

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/08/2020.

**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. Coursou 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 rizobios 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 were 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 was 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.

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.