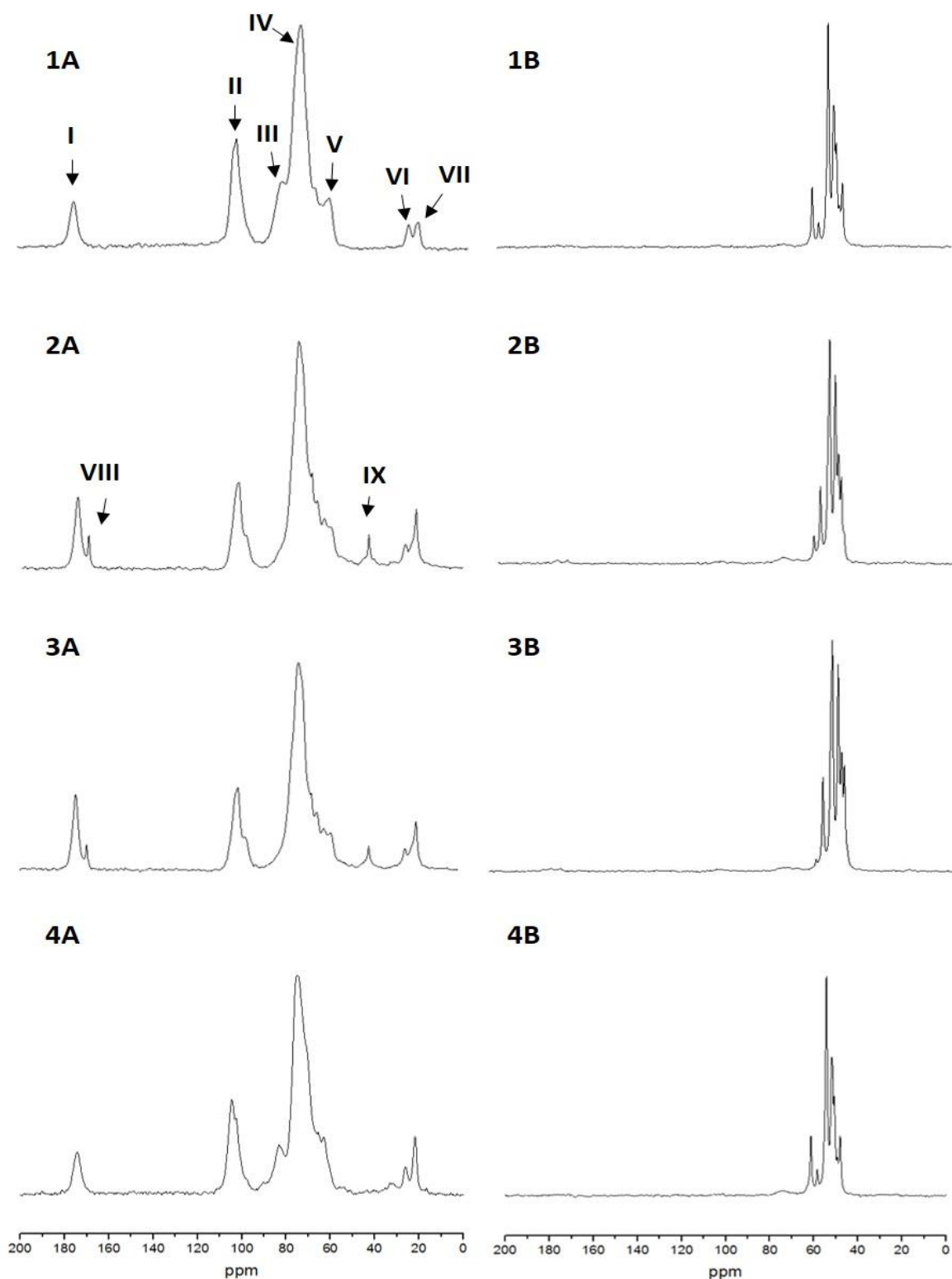


Figura 7. Espectros de RMN de ^{13}C CP-MAS das amostras de EPS nativos (A) e tratados com a enzima xantana liase (B) após 10 min de incubação a 40 °C. 1: Goma Xantana; 2: EPS H152; 3: EPS 8819 e 4: EPS 4077. I a IX: sinais característicos de grupos funcionais componentes da estrutura de EPS rizobianos e goma xantana.

Enquanto que, observamos ausência deste sinal na goma xantana modificada (Figura 7. 1B), bem como, de outros sinais anteriormente relatados. O sinal de acetato de metila a ppm 21, por sua vez, é observado apenas nos espectros de EPS nativos, 4077, 8819 e H152 (Figura 7. A), e o sinal metílico do piruvato a 25 ppm (pico VI) também foi observado nos espectros. Nota-se nas amostras tratadas (Figura 7. B) a ausência de sinal em 30 ppm presentes (pico VII) nos espectros de EPS nativos, que foi devido provavelmente ao metileno (CH₂) do grupo succinil.

3.7. Termogravimetria

A análise termogravimétrica pode medir a quantidade e a proporção de mudanças de massa em um material, em função da temperatura ou do tempo, em uma atmosfera controlada, onde as medidas são usadas para determinar a composição e estabilidade térmica de um material (ZHENG et al., 2014).

É possível observar a partir do termograma (Figura 8) que os EPS rizobianos H152 (2B), 8819 (3B) após o tratamento com a enzima xantana liase. Os EPS aumentaram a temperatura de resistência a perda de massa em 65,74 °C e 69,87 °C, respectivamente, sendo estes superiores a goma xantana tratada com a enzima (Figura 8. 1B) que aumentou 28,24 °C, enquanto que, o EPS 4077 reduziu a temperatura em 11,25 °C após a modificação em sua estrutura.

Após a modificação enzimática das amostras, houve aumento da resistência da estrutura em perder a molécula de água ligada às superfícies dos EPS produzidos pelas estirpes LMG 8819 e H152, e pode revelar alta capacidade de retenção de água dos mesmos, onde esta propriedade é atribuída à presença de grupos carboxílicos, já que estes estão ligados a uma molécula de água (SAJNA et al., 2013).

A goma xantana e os EPS 8819 e H152 nativos reduziram sua massa em 83,45%, 85,69% e 87,65% a 700 °C, enquanto que após o tratamento estes resistiram a perda de massa total em aproximadamente 72% até a máxima temperatura avaliada, isto significa que a modificação com a enzima favoreceu a resistência da estrutura destas moléculas a altas temperaturas.

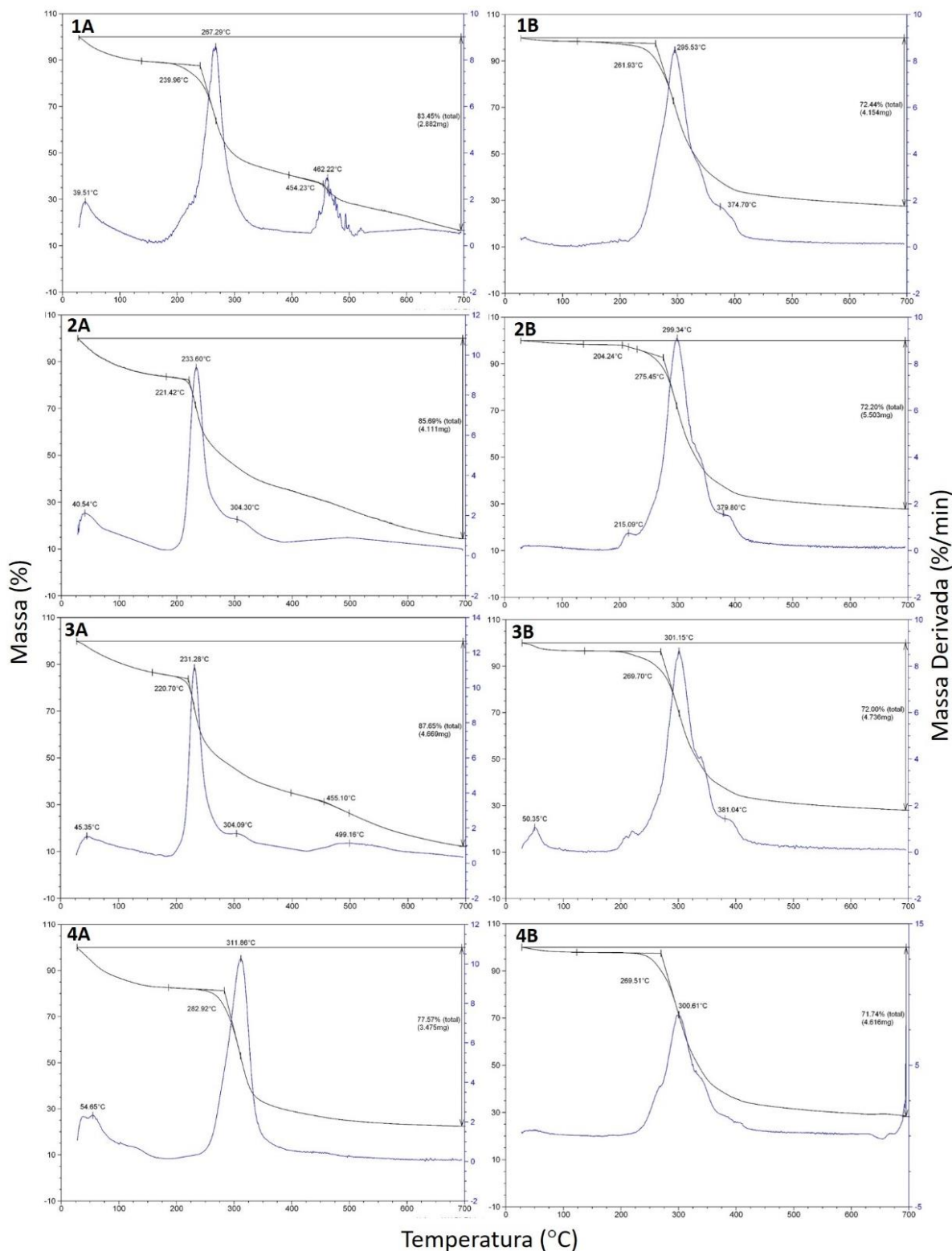


Figura 8. Curvas de termogravimetria (TGA) em atmosfera inerte de nitrogênio de EPS rizobianos nativos (A) e tratados com a enzima xantana liase (B). 1: Goma Xantana; 2: EPS H152; 3: EPS 8819 e 4: EPS 4077.

Geralmente nos processamentos são empregadas elevadas temperaturas, entre 200 e 230 °C (LUNA, 2016), características como termoestabilidade são exploradas na indústria, principalmente em várias preparações alimentícias e farmacêuticas, onde os EPS podem ser utilizados como espessantes. Desta maneira, os EPS rizobianos utilizados neste estudo apresentaram potencial uso industrial.

4. CONCLUSÃO

A quantidade de polímero produzido pelas estirpes rizobianas na presença de sacarose, como fonte de carbono, foi eficiente. Os resultados sugerem que é possível produzir um heteropolissacarídeo rizobiano modificado e com propriedades distintas quando comparado ao biopolímero nativo através da ação enzimática da xantana liase, uma vez que agiram despolimerizando e dessa forma alterando a estrutura dos mesmos. Conseqüentemente ocorreram alterações na solubilidade dos EPS provavelmente devido a remoção de eventuais grupos funcionais da estrutura dos EPS. Por outro lado, eventuais alterações na estrutura favoreceram os EPS produzidos pelas estirpes H152 e LMG 8819 em relação ao aumento da capacidade de resistência térmica, perfil este semelhante ao EPS 4077 nativo. Sendo assim, essas estirpes podem ser consideradas candidatas a produção de EPS com interesse industrial.

5. REFERÊNCIAS

BECKER, A. et al. Xanthan gum biosynthesis and application: A biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 145–152, 1998.

BISHOP, P. E. et al. Relation between Glutamine Synthetase and Nitrogenase Activities in the Symbiotic Association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. **Plant physiology**, 1976.

BOURASSA, D. V. et al. The lipopolysaccharide lipid A long-chain fatty acid is important for *Rhizobium leguminosarum* growth and stress adaptation in free-living and nodule environments. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 30, n. 2, p. 161–175, fev. 2017.

CASTELLANE, T. C. L. et al. Production of exopolysaccharide from rhizobia with

potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515–522, 2015.

CASTELLANE, T. C. L. et al. Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 361–369, 2017.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. D. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1503–1506, 2007.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. D. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191–197, 2014.

CASTELLANE, T. C. L.; OTOBONI, A. M. M. B.; LEMOS, E. G. DE M. Characterization of Exopolysaccharides Produced by Rhizobia Species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1566–1575, 2015.

CHAGAS, A. F.; DE OLIVEIRA, L. A.; DE OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 161–169, 2010.

DI DONATO, P. et al. Recent advances in the study of marine microbial biofilm: from the involvement of Quorum Sensing in its production up to biotechnological application of the polysaccharide fractions. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 4, n. 2, p. 34, 2016.

DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012.

DUTA, F. P. et al. Effect of process parameters on production of a biopolymer by *Rhizobium* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 639–652, 2004.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. et al. Production and rheological behavior of exopolysaccharide synthesized by pigeonpea rhizobia isolates. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1465–1471, 2010.

FREITAS, F. et al. Controlled production of exopolysaccharides from *Enterobacter* A47 as a function of carbon source with demonstration of their film and emulsifying abilities. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 641–657, 2014.

FU, D.; O'NEILL, R. A. **Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography** *Analytical Biochemistry*, 1995.

GOMES-PEPE, E. S. et al. Bg10: A novel metagenomics alcohol-tolerant and glucose-stimulated gh1 β -glucosidase suitable for lactose-free milk preparation. **PLoS ONE**, v.

11, n. 12, p. 1–25, 2016.

GUNDI, J. S. et al. Development of liquid inoculants for strains of *Rhizobium tropici* group using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 13, p. 411–421, 28 mar. 2018.

HASHIMOTO, W. et al. Xanthan lyase of *Bacillus* sp. strain GL1 liberates pyruvylated mannose from xanthan side chains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3765–3768, 1998.

HEYMANN, D. et al. Anti-metastatic properties of a marine bacterial exopolysaccharide-based derivative designed to mimic glycosaminoglycans. **Molecules**, v. 21, n. 3, 2016.

JANCZAREK, M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 11, p. 7898–7933, 2011.

KOOL, M. M. **Enzymatic modification and characterization of xanthan**. 2014.

LIU, C. F. et al. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2284–2291, 2011.

LUNA, W. N. S. **Acetilação do exopolissacarídeo (1→6)- β-D-glucana (Iasiodiplodana): derivatização química e caracterização**. 2016. 64f. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

MAALEJ, H. et al. Depolymerization of *Pseudomonas stutzeri* exopolysaccharide upon fermentation as a promising production process of antibacterial compounds. **Food Chemistry**, v. 227, p. 22–32, 2017.

MALEKI, S. et al. Alginate biosynthesis factories in *Pseudomonas fluorescens*: localization and correlation with alginate production level. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 4, p. 1227–1236, 2016.

MALICK, A. et al. Production of exopolysaccharides by selected *Bacillus* strains: Optimization of media composition to maximize the yield and structural characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 539–549, 2017.

MARUYAMA, Y. et al. Crystal structure of *Bacillus* sp. GL1 xanthan lyase complexed with a substrate: Insights into the enzyme reaction mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 350, n. 5, p. 974–986, 2005.

MARZOCCA, M. P. et al. Location and cloning of the ketal pyruvate transferase gene of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 23, p. 7519–7524, 1991.

MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. Comparative depolymerization of xanthan gum by ultrasonic and enzymic treatments. Rheological and structural properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 6, n. 2, p. 95–107, 1986.

MORETTO, C. et al. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 291–298, 2015.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L. DOS; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, v. 21, n. 4, p. 305–310, 2011.

MUSZYŃSKI, A. et al. Structures of exopolysaccharides involved in receptor-mediated perception of *Mesorhizobium loti* by *Lotus japonicus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 40, p. 20946–20961, 2016.

NÁCHER-VÁZQUEZ, M. et al. Dextran production by *Lactobacillus sakei* MN1 coincides with reduced autoagglutination, biofilm formation and epithelial cell adhesion. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 22–31, 2017.

NAMPOOTHIRI, K. M. et al. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1513–1519, 2003.

NANKAI, H. et al. Microbial system for polysaccharide depolymerisation: enzymatic route for xanthan depolymerisation by *Bacillus* sp. strain GL1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2520–2526, 1999.

NISHITANI, Y. et al. Recognition of heteropolysaccharide alginate by periplasmic solute-binding proteins of a bacterial ABC transporter. **Biochemistry**, v. 51, n. 17, p. 3622–3633, 2012.

OSIŃSKA-JAROSZUK, M. et al. Bacterial exopolysaccharides as a modern biotechnological tool for modification of fungal laccase properties and metal ion binding. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 0, n. 0, p. 1–17, 2018.

PETRI, D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 23, 2015.

RASULOV, B. A. et al. Production, characterization and structural modification of exopolysaccharide-based bioflocculant by *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 and media optimization. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, p. 2–10, 2017.

RENDUELES, O.; KAPLAN, J. B.; GHIGO, J. M. Antibiofilm polysaccharides. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 334–346, 2013.

REUBER, T. L.; WALKER, G. C. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. **Cell**, v. 74, n. 2, p. 269–280, 1993.

RIGOUIN, C. et al. Assessment of biochemical methods to detect enzymatic depolymerization of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 279–284, 2009.

RUIJSSENAARS, H. J.; HARTMANS, S.; VERDOES, J. C. A novel gene encoding xanthan lyase of *Paenibacillus alginolyticus* strain XL-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3945–3950, 2000.

SAJNA, K. V. et al. Studies on structural and physical characteristics of a novel exopolysaccharide from *Pseudozyma* sp. NII 08165. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, n. April 2013, p. 84–89, 2013.

SALAH, R. et al. Anticancer activity of chemically prepared shrimp low molecular weight chitin evaluation with the human monocyte leukaemia cell line, THP-1. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, n. 1, p. 333–339, 2013.

SATHIYANARAYANAN, G.; SEGHAL KIRAN, G.; SELVIN, J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine *Bacillus subtilis* MSBN17. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 13–20, 2013.

SIVASANKAR, P. et al. Characterization, antimicrobial and antioxidant property of exopolysaccharide mediated silver nanoparticles synthesized by *Streptomyces violaceus* MM72. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, n. October 2017, p. 752–759, 2018.

SKORUPSKA, A. et al. Rhizobial exopolysaccharides: Genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 1–19, 2006.

STAUDT, A. K.; WOLFE, L. G.; SHROUT, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 3, p. 197–206, 2012.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3–9, 2001a.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 663–674, 2001b.

TORRES, C. A. V et al. Study of the interactive effect of temperature and pH on exopolysaccharide production by *Enterobacter* A47 using multivariate statistical analysis. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 148–156, 2012.

VIDHYALAKSHMI, R. et al. *Bacillus circulans* exopolysaccharide: Production, characterization and bioactivities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 405–414, 2016.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria**. Internatio ed. [s.l.] Blackwell Scientific, 1970.

YANG, F. et al. Production and purification of a novel xanthan lyase from a xanthan-degrading *Microbacterium* sp. Strain XT11. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

ZHAO, L. et al. Studies on the chemical structure and antitumor activity of an exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 5,

p. 637–643, 2010.

ZHENG, J. Q. et al. Characterization and antioxidant activity for exopolysaccharide from submerged culture of *Boletus aereus*. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1047–1053, 2014.

ZHOU, F. et al. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 362–368, 2014.

ZOU, P. et al. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, n. 12, p. 1174–1181, 2016.