

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS POR MICRORGANISMOS MODIFICADOS
GENETICAMENTE**

Francine Ferreira Padilha

Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Bióloga

Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini

Orientadora

Tese apresentada à
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor
em Ciência de Alimentos

Campinas, 2003

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adilma R. Pippa Scamparini – (Presidente)

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre – (Membro)

Prof^a. Dr^a. Telma T. Franco – (Membro)

Dr^a. Ângela Mehta – (Membro)

Prof^a. Dr^a. Cristina M. R. da Silva – (Membro)

Prof. Dr. José Luis Pereira – (Membro suplente)

Prof^a. Dr^a. Janice I. Druzian (Membro Suplente)

Campinas, de de 2003

Dedico,

Aos meus pais Carmen, Jair, Paulo Roberto (in memoriam)

As minhas irmãs Chiara, Roberta e Tiane

" De tudo ficaram três coisas:

a certeza de que estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar
e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,
Fazer da queda, um passo de dança,
Do medo, uma escada,
Do sonho, uma ponte,
Da procura, um encontro."

Fernando Pessoa

AMIGOS

" Cada pequeno Olá,
cada pequeno sorriso,
cada pequena ajuda,
é capaz de salvar um coração machucado.
VOCÊ é especial.
Há um milagre chamado amizade.
Você não sabe como ela aconteceu,
ou quando começou,
mas você sabe a alegria que ela traz
e percebe que a amizade é um dos dons mais preciosos que Deus nos concedeu.
Amigos são jóias preciosas, realmente.
Eles nos fazem sorrir e nos encorajam para o sucesso.
Eles estão sempre ali para nos ouvir,
para nos elogiar,
e estão sempre de coração aberto para nos receber."
(autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

A DEUS que me deu a vida e é força infinita do universo;

Aos meus queridos pais que são minha fonte de incentivo, sempre me apoiando e acreditando em mim em todos os momentos de minha vida não me deixando esmorecer nunca, muito obrigado pelo amor que me deram e dão, pela confiança, amizade.....já ia esquecendo...rsss...e pela ajuda financeira sem a qual não teria conseguido realizar meu sonho e financiando minhas idas para casa pois a saudade era imensa...muito obrigada !!!

As minhas amadas irmãs, que sempre me apoiaram, suportaram os momentos de mau humor.....não que eu tenha....rsss....e também serviram de ombro amigo sempre me escutando e consolando quando precisava desabafar, como também são minhas companheiras para todas as horas....a vocês um obrigada muito especial. Ao meu cunhadinho, Márcio, que considero como um irmão, muito obrigada pelo apoio e incentivo.

A minha querida orientadora, a qual foi e continuará sendo sempre uma segunda mãe ou consideraria minha avó???? (não posso esquecer da Claire que foi cria também)....rsss....mas não importa.....no meu coração sempre estará ocupando um local especial, pois é um exemplo como profissional e como ser humano. Minha amiga que sempre contei em todas as horas, principalmente para sair.....rsss....mas a qual me deu inúmeras oportunidades e abriu muitas portas para o meu crescimento profissional e pessoal, muito obrigada.

A querida Yoko, minha co-orientadora, que é exemplo de profissional a ser seguido, a qual me ajudou muito e deu suporte financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

A querida amiga Claire, que pela ordem cronológica seria minha segunda mãe...rsss....a qual me incentivou a fazer o doutorado na UNICAMP, muito obrigada.

A minha família que sempre me deram incentivo, principalmente meus avós.

Ao tio Cunha e ao Alcides, que sempre me apoiaram e ajudaram nos momentos em que necessitei.

Ao tio Maneca e tia Alice que me incentivaram em todos os momentos.

A Gabi e a Rô que são grandes amigas.

proporcionaram muitas alegrias, pois esta é uma turma que não existe.....são
DEMAISSS...muitoobrigada pela amizade de vocês.

A Karlota, técnica do laboratório, e pessoa indispensável para todos os momentos desta tese, principalmente o final.....desculpa ter incomodado tanto....rsss...obrigada por ser esta pessoa maravilhosa. Sempre auxiliando a todos no laboratório, com um humor invejável e pronta para organizar as festas, obrigada pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Lucy, Elcio, Alegani..... e a todos que colaboraram e me incentivaram em todos os momentos muito obrigada.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xii
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	3
CAPÍTULO 1 - Goma xantana e levana: biossíntese e genética	4
RESUMO	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS	7
2.1. Xantana	9
2.2. Levana	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO 2 - Clonagem e expressão do gene <i>sacB</i> de <i>Zymomonas mobilis</i> na síntese de exopolissacarídeo em <i>Xanthomonas</i>	25
RESUMO	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Linhagens bacterianas utilizadas e meios de cultura	31
2.2. Manipulação de DNA	31
2.2.1. PCR (Polymerase chain reaction)	32
2.2.2. Clonagem do gene <i>sacB</i> e transformação	32
2.3. Produção de polissacarídeo	33
2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE	34
2.5. Reologia	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. Clonagem do gene <i>sacB</i> e transformação de <i>Xanthomonas</i>	36
3.2. Produção de exopolissacarídeo	37

3.3. Análise dos monossacarídeos por CLAE _____	37
3.4. Análise reológica _____	39
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	41
<i>CAPÍTULO 3 - Efeito da transferência do operon gum de Xylella fastidiosa em Xanthomonas campestris na síntese de exopolissacarídeo</i> _____	47
RESUMO _____	48
1. INTRODUÇÃO _____	49
2. MATERIAL E MÉTODOS _____	51
2.1. Linhagens utilizadas _____	51
2.2. Extração do cosmídio _____	51
2.3. Eletroporação _____	52
2.4. Produção e recuperação de polissacarídeo _____	52
2.5. Análise de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE _____	53
2.6. Reologia _____	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	54
3.1. Seleção da linhagem de <i>X. campestris</i> contendo o operon <i>gum</i> de <i>X. fastidiosa</i> _____	54
3.2. Produção do polissacarídeo _____	55
3.3. Análise dos monossacarídeos por CLAE _____	57
3.4. Comportamento reológico do EPS _____	58
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	62
<i>CAPÍTULO 4 - Xanthomonas campestris pv campestris CA110 and Xanthomonas axonopodis pv manihotis 289: Produção e caracterização de exopolissacarídeo</i> _____	68
RESUMO _____	69
1. INTRODUÇÃO _____	70
2. MATERIAL E MÉTODOS _____	71

2.1. Microrganismos	71
2.2. Produção de biopolímero	72
2.3. Recuperação da goma xantana	72
2.4. Análise da goma xantana por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	72
2.5. Viscosidade aparente	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1. Produção de goma xantana	73
3.2. Análise da composição química da goma por CLAE	74
3.3. Análise reológica	75
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CONCLUSÕES GERAIS	83

RESUMO GERAL

O presente trabalho teve o objetivo de estudar a produção de biopolímeros por microrganismos modificados geneticamente. *Xanthomonas campestris* pv *campestris* e *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* foram estudadas como linhagem receptora dos genes em estudo, e *Zymomonas mobilis* e *Xylella fastidiosa* como linhagens doadoras. O primeiro capítulo trata-se de um artigo de revisão sobre a produção dos biopolímeros microbianos onde se fez um levantamento bibliográfico sobre goma xantana e levana. O segundo capítulo relata o efeito da transferência do operon *gum* de *Xylella fastidiosa* em *Xanthomonas campestris* na síntese de exopolissacarídeo, onde foram verificadas a influência da adição deste operon na produção de exopolissacarídeo e nas características físico-químicas, através de análises cromatográficas e reológicas. O terceiro capítulo relata a Influência da clonagem e expressão em *Xanthomonas* do gene *sacB* de *Zymomonas mobilis* na síntese de exopolissacarídeo, avaliando-se a expressão da enzima levana sacarase em *Xanthomonas* e sua influência no exopolissacarídeo sintetizado por análise de produtividade, composição química e reológica. O quarto capítulo relata um estudo sobre a aplicação de de íons em soluções de goma xantana e a influência exercida nas suas características reológicas.

SUMMARY

This work aimed to study the production of biopolymers by genetically modified microorganisms. *Xanthomonas campestris pv campestris* and *Xanthomonas axonopodis pv manihotis* were studied as a receiver lineage of the genes under study, and *Zymomonas mobilis* and *Xylella fastidiosa* as donor lineages. The first chapter is a revision article about the production of biopolymers microbians where a bibliographic survey about xanthan and levan gum is performed. The second chapter reports the transfer effect of operon *gum* of *Xylella fastidiosa* in *Xanthomonas campestris* in the synthesis of exopolysaccharide, where the influences of the addition of this operon in the production of exopolysaccharide and in the physics-chemical characteristics through chromatographic and rheologic analysis were verified. The third chapter reports the influence of cloning and expression in *Xanthomonas mobilis* in the synthesis of exopolysaccharide, evaluating the expression of levan-saccharase enzymes in *Xanthomonas* and their influence on synthesized exopolysaccharide by an analysis of productivity, chemical composition and rheologic characteristics. The fourth chapter reports a study about the application of ions in xanthan gum solutions and the influence carried out in their rheologic characteristics.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os exopolissacarídeos (EPS) microbianos, também denominados biopolímeros microbianos, são produzidos por diversos gêneros de bactérias, fungos e leveduras (Crescenzi, 1995; Linton *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1999). Os biopolímeros vêm sendo pesquisados para aplicação nas indústrias de tintas, alimentos, farmacêutica e petroquímica (Paul *et al.*, 1986; Yalpani & Sandford, 1987). Os estudos realizados têm-se focalizado na otimização das condições de cultura para produção de polissacarídeos e mais recentemente, no isolamento, clonagem e sequenciamento dos genes envolvidos na síntese de biopolímeros, como por exemplo, os genes de *Xanthomonas campestris* para a síntese de goma xantana (Boulnois & Roberts, 1990; Leigh & Coplin, 1992; Leigh & Walker, 1994; Sutherland & Tait, 1992; Petroni & Ielpi, 1996), e dos gêneros *Zymomonas*, *Erwinia*, *Pseudomonas* para a síntese de levana (Ananthakumari & Gunasekaran, 1999; Hettwer *et al.*, 1998; Song, *et al.*, 1999; Du & Geider, 2002; Toma *et al.*, 2003), entre outros genes para os mais diversos produtos.

A goma xantana, EPS sintetizado pela bactéria *Xanthomonas* sp, é um polissacarídeo de elevado interesse industrial, principalmente para a área de alimentos, farmacêutica e de petróleo. O interesse deve-se as suas propriedades físico-químicas que superam as de todos os outros polissacarídeos disponíveis no mercado. Dentre estas propriedades destaca-se a sua elevada viscosidade em baixas concentrações, bem como sua ampla faixa de estabilidade a temperatura e pH (Meyer, *et al.*, 1993; Sutherland & Kennedy, 1996; García-Ochoa, *et al.*, 2000). Inúmeros estudos vêm sendo realizados para caracterizar a via de biossíntese deste polímero, pois estudos correlacionam a síntese de goma xantana com a virulência da bactéria quando esta infecta plantas.

A goma levana vem sendo aplicada na indústria de alimentos, como espessante de alimentos e estudada como possível substituinte da goma arábica; e na área médica e farmacêutica devido as suas características de ação anti-tumoral e efeito hipocolesterolêmico. Em relação a biossíntese de levana inúmeros

estudos estão sendo realizados para identificar os genes das enzimas envolvidas no processo de biossíntese, as respectivas localizações destes genes, como também a funcionalidade dos mesmos em diferentes microrganismos (Ananthalakmy & Gunasekaran, 1999; Hettwer *et al.*, 1998; Song, *et al.*, 1999; Calazans *et al.*, 2000; Wendt, 2001; Du & Geider, 2002; Toma *et al.*, 2003).

Estudos de biossíntese de polissacarídeos vêm sendo realizados utilizando diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e frutose) ou microrganismos mutantes para examinar os efeitos no peso molecular, produtividade e composição da cadeia principal e ramificações dos biopolímeros (Hassler & Doherty, 1990; Kaplan *et al.*, 1994). Os estudos de biologia molecular são de extrema relevância, pois o conhecimento dos genes envolvidos nas rotas de biossíntese é fundamental, tanto para modificar microrganismos com a finalidade de aumentar a produtividade no processo fermentativo, como para alterar o peso molecular e a composição química do polímero, além de serem de fundamental importância nos estudos de fitopatologia (Hettwer *et al.*, 1998).

Visto que a xantana e a levana possuem um grande interesse para as indústrias de alimentos e farmacêutica, devido as suas características físico-químicas e atividades anti tumoral e anti HIV, novos estudos são requeridos para investigar o metabolismo do microrganismo e seus produtos, já que pouco se conhece sobre os genes envolvidos na biossíntese destes

2. OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo geral à identificação e expressão heteróloga de genes envolvidos com a produção de xantana e levana. As seguintes etapas foram efetivadas:

a) Xantana:

- Selecionar cosmídios com as ORFs de *Xyella fastidiosa* relacionadas à produção de goma xantana;
- Transformar a linhagem de *Xanthomonas* CA110 com os genes envolvidos na produção de goma;
- Avaliar a produção de goma na linhagem recombinante;
- Avaliar as características físico-químicas da goma.

b) Levana:

- Isolar o gene *SacB* de linhagens de *Zymomonas mobilis* e clonar em *Escherichia coli*;
- Subclonar o gene *SacB* de *E. coli* para linhagens de *Xanthomonas*;
- Avaliar a produção de goma nas linhagens recombinantes;
- Avaliar as características físico-químicas da goma.

CAPÍTULO 1 - Goma xantana e levana: Biossíntese e genética

Goma xantana e levana: Biossíntese e genética

Padilha, F.F.¹; Rosato, Y.B.²; Scamparini, A.R.P.¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos – FEA; ² Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- C.P. 6121, CEP 13081.970, Campinas, SP, Brasil. e-mail: francinepadilha@hotmail.com

RESUMO

Os polissacarídeos microbianos devido as suas propriedades físico-químicas que superam os demais polissacarídeos, possuem uma elevada significância comercial, pois são capazes de atuar em baixas concentrações e possuir estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura. Dentre os principais polissacarídeos, temos a goma xantana que é formada por unidades repetitivas de um pentassacarídeo constituído por glicose, manose, ácido glicurônico e grupamentos acetil e piruvato; e a levana que é um polissacarídeo formado por unidades de frutose. Estas gomas podem ser aplicadas como agentes emulsificantes, estabilizantes, gelificantes e encapsulante em diversos segmentos industriais. A levana também é estudada quanto a sua propriedade anti-tumoral e hipocolesterolêmica. Esta revisão procurou focar vários aspectos da biossíntese, do processo de formação dos polissacarídeos, e a caracterização dos genes envolvidos na produção destes, bem como o melhoramento das linhagens produtoras de goma xantana e levana.

Palavras-chaves: biopolímeros, goma xantana, levana, biossíntese, genética

1. INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) microbianos, também denominados biopolímeros microbianos, são produzidos por diversos gêneros de bactérias, fungos e leveduras (Crescenzi, 1995; Linton *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1999). Muitos destes biopolímeros vêm sendo pesquisados para aplicação nas indústrias de tintas, alimentos, farmacêutica e petroquímica (Paul *et al.*, 1986; Yalpani & Sandford, 1987). Os estudos realizados se focalizam na otimização das condições de cultura para produção de polissacarídeos e mais recentemente, no isolamento, clonagem e sequenciamento dos genes envolvidos na síntese de biopolímeros, como por exemplo, os genes de *Xanthomonas campestris* para a síntese de goma xantana (Boulnois & Roberts, 1990; Leigh & Coplin, 1992; Leigh & Walker, 1994; Sutherland & Tait, 1992; Petroni & Ielpi, 1996) de *Agrobacterium* e *Alcaligenes faecalis* para a síntese de goma curdulana (Stasinopoulos *et al.*, 1999), dos gêneros *Zymomonas*, *Erwinia*, *Pseudomonas* para a síntese de levana (Ananthakumari & Gunasekaran, 1999; Hettwer *et al.*, 1998; Song, *et al.*, 1999; Du & Geider, 2002; Toma *et al.*, 2003) entre outros genes para os mais diversos produtos.

A goma xantana, EPS sintetizado pela bactéria *Xanthomonas* sp, é um polissacarídeo de elevado interesse industrial, principalmente a indústria de alimentos, farmacêutica e de petróleo. O interesse deve-se as suas propriedades físico-químicas que superam as de todos os outros polissacarídeos disponíveis no mercado. Dentre estas propriedades destaca-se a sua elevada viscosidade em baixas concentrações, bem como, a sua ampla faixa de estabilidade a temperatura e pH (Meyer, *et al.*, 1993; Sutherland & Kennedy, 1996; García-Ochoa, *et al.*, 2000).

Outro polissacarídeo de interesse é a goma levana que vem sendo aplicada na área de alimentos, como espessante e estudada como possível substituinte da goma arábica. Na área médica e farmacêutica vem se destacando devido a sua propriedade anti-tumoral e efeito hipocolesterolêmico. Inúmeras pesquisas vem

sendo realizadas com os polissacarídeos que possuem, potencialmente, atividade anti-tumoral e seus derivados sulfatados que tem ação anti-HIV *in vitro* (Kaneko *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1990; Osawa *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1999). Em relação a biossíntese de levana, inúmeros estudos estão sendo realizados para identificar os genes das enzimas envolvidas no processo de biossíntese, as localizações destes genes, como também a funcionalidade dos mesmos em diferentes microrganismos (Ananthakumari & Gunasekaran, 1999; Hettwer *et al.*, 1998; Song, *et al.*, 1999; Calazans *et al.*, 2000; Wendt, 2001; Du & Geider, 2002; Toma *et al.*, 2003).

Os estudos de biologia molecular são de extrema relevância, pois o conhecimento dos genes envolvidos nas rotas de biossíntese é fundamental tanto para modificar os microrganismos com a finalidade de elevar a produtividade no processo fermentativo, como para alterar o peso molecular e a composição química do polímero, além de serem de fundamental importância nos estudos de fitopatologia, pois inúmeros estudos correlacionam a síntese de goma xantana com a virulência da bactéria quando esta infecta a planta (Hettwer *et al.*, 1998; Fontaniella *et al.*, 2002). As modificações, nas últimas décadas, no polímero vem sendo obtidas em estudos que utilizam diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e frutose), ou por microrganismos mutantes, o que naturalmente torna os resultados muito inespecíficos (Hassler & Doherty, 1990; Kaplan *et al.*, 1994).

Visto que, a goma xantana e a levana, possuem um grande interesse para as áreas de alimentos e farmacêutica, novos estudos são requeridos para investigar o metabolismo dos microrganismos envolvidos na síntese destes EPS. e seus produtos, já que pouco se conhece sobre os genes envolvidos nesta biossíntese.

2. EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

A produção de polissacarídeos extracelulares (EPSs) é extremamente comum em diversos microrganismos, sendo importantes constituintes das células bacterianas, e possuem um papel crítico na interação das bactérias com o meio ambiente. Esses EPSs podem estar associados à superfície celular, como uma cápsula ao redor da célula ou serem excretados para o meio ambiente como um muco (Coplin & Cook, 1990; Silva *et al.*, 2001).

Os EPSs possuem duas propriedades que ajudam a determinar suas funções: (a) os polissacarídeos capsulares são altamente hidratados, e portanto, protegem a bactéria da dessecação, e evitam que moléculas hidrofóbicas penetrem na cápsula e cheguem à membrana celular; (b) os EPSs ácidos produzidos pela maioria das bactérias fitopatogênicas são altamente aniônicos e assim, podem atuar como resinas de troca iônica, concentrando minerais e nutrientes ao redor da célula. Outra função importante do polissacarídeo capsular, no solo ou em ambientes aquáticos, é auxiliar na adesão da bactéria a superfícies biológicas ou inertes, nas quais existem altas concentrações de nutrientes. As bactérias fitopatogênicas precisam crescer ou sobreviver no solo, em folhas ou raízes de plantas para completar seu ciclo de vida, portanto a proteção contra o meio ambiente hostil pode ser um motivo para que a bactéria produza EPS (Coplin & Cook, 1990; Silva *et al.*, 2001).

Os EPS, sintetizados por bactérias, vêm sendo estudados com visível interesse devido suas propriedades reológicas, que, em muitos casos, superam as características funcionais dos polissacarídeos de origem vegetal. Alguns são amplamente utilizados como espessantes, gelificantes, estabilizantes e, em alguns casos, como emulsificantes e colóides protetores (Sanderson & Clark, 1983; Rinaudo, 1993). Esses polissacarídeos de cadeia complexa são capazes de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso mesmo em baixas concentrações, segundo Stading (1988), não existe outra categoria de substâncias que exiba esse comportamento.

A produção de exopolissacarídeos é um processo complexo envolvendo inúmeras etapas. A sua complexidade e o relativo desconhecimento dos eventos

moleculares envolvidos, tem dificultado a manipulação genética das bactérias produtoras de EPS. As alterações realizadas têm o intuito de modificar as condições de fermentação, desenvolver novos microrganismos produtores, bem como, alterar a estrutura dos EPS. Com estas modificações procura-se aumentar o campo de aplicabilidade destes EPSs, devido principalmente a descoberta de novas funções em diversos segmentos onde são aplicados (Pollock *et al.*, 1997).

Os estudos de aplicação dos EPS dependem de inúmeros fatores, como por exemplo os segmentos onde serão aplicados: indústria de alimentos, farmacêutica, química e petroquímica. Pois, dependendo da área de aplicação exigem-se testes de segurança antes da sua liberação no mercado.

2.1. Xantana

Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica que infecta diversas espécies de crucíferas causando a morte destas plantas. Quando esta bactéria infecta a planta ela produz um polissacarídeo de alto peso molecular conhecido como goma xantana e que está relacionado aos fatores de virulência (Fontaniella, *et al.*, 2002). A goma xantana é um heteropolissacarídeo, cuja unidade básica repetidora é um pentassacarídeo, constituído por glicose, manose, ácido glucurônico e grupos piruvato e acetil (Figura 1). A sua aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica, petroquímica é devido principalmente as suas propriedades de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis que lhe fornecem propriedades reológicas únicas, além de manter soluções estáveis em ampla faixa de pH e temperatura. Atualmente é o único polissacarídeo microbiano que vem sendo comercializado em grande escala (Meyer *et al.*, 1993; Sutherland & Kennedy, 1996; García-Ochoa *et al.*, 2000).

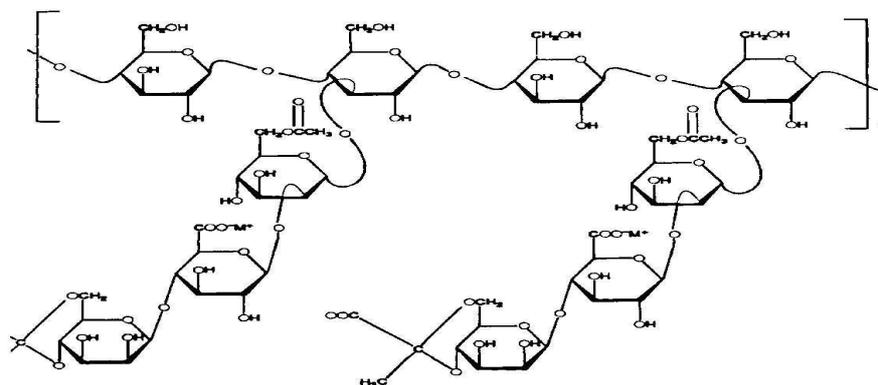


Figura 1 – Estrutura da goma xantana (García-Ochoa *et al.*, 2000)

Dentre os biopolímeros utilizados na recuperação terciária de petróleo (EOR) a xantana é o mais utilizado, não tendo até o momento nenhum outro em escala comercial que supere suas qualidades. A goma xantana tem sido usada junto com hidróxido de sódio e surfactantes na técnica conhecida como APS (álcali-polímero-surfactante) (Navarrete *et al.*, 2001; Navarrete & Shah, 2001).

A indústria de petróleo nos EUA, não utiliza grandes quantidades deste polímero, e sim associações de características não tão específicas, devido ao custo elevado de produção da goma xantana (Stredansky & Conti, 1999; Yoo & Harcum, 1999). No Brasil o substrato representa um baixo custo de produção, entretanto em outros países o custo do meio de fermentação representa um fator crítico sob o aspecto comercial na produção do polissacarídeo. Portanto, o Brasil mostra-se com um grande potencial para a fabricação deste polímero em escala industrial, já que dispõe de matéria-prima básica para a produção: açúcar, extrato de levedura e álcool do setor sucro-alcooleiro.

O grande interesse de produção de goma xantana no país, despertou o interesse no desenvolvimento de pesquisas que melhorassem geneticamente as linhagens produtoras de goma xantana, visando aumentar a sua produção e qualidade. Estudos dos genes responsáveis pela síntese de goma xantana vêm sendo realizados há muitos anos, sempre tendo como enfoque o processo de

Os genes, que sintetizam as enzimas envolvidas na transferência dos monossacarídeos e dos substituintes não glicosídicos, piruvato e acetil, estão localizados em um *cluster* com 12 genes que compreende uma região de 16 Kb no genoma de *X. campestris*, denominado como *xpsI* ou *gum* (*gumB* – *gumM*) (GenBank nº de acesso U22511) (Katzen *et al.*, 1998). A função de alguns genes tem sido estabelecida. *GumD*, *M*, *H*, *K* e *I* estão envolvidos com a polimerização do pentassacaríde. Estes genes codificam respectivamente para a transferência seqüencial de glicose-1-fosfato, glicose, manose, ácido glucurônico e finalmente a manose para o isoprenilfosfato que tem a função de carreador. A acetilação é determinada pelos genes *gumF* e *G* que codificam a enzima acetiltransferase. A enzima cetal piruvato transferase é codificada pelo gene *gumL*. Os genes *gumB*, *gumC*, *gumE*, *gumJ* estão envolvidos em uma séria de etapas na polimerização e secreção da xantana através da membrana da bactéria (Pollock *et al.*, 1997; Katzen *et al.*, 1998; Vojnov *et al.*, 1998; Flores-Candia & Deckwer, 1999; Katzen *et al.*, 1999).

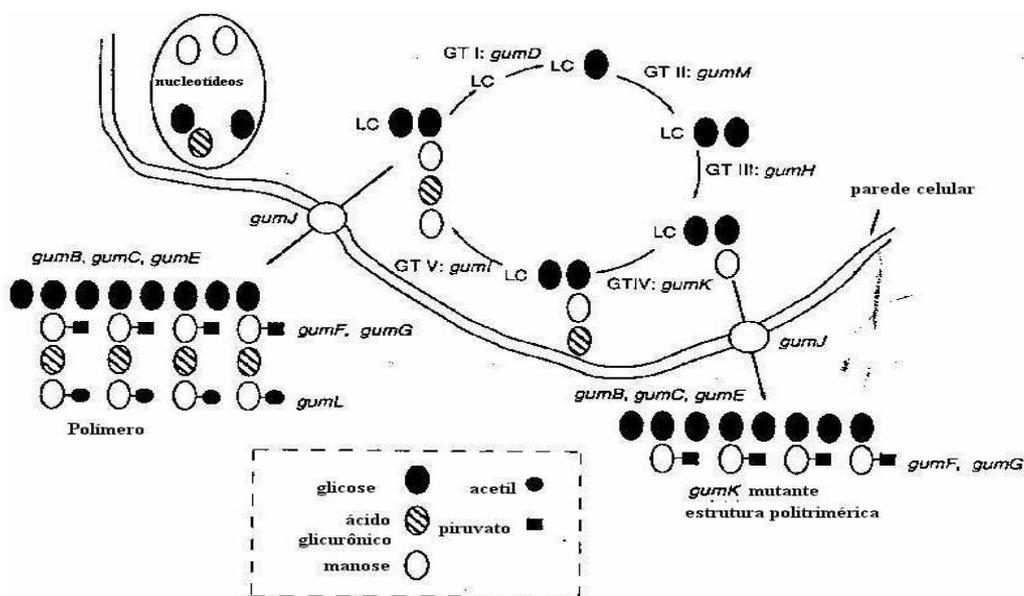


Figura 3 – Operon *gum* na síntese de goma xantana (Coplín & Cook, 1990)

Devido à intensa utilização dos EPSs, inúmeros estudos vem sendo realizados na área de expressão de genes que codificam a produção de polissacarídeo, bem como para verificar a expressão heteróloga destes genes em outros sistemas, e a sua influência no metabolismo celular e nos produtos formados (Kannan *et al.*, 1995; Pollock *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001).

Pollock *et al.* (1997) estudaram a produção de goma xantana em *Sphingomonas*, e clonaram os genes relacionados à síntese do EPS, utilizando uma biblioteca de cosmídios contendo os genes de interesse, expressando em um sistema não produtor desta goma (Figura 4).

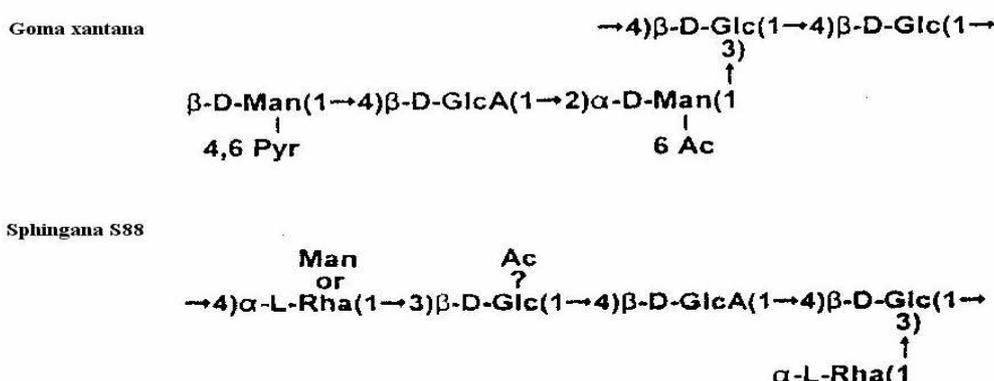


Figura 4 – Estrutura de goma xantana e sphingana S-88 (Pollock *et al.*, 1997)

Silva *et al.* (2001) sequenciaram o genoma de *Xylella fastidiosa* revelando a presença de um fragmento de DNA de 12 kb contendo nove ORFs, numa estrutura típica de operon, que mostrou homologia com os genes relacionados à produção de EPS em diversas espécies bacterianas. Estas ORFs possuem uma elevada similaridade com os genes do operon de *X. campestris* (*gumB–M*), tendo homologia com os genes *gumB, C, D, E, F, H, J, K* e *M*. Os genes *gumG, I* e *L* não foram encontrados neste fragmento de DNA e também não foram localizados em nenhum outro local do genoma de *X. fastidiosa*, incluindo os plasmídios. Devido à alta similaridade com o operon de *X. campestris* este cluster foi denominado de operon de goma fastidiana e os genes constituintes foram denominados da

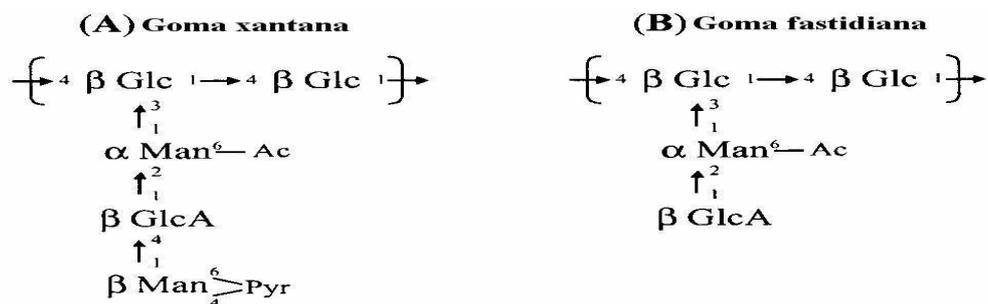


Figura 6 – Estrutura de goma xantana e goma fastidiana (Silva *et al.*, 2001)

2.2. Levana

A levana é um polímero de frutose formado durante a fermentação da sacarose. A levana é formada através de reações de transfrutossilacção, constituindo-se basicamente por unidades de frutose ligadas na posição β -(2,6), com ramificação β -(2,1) a cada nove resíduos de frutose.

Dentre as aplicações de levana incluem-se seu uso como emulsificante, estabilizante, agente encapsulante, carreador de cor e aroma na indústria de alimentos. A alta solubilidade e a baixa viscosidade das soluções aquosas de levana levaram a sugerir-lha como uma possível substituta da goma arábica (Wendt, 2001).

A levana também tem sido associada devido as suas propriedades biológicas como inibidora de tumores, pois aumentaria a permeabilidade celular para que entrem com maior facilidade os agentes citotóxicos (Leibovici & Stark, 1985; Calazans, *et al.*, 1997). Por estas razões, diversos microrganismos produtores de levanasacarase têm sido isolados e caracterizados (Ohtsuka *et al.*, 1992; Song & Rhee, 1994; Hettwer *et al.*, 1995; Sunitha *et al.*, 2000).

A levana pode ser sintetizada a partir de inúmeras espécies de microrganismos como: *Zymomonas*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, entre outras. A *Zymomonas mobilis* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa,

conhecida como uma eficiente produtora de etanol, tendo uma produtividade superior as leveduras comerciais. Em *Z. mobilis*, os monossacrídeos glicose e frutose são transportados para o interior da célula pelo processo de difusão facilitada e metabolizado pela via de Entner-Doudoroff, conhecida como glicólise oxidativa. A *Z. mobilis* pode fermentar sacarose, no entanto a capacidade fermentativa parece ser dependente da linhagem utilizada, e com o acúmulo de sub produtos como levana e sorbitol. Esta característica sugere que há diferentes grupos de enzimas com capacidade de hidrolisar a sacarose envolvida no metabolismo (Di Marco & Romano, 1985; Viikari, 1984).

O principal produto da fermentação de açúcares por *Zymomonas mobilis* é o etanol quando a glicose e a frutose são utilizadas como fonte de carbono, com rendimento superior a 95% em relação ao rendimento teórico (Lee *et al.*, 1997). Entretanto, quando a sacarose é utilizada na fermentação, o rendimento fermentativo diminui devido à formação de sub-produtos como levana (Lyness & Doelle, 1983; Park *et al.* 1983; Yoshida *et al.*1990) e sorbitol (Viikari, 1984; Amin & Khalaf Allah, 1992). Além destes compostos também são produzidos acetaldeído e ácido acético (Tanaka *et al.*, 1990) e pequenas quantidades de alguns álcoois superiores e fenol .

A levana se forma a partir da sacarose, mas não a partir de glicose ou frutose, ou de mistura desses açúcares, e o sorbitol parece ser sintetizado pela redução da frutose com simultânea oxidação da glicose.

A enzima levanasacarase, que atua na síntese de levana é uma tranfrutosilase (EC 2.4.1.10), capaz de catalisar a conversão enzimática de sacarose para levana. Três enzimas são capazes de hidrolisar a sacarose: (1) sacarase intracelular (*sacA* ou *invA*), (2) levanasacarase extracelular (*sacB* ou *invC*) e (3) sacarase extracelular (*sacC* ou *invB*) (Sangiliyandi & Gunasekaran, 2001).

A enzima *sacA* é um monômero com peso molecular de 58 kDa. O gene de *sacA*, de *Z. mobilis*, foi clonado, seqüenciado e caracterizado, entretanto na

ausência de um mecanismo de transporte para a sacarose, à função da sacarase intracelular não foi ainda identificada (Gunasekaran *et al.*, 1990).

A atividade da sacarase extracelular (*sacC* ou *invB*) tem alta especificidade para hidrolisar a sacarose, contribuindo com 60% da atividade de sacarase extracelular, mas não auxiliando na polimerização de frutose para obtenção de levana, nem com a degradação de polifrutoses como levana ou inulina.

A levanasacarase, uma beta-fruto-furanosidase, é uma enzima extracelular que é responsável pela hidrólise de sacarose e formação de levana. A enzima *SacB* de *Z. mobilis* Z6C tem um peso molecular de 56 kDa. O gene *sacB* clonado de *Z. mobilis* foi expresso e purificado a partir de um sistema recombinante (Lyness & Doelle, 1983).

Concluindo-se, o metabolismo da sacarose em *Z. mobilis* pode ser postulado da seguinte forma: Primeiro a sacarose exógena é hidrolisada para glicose e frutose pela sacarase extracelular (*sacC*), e então estes monossacarídeos são transportados para o interior das células. A enzima extracelular (*sacB*), catalisa a reação de transfrutoseilação para acumular levana, resultando no decréscimo da produtividade de etanol. Por um outro lado, a função da invertase intracelular (*sacA*) no metabolismo ainda não está esclarecida, podendo atuar desde na difusão facilitada ou no transporte ativo de sacarose, similar ao que é descrito em outras bactérias Gram-negativas (Yanase, *et al.*, 1995).

Agradecimentos: Ao CNPQ e a FAPESP pelo suporte financeiro.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Amin, G.; Khalaf Allah, A.M. (1992) By-production during direct conversion of sugar beets to ethanol by *Zymomonas mobilis* in conventional submerged and solid-state fermentations. **Biotechnology Letters** 14, 12, 1187-1192.
- Ananthalakshmy, V.K.; Gunasekaran, P. (1999) Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned *sacB* gene. **Enzyme and Microbial Technology** 25, 109-115.
- Boulnois, G. J.; Roberts, I. S. (1990) Genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Current Topic Microbiology and Immunology** 150, 1-18
- Calazans, G.M.T.; Lopes, C.E.; Lima, R.M.O.C.; França de, F.P. (1997) Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters** 19, 19-21.
- Calazans, G.M.T.; Lima, R.C.; França, F.P.de; Lopes, C.E. (2000) Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules** 27, 245-247.
- Crescenzi, V. (1995) Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. **Biotechnology Progress** 11, 251-259.
- Coplin, D.L.; Cook, D. (1990) Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 3, 5:271-279.
- Di Marco, A.A.; Romano, A.H. (1985) D-glycose transport system of *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology** 49, 151-157.
- Du, Z.; Geider, K. (2002) Characterization of an activator gene upstream of *Isc*, involved in levan synthesis of *Erwinia amylovora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 60, 9-17.
- Flores-Candia, J.L.F.; Deckwer, W.D. (1999) Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan. **Biotechnology Progress** 15, 3:446.

- Fontaniella, B.; Rodríguez, C.W.; Piñón, D.; Vicente, C.; Legaz, M.-E. (2002) Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Chromatography B** 770, 275-81.
- García-Ochoa, F.; Santos, V.E.; Casas, J.A.; Gómez, E. (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances** 18, 549-579.
- Gunasekaran, P.; Karunakaran, T.; Cami, B.; Mukundan, A.G.; Preziosi, L.; Baratti, J. (1990) Cloning and sequencing of the *sacA* gene: characterization of a sucrose from *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology** 172, 6727-6735.
- Hassler, R. A.; Doherty, D.H. (1990) Genetic engineering of polysaccharide structure: production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Progress** 6, 182-187.
- Hettwer, U.; Gross, M.; Rudolph, K. (1995) Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Journal of Bacteriology** 177, 2834-2839.
- Hettwer, U.; Jaeckel, F.R.; Boch, J.; Meyer, M.; Rudolph, K.; Ullrich, M (1998) Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*. **Applied and Environmental Microbiology** 64, 9:3180-3187.
- Hsu, C.-H.; Lo, Y.M. (2003) Characterization of xanthan *gum* biosynthesis in a centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. **Process Biochemistry** 1-9 (article in press).
- Ielpi, L.; Couso, R.O.; Dankert, M.A. (1993) Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. **Journal of Bacteriology** (1993) 175, 9:2490-2500.
- Kaplan, D.L.; Wilwy, B.J.; Mayer, J.M.; Arcidiacono, S.; Keith, J.; Lombardi, S.j., Ball, D.; Allen, A.L. **Biosynthetic polysaccharides. In: Biomedical**

- polymers: designed-to-degrade systems.** Ed. S.W. Shalaby. Hanser Publishers, New York, 1994. p. 189-212.
- Kannan, R.; Pitchaimani, K.; Gunasekaran, P.; Aït-Abdelkader, N.; Baratti, J. (1995) Overexpression of extracellular sucrose (sacC) of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters** 133, 29-33.
- Katzen, F.; Ferreiro, D.U.; Oddo, C.G.; Ielmini, M.V.; Becker, A.; PÜHLER, A.; Ielpi, L. (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology** 180, 7:1607-1617.
- Katzen, F.; Becker, A.; Ielmini, M.V.; Oddo, C.G.; Ielpi, L. (1999) New mobilizable vectors for gene replacement in Gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. **Applied and Environmental Microbiology** 65, 1:278-282.
- Kim, M-K.; Lee, I-Y.; Ko, J-H.; Rhee, Y.H.; Park, Y-H. (1999) Higher intracellular levels of uridine monophosphate under nitrogen-limited conditions enhance metabolic flux of curdlan synthesis in *Agrobacterium* species **Biotechnology and Bioengineering** 62, 3:317-322.
- Lee, J.W.; Yeomans, W.G.; Allen, A. L.; Kaplan, D. L.; Deng, F.; Gross, R. A. **Canadian Journal Microbiology** (1997) 43, 149-156.
- Leibovici, J.; Stark, Y. (1985) Increase cell permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. **Cellular and Molecular Biology** 31, 337-341.
- Leigh, J. A.; Coplin, D.L. 1992) Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. **Annu. Ver. Microbiol.** 46, 307-346.
- Leigh, J. A.; Walker, G. C. (1994) Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. **Trends Genetic** 10, 63-67.
- Letisse, F.; Chevallereau, P.; Simon, J.-L.; Lindley, N. (2002) The influence of metabolic network structures and energy requirements on xanthan gum yields. **Journal of Biotechnology** 99, 307-317.

- Linton, J.D.; Ash, S.G.; Huybrechts, I. Microbial polysaccharides. In: Byrom, D., ed. **Biomaterials** (1991) 215-261.
- Lyness, E.W.; Doelle, H.W. (1983) Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters** 5, 5, 345-350.
- Meyer, E.L.; Fuller, G.G.; Clark, R.C.; Kulicke, W.M. (1993) Investigation of xanthan gum solution behavior under shear-flow using rheo-optical techniques. **Macromolecules** 26, 3:504-11.
- Navarrete, R.C.; Shah, S.N.. (2001) **New Biopolymer for coiled tubing applications**. Society of Petroleum Engineers 68487, Richardson, TX, USA, 1-10.
- Navarrete, R.C.; Seheult, J.M.; Coffey, M.D. (2001) **New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer, and coil-tubing fluid, Part II**. International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 64982, Houston, TX, 1-15.
- Ohtsuka, K.; Hino, S.; Fukushima, T.; Ozawa, O.; Kanematsu, T.; Uchida, T. (1992) Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 56, 1373-1377.
- Park, Y.P.; Mortatti, M.P.L.; Sato, H.H. (1983) Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. **Biotechnology Letters** 5, 8:515-518.
- Paul, F.; Morin, A.; Monsan, P. (1986) Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. **Biotechnology Advances** 4, 245-259.
- Petroni, A.; Ielpi, L. (1996) Isolation and nucleotide sequence of the GDP-mannose: cellobiosyl-diphosphoprenol α -mannosyltransferase gene from *Acetobacter xilinum*. **Journal of Bacteriology** 178, 16:4814-4821.
- Pollock, T.J.; Workun, W.A.T.; Thorne, L.; Mikolajczak, M.J.; Yamazaki, M.; Kijne, J.W.; Armentrout, R.W. (1998) Assignment of biochemical functions to glycosyl transferase genes which are essential for biosynthesis of exopolysaccharide in

- Sphingomonas* strain S88 and *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology**, 180:3, 586-593.
- Rinaudo, M. On the relation structure-properties of some polysaccharides used in the food industry. In: Nishinari, K.; Doi, R. ed. **Food Hydrocolloids**. New York: Plenum Press, 1993. 510 p.
- Sanderson, G. R; Clark, R .C. (1983) Laboratory-produced microbial polysaccharide has many potencial food applications as a gelling, stabilizing and texturizing agent. **Food Technology** 37, 63-70.
- Sangiliyandi, G.; Gunasekaran, P. (2001) Polymerase and hydrolase activities of *Zymomonas mobilis* levansucrase separately modulated by in vitro mutagenesis and elevated temperature. **Process Biochemistry** 36, 6:543-545.
- Silva, F.R; Vettore, A.L; Kemper, E.L.; Leite, A.; Arruda, P. (2001) Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters** 203, 165-71.
- Song, K.B.; Rhee, S.K. (1994) Enzymatic synthesis of levan by *Zymomonas mobilis* levansucrase overexpressed in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters** 16, 1305-1310.
- Song, K.-B.; Seo, J.-W.; Rhee, S.-K. (1999) Transcriptional analysis of *levU* operon encoding saccharolytic enzymes and two apparent genes involved in amino acid biosynthesis in *Zymomonas mobilis* **Gene** 232, 1:107-114.
- Song, K-B.; Bae, K-S.; Lee, Y-B.; Lee, K-Y.; Rhee, S-K. (2000) Characteristics of levan fructotransferase from *Arthrobacter ureafaciens* K2032 and difructose anhydride IV formation from levan. **Enzyme and Microbial Technology** 27,212-218.
- Stading, M. **Gel structure and rheology in theory and practice**. Sweeden: Dep. of Food Science, Chalmers University of Technology, 1988. (Tese PhD).
- Stasinopoulos, S. J.; Fisher, P.R.; Stone, B. A.; Stanisich, V. A. (1999) Detection of two loci involved in (1-->3)-beta-glucan (curdlan) biosynthesis by

- Agrobacterium sp. ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene. **Glycobiology** 9, 1:31-41.
- Stredansky, M.; Conti, E.; Navarini, L.; Bertocchi, C. (1999) Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. **Process Biochemistry** 34, 11-16.
- Sunitha, K.; Chung, B.H.; Jang, K-H.; Song, K-B.; Kim, C.H.; Rhee, S-K. (2000) Refolding and Purification of *Zymomonas mobilis* Levansucrase Produced as Inclusion Bodies in Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification** 18, 3: 388-393.
- Sutherland, I.; Tait, M. Biopolymers. In: LEDERBERG, J. ed. **Encyclopedia of microbiology**. San Diego: Academic Press, 1992. p.339-349.
- Sutherland, I.W.; Kennedy, L. (1996) Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. **Microbiology (UK)** 142, 867-72.
- Tanaka, H.; Ishikawa, H.; Osuga, K.; Takagi, Y. (1990) Fermentative ability of *Zymomonas mobilis* under various oxygen supply conditions in batch culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 69, 4:234-239.
- Toma, M.M.; Kalnenieks, U.; Berzins, A.; Vigants, A.; Rikmanis, M.; Viesturs, U. (2003) The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry** 1-4 (article in press)
- Viikari, L. (1984) Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 19, 252-255.
- Vojnov, A.A.; Zorreguieta, A.; Dow, J.M.; Daniels, M.J.; Dankert, M.A. (1998) Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. **Microbiology** 144, 1487-1493.
- Wendt, R. **Estudo da produção de levana através de *Zymomonas mobilis***. Campinas, 2001. 176p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- Yalpani, M.; Sandford, P.A.; Commercial polysaccharides: Recent trends and developments. In: Yalpani, M., ed. Industrial polysaccharides. **Progress in Biotechnology**, v. 3. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 311-335.
- Yanase, H.; Iwata, M.; Kita, K.; Kato, N.; Tonomura, K. (1995) Purification, crystallization, and characterization of the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 79, 4:367-369.
- Yoo, S.D.; Harcum, S.W. (1999) Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. **Bioresourse Technology** 70, 105-109.
- Yoshida, Y.; Suzuki, R.; Yagi, Y. (1990) Production of levan by a *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 70, 4:269-271.

**CAPÍTULO 2 - Clonagem e expressão do gene *sacB* de *Zymomonas mobilis*
em *Xanthomonas*: síntese de exopolissacarídeo**

**Clonagem e expressão do gene *sacB* de *Zymomonas mobilis* em
Xanthomonas: síntese de exopolissacarídeo**

Padilha, F.F.¹; Tahara, S.T.²; Rosato, Y.B.²; Scamparini, A.R.P.¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos – FEA; ² Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- C.P. 6121, CEP 13081.970, Campinas, SP, Brasil. e-mail: francinepadilha@hotmail.com

RESUMO

A produção de exopolissacarídeos bacterianos é um processo complexo e o desconhecimento dos eventos moleculares que estão envolvidos na síntese destes, fazem com que haja dificuldade na manipulação das culturas, no processo fermentativo e nas modificações das propriedades físico-químicas dos polissacarídeos. O objetivo do presente trabalho foi transferir e expressar o gene *sacB* de *Zymomonas mobilis* para linhagens de *Xanthomonas* e caracterizar o polímero produzido pelas linhagens transformadas, verificando a influência da adição deste gene na produção de goma. O gene *sacB* de *Z. mobilis* foi amplificado por PCR, clonado no vetor pKX e utilizado para eletrotransformar as linhagens de *X. campestris* pv *campestris* CA110 e *X. axonopodis* pv *manihotis* 289. As linhagens transformadas foram analisadas quanto a produção de exopolissacarídeo (EPS). Para a fermentação foram utilizados os meios YM e RS para crescimento celular e os meios RS com alta concentração de sacarose e I+II para produção de EPS. O EPS produzido foi quantificado para cálculo da produção e posterior análises através de cromatografia e viscosidade aparente. Os resultados mostram que dentre as nove linhagens transformadas obtidas, somente três apresentaram frutose na composição química do EPS produzido,

característica do polímero de levana, tendo também um acréscimo na viscosidade aparente quando comparado à linhagem não transformada.

Palavras-chaves: levana, *Zymomonas mobilis*, recombinante, *Xanthomonas*

1. INTRODUÇÃO

A produção de polissacarídeos extracelulares (EPSs) é extremamente comum em diversos microrganismos, sendo importantes constituintes das células bacterianas e com papel relevante na interação das bactérias com o meio ambiente. Esses EPSs podem estar associados à superfície celular, como uma cápsula ao redor da célula ou serem excretados para o meio ambiente como um muco (Coplin & Cook, 1990; Silva *et al.*, 2001).

Os estudos de modificações no processo fermentativo, nas propriedades físico-químicas e para a elucidação do processo de biossíntese de polissacarídeos vem sendo realizada utilizando diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e frutose) ou por microrganismos mutantes, o que naturalmente torna os resultados muito inespecíficos (Hassler & Doherty, 1990; Kaplan *et al.*, 1994). Atualmente, os estudos de biologia molecular são de extrema relevância, pois o conhecimento dos genes envolvidos nas rotas de biossíntese é fundamental tanto para modificar microrganismos com a finalidade de aumentar a produtividade no processo fermentativo, como para alterar o peso molecular e a composição química do polímero, além de serem de fundamental importância nos estudos de fitopatologia (Hettwer *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2001; Fontaniella *et al.*, 2002).

A levana é um polímero de frutose, formado através de reações de transfrutossilacção, constituindo-se basicamente por unidades de frutose ligadas na posição β -(2,6), com ramificação β -(2,1) a cada nove resíduos de frutose (Figura 1). Apresenta uma aplicação potencial nas áreas de alimentos, farmacêutica e como agente anti-tumoral (Calazans *et al.*, 1997 e 2000). A levana tem sido citada

pelas suas propriedades biológicas como inibição de tumores, devido aumentar a permeabilidade celular facilitando a ação dos agentes citotóxicos (Leibovici & Stark, 1985). Por estas razões, diversos microrganismos produtores de levanasacarase têm sido isolados e caracterizados (Ohtsuka *et al.*, 1992; Song & Rhee, 1994; Hettwer *et al.*, 1995; Sunitha *et al.*, 2000). Em relação a biossíntese de levana inúmeros estudos estão sendo realizados para identificar os genes das enzimas envolvidas no processo de síntese de levana e suas localizações, como também a funcionalidade dos mesmos em diferentes microrganismos (Ananthakumari & Gunasekaran, 1999; Hettwer *et al.*, 1998; Song, *et al.*, 1999; Calazans *et al.*, 2000; Wendt, 2001; Du & Geider, 2002; Toma *et al.*, 2003).

A levana pode ser sintetizada a partir de inúmeras espécies de microrganismos como: *Zymomonas*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, entre outras. A *Z. mobilis* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, conhecida como uma eficiente produtora de etanol, tendo uma produtividade superior as leveduras comerciais. Em *Z. mobilis* os monossacrídeos glicose e frutose são transportados para o interior da célula pelo processo de difusão facilitada e metabolizado pela via de Entner-Doudoroff conhecida como glicólise oxidativa. A *Z. mobilis* pode fermentar sacarose, no entanto a capacidade fermentativa parece ser dependente da linhagem utilizada, como também o acúmulo de sub produtos como levana e sorbitol. Esta característica sugere que há diferentes grupos de enzimas com capacidade de hidrolisar a sacarose envolvida no metabolismo (Di Marco & Romano, 1985; Viikari, 1984).

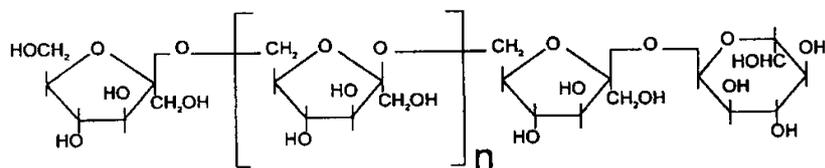


Figura 1 – Estrutura da goma levana (Hettwer *et al.*, 1998)

Quando *Z. mobilis* cresce em meio contendo sacarose, as enzimas hidrolisam a sacarose liberando glicose e frutose. Três diferentes enzimas são

capazes de hidrolisar a sacarose: uma sacarase intracelular (*sacA* ou *invA*), uma levanasacarase extracelular (*sacB* ou *invC*) e uma sacarase extracelular (*sacC* ou *invB*) (Sangiliyandi & Gunasekaran, 2001). A enzima *sacA* é um monômero com peso molecular de 58 kDa. O gene de *sacA*, de *Z. mobilis*, foi clonado, seqüenciado e caracterizado, entretanto na ausência de um mecanismo de transporte para a sacarose, a função da sacarase intracelular não está bem esclarecida (Gunasekaran *et al.*, 1990).

A atividade de sacarase extracelular (*sacC* ou *invB*) tem alta especificidade na hidrólise de sacarose. Esta enzima contribui com 60% da atividade de sacarase extracelular, mas nada com a catálise da polimerização de frutose para levana nem com a degradação de polifrutoses como levana ou inulina.

A levanasacarase (*sacB*), uma beta-fruto-furanosidase, é uma enzima extracelular que é responsável pela hidrólise de sacarose e polimerização das unidades de frutose para a formação de levana. A enzima *sacB* de *Z. mobilis* Z6C tem um peso molecular de 56 kDa. O gene *sacB* de *Z. mobilis* foi clonado, expresso e purificado em *E. coli* recombinante (Lyness & Doelle, 1983).

O metabolismo da sacarose, em *Z. mobilis*, pode ser postulado da seguinte forma: primeiro a sacarose exógena é hidrolisada para glicose e frutose pela invertase extracelular (*sacC*), sendo os monossacarídeos obtidos pela hidrólise transportados para o interior da célula. A enzima extracelular, *sacB*, catalisa a reação de transfrutossilacção para acumular levana, resultando no decréscimo da produtividade de etanol. A função da invertase intracelular, *sacA*, no metabolismo ainda não está elucidada, podendo atuar na difusão facilitada ou no transporte ativo de sacarose, similar ao que é descrito em outras bactérias Gram-negativas. (Yanase *et al.*, 1995).

A *Xanthomonas campestris* é uma bactéria fitopatogênica que infecta diversas espécies de crucíferas causando a morte destas plantas. Quando esta bactéria infecta a planta ela produz um polissacarídeo de alto peso molecular

conhecido como goma xantana e que pode estar relacionada aos fatores de virulência (Fontaniella *et al.*, 2002).

A xantana é um heteropolissacarídeo, cuja unidade básica repetidora é um pentassacarídeo constituído por glicose, manose, ácido glucurônico (2:2:1) e grupos piruvato e acetil, de extrema importância sob o aspecto comercial. A sua aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica, petroquímica é devido principalmente as suas propriedades de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis que lhe fornecem propriedades reológicas únicas, além de manter soluções estáveis em ampla faixa de pH e temperatura. Atualmente é o único polissacarídeo microbiano que vem sendo comercializado em grande escala (Meyer *et al.*, 1993; Sutherland & Kennedy, 1996; Garcia-Ochoa *et al.*, 2000).

Devido à intensa utilização destes polissacarídeos, inúmeros estudos tem sido realizados na área de expressão de genes que codificam a produção de polissacarídeo, bem como na expressão heteróloga destes genes em outros sistemas para verificar a sua influência (Kannan *et al.*, 1995; Pollock *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001).

A *Z. mobilis* é considerada com potencial para a produção em larga escala de levana, mas possui uma baixa produtividade do polissacarídeo durante o processo fermentativo, portanto torna-se necessário o estudo da expressão do gene *sacB* em outros microrganismos que possam apresentar melhor eficiência na expressão do gene (Song & Rhee, 1994; Belghith *et al.*, 1996; Ananthalakshmy & Gunasekaran, 1999).

O objetivo deste trabalho foi expressar o gene *sacB* de levanasacarase de *Z. mobilis* em *X. campestris* pv *campestris* CA110 e *X. axonopodis* pv *manihotis* 289, e caracterizar o exopolissacarídeo produzido pela linhagem recombinante, através de análise da produção, composição dos monossacarídeos constituintes do polímero e viscosidade aparente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Linhagens bacterianas utilizadas e meios de cultura

As linhagens utilizadas nos experimentos foram as seguintes: *Z. mobilis* linhagem Z-6-88 (Coleção do Departamento de Antibióticos – UFPE); *X. campestris* pv *campestris* CA110 (NRRL B-1459) e *X. axonopodis* pv *manihotis* linhagem 289 (SBF, Instituto Biológico, Campinas, SP). A linhagem *E. coli* DH5 α foi utilizada para as etapas de clonagem. A linhagem de *Z. mobilis* foi mantida segundo Wendt (2001). As linhagens de *Xanthomonas* foram mantidas em meio NYGB (Turner *et al.*, 1984). As células competentes de *E. coli* e *Xanthomonas* (Ferreira *et al.*, 1996), CA110 e 289, foram mantidas a -70°C.

2.2. Manipulação de DNA

A extração do DNA cromossômico foi feita a partir das células retiradas das placas, estas foram colocadas em tubos de microcentrifuga, lavadas com tampão TAS (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0) e ressuspendidas em 500 μ L do mesmo tampão. SDS (concentração final de 1%) e proteinase K (150 μ g/mL) foram adicionados na suspensão celular e os tubos incubados por 1h a 50°C. O material celular restante foi removido pela adição de 500 μ L de fenol na suspensão e centrifugado por 3 min a 10000 x g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e 500 μ L de clorofórmio foram adicionados. O tubo foi novamente centrifugado por 3 min e o sobrenadante transferido para uma membrana de diálise. A suspensão foi dialisada contra tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,8) por 48 h. O DNA dialisado foi armazenado em tubos a 4°C.

A extração de plasmídios foi de forma geral efetuada por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). As bactérias foram crescidas em meio de cultura líquido e cerca de 3 mL foram utilizados para cada extração. As células foram coletadas após centrifugação (10000 x g / 1 minuto) e suspensas em 300 μ L de solução P1

(Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM; EDTA (pH 8,0) 10 mM; RNase 100 µg/mL). A seguir foram adicionados 300 µL de solução P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%) e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 300 µL de solução P3 (acetato de potássio 3M; pH 5,5) e agitado suavemente por inversão. O tubo foi centrifugado a 10000 x g / 10 minutos a 14°C e 700–800 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 400 µL de isopropanol seguido por centrifugação a 10000 x g / 10 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi lavado com 500–700 µL de etanol 70% e o DNA precipitado secado completamente, sendo ressuspendido posteriormente em 20 µL de TE. Após a extração foi quantificado o DNA em gel de agarose 0,8% para uso posterior na eletroporação.

2.2.1. PCR (Polymerase chain reaction)

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL, contendo: 50 ng de DNA, 5 pmol do *primer* LEV1 (AAAGCAGGCATTGCAGAG) e 5 pmol do *primer* LEV2 (GATCTGTGGCGGAATATAG), 250 µM de dNTP, 0,5 unidades de *Taq* polimerase (Amersham – Pharmacia). As condições de amplificação usadas foram: um ciclo de 3 min a 94°C, quarenta ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 2 min a 72°C. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese com gel de agarose 0,8% e visualizados no transiluminador após coloração com brometo de etídio.

2.2.2. Clonagem do gene *sacB* e transformação

O material amplificado por PCR foi extraído do gel com o kit Concert™ Rapid Gel Extraction System (GibcoBRL, USA), e quantificado em gel de agarose 0,8%. O fragmento purificado foi clonado no vetor pGEM®-T Easy Vector System I (Promega) com reação final de 5 µL contendo: 2,5 µL de tampão de clonagem (2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase), 0,5 µL de pGEM®-T Easy Vector (50ng/mL)

0,5 µL de T4 DNA ligase e 30 ng de DNA (inserto). A reação foi realizada à temperatura ambiente por 2 horas e posteriormente utilizada para transformar *E. coli* DH5α. A transformação foi realizada utilizando uma alíquota da reação de PCR, 2,5 µL, que foi adicionada em um tubo contendo 0,1 mL de células competentes de *E. coli* DH5α e mantida por 30 min no gelo, 1 min a 42°C e 2 min no gelo. Foram adicionados 0,9 mL de meio LB e a mistura foi incubada a 37°C por 1 h. Alíquotas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (Amp) e X-gal e incubadas a 37°C. Os clones obtidos na transformação foram inoculados em meio LB/Amp e incubados a 37°C por 24 h para extração do plasmídeo (Kit MINIPREP Quiagen). A presença do inserto foi confirmada por reação de PCR utilizando se DNA plasmidial.

O gene *sacB* foi transferido também para o vetor pKX (Baldini *et al.*, 1999), um vetor compatível para *Xanthomonas*. A subclonagem de *sacB* foi efetuada no sítio de clonagem *EcoRI* e a preparação de células competentes para a transformação de *Xanthomonas* procedeu-se de acordo com metodologia descrita (Ferreira *et al.*, 1996), utilizando-se 50 ng/mL de inserto/vetor. Após a eletroporação, realizada a 1,9 V, com pulsos de 4,4 – 4,7 mseg, foram adicionados 900 µL de meio N seguido por incubação a 28°C por 2 horas. Amostras foram plaqueadas em meio N contendo kanamicina e incubadas a 28°C por 48 horas. O controle foi feito com células não transformadas (Sambrook *et al.*, 1989).

2.3. Produção de polissacarídeo

A fermentação foi realizada utilizando células de *X. campestris* pv *campestris* CA110 e *X. axonopodis* pv *manihotis* 289 transformadas e não transformadas para os estudos de produtividade e caracterização físico-química da goma sintetizada.

A fermentação das linhagens transformadas foi feita utilizando dois meios para o inóculo e dois para a fermentação, o de xantana (YM e MPI+II) e o de levana (RS e RS com 18% sacarose) (Wendt, 2001).

O inóculo foi feito, em erlenmeyer de 50 mL, com 7 mL de meio YM contendo (g L^{-1}): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0 ou em meio RS contendo (g L^{-1}): sacarose 50,0; KH_2PO_4 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0; MgSO_4 0,5; extrato de levedura 10,0. O inóculo foi incubado a 28°C , 120 rpm, 24 horas.

A produção do polissacarídeo foi feita, em erlenmeyer de 250 mL, com 43 mL de meio de fermentação MPI+II contendo (g L^{-1}): $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2,5; K_2HPO_4 5,0; H_3BO_3 0,006; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0; FeCl_3 0,0024; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,002; ZnSO_4 0,002; sacarose 50,0; ou no meio RS contendo (g L^{-1}): sacarose 180,0; KH_2PO_4 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4; MgSO_4 0,5; extrato de levedura 10,0. O inóculo adicionado estava com a concentração celular de $1,9 \times 10^8$ UFC/mL. Após a adição do inóculo (10%) os erlenmeyers foram incubados a 28°C , 200 rpm, 72 horas.

O caldo fermentado foi centrifugado a $16000 \times g$ por 20 min e o polissacarídeo recuperado a partir do sobrenadante que foi precipitado com etanol 96% (1:4, v/v) e centrifugado a $16000 \times g$ por 10 min. O precipitado foi liofilizado, dializado e novamente liofilizado, para posterior pesagem e cálculo da produção.

2.4. Análise de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

As amostras dos polissacarídeos foram analisadas quanto a sua composição química por CLAE, os padrões utilizados foram glicose, frutose, manose, ramnose, ácido glucurônico e ácido galacturônico (Sigma, EUA). As metodologias utilizadas na CLAE foram segundo Druzian (2000).

A hidrólise da amostra foi realizada nas seguintes condições: 5 mg de amostra, 500 mL de TFA 1M. 16h a 100°C, a amostra foi seca com N₂ e ressuspendida em 500 mL de água milli-Q. Sendo posteriormente filtrada e armazenada em vials até a análise a 4°C.

As condições de análise para os açúcares foram as seguintes: fase móvel – água deionizada; fluxo de 0,5 mL/min; temperatura do forno de 80°C; Pressão de 72Kgf/cm²; detector de Índice de refração; coluna - Polyspher® CHCA Carbohydrate Column (Merck).

As condições de análise para ácidos foram as seguintes: fase móvel – ácido perclórico pH 1,9; fluxo de 0,6 mL/min; temperatura do forno de 80°C; Pressão de 72Kgf/cm²; detector Arranjo de Diodos; coluna: Shim-pack SCR-101H polystyrene-divinylbenzene (Shimadzu).

2.5. Reologia

As análises de viscosidade foram feitas com solução aquosa a 1% das amostras obtidas pelas linhagens transformadas e não transformadas. As amostras de polímero foram diluídas em água milli-q, a concentração da solução foi de 1%. A solução foi mantida sob agitação por 1h e posteriormente ficou em repouso por 24h a 4°C.

As análises foram determinadas a 25°C, em uma taxa de cisalhamento de 0 - 300 s⁻¹, utilizando dispositivo tipo cone-placa PQ-45 e reômetro Haake modelo CV-20.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Clonagem do gene *sacB* e transformação de *Xanthomonas*

O resultado da amplificação, com o *primer* LEV, da linhagem de *Z. mobilis* Z-6-88 foi à obtenção de um fragmento com 1.2 kb, sendo este o tamanho de fragmento esperado segundo Hettwer *et al.* (1998) e Seo *et al.* (2000) (Figura 2). O fragmento foi isolado após purificação do fragmento do gel de agarose e clonado no vetor pGEM[®]-T Easy. O gene clonado foi utilizado para transformar *E. coli*, sendo a confirmação da clonagem efetuada por reação de PCR. A nova linhagem obtida foi denominada L24.

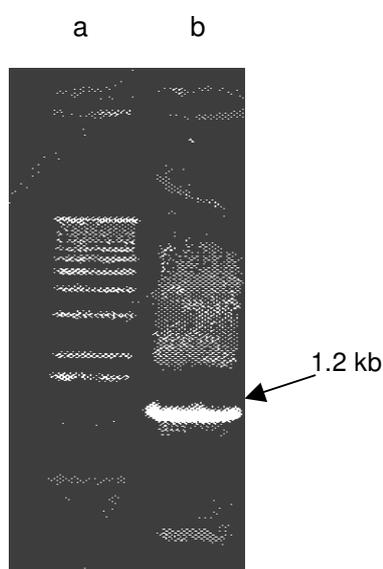


Figura 2 – Gel de agarose 0,8% com produto da reação de PCR utilizando DNA cromossômico de *Z. mobilis* com primers de *sacB*. (a) marcador de peso molecular de 1 kb (Gibco BRL, USA); (b) produto da reação de PCR

Desde que o vetor de clonagem é incompatível em bactérias do gênero *Xanthomonas* houve necessidade de subclonar este fragmento em um outro vetor, tendo sido escolhido o pKX (Baldini *et al.*, 1999). Dessa forma o DNA plasmidial da L24 foi extraído e digerido com a enzima *EcoRI* e transferido para o novo vetor também digerido com a enzima *EcoRI*. Após ligação do fragmento ao pKX, a mistura foi utilizada para eletroporar células de *X. campestris* pv *campestris* CA110 e *X. axonopodis* pv *manihotis* 289, previamente preparadas para

competência. Os clones obtidos após a eletroporação foram purificados e confirmados quanto ao fragmento clonado por reação de PCR. A confirmação da clonagem foi também efetuada por extração do plasmídeo e digestão com *EcoRI*.

Foram obtidos no total 9 clones de *Xanthomonas* portando o gene de levana, sendo estes denominados de CA110 L24 e 289 L24 de acordo com a linhagem hospedeira. Foram selecionados dois clones de cada uma das linhagens utilizadas, CA110 L24C2, CA110 L24C4, 289 L24C2 e 289 L24C4, para a produção de exopolissacarídeo.

3.2. Produção de exopolissacarídeo

As linhagens transformadas de *Xanthomonas* foram analisadas quanto à produção de EPS utilizando dois meios para a fermentação específicos para produção de xantana (YM e MPI+II) e levana (RS e RS com 18% de sacarose). Como controle foram utilizadas as linhagens originais de *Xanthomonas* não transformadas. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 1.

A Tabela 1 mostra que a linhagem transformada (RS289 L24C4) ($8,79 \text{ gL}^{-1}$) teve uma produção de 18,1% superior à linhagem não transformada (RS289) ($7,44 \text{ gL}^{-1}$). A produtividade das demais linhagens transformadas foi inferior em relação às linhagens não transformadas. Segundo Diez & Yokoya (1996) a produção de levana por *Z. mobilis* CP4 foi de $3,56 \text{ gL}^{-1}$, para mutantes de *Lactobacillus reuteri* foi obtida uma produção de $1,7 \text{ gL}^{-1}$ (Van Geel-Schutten *et al.*, 1999).

3.3. Análise dos monossacarídeos por CLAE

Os polímeros obtidos por fermentação foram analisados por CLAE, utilizando o detector de índice de refração, para verificar os monossacarídeos presentes no polímero sintetizado pelas linhagens transformadas. A análise dos cromatogramas mostra a presença de frutose no EPS sintetizado por três linhagens transformadas. Os clones que sintetizaram o novo exopolissacarídeo, contendo glicose, manose e frutose, foram os seguintes: CA110 L24C2 e CA110

L24C4 ambos fermentados em meio MP I+II e o clone 289 L24C4 fermentado em meio RS.

Os demais clones testados não apresentaram frutose em sua composição. A ausência deste monossacarídeo nos EPS sintetizados pelos clones, pode ser devido à não incorporação do gene corretamente no DNA do hospedeiro e como consequência a não expressão do gene. Pois, em testes complementares de PCR com o DNA extraído dos clones foi detectado um fragmento de 1.2 Kb amplificado com os primers específicos do gene de levana sacarase, evidenciando a presença do gene em todos os clones obtidos.

O clone que obteve maior produtividade em relação à linhagem não transformada também apresentou frutose na sua composição. A presença de frutose nos novos exopolissacarídeos indica que há expressão do gene *sacB* nestes clones. A síntese de levana tem sido reportada em diversos microrganismos (Van Geel-Schutten *et al.*, 1999; Jang *et al.*, 2003), entretanto não foi relatado em *Xanthomonas*. Este estudo relata a síntese de levana ou um novo polissacarídeo sintetizado pela linhagem transformada com frutose na sua estrutura.

Entretanto, desconhece-se como a frutose está sendo incorporada, se pela formação de levana ou pela incorporação desse açúcar na estrutura da xantana. Para o esclarecimento desta questão é necessária uma análise de peso molecular do polissacarídeo sintetizado para verificar se este é um único polissacarídeo ou dois que estão sendo precipitados concomitantemente.

Tabela 1 – Produção de exopolissacarídeo por linhagens transformadas e não transformadas em dois meios de fermentação (I+II e RS)

<i>Amostra</i>	<i>Produção de EPS (gL⁻¹)*</i>
RSCA110	8,59
RSCA110 L24-C2	4,97
RSCA110 L24-C4	7,89
RS289	7,44
RS289 L24-C2	3,69
RS289 L24-C4	8,79
I+II CA110	6,48
I+II CA110 L24-C2	4,70
I+II CA110 L24-C4	5,68
I+II 289	5,75
I+II 289 L24-C2	2,99
I+II 289 L24-C4	4,95

* Média de experimento feito em triplicata.

3.4. Análise reológica

A análise de viscosidade aparente foi realizada para verificar o comportamento dos polissacarídeos sintetizados pelas linhagens transformadas e não transformadas. Os reogramas podem fornecer um indicativo das principais aplicações do polissacarídeo.

As soluções de polissacarídeo, proveniente da linhagem transformada e não transformada, apresentaram comportamento pseudoplástico, isto é, a viscosidade aparente decresce como o aumento da taxa de cisalhamento. Este comportamento é esperado em soluções poliméricas de polissacarídeos

bacterianos. Os valores foram analisados aplicando-se a equação do Modelo de Ostwald de Waele ($\tau = K\dot{\gamma}^n$). O cálculo foi feito com taxas entre 0 – 300 s⁻¹ segundo Amanullah *et al.*, 1996; Cacik *et al.*, 2001; Manjula Rao *et al.*, 2003.

Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 3. Esta figura mostra que a solução aquosa do polissacarídeo sintetizado em meio I+II pela linhagem transformada CA110 L24C4, a qual contém o gene *sacB*, apresenta viscosidade aparente superior as soluções de polissacarídeos obtidos por linhagens não modificadas. No entanto, este comportamento não é similar para as outras soluções de polímeros sintetizados por linhagens transformadas que contém o gene *sacB*.

Devido as diferenças apresentadas no comportamento reológico dos EPS analisados torna-se necessário um estudo mais aprofundado com ensaios oscilatórios para verificar a característica viscoelástica das amostras.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que se obteve um clone com expressão do gene de levana sacarase e este apresentou viscosidade aparente superior às linhagens padrões. É necessário prosseguir os estudos da avaliação destes polissacarídeos quanta a suas aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica, também como para elucidar se a frutose está sendo incorporada estruturalmente em um novo EPS ou levana está sendo formada de forma independente e co-precipitando com a xantana.

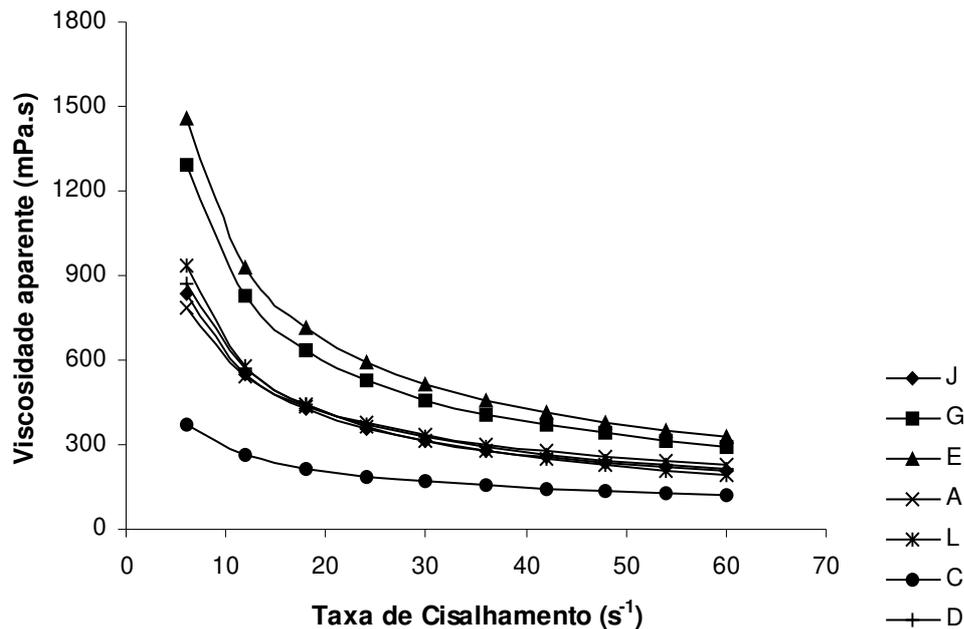


Figura 3 - Viscosidade aparente da solução aquosa a 1% de exopolissacarídeo sintetizado por linhagens transformadas (L24) e não transformadas (CA110 e 289) em dois meios de fermentação (I+II e RS com 18% de sacarose) a 25°C usando dispositivo de cone-placa PQ45, reômetro Haake modelo CV-20. (A) I+II CA110 L24C2; (C) RS CA110 L24C2; (D) RS 289 L24C4; (E) I+II CA110 L24C4; (G) I+II CA110; (J) I+II 289 L24C4 (L) RS 289

Agradecimentos: Ao CNPQ e a FAPESP pelo suporte financeiro.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amanullah, A.; Serrano, L.-C.; Galindo, E.; Nienow, A.W. (1996) Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. **Biotechnology Progress** 12, 466-473.

- Ananthalakshmy, V.K.; Gunasekaran, P. (1999) Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned *sacB* gene. **Enzyme and Microbial Technology** 25, 109-115.
- Baldini, R.L.; Tahara, S.; Rosato, Y.B. (1999) A rolling-circle miniplasmid of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: the nucleotide sequence and its use as a cloning vector. **Plasmid** 42, 126-133.
- Belghith, H.; Song, K.-B.; Kim, C.-H.; Rhee, S.-K. (1996) Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. **Biotechnology Letters** 18, 467-472.
- Cacik, F.; Dondo, R.G.; Marqués, D. (2001) Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. **Computers and Chemical Engineering** 25, 409-418.
- Calazans, G.M.T.; Lopes, C.E.; Lima, R.M.O.C.; França de, F.P. (1997) Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters** 19, 19-21.
- Calazans, G.M.T.; Lima, R.C.; França, F.P.de; Lopes, C.E. (2000) Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules** 27, 245-247.
- Coplin, D.L.; Cook, D. (1990) Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 3, 5:271-279.
- Di Marco, A.A.; Romano, A.H. (1985) D-glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology** 49, 151-157.
- Diez, J.C.; Yokoya, F. Efeito da temperatura e pH na produção de etanol e levana durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. **Arquivo de Biologia e Tecnologia** 39, 1:129-137.
- Druzian, J.I. Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de

- cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.)**, Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2000. 179p.
- Du, Z.; Geider, K. (2002) Characterization of an activator gene upstream of *Isc*, involved in levan synthesis of *Erwinia amylovora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 60, 9-17.
- Ferreira, H.; Barrientos, F.A.; Baldini, R.L.; Rosato, Y.B. (1996) Electrotransformation of three pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 43, 651-655.
- Fontaniella, B.; Rodríguez, C.W.; Piñón, D.; Vicente, C.; Legaz, M.-E. (2002) Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Chromatography B** 770, 275-81.
- García-Ochoa, F.; Santos, V.E.; Casas, J.A.; Gómez, E. (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances** 18, 549-579.
- Gunasekaran, P.; Karunakaran, T.; Cami, B.; Mukundan, A.G.; Preziosi, L.; Baratti, J. (1990) Cloning and sequencing of the *sacA* gene: characterization of a sucrose from *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology** 172, 6727-6735.
- Hassler, R. A.; Doherty, D.H. (1990) Genetic engineering of polysaccharide structure: production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Progress** 6, 182-187.
- Hettwer, U.; Jaekel, F.R.; Boch, J.; Meyer, M.; Rudolph, K.; Ullrich, M (1998) Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*. **Applied and Environmental Microbiology** 64, 9:3180-3187.
- Hettwer, U.; Gross, M.; Rudolph, K. (1995) Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Journal of Bacteriology** 177, 2834-2839.

- Jang, K.-H.; Ryu, E.-J.; park, B.-S.; Song, K.-B.; Kang, S.A.; Kim, C.H.; Uhm, T.-B.; Park, Y.-I.; Rhee, S.-K. (2003) Levan fructotransferase from *Arthrobacter oxydans* J17-21 catalyzes the formation of the di-D-fructose dianhydride IV from levan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 2632-2636.
- Kannan, R.; Pitchaimani, K.; Gunasekaran, P.; Aït-Abdelkader, N.; Baratti, J. (1995) Overexpression of extracellular sucrose (*sacC*) of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters** 133, 29-33.
- Kaplan, D.L.; Wilwy, B.J.; Mayer, J.M.; Arcidiacono, S.; Keith, J.; Lombardi, S.j., Ball, D.; Allen, A.L. **Biosynthetic polysaccharides. In: Biomedical polymers: designed-to-degrade systems.** Ed. S.W. Shalaby. Hanser Publishers, New York, 1994. p. 189-212.
- Leibovici, J.; Stark, Y. (1985) Increase cell permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. **Cellular and Molecular Biology** 31, 337-341.
- Lyness, E.W.; Doelle, H.W. (1983) Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters** 5, 5, 345-350.
- Manjula Rao, Y.; Suresh, A.K.; Suraishkumar, G.K. (2003) Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry** 1-10
- Meyer, E.L.; Fuller, G.G.; Clark, R.C.; Kulicke, W.M. (1993) Investigation of xanthan *gum* solution behavior under shear-flow using rheo-optical techniques. **Macromolecules** 26, 3:504-11.
- Ohtsuka, K.; Hino, S.; Fukushima, T.; Ozawa, O.; Kanematsu, T.; Uchida, T. (1992) Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 56, 1373-1377.
- Pollock, T.J.; Mikolajczak, M.; Yamazaki, M.; Thorne, L.; Armentrout, R.W. (1997) Production of xanthan gum by *Sphingomonas* bacteria carrying genes from *Xanthomonas campestris*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 19, 92-97.

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) **Molecular Cloning: a laboratory manual**, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sangiliyandi, G.; Gunasekaran, P. (2001) Polymerase and hydrolase activities of *Zymomonas mobilis* levansucrase separately modulated by in vitro mutagenesis and elevated temperature. **Process Biochemistry** 36, 6:543-545.
- Seo, J.-W.; Song, K.-B.; Jang, K.-H.; Kim, C.-H.; Jung, B.-H.; Rhee, S.-K. (2000) Molecular cloning of a gene encoding the thermoactive levansucrase from *Rahnella aquatilis* and its growth phase-dependent expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology** 81, 63-72.
- Silva, F.R.; Vettore, A.L.; Kemper, E.L.; Leite, A.; Arruda, P. (2001) Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters** 203, 165-71.
- Song, K.B.; Rhee, S.K. (1994) Enzymatic synthesis of levan by *Zymomonas mobilis* levansucrase overexpressed in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters** 16, 1305-1310.
- Song, K.-B.; Seo, J.-W.; Rhee, S.-K. (1999) Transcriptional analysis of *levU* operon encoding saccharolytic enzymes and two apparent genes involved in amino acid biosynthesis in *Zymomonas mobilis* **Gene** 232, 1:107-114.
- Song, K.-B.; Bae, K.-S.; Lee, Y.-B.; Lee, K.-Y.; Rhee, S.-K. (2000) Characteristics of levan fructotransferase from *Arthrobacter ureafaciens* K2032 and difructose anhydride IV formation from levan. **Enzyme and Microbial Technology** 27,212-218.
- Sunitha, K.; Chung, B.H.; Jang, K.-H.; Song, K.-B.; Kim, C.H.; Rhee, S.-K. (2000) Refolding and Purification of *Zymomonas mobilis* Levansucrase Produced as Inclusion Bodies in Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification** 18, 3: 388-393.
- Sutherland, I.W.; Kennedy, L. (1996) Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. **Microbiology (UK)** 142, 867-72.

- Toma, M.M.; Kalnenieks, U.; Berzins, A.; Vigants, A.; Rikmanis, M.; Viesturs, U. (2003) The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry** 1-4 (*article in press*)
- Turner, P.; Barber, C.; Daniels, M. (1984) Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular General Genetic** 195, 101-107
- Van Geel-Schutten, G.H.; Faber, E.J.; Smit, E.; Bonting, K.; Smith, M.R.; Ten Brink, B.; Kamerling, J.P.; Vliegthart, J.F.G.; Dijkhuizen, L. (1999) Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. **Applied and Environmental Microbiology** 65, 7:3008-3014.
- Viikari, L. (1984) Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 19, 252-255.
- Wendt, R. **Estudo da produção de levana através de *Zymomonas mobilis***. Campinas, 2001. 176p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Yanase, H.; Iwata, M.; Kita, K.; Kato, N.; Tonomura, K. (1995) Purification, crystallization of the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 79, 4:367-369.

CAPÍTULO 3 - Efeito da transferência do operon *gum* de *Xylella fastidiosa* em *Xanthomonas campestris* na síntese de exopolissacarídeo

Efeito da transferência do operon *gum* de *Xylella fastidiosa* em *Xanthomonas campestris* na síntese de exopolissacarídeo

Padilha, F.F.¹; Gonçalves, E.R.²; Druzian, J.I.¹; Rosato, Y.B.²; Scamparini, A.R.P.¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos – FEA; ² Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- C.P. 6121, CEP 13081.970, Campinas, SP, Brasil. e-mail: francinepadilha@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da transferência do operon *gum* de *Xylella fastidiosa* para *Xanthomonas campestris* pv *campestris* CA110 através da caracterização da produção do exopolissacarídeo sintetizado e características físico-químicas, correlacionando com a linhagem não transformada. *X. campestris* foi transformada com o cosmídio contendo nove genes do operon *gum* de *X. fastidiosa*. A linhagem recombinante obtida (CA110-C12) apresentou uma produção de goma 13,5% superior em relação à linhagem não transformada. Os cromatogramas obtidos, pela análise de CLAE mostraram também um aumento no conteúdo de manose (23,7%) e glicose (16,9%) nas amostras de polímero sintetizado pela linhagem transformada. O valor medido de viscosidade aparente da solução aquosa, da goma produzida pela linhagem transformada, foi superior ao valor obtido pela solução aquosa da goma sintetizada pela linhagem não transformada. Este comportamento é evidente em baixas taxas de cisalhamento, 10 s⁻¹, onde foi observada uma viscosidade aparente de 393 mPa.s e de 602 mPa.s para o EPS sintetizado pela linhagem não transformada e transformada respectivamente. A goma obtida pela linhagem transformada apresentou um comportamento viscoelástico onde o módulo de estocagem (G') foi superior ao

módulo de perda (G''), sendo este comportamento inverso ao encontrado para a linhagem não transformada.

Palavras-chaves: *Xanthomonas*, *Xylella fastidiosa*, xantana, exopolissacarídeo.

1. INTRODUÇÃO

Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica que infecta inúmeras espécies de valor comercial como arroz, mandioca, algodão, tomate, trigo, crucíferas e cítricos. A bactéria produz um exopolissacarídeo de alto peso molecular denominado goma xantana, que pode estar associado aos fatores de virulência e de grande importância sob o aspecto comercial (Coplin & Cook, 1990; Dharmapuri & Sonti, 1999; Hung *et al.*, 2002). A goma xantana tem aplicação em diversos segmentos industriais como na área de recuperação de petróleo, na indústria de alimentos onde é utilizada como espessante e emulsificante, na indústria farmacêutica e na agricultura. A sua aplicação nestes setores é devida principalmente as suas propriedades de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis que lhe fornecem propriedades reológicas únicas em baixas concentrações, como também estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura (Meyer *et al.*, 1993; Sutherland & Kennedy, 1996; García-Ochoa *et al.*, 2000; Navarrete *et al.*, 2001; Fontaniella *et al.*, 2002).

Devido ao seu elevado interesse agrícola e industrial, inúmeros estudos vêm sendo realizados tendo como enfoque o processo de biossíntese da goma e sua relação com o processo de interação entre hospedeiro e patógeno (Silva *et al.*, 2002).

No processo de biossíntese, dois sistemas foram identificados na rota do metabolismo de glicose em *X. campestris*, um periplásmico e oxidativo, e um segundo intracelular e fosforilativo (Letisse *et al.*; 2002; Hsu & Lo, 2003). Estudos *in vitro* têm indicado que a biossíntese da goma ocorre em dois estágios no mínimo: primeiramente, a unidade repetitiva pentassacarídica é seqüencialmente

montada ligando-se ao poliprenol através de uma ligação difosfato; num segundo estágio, as unidades repetitivas são excretadas e polimerizadas sendo o polímero liberado para o meio de crescimento (Ielpi *et al.*, 1993; Vojnov *et al.*, 1998)

Os genes, que sintetizam as enzimas envolvidas na transferência dos monossacarídeos e dos substituintes não glicosídicos, piruvato e acetil, estão localizados em um *cluster* com 12 genes que compreende uma região de 16 Kb no genoma de *X. campestris*, denominado como *xpsl* ou *gum* (*gumB* – *gumM*) (GenBank nº de acesso U22511) (Katzen *et al.*, 1998). A função de alguns genes tem sido estabelecida. *GumD*, *M*, *H*, *K* e *I* estão envolvidos com a polimerização do pentassacarídeo. Estes genes codificam respectivamente para a transferência seqüencial de glicose-1-fosfato, glicose, manose, ácido glucurônico e finalmente a manose para o isoprenilfosfato que tem a função de carreador. A acetilação é determinada pelos genes *gumF* e *G* que codificam a enzima acetiltransferase. A enzima cetal piruvato transferase é codificada pelo gene *gumL*. Os genes *gumB*, *gumC*, *gumE*, *gumJ* estão envolvidos em uma série de etapas na polimerização e secreção da xantana através da membrana da bactéria (Pollock *et al.*, 1997; Katzen *et al.*, 1998; Vojnov *et al.*, 1998; Katzen *et al.*, 1999).

A existência de um operon *gum*, com alto grau de homologia, foi também encontrado no genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*, a goma produzida por esta bactéria foi denominada goma fastidiana (Silva *et al.*, 2001). O operon *gum* de *X. fastidiosa* compreende um fragmento de DNA de 12 kb contendo nove ORFs, numa estrutura típica de operon. Os genes *gumB*, *C*, *D*, *E*, *F*, *H*, *J*, *K* e *M* possuem alta similaridade com os genes do operon de *X. campestris*, enquanto os genes *gumG*, *I* e *L* não foram encontrados no genoma ou plasmídios de *X. fastidiosa*. Devido à alta similaridade com o operon de *X. campestris* este *cluster* foi denominado de operon da goma fastidiana e os genes constituintes foram denominados da mesma forma que o correspondente no operon da goma xantana.

Os três genes de *X. campestris* que não foram encontrados em *X. fastidiosa* (*gumG*, *I* e *L*) estão relacionados à polimerização ou modificação da última

manose da unidade pentassacarídica repetitiva de goma xantana. O *gumI* adiciona uma molécula de manose no lipídio-tetrassacarídeo intermediário. O *gumL* e *G* auxiliam na colocação dos grupos piruvato e acetil, respectivamente, na manose. Deste modo à unidade repetitiva do EPS de *X. fastidiosa*, provavelmente seja um tetrassacarídeo. Estudos de expressão destes genes, de *Xylella fastidiosa*, *in vitro* vêm sendo realizados com o intuito de esclarecer a homologia com o sistema de *Xanthomonas* e relacionar com os fatores de virulência (Scarpari *et al.*, 2003).

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da transferência do operon *gum* de *X. fastidiosa* em *Xanthomonas campestris* pv *campestris* CA110 e caracterizar o exopolissacarídeo sintetizado quanto a sua produção e características físico-químicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Linhagens utilizadas

A linhagem de *X. campestris* pv *campestris* CA110 (NRRL B-1459) foi cultivada em meio N, à temperatura de 28°C. Quando necessário foi adicionado kanamicina (50 µg mL⁻¹). A partir do banco de cosmídios de *X. fastidiosa*, construído por Frohme *et al.* (2000), foi selecionado o cosmídio C12, que contém o operon *gum* com 12 kb (*gumB*, C, D, E, F, H, J, K, M).

2.2. Extração do cosmídio

A extração do cosmídio foi feita por lise alcalina, onde se inoculou a linhagem de *E. coli* contendo o cosmídio C12, em 3 mL de meio LB e incubou-se *overnight* a 37°C, 200 rpm. As células foram coletadas por centrifugação (10000 x g / 3 minutos) e suspensas em 300 µL de solução P1 (Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM; EDTA (pH 8,0) 10 mM; RNase 100 µg/mL) utilizando vortex. A seguir, foram adicionados 300 µL de solução P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%), com agitação suave do tubo e adicionados 300 µL de solução P3 (acetato de potássio 3M; pH 5,5 com

ácido acético glacial). O tubo foi centrifugado a 10000 x g / 10 minutos a 14°C e 700–800 µL do sobrenadante foram coletados e transferidos para um novo tubo. Foram adicionados 400 µL de isopropanol, a mistura foi centrifugada a 10000 x g / 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionado 500 – 700 µL de etanol 70% ao sedimento seguido por uma centrifugação à 14°C durante 4–5 minutos. O etanol foi descartado e o DNA precipitado foi seco completamente, sendo ressuscitado posteriormente em 20 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,8). Após a extração o DNA foi quantificado em gel de agarose 0.8% para uso posterior na eletroporação.

2.3. Eletroporação

X. campestris pv *campestris* CA110 foi utilizada como linhagem receptora e a transformação foi efetivada de acordo com Ferreira *et al.* (1996). Foram utilizados 50 ng/mL de cosmídio, 100 µL de células competentes, e a eletroporação foi efetuada a 1,9 V, com pulsos de 4.4 – 4.7 msec. Após a eletroporação, foram adicionados 900 µL de meio N, incubado a 28°C por 2 horas e plaqueadas em meio LB/Km a 28°C por 48 horas. O controle foi feito com células não transformadas. As células transformadas foram utilizadas para os experimentos de produção de polissacarídeo.

2.4. Produção e recuperação de polissacarídeo

A produção de polissacarídeo foi realizada em duas etapas: crescimento celular e produção do polímero. Para o crescimento celular foi utilizado erlenmeyer de 250 mL, com 14 mL, de meio YM contendo (gL⁻¹): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0. A incubação foi em agitador orbital (shaker) à 28°C, 120 rpm, 24 horas. Como inóculo para a fermentação foram utilizadas suspensões celulares com 2,6 x 10⁸ UFC/mL, calculada por diluição e plaqueamento. A relação inóculo/meio de fermentação foi de 10% (v/v).

A produção de goma foi realizada em erlenmeyer de 250 mL, com 100 mL de volume final, com o meio de fermentação MPI+II contendo (gL^{-1}): $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2,5; K_2HPO_4 5,0; H_3BO_3 0,006; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0; FeCl_3 0,0024; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,002; ZnSO_4 0,002; sacarose 50,0, à 28°C, 200 rpm, 72 horas. O experimento foi realizado em um agitador orbital (shaker) (New Brunswick Scientific, Co., modelo G25).

A recuperação do polissacarídeo foi efetuada por centrifugação do caldo fermentado a 16000 x g / 20 min, o sobrenadante foi precipitado com etanol 96% (1:4, v/v) e centrifugado a 16000 x g por 10 min. O precipitado foi recuperado e liofilizado, sendo posteriormente dializado e secado novamente para as análises seguintes. O cálculo da produção foi efetuado por pesagem da goma em relação ao volume de meio fermentado, sendo expresso em gL^{-1} .

2.5. Análise de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

As amostras dos polissacarídeos foram analisadas quanto a sua composição química por CLAE (Shimadzu, modelo LC-10), e a identificação foi realizada com o uso de padrões de glicose, frutose, manose e ácido glucurônico (Sigma, USA).

A amostra (5 mg) foi hidrolisada com TFA 1M (500 μL) por 16 h a 100°C. Após a hidrólise a amostra foi seca com N_2 e ressuspendida em 500 μL de água milli-Q e filtrada. As condições de análise para açúcares foram as seguintes: fase móvel – água deionizada; fluxo de 0,5 mL/min; temperatura do forno de 80°C; Pressão de 72Kgf/cm²; detector de Índice de refração (Shimadzu, modelo RID-6A); coluna - Polyspher® CHCA Carbohydrate Column (Merck, USA). As condições de análise para ácidos foram as seguintes: fase móvel – ácido perclórico pH 1,9; fluxo de 0,6 mL/min; temperatura do forno de 80°C; Pressão de 72Kgf/cm²; detector Arranjo de diodos (Shimadzu, modelo SPD-M10A); coluna:

Shim-pack SCR-101H polystyrene-divinylbenzene (Shimadzu, Japão). A quantificação foi pelo método padrão externo (Druzian, 2000).

2.6. Reologia

As análises de viscosidade e viscoelasticidade foram feitas com solução aquosa a 1%. A viscosidade aparente foi medida em taxa de cisalhamento de 0-300 s⁻¹. Para a medida oscilatória foi usada uma deformação de 0,04Hz e uma frequência de 20%. Ambas as análises foram realizadas a 25°C, utilizando dispositivo tipo cone-placa PQ-45 e reômetro Haake (modelo CV-20).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção da linhagem de *X. campestris* contendo o operon *gum* de *X. fastidiosa*

O sequenciamento do genoma da bactéria *X. fastidiosa* revelou um fragmento de 12 kb contendo nove ORFs (*gumB, C, D, E, F, H, J, K* e *M*), que apresentou uma alta similaridade com os genes do operon *gum* de *X. campestris* pv *campestris* (Simpson *et al.*, 2000). O banco de cosmídeos de *X. fastidiosa* foi construído para propósitos de sequenciamento e para o mapeamento físico do genoma da bactéria (Frohme *et al.*, 2000) e dentre as amostras foi identificado o cosmídeo C12, que possui o operon completo da goma fastidiana (Silva *et al.*, 2001).

Neste trabalho fez-se a transferência dos genes *gum* de *X. fastidiosa* para a linhagem de *X. campestris* pv *campestris* CA110. Esta linhagem corresponde à linhagem NRRL B-1459 descrita como produtora de goma xantana no trabalho inicial com o polissacarídeo (Jeanes *et al.*, 1976) e tem sido comumente utilizada em trabalhos com a referida goma por diferentes autores (Destefano & Rosato,

1991; Esgalhado *et al.*, 1996; Galindo & Salcedo, 1996; Katzen *et al.*, 1996; Esgalhado *et al.*, 2001; Esgalhado *et al.*, 2002; Hsu & Lo, 2003).

A eletroporação, de *X. campestris* pv *campestris* CA110, com o cosmídio C12 resultou em um índice de transformação baixo, tendo se obtido apenas um recombinante. A eficiência da transformação foi de 1:5 (n^o de recombinantes/ng de DNA). A baixa eficiência de transformação já era esperada, pois as células receptoras de *Xanthomonas* oferecem maior resistência à entrada de plasmídios de alto peso molecular (Ferreira *et al.*, 1996). A nova linhagem recombinante foi denominada CA110-C12, não foram observadas diferenças aparentes na morfologia e/ou crescimento da colônia, entretanto a colônia apresentou uma maior gomosidade em relação à linhagem original.

3.2. Produção do polissacarídeo

A linhagem obtida após a transformação, CA110-C12, e a não transformada foram utilizadas nos experimentos de produção de polissacarídeo. Os resultados mostram um acréscimo de 13,5% na concentração de polissacarídeo da linhagem CA110-C12 em relação a não transformada (Gráfico 1) utilizando o meio MPI+II.

Este resultado é bastante significativo para a indústria, pois em uma fábrica com uma produção de 200 ton/mês passaria a uma produtividade de 227,4 ton/mês, significando um incremento de 27,4 ton/mês. Considerando-se que uma tonelada de goma xantana custa aproximadamente US\$ 7,000.00 (<http://aliceweb.mdic.gov.br>) dependendo do grau de pureza do produto e do País onde é produzida, ocorreria um aumento de US\$ 191.800,00, usando-se as mesmas condições de processo.

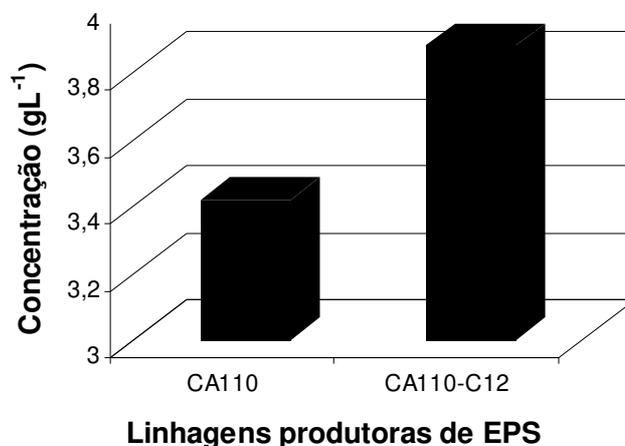


Gráfico 1 – Concentração de goma xantana utilizando *X. campestris* pv *campestris* CA110 e *X. campestris* pv *campestris* CA110-C12 em meio MPI+II a 28°C, 200 rpm, 72 h

As condições de fermentação exercem um profundo efeito na direção de síntese do produto final, e tem sido proposto que estas diferenças estão relacionadas as diferentes rotas de biossíntese, que podem ser direcionadas conforme as condições aplicadas. Dessa forma, polissacarídeos podem ser obtidos por fermentação em diversos meios de cultura, com os mais variados rendimentos em relação ao volume de meio utilizado, dependendo da espécie de microrganismo cultivado (Druzian, 2000, Hsu & Lo, 2003).

No caso do EPS sintetizado por *X. campestris*, a estrutura contendo glicose, manose, ácido glucurônico, grupos acetil e piruvato, pode ser alterada, dependendo da espécie utilizada como também pelas condições de fermentação (Chowdhury *et al.*, 1987; Molinaro *et al.*, 2000; Moreira, 2001). Essas informações são indicativas de que a linhagem CA110-C12 pode apresentar rendimentos superiores após otimização das condições de fermentação. Vojnov *et al* (1998), analisando a produção de goma xantana sintetizada por uma linhagem transformada com os genes *gumB* e *gumC*, observaram um decréscimo na produtividade (1,76 gL⁻¹) quando comparada com a linhagem não transformada (6,46 gL⁻¹).

3.3. Análise dos monossacarídeos por CLAE

A análise cromatográfica foi realizada utilizando o exopolissacarídeo (EPS) sintetizado pela linhagem transformada, CA110-C12, para identificação dos monossacarídeos presentes e comparação com a linhagem CA110. As amostras obtidas foram injetadas no sistema CLAE-IR, conforme metodologia descrita.

Os resultados obtidos nas análises de CLAE para este experimento, identificaram os mesmos monossacarídeos na composição da goma xantana sintetizada pela linhagem recombinante e pela linhagem não transformada: glicose e manose. Os resultados mostraram um aumento na concentração de glicose (16,9%) e manose (23,7%) para o polímero sintetizado com a linhagem CA110-C12. O cromatograma pode ser visualizado na Figura 1.

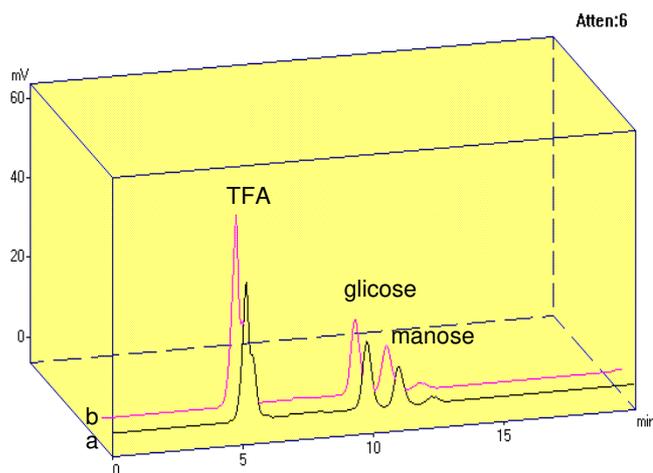


Figura 1 –

de
nin;
ctor
imn
:om

Em tros monossacarídeos, além de glicose e manose, como por exemplo a presença de ramnose que é encontrada em polissacarídeos sintetizados por *X. c. pv juglandis* (Lawson & Symes, 1977), em *X. c. pv vitians* (Molinari *et al.*, 2000) e em *X. c. pv pruni* (Antunes *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2001). Pollock *et al.* (1997) estudando a

produção de goma xantana por *Sphingomonas* modificada com os genes *gum*, observaram a presença de ramnose no polímero sintetizado pela linhagem transformada.

3.4. Comportamento reológico do EPS

A importância da goma xantana em diversas áreas de aplicação deve-se a sua capacidade de, quando em solução, apresentar alta viscosidade a baixas concentrações. O comportamento reológico de fluido não-Newtoniano das soluções de goma xantana é bem conhecido e geralmente é expresso pela equação de “power law” (Ostwald de Waele) (Manjula Rao *et al.*, 2003).

As propriedades reológicas das soluções aquosas foram medidas conforme metodologia descrita. O objetivo desta análise foi comparar o comportamento reológico do EPS sintetizado pela linhagem transformada e não transformada. Com este resultado pode-se avaliar a influência da inserção do operon *gum*, de *X. fastidiosa*, em *X. c. pv campestris* CA110 na síntese de goma xantana.

O efeito da taxa de deformação na viscosidade aparente das soluções aquosas foram descritas pelo modelo de power-law ($\tau = K\dot{\gamma}^n$). O cálculo foi feito com taxas entre 0 – 300 s⁻¹ (Xuewu *et al.*, 1996; Manjula Rao *et al.*, 2003). O resultado obtido no experimento demonstrou que ambas as soluções analisadas apresentaram comportamento pseudoplástico, onde foi observado que a viscosidade aparente decresce com o aumento da taxa de cisalhamento. Este comportamento é esperado em soluções poliméricas de polissacarídeos bacterianos, sendo também observado por Xuewu *et al.* (1996) e por Escudier *et al.* (2001).

As soluções analisadas apresentaram comportamento similar, entretanto foi obtido um valor de viscosidade aparente superior para o polímero sintetizado pela linhagem transformada quando aplicada baixas taxas de cisalhamento. Quando foi aplicada taxa de cisalhamento superior a 50 s⁻¹ este comportamento não evidenciado. Em uma taxa de deformação de 10 s⁻¹ foi medida uma viscosidade

aparente de 393 mPa.s e de 602 mPa.s para o EPS sintetizado pela linhagem não transformada e a transformada respectivamente (Figura 2).

Destefano & Rosato (1991), obtiveram o valor de 325 mPa.s para solução de goma xantana a 1% em uma taxa de deformação de 100 rpm, observaram que neste trabalho a goma sintetizada pela linhagem transformada teve viscosidade inferior a não transformada. Pollock *et al.* (1997), medindo a viscosidade aparente de soluções aquosas com concentração de goma xantana de 0,1%, obtiveram os valores de 27 mPa.s e 9 mPa.s para as soluções com goma sintetizada pela linhagem sem transformação e transformada respectivamente, em uma taxa de deformação de 12 s^{-1} , verificando portanto o mesmo comportamento descrito anteriormente.

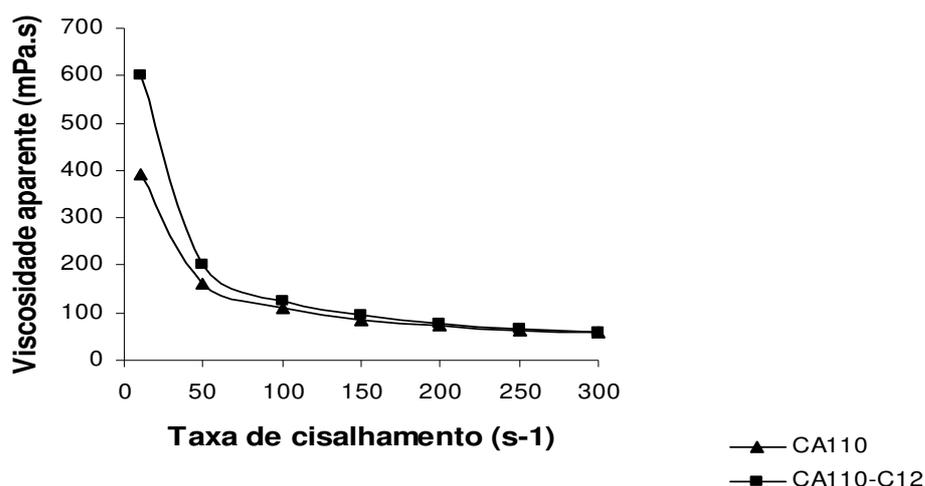


Figura 2 – Viscosidade aparente da solução aquosa a 1% de goma xantana, sintetizada por *X. campestris pv campestris* CA110 e *X. campestris pv campestris* CA110-C12, a 25°C usando dispositivo de cone-placa PQ45, reômetro Haake

A propriedade de viscoelasticidade das soluções pode ser observada nas Figuras 3 e 4, onde se verifica o comportamento dos módulos de estocagem, que corresponde a resposta elástica da amostra (G') e de perda que corresponde a resposta viscosa da amostra (G''). Soluções com G' superior a G'' possuem característica elástica, e com G'' superior a G' característica viscosa. Quando

ocorre a intersecção das duas retas, o ponto de intersecção é denominado de ponto de gel, ou seja, a solução que está sendo analisada em alguma condição que deverá ser estudada poderá formar gel. No entanto, o cruzamento das duas retas depende da concentração de polímero, temperatura de gelificação do produto e solvente utilizado (Clark, 1991).

Os resultados obtidos na análise de viscoelasticidade de ambas as soluções analisadas mostram um módulo de estocagem superior ao módulo de perda. Estes resultados estão mais evidentes na solução de goma sintetizada com a linhagem CA110-C12 (Figura 3 e 4). Escudier *et al* (2001) e Pashkovski *et al.* (2003), observaram nas soluções de xantana uma dependência do módulo de estocagem em função da frequência aplicada, sendo na solução analisada o G' superior ao G'' .

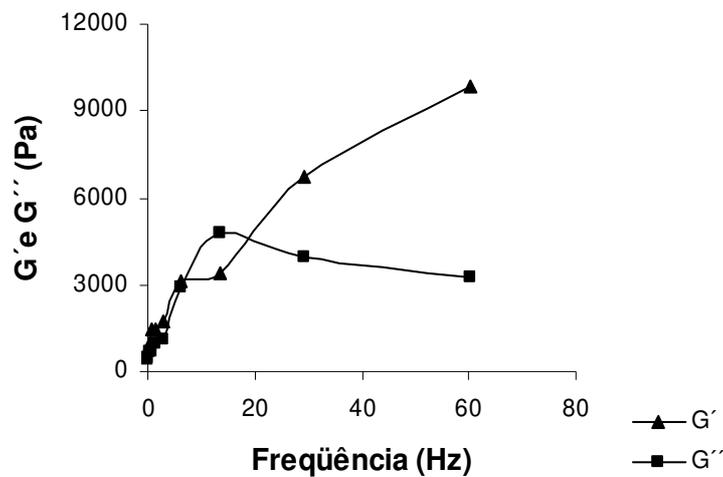


Figura 3 - Viscoelasticidade da solução aquosa a 1% de goma xantana, sintetizada por *X. campestris* pv *campestris* CA110 a 25°C usando dispositivo de cone-placa PQ45, reômetro Haake. G' é módulo de estocagem e G'' é módulo de perda

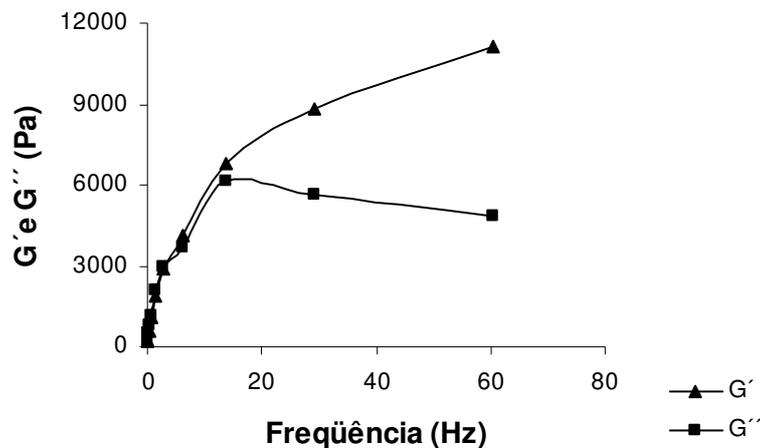


Figura 4 - Viscoelasticidade da solução aquosa a 1% de goma xantana, sintetizada por *X. campestris* pv *campestris* CA110-C12 a 25°C usando dispositivo de cone-placa PQ45, reômetro Haake. G' é módulo de estocagem e G'' é módulo de perda

Analisando os resultados obtidos nos experimentos de seleção do recombinante e na produção, pode-se concluir que a transferência do operon *gum* de *X. fastidiosa* em *X. campestris* CA110 influenciou na síntese de polissacarídeo, proporcionando um aumento na produtividade de 13,5%, o que é de extremo interesse sob o aspecto industrial. Concomitantemente, foi observado um aumento na viscosidade aparente da solução aquosa da goma sintetizada pela linhagem transformada em baixas taxas de deformação.

Finalmente, pode ser mencionado que novos estudos serão necessários para verificar se os operons *gum*, provenientes de diferentes espécies bacterianas, estão atuando conjuntamente ou independentemente para a produção de uma nova goma com estrutura. Cabe enfatizar que a goma fastidiana ainda não foi isolada e caracterizada e sua produção foi apenas predita pela análise *in silico* (Silva *et al.*, 2001).

Agradecimentos: Ao CNPQ e a FAPESP pelo suporte financeiro.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, A.E.C.; Moreira, A.S.; Vendruscolo, J.L.S.; Vendruscolo, C.T. (2000) Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. **Ciência e Engenharia** 9, 1:83-87.
- Chowdhury, T.A.; Lindberg, B.; Lindquist, U., Baird, J. (1987) Structural studies of an extracellular polysaccharide, S-657, elaborated by *Xanthomonas* ATCC53159. **Carbohydrate Research** 164, 117-122.
- Clark, A.H. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Food Polymers, Gels and Colloids**. ed. Eric Dickinson, The Royal Society of Chemistry. 322-338, 1991.
- Coplin, D.L.; Cook, D. (1990) Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 3, 5:271-279.
- Destefano, S.A.L.; Rosato, Y.B. (1991) Effect of transposon Tn5 on exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris*. **Brazilian Journal of Genetics** 14, 3: 599-607.
- Dharmapuri, S.; Sonti, R.V. (1999) A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. **FEMS Microbiology Letters** 179, 53-59.
- Druzian, J.I. **Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.)**, Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2000. 179p.
- Escudier, M.P.; Gouldson, I.W.; Pereira, A.S.; Pinho, F.T.; Poole, R.J. (2001) On the reproducibility of the rheology of shear-thinning liquids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics** 97, 99-124.

- Esgalhado, M.E.; Roseiro, J.C.; Amaral-Collaço, M.T. (1996) Kinetics of acid toxicity in cultures of *Xanthomonas campestris*. **Food Microbiology** 13, 441-446.
- Esgalhado, M.E.; Caldeira, A.T.; Roseiro, J.C.; Emery, A.N. (2001) Polysaccharide synthesis as a carbon dissipation mechanism in metabolically uncoupled *Xanthomonas campestris* cells. **Journal of Biotechnology** 89, 55-63.
- Esgalhado, M.E.; Caldeira, A.T.; Roseiro, J.C.; Emery, A.N. (2002) Sublethal acid stress and uncoupling effects on cell growth and product formation in *Xanthomonas campestris* cultures. **Biochemical Engineering Journal** 12, 181-192.
- Ferreira, H.; Barrientos, F.A.; Baldini, R.L.; Rosato, Y.B. (1996) Electrotransformation of three pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 43, 651-655.
- Fontaniella, B.; Rodríguez, C.W.; Piñón, D.; Vicente, C.; Legaz, M.-E. (2002) Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Chromatography B** 770, 275-81.
- Frohme, M.; Camargo, A.A.; Heber, S.; Czink, C.; Simpson, A.J.D.; Hoheisel, J.D.; Souza, A.P. (2000) Mapping analysis of the *Xyllela fastidiosa* genome. **Nucleic Acids Research** 28,16:3100-3104.
- Galindo, E.; Salcedo, G. (1996) Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *Xanthomonas campestris*. **Enzyme and Microbial Technology** 19, 145-149.
- García-Ochoa, F.; Santos, V.E.; Casas, J.A.; Gómez, E. (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances** 18, 549-579.
- Jeanes, A.R.; Rogovin, P.; Cadmus, M.C.; Silman, R.W.; Knutson, C.A. **Polysaccharide of *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and**

- analysis.** ARS-NC-51. Washington, D.C. Agriculture Research Service, U.S. Department of Agriculture, 1976.
- Hsu, C.-H.; Lo, Y.M. (2003) Characterization of xanthan *gum* biosynthesis in a centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. **Process Biochemistry** 1-9 (article in press).
- Hung, C.-H.; Wu, H.-C.; Tseng, Y.-H. (2002) Mutation in the *Xanthomonas campestris xanA* gene required for synthesis of xanthan and lipopolysaccharide drastically reduces the efficiency of bacteriophage ϕ L7 adsorption. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 291, 338-343.
- Ielpi, L.; Couso, R.O.; Dankert, M. (1993) Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. **Journal of Bacteriology** 175, 2490-2500.
- Katzen, F.; Becker, A.; Zorreguieta, A.; Pühler, A.; Ielpi, L. (1996) Promoter análisis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. **Journal of Bacteriology** 178, 14:4313-4318.
- Katzen, F.; Ferreira, D.U.; Oddo, C.G.; Ielmini, M.V.; Becker, A.; Pühler, A.; Ielpi, L. (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology** 180, 1607-17.
- Katzen, F.; Becker, A.; Ielmini, M.V.; Oddo, C.G.; Ielpi, L. (1999) New mobilizable vectors for gene replacement in Gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* operon. **Applied and Environmental Microbiology** 65, 1:278-282.
- Lawson, C.J.; Symes, K.C. (1977) Oligosaccharides produced by partial acetolysis of xanthan *gum*. **Carbohydrate Research** 58, 433-438.

- Letisse, F.; Chevallereau, P.; Simon, J.-L.; Lindley, N. (2002) The influence of metabolic network structures and energy requirements on xanthan *gum* yields. **Journal of Biotechnology** 99, 307-317.
- Manjula Rao, Y.; Suresh, A.K.; Suraishkumar, G.K. (2003) Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry** 1-10
- Meyer, E.L.; Fuller, G.G.; Clark, R.C.; Kulicke, W.M. (1993) Investigation of xanthan *gum* solution behavior under shear-flow using rheoptical techniques. **Macromolecules** 26, 3:504-11.
- Molinaro, A.; Evidente, A.; Lanzetta, R.; Parrilli, M.; Zoina, A. (2000) O-specific polysaccharide structure of the aqueous lipopolysaccharide fraction from *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* strain 1839. **Carbohydrate Research** 328, 435-439.
- Moreira, A.S.; Vendruscolo, J.L.S.; Gil-Turnes, C.; Vendruscolo, C.T. (2001) Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. **Food Hydrocolloids** 15, 469-474
- Navarrete, R.C.; Seheult, J.M.; Coffey, M.D. (2001) **New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer, and coil-tubing fluid, Part II**. International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 64982, Houston, TX, 1-15.
- Pashkovski, E.; Masters, J.G.; Mehreteab, A. (2003) Viscoelastic scaling of colloidal gels in polymer solutions. **Langmuir** 19, 3589-3595.
- Pollock, T.J.; Mikolajczak, M.; Yamazaki, M.; Thorne, L.; Armentrout, R.W. (1997) Production of xanthan *gum* by *Sphingomonas* bacteria carrying genes from *Xanthomonas campestris*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 19, 92-97.
- Scarpari, L.M.; Lambais, M.R.; Silva, D.S.; Carraro, D.M.; Carrer, H. (2003) Expression of putative pathogenicity-related genes in *Xylella fastidiosa* grown at low high cell density conditions in vitro. **FEMS Microbiology Letters** 222, 83-92.

Silva F.R.; Vettore, A.L.; Kemper, E.L.; Leite, A.; Arruda, P. (2001) Fastidian *gum*: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters** 203, 165-71.

Silva, A.C.R.; Ferro, J.A.; Reinach, F.C.; Farah, C.S.; Furlan, L.R.; Quaggio, R.B.; Monteiro-Vitorello, C.B.; Van Sluys, M.A.; Almeida, N.F.; Alves, L.M.C.; do Amaral, A.M.; Bertolini, M.C.; Camargo, L.E.A.; Camarotte, G.; Cannavan, F.; Cardozo, J.; Chambergo, F.; Ciapina, L.P.; Cicarelli, R.M.B.; Coutinho, L.L.; Cursino-Santos, J.R.; El-Dorry, H.; Faria, J.B.; Ferreira, A.J.S.; Ferreira, R.C.C.; Ferro, M.I.T.; Formighieri, E.F.; Franco, M.C.; Greggio, C.C.; Gruber, A.; Katsuyama, A.M.; Kishi, L.T.; Leite, R.P.; Lemos, E.G.M.; Lemos, M.V.F.; Locali, E.C.; Machado, M.A.; Madeira, A.M.B.N.; Martinez-Rossi, N.M.; Martins, E.C.; Meidanis, J.; Menck, C.F.M.; Miyali, C.Y.; Moon, D.H.; Moreira, L.M.; Novo, M.T.M.; Okura, V.K.; Oliveira, M.C.; Oliveira, V.R.; Pereira, H.A.; Rossi, A.; Sena, J.A.D.; Silva, C.; de Souza, R.F.; Spinola, L.A.F.; Takita, M.A.; Tamura, R.E.; Teixeira, E.C.; Tezza, R.I.D.; Trindade dos Santos, M.; Truffi, D.; Tsai, S.M.; White, F.F.; Setubal, J.C.; Kitajima, J.P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** 417, 459-463.

Simpson, A.J.G.; Reinach, F.C.; Arruda, P.; Abreu, F.A.; Acencio, M.; Alvarenga, R.; Alves, L.M.C.; Araya, J.E.; Baia, G.S.; Baptista, C.S.; Barros, M.H.; Bonaccorsi, E.D.; Bordin, S.; Bove, J.M.; Briones, M.R.S.; Bueno, M.R.P.; Camargo, A.A.; Camargo, L.E.A.; Carraro, D.M.; Carrer, H.; Colauto, N.B.; Colombo, C.; Costa, F.F.; Costa, M.C.R.; Costa-Neto, C.M.; Coutinho, L.L.; Cristofani, M.; Dias-Neto, E.; Docena, C.; El Dorry, H.; Facincani, A.P.; Ferreira, A.J.S.; Ferreira, V.C.A.; Ferro, J.A.; Fraga, J.S.; Franca, S.C.; Franco, M.C.; Frohme, M.; Furlan, L.R.; Garnier, M.; Goldman, G.H.; Goldman, M.H.S.; Gomes, S.L.; Gruber, A.; Ho, P.L.; Hoheisel, J.D.; Junqueira, M.L.; Kemper, E.L.; Kitajima, J.P.; Krieger, J.E.; Kurumae, E.E.; Laigret, F.; Lambais, M.R.; Leite, L.C.C.; Lemos, E.G.M.; Lemos, M.V.F.; Lopes, S.A.; Lopes, C.R.; Machado, J.A.; Machado, M.A.; Madeira, A.M.B.N.; Madeira, H.M.F.; Marino, C.L.; Marques, M.V.; Martins, E.A.L.; Martins, E.M.F.; Matsukuma, A.Y.;

Menck, C.F.M.; Miracca, E.C.; Miyaki, C.Y.; Monteiro-Vitorello, C.B.; Moon, D.H.; Nagai, M.A.; Nascimento, A.L.T.O.; Netto, L.E.S.; Nhani, J.; Nobrega, F.G.; Nunes, L.R.; Oliveira, M.A.; de Oliveira, M.C.; de Oliveira, R.C.; Palmieri, D.A.; Paris, A.; Peixoto, B.R.; Pereira, G.A.G.; Pereira, J.; Pesquero, J.B.; Quaggio, R.B.; Roberto, P.G.; Rodrigues, V.; Rosa, A.J.D.; de Rosa, V.E. de Sa, R.G.; Santelli, R.V.; Sawasaki, H.E.; da Silva, A.C.R.; da Silva, F.R.; Silva, A.M.; da Silveira, J.F.; Silvestri, M.L.Z.; Siqueira, W.J.; de Souza, A.A.; de Souza, A.P.; Terenzi, M.F.; Truffi, D.; Tsai, S.M.; Tshako, M.H.; Vallada, H.; Van Sluys, M.A.; Meidanis, J.; Setubal, J.C. (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature** 406, 151-157.

Sutherland, I.W.; Kennedy, L. (1996) Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. **Microbiology** (UK) 142, 867-72.

Vojnov, A.A.; Zorreguieta, A.; Dow, J.M.; Daniels, M.J.; Dankert, M.A. (1998) Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. **Microbiology** 144, 1487-1493.

Xu, Z.; Xin, L.; Dexiang, G.; Wei, Z.; Tong, X.; Yonghong, M. (1996) Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering** 27, 203-209.

**CAPÍTULO 4 - *Xanthomonas campestris* pv *campestris* CA110 e
Xanthomonas axonopodis pv *manihotis* 289: Produção e caracterização da
goma xantana**

***Xanthomonas campestris* pv *campestris* CA110 e *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* 289: Produção e caracterização da goma xantana**

Padilha, F.F.¹; Reis, H.S.¹; Rosato, Y.B.²; Scamparini, A.R.P.¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos – FEA; ² Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- C.P. 6121, CEP 13081.970, Campinas, SP, Brasil. e-mail: francinepadilha@hotmail.com

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência do tempo de fermentação na produção de polissacarídeo sintetizado pelas linhagens *X. campestris* pv *campestris* CA110 e *X. axonopodis* pv *manihotis* 289 e a caracterização dos biopolímeros obtidos por cromatografia e viscosidade aparente. O meio de fermentação utilizado foi o MPI+II, à 28°C, 200 rpm e pH 7,0 por 72 e 96 h. O polímero foi recuperado com etanol (1:4, v/v), seco, pesado e a concentração expressa em gL⁻¹ de meio. A análise da composição química dos monossacarídeos foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência e a análise de viscosidade aparente foi realizada em solução aquosa a 1% com e sem a adição de sódio, potássio e cálcio (0,1M), aplicando taxa de deformação entre 10 – 100 rpm, a 25°C. Os resultados mostraram maior produção para a linhagem *X. a.* pv. *manihotis* 289 após 96 h de fermentação, onde se obteve 7,9 gL⁻¹ de polissacarídeo, nas mesmas condições a linhagem *X. c.* pv. *campestris* obteve 6,8 gL⁻¹. A análise cromatográfica mostrou a mesma composição de monossacarídeos para os EPSs sintetizados por ambas as linhagens: glicose e manose. A análise de viscosidade aparente mostrou soluções com comportamento pseudoplástico,

onde a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento. Os melhores resultados de viscosidade aparente foram obtidos com o polímero, sintetizado pela linhagem *X. a. pv. manihotis* 289, após 96 h de fermentação e com a adição de cálcio.

Palavras-chaves: goma xantana, composição, produtividade, reologia

1. INTRODUÇÃO

A produção de polissacarídeos extracelulares (EPSs) é extremamente comum em diversos microrganismos, possuindo um papel significativo na interação das bactérias com o meio ambiente. Esses EPSs podem estar associados à superfície celular, como uma cápsula ao redor da célula ou serem excretados para o meio ambiente como um muco (Coplin & Cook, 1990; Silva *et al.*, 2001).

Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica que infecta diversas espécies de crucíferas causando a morte destas. Durante o processo de infecção a bactéria produz um polissacarídeo de alto peso molecular conhecido como goma xantana e que está relacionado aos fatores de virulência (Fontaniella, *et al.*, 2002). A xantana é um heteropolissacarídeo, cuja unidade básica repetidora é um pentassacarídeo constituído por glicose, manose, ácido glucurônico e grupos piruvato e acetil, de extrema importância sob o aspecto comercial. A sua aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica, petroquímica é devido principalmente as suas propriedades de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis que lhe fornecem propriedades reológicas únicas, além de manter soluções estáveis em ampla faixa de pH e temperatura. Atualmente é o único polissacarídeo microbiano que vem sendo comercializado em grande escala (Meyer *et al.*, 1993; Sutherland & Kennedy, 1996; García-Ochoa *et al.*, 2000).

Inúmeros estudos vem sendo realizados com a interação da goma xantana com íons e outros polissacarídeos com o intuito de verificar o sinergismo e as características reológicas para a aplicação em produtos alimentícios e nos demais setores industriais (Symes, 1980; Bresolin *et al.*, 1998; Navarrete *et al.*, 2001).

Lundin & Hermansson (1997) estudaram a aplicação de Na, Ca e K em soluções de κ -carragena e galactomanana, foi observado a agregação das cadeias na presença destes íons, sendo a mudança conformacional de desordem e a formação da interação entre as cadeias, influenciada pela composição iônica da solução.

Bresolin *et al.* (1998) verificaram a conformação das soluções com a interação de xantana e galactomana, onde foi observada a dependência da força iônica na formação do gel. Pois, a transição conformacional das cadeias é dependente da força iônica da solução, da natureza do eletrólito, do pH e do conteúdo de grupas acetil e piruvato.

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência do tempo de fermentação na produção e propriedades físico-químicas do polímero sintetizado, e caracterizar as soluções aquosas obtidas com adição de cálcio, sódio e potássio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Foram utilizadas as linhagens de *X. axonopodis* pv *manihotis* 289 e de *X. campestris* pv *campestris* CA110, as quais foram mantidas em meio YM contendo (gL^{-1}): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0, ágar 25,0.

2.2. Produção de biopolímero

Foi utilizado o meio YM líquido para inóculo e para a produção de biopolímero MPI+II (g L^{-1}) contendo: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2,5; K_2HPO_4 5,0; H_3BO_3 0,006; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0; FeCl_3 0,0024; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,002; ZnSO_4 0,002; sacarose 50,0. A fermentação foi feita em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio a 28°C em incubador agitador (shaker) (New Brunswick, modelo G25), 200 rpm, 72 e 96 h de fermentação. Para a fermentação foi utilizado 10% de inóculo com concentração celular de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.3. Recuperação da goma xantana

O caldo de fermentação foi centrifugado a $16000 \times g$ por 20 min, para a remoção das células. Ao sobrenadante foi adicionado etanol (1:4, v/v) para a precipitação da goma, e centrifugado a $16000 \times g$ por 10 min para a recuperar o precipitado. O polissacarídeo foi liofilizado e armazenado para as análises posteriores. Os valores da concentração de goma xantana foram expresso em g L^{-1} .

2.4. Análise da goma xantana por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

A amostra (5 mg) foi hidrolisada com TFA 1M (500 μL) por 16 h a 100°C . Após a hidrólise a amostra foi seca com N_2 e ressuspenida em 500 μL de água milli-Q e filtrada. As condições de análise para açúcares foram as seguintes: fase móvel – água deionizada; fluxo de 0,5 mL/min; temperatura do forno de 80°C ; Pressão de 72Kgf/cm^2 ; detector de Índice de refração (Shimadzu, RID-6A); coluna - Polyspher® CHCA Carbohydrate Column (Merck). As condições de análise para ácidos foram as seguintes: fase móvel – ácido perclórico pH 1,9; fluxo de 0,6 mL/min; temperatura do forno de 80°C ; Pressão de 72Kgf/cm^2 ; detector Arranjo de

diodos (Shimadzu, SPD-M10A); coluna: Shim-pack SCR-101H polystyrene-divinylbenzene (Shimadzu) (Druzian, 2000).

2.5. Viscosidade aparente

As análises de viscosidade aparente foram realizadas em soluções aquosas das gomas sintetizadas, em meio MPI+II, pelas linhagens 289 e CA110 a 1% com e sem adição de sais de Na, Ca, K (0,1M). A taxa de cisalhamento aplicada foi de 10 - 100 rpm, em viscosímetro Brookfield modelo DVIII, spindle 31 a 25°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção de goma xantana

A linhagem *X. campestris* pv *campestris* CA110 corresponde à linhagem NRRL B-1459, utilizada inicialmente para estabelecer protocolos de produção de goma xantana (Silman & Rogovin, 1970) e também utilizada comumente por diferentes autores para estudos de modificação nos meios de produção e caracterização da goma. Dessa forma a produção de xantana, por esta linhagem, foi descrita previamente em diversos meios de cultura com modificações em sais e na fonte de carbono, onde se utilizou melaço, lactose, soro de leite em substituição sacarose na tentativa de diminuir custos e aproveitamento de rejeitos industriais (Moraine & Rogovin, 1973; Souw & Demain, 1979; Katzen *et al.*, 1996; Esgalhado *et al.*, 2001; Esgalhado *et al.*, 2002; Hsu & Lo, 2003).

Entretanto, nenhum meio alternativo substituiu a utilização de sacarose até o momento com efeito significativo na qualidade e produtividade da goma xantana. Por outro lado, experimentos previamente conduzidos pelo laboratório de biopolímeros da FEA, UNICAMP, demonstraram a possibilidade de uma produção superior de xantana por outras linhagens de *Xanthomonas*, dentre as quais a linhagem *X. axonopodis* pv. *manihotis* 289.

Os resultados de fermentação obtidos para as duas linhagens utilizadas demonstraram a influência do tempo de incubação na produção do biopolímero, a linhagem *X. a. pv. manihotis* apresentou maior concentração em ambas as condições testadas, 72 e 96 horas, em relação à linhagem de *X. c. pv. campestris* CA110, onde foi verificado um aumento na produção de aproximadamente 16%, quando comparada a linhagem CA110 em 96 h de fermentação (Tabela 1). Este resultado salienta a importância da pesquisa com novas linhagens, principalmente as de ocorrência no país onde encontram-se linhagens com produtividade superior a CA110 que é utilizada a nível mundial para produção de goma xantana (Antunes *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2001).

No entanto, uma maior produtividade em muitos casos não indica uma melhor qualidade reológica do polissacarídeo, devendo ser levado em consideração as propriedades reológicas e o setor de aplicação da goma na escolha da linhagem para uma transposição de escala.

Tabela 1 – Concentração de goma xantana em meio MPI+II

	72 horas (gL ⁻¹)	96 horas (gL ⁻¹)
<i>X. c. pv campestris</i> CA110	6,3	6,8
<i>X. a. pv manihotis</i> 289	6,9	7,9

3.2. Análise da composição química da goma por CLAE

A análise do cromatograma mostra que a goma xantana produzida pelas linhagens 289 e CA110 possuem a mesma composição de monossacarídeos. Os monossacarídeos presentes nas amostras são glicose e manose (Figura 1), sendo esta composição a mais comumente encontrada na goma xantana. Entretanto, segundo Antunes *et al.* (2000) e Moreira *et al.* (2001) encontram-se linhagens de *Xanthomonas*, principalmente do patovar *pruni* que sintetizam goma xantana com a adição de ramnose, além da glicose e manose, monossacarídeos também

presentes no polissacarídeo sintetizado por *Xanthomonas* ATCC 53159 (Chowdhury *et al.*, 1987).

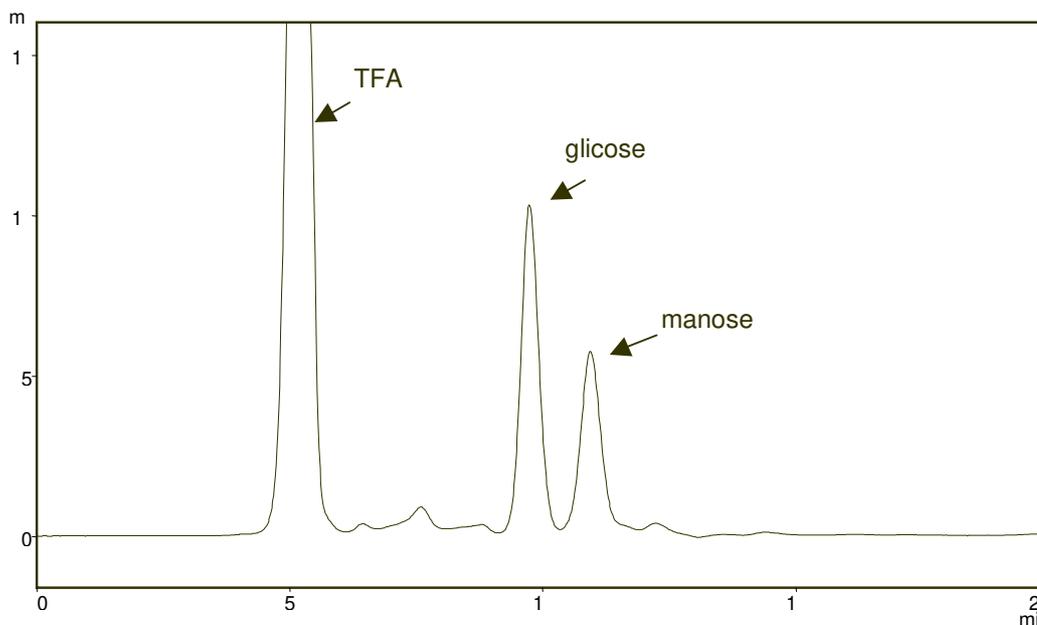


Figura 1 – Composição do polissacarídeo analisado por CLAE. Condições de análise: fase móvel – água deionizada; vazão de 0,5 mL/min; temperatura de forno de 80°C; Pressão de 72 Kgf/cm²; detector índice de refração; coluna - Polyspher® CHCA Carbohydrate Column (Merck). TFA residual, não evaporado com N₂

3.3. Análise reológica

A importância da goma xantana em diversos segmentos industriais, deve-se a sua capacidade de, quando em solução, apresentar alta viscosidade a baixas concentrações, as condições podem ser melhoradas com a interação de outras gomas ou pela força iônica da solução.

A viscosidade aparente das soluções aquosas forma medidas conforme descrito na metodologia. Esta análise teve por objetivo verificar a influência da

força iônica nas soluções de goma xantana sintetizada pelas linhagens 289 e CA110 nos tempos de fermentação de 72 e 96 h.

Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras 2, 3, 4 e 5. Foi observada a dependência da viscosidade em função da taxa de deformação aplicada, a viscosidade decresce com o aumento do cisalhamento, caracterizando um comportamento pseudoplástico para estas soluções. Xuewu *et al.* (1996) e Escudier *et al.* (2000) observaram o mesmo comportamento para as soluções analisadas. O efeito da taxa de deformação na viscosidade aparente das soluções foi descrito pelo modelo de power law ($\tau = K\dot{\gamma}^n$).

As soluções aquosas dos polissacarídeos fermentados por 96 horas obtiveram valores de viscosidade aparente mais elevados que os obtidos em 72 horas. A adição de sais de Na e K teve o efeito de diminuir a viscosidade aparente das soluções, devendo ser pesquisada a sua ação para produtos que não necessitem de alta viscosidade, bem como em locais de aplicação onde se tenha estes íons em excesso.

Destefano & Rosato (1991) obtiveram o valor de 325 mPa.s para solução de goma xantana a 1% em 100 rpm. Os valores medidos da viscosidade também são dependentes as condições de preparo da amostra, pois possibilita o arranjo conformacional das cadeias, podendo alterar os estados de desordem-ordem (Bresolin *et al.*, 1998).

A adição de cálcio propiciou um incremento da viscosidade aparente em todas as soluções analisadas (Figura 2, 3, 4 e 5), comportamento este evidenciado para ambas as linhagens e tempos de fermentação utilizados. Segundo Lundin & Hermansson (1997), a presença de sódio e cálcio aumenta significativamente o módulo de estocagem (G') da solução, sendo este efeito mais pronunciado com a adição de sódio comparado com cálcio para solução de κ -carragena.

Inúmeros estudos vêm sendo realizados com a interação de íons em goma xantana, bem como seu sinergismo com outros polissacarídeos, procurando-se sempre uma melhor qualidade reológica dos produtos e a ampliação de suas

aplicações nos diversos segmentos industriais (Symes, 1980; Bresolin *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2001).

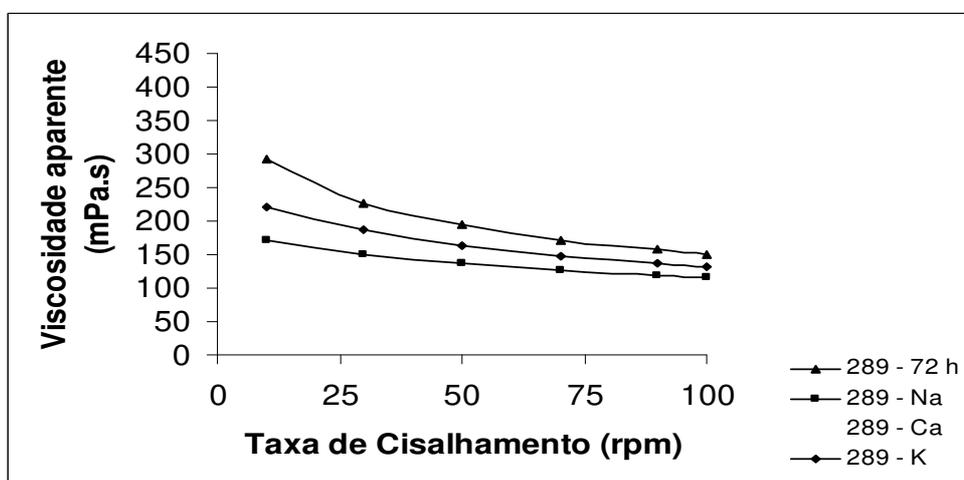


Figura 2 – Viscosidade aparente das soluções aquosas a 1% de goma xantana sintetizada por *X. axonopodis* pv *manihotis* 289 em 72h com e sem adição de sódio (Na), cálcio (Ca) ou potássio (K), em viscosímetro Brookfield modelo DVIII, spindle 31 a 25°C

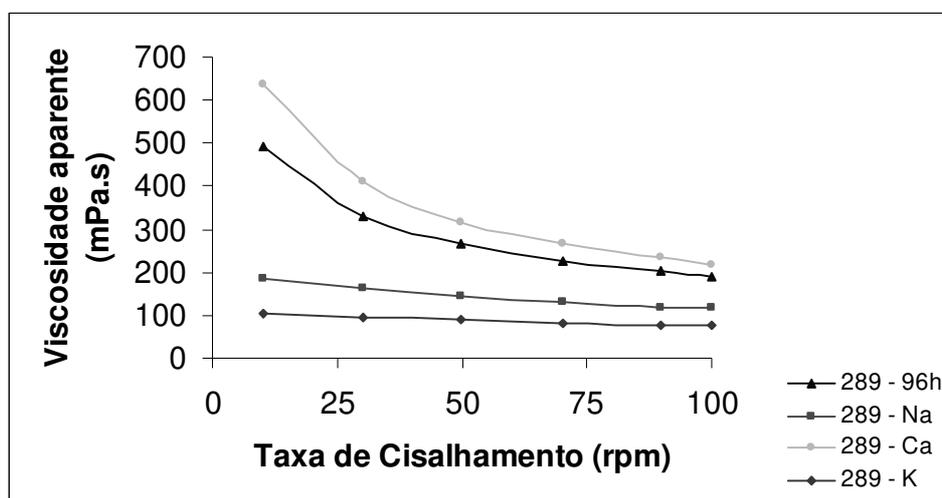


Figura 3 – Viscosidade aparente das soluções aquosas a 1% de goma xantana sintetizada por *X. axonopodis* pv *manihotis* 289 em 96h com e sem adição de sódio (Na), cálcio (Ca) ou potássio (K), em viscosímetro Brookfield modelo DVIII, spindle 31 a 25°C

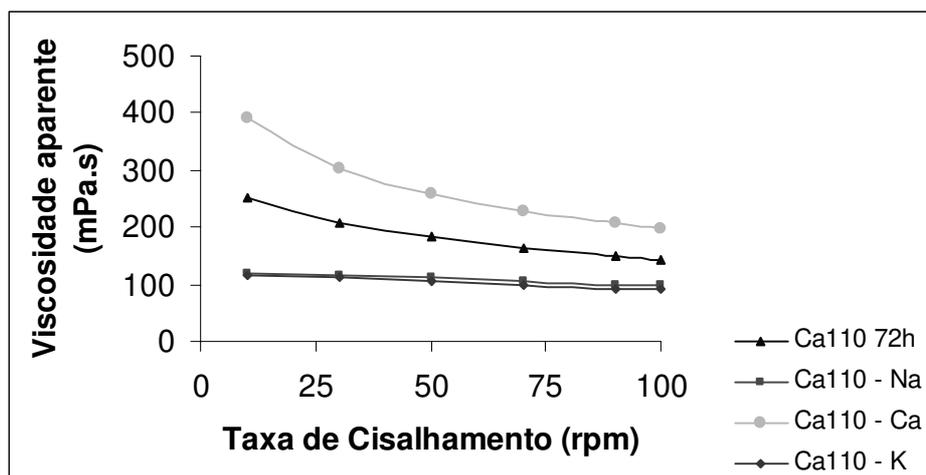


Figura 4 – Viscosidade aparente das soluções aquosas a 1% de goma xantana sintetizada por *X. campestris pv campestris* CA110 em 72h com e sem adição de sódio (Na), cálcio (Ca) ou potássio (K), em viscosímetro Brookfield modelo DVIII, spindle 31 a 25°C

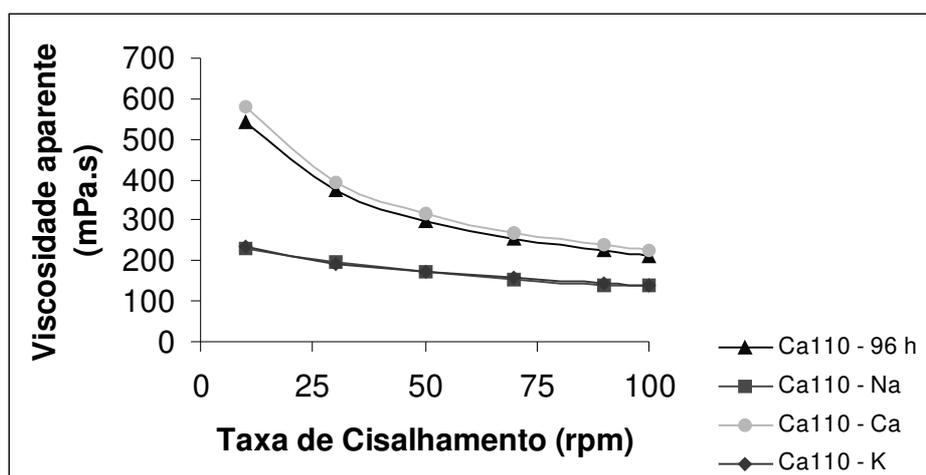


Figura 5 – Viscosidade aparente das soluções aquosas a 1% de goma xantana sintetizada por *X. campestris pv campestris* CA110 em 96h com e sem adição de sódio (Na), cálcio (Ca) ou potássio (K), em viscosímetro Brookfield modelo DVIII, spindle 31 a 25°C

Analisando-se os resultados obtidos pode-se concluir que a linhagem *X. a. pv. manihotis* apresenta os melhores valores de produção e viscosidade aparente com e sem a adição de sais, que a linhagem *X. c. pv. campestris* CA110, bem como a adição de cálcio teve melhores resultados que os sais de Na e K nas soluções aquosas dos polissacarídeos analisados.

Finalmente, pode ser mencionado que novos estudos com diferentes linhagens e meios devem ser realizados com a finalidade de obter melhores resultados de produção e viscosidade. Como também deve ser ampliado o estudo da interação de goma xantana com outros sais bem como a forma de incorporação destes no polímero, sendo necessários estudos que possibilitem verificar a conformação destes polímeros em solução com força iônica modificada.

Agradecimentos: Ao CNPQ e a FAPESP pelo suporte financeiro.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, A.E.C.; Moreira, A.S.; Vendruscolo, J.L.S.; Vendruscolo, C.T. (2000) Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *Xanthomonas campestris pv. pruni*. **Ciência e Engenharia** 9, 1:83-87.
- Bresolin, T.M.B.; Milas, M.; Rinaudo, M.; Ganter, J.L.M.S. (1998) Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **International Journal of Biological Macromolecules** 23, 263-275.
- Coplin, D.L.; Cook, D. (1990) Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 3, 5:271-279.
- Chowdhury, T.A.; Lindberg, B.; Lindquist, U., Baird, J. (1987) Structural studies of an extracellular polysaccharide, S-657, elaborated by *Xanthomonas* ATCC53159. **Carbohydrate Research** 164, 117-122.

- Destefano, S.A.L.; Rosato, Y.B. (1991) Effect of transposon Tn5 on exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris*. **Brazilian Journal of Genetics** 14, 3: 599-607.
- Druzian, J.I. **Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.)**, Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2000. 179p.
- Escudier, M.P.; Gouldson, I.W.; Pereira, A.S.; Pinho, F.T.; Poole, R.J. (2001) On the reproducibility of the rheology of shear-thinning liquids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics** 97, 99-124.
- Esgalhado, M.E.; Caldeira, A.T.; Roseiro, J.C.; Emery, A.N. (2001) Polysaccharide synthesis as a carbon dissipation mechanism in metabolically uncoupled *Xanthomonas campestris* cells. **Journal of Biotechnology** 89, 55-63.
- Esgalhado, M.E.; Caldeira, A.T.; Roseiro, J.C.; Emery, A.N. (2002) Sublethal acid stress and uncoupling effects on cell growth and product formation in *Xanthomonas campestris* cultures. **Biochemical Engineering Journal** 12, 181-192.
- Fontaniella, B.; Rodríguez, C.W.; Piñón, D.; Vicente, C.; Legaz, M.-E. (2002) Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Chromatography B** 770, 275-81.
- García-Ochoa, F.; Santos, V.E.; Casas, J.A.; Gómez, E. (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances** 18, 549-579.
- Hsu, C.-H.; Lo, Y.M. (2003) Characterization of xanthan *gum* biosynthesis in a centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. **Process Biochemistry** 1-9 (article in press).
- Ielpi, L.; Couso, R.O.; Dankert, M. (1993) Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan

- polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. **Journal of Bacteriology** 175, 2490-2500.
- Katzen, F.; Becker, A.; Zorreguieta, A.; Pühler, A.; Ielpi, L. (1996) Promoter análisis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. **Journal of Bacteriology** 178, 14:4313-4318.
- Lundin, L.; Hermansson, A.-M. (1997) Rheology and microstructure of Ca- and Na- κ -carrageenan and locust bean gum gels. **Carbohydrate Polymers** 34, 365-375.
- Meyer, E.L.; Fuller, G.G.; Clark, R.C.; Kulicke, W.M. (1993) Investigation of xanthan gum solution behavior under shear-flow using rheoptical techniques. **Macromolecules** 26, 3:504-11.
- Moraine, R.A.; Rogovin, P. (1973) Kinetics of the xanthan fermentation. **Biotechnology and Bioengineering** 15, 225-237.
- Moreira, A.S.; Vendruscolo, J.L.S.; Gil-Turnes, C.; Vendruscolo, C.T. (2001) Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. **Food Hydrocolloids** 15, 469-474
- Navarrete, R.C.; Seheult, J.M.; Coffey, M.D. (2001) **New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer, and coil-tubing fluid, Part II**. International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 64982, Houston, TX, 1-15.
- Ojinaka, C.; Brownsey, G.J.; Morris, E.R.; Morris, V.J. (1998) Effect of deacetylation on the synergistic interaction of acetan with locust bean gum or konjac mannan. *Carbohydrate Research* 305, 101-108.
- Silman, R.W.; Rogovin, P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: laboratory investigation. (1970) **Biotechnology and Bioengineering** 12, 75-83.
- Silva F.R.; Vettore, A.L.; Kemper, E.L.; Leite, A.; Arruda, P. (2001) Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters** 203, 165-71.

- Souw, P.; Demain, A.L. (1979) Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology** 37, 6:1186-1192.
- Sutherland, I.W.; Kennedy, L. (1996) Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. **Microbiology** (UK) 142, 867-72.
- Symes, K.C. (1980) The relationship between the covalent structure of the *Xanthomonas* polysaccharide (xanthan) and its function as a thickening, suspending and gelling agent. **Food Chemistry** 6, 63-76.
- Vojnov, A.A.; Zorreguieta, A.; Dow, J.M.; Daniels, M.J.; Dankert, M.A. (1998) Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. **Microbiology** 144, 1487-1493.
- Xuewu, Z.; Xin, L.; Dexiang, G.; Wei, Z.; Tong, X.; Yonghong, M. (1996) Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering** 27, 203-209.

CONCLUSÕES GERAIS

A presente tese apresentou dois artigos com a finalidade de expressar os genes de produção de exopolissacarídeo (*sacB* e o operon *gum*) em *Xanthomonas* como linhagem hospedeira e um artigo analisando a produção e caracterizando as soluções de goma xantana com a adição de sódio, cálcio e potássio. Com base nos resultados apresentados podemos concluir que:

a) Clonagem e expressão do gene *sacB* de *Zymomonas mobilis* em *Xanthomonas*: síntese de exopolissacarídeo

A pesquisa desenvolvida objetivou a clonagem e expressão do gene *sacB* de *Zymomonas mobilis* Z-6-88 em *Xanthomonas campestris* pv *campestris* CA110 e *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* 289, verificando sua influência na produção do exopolissacarídeo.

Neste trabalho conclui-se que é possível expressar o gene *sacB* em ambas as linhagens de *Xanthomonas* utilizadas. A expressão foi verificada pela análise da presença do gene por PCR nas linhagens transformadas, obtendo-se nove clones.

As linhagens identificadas com a presença do gene, foram utilizadas para a produção de polissacarídeo e estes analisados com o objetivo de verificar se havia expressão do gene responsável pela polimerização da frutose (*sacB*). Os resultados obtidos permitem concluir que apenas três clones sintetizaram um polissacarídeo que contém frutose na sua composição. Entretanto, novos estudos são necessários para determinar a estrutura destes polissacarídeos e verificar se a frutose presente faz parte da estrutura ou esta ocorrendo a síntese de dois polissacarídeos concomitantemente.

As análises reológicas permitem concluir que o polissacarídeo sintetizado pelo clone CA110 L24C4 fermentado em meio MPI+II obteve valores de viscosidade aparente superior ao polissacarídeo obtido pela linhagem não transformada.

b) Efeito da transferência do operon *gum* de *Xylella fastidiosa* em *Xanthomonas campestris* na síntese de exopolissacarídeo

Este trabalho objetivou fazer a transferência do operon *gum* de *Xylella fastidiosa* para *Xanthomonas campestris* pv *campestris* CA110 e verificar a sua influência na síntese de goma xantana.

Os resultados obtidos permitem concluir que com a adição do operon *gum* foi obtido um incremento de 13,5% na produção de polissacarídeo, obtendo-se também um aumento nas concentrações de manose (23,7%) e glicose (16,9%). A análise da viscosidade aparente, da solução aquosa do polissacarídeo obtido com a linhagem transformada, apresenta valores superiores ao polissacarídeo sem modificação quando analisada a baixas taxas de deformação (10 s⁻¹), 602 mPa.s e 393 mPa.s respectivamente.

Podemos concluir que a linhagem transformada apresenta potencial para ser aplicada industrialmente, sendo no entanto necessários estudos de otimização do processo fermentativo.

c) *Xanthomonas campestris* pv *campestris* CA110 e *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* 289: Produção e caracterização da goma xantana

Neste trabalho avaliou-se a produção e caracterizou-se a goma xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* CA110 e *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* 289, verificando-se a importância da adição de cálcio, potássio e sódio com a finalidade de melhorar a viscosidade aparente das soluções aquosas.

Os resultados obtidos nas condições testadas permitem concluir que a adição de cálcio proporcionou um aumento na viscosidade aparente e a adição de sódio e potássio diminuiu a viscosidade aparente das soluções aquosas analisadas. Estes resultados são de elevado interesse na escolha do processo industrial e condições onde serão aplicados estes polissacarídeos.