



**Universidade Federal da Bahia**  
**Instituto de Ciências da Saúde**  
**Departamento de Ciências da Biointeração**  
**Programa de Pós Graduação em Biotecnologia**

**Brena Mota Moitinho**

**Análise da expressão diferencial de genes relacionados à produção de  
xantana em *Xanthomonas arboricola* e *Enterobacter cloacae***

**Salvador - BA**  
**2012**

**BRENA MOTA MOITINHO**

**Análise da expressão diferencial de genes relacionados à produção de xantana em *Xanthomonas arboricola* e *Enterobacter cloacae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque.

Co-orientador: Paulo Fernando de Almeida

**Salvador – BA  
2012**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca  
Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

M175 Moitinho, Brena Mota

Análise da expressão diferencial de genes relacionados à produção de xantana em *Xanthomonas arboricola* e *Enterobacter cloacae* / Brena Mota Moitinho. – Salvador, 2012.

182 f.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Expressão gênica. 3. Xantana. 4. *Xanthomonas*. I. Roque, Milton Ricardo de Abreu. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 574.6



---

---

## TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação:

**Análise da expressão diferencial de genes relacionados à  
produção de xantana**

Elaborada por:

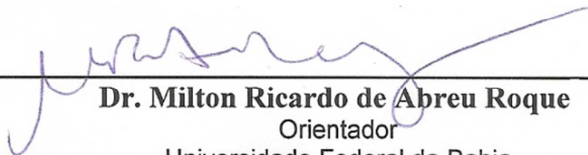
**BRENA MOTA MOITINHO**


e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora foi aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do título de

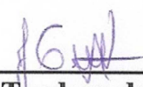
**MESTRE EM BIOTECNOLOGIA**

Salvador, Bahia, 13 de novembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque**  
Orientador  
Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Luís Gustavo Carvalho Pacheco**  
Examinador Interno  
Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Jorge Teodoro de Souza**  
Examinador Externo  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

## AGRADECIMENTOS

Em todos os passos que dou, nunca estou só e sou feliz em dedicar minhas conquistas àqueles que caminharam comigo e que, de alguma forma, me apoiaram. Agradeço, em especial, a Deus por permitir e me acompanhar em todos os momentos, me concedendo coragem, saúde e alegria, sempre!

Aos meus amados pais, Ednaldo e Sirlene, pela confiança, apoio, carinho e compreensão, sempre! Estiveram sempre ao meu lado, assim como meus irmãos, Bruno e Rafael, sempre companheiros e fiéis, compartilhamos cada conquista!

Ao meu noivo e amor eterno, Celso Júnior, que participou de cada segundo dessa jornada, compartilhando momentos de alegria e preocupação, com o melhor carinho e compreensão que eu poderia esperar!

Ao meu orientador, Milton Roque, que da sua melhor forma, me guiou pelos melhores caminhos, me permitindo crescer e sonhar academicamente. Vibrou nos bons resultados e me animou dias melhores, quando necessário.

Ao meu co-orientador, Paulo Almeida, sempre empolgado com bons resultados, ainda faz brilhar os olhos com novas ideias, permitiu e contribuiu cada novo passo conquistado.

A Prof. Josilene, que me guiou importantíssimas vezes, e com uma atenção e boa vontade sem igual, abraçou o trabalho e colaborou na sua melhor construção.

Aos amigos e parceiros de pesquisa do LABEM, em especial a inseparável equipe Aldi e Luiz, com quem tive os melhores aprendizados em cumplicidade de experimentos e discussões. Aos amigos, colaboradores(as) e pesquisadores(as) Luísa, Jamile, Diana, Bethânia, Leila, Roberta, Pati, Sueli, Michele, Cátia, Kênia, Rodrigo, Hendor, Elderlei, Neto e Ed que me fizeram, cada um do seu jeito, levar para casa, diariamente, uma dose de conhecimento. Além da grande amiga Fúlvia que sempre me deu força e em nenhum momento me negou ajuda e companhia. À Pati, amiga e parceira na pesquisa, que não mediu esforço para contribuir no sequenciamento e na interpretação de resultados.

Não posso deixar de agradecer aos amigos que tive a honra de conviver do LBBB, Felipe, Marla, Érica, Cissa, Cris, Guilherme, Paulo, Ivana, Valdir e, em especial a Alexandre, Cimile e Dani que me concederam riquíssimas orientações nas análises de expressão. Além, é claro, dos ilustríssimos Prof. Renato, Prof.<sup>a</sup> Luzimar e Prof.<sup>a</sup> Marta, que apoiaram e permitiram a parceria. Agradeço também, ao pesquisador Raimundo e ao professor Martins pela atenção e importantíssima contribuição nas análises estruturais, permitindo o enriquecimento dos resultados.

Aos meus queridos extra amigos que mesmo não tão pertinho, continuam ligados à mim e influenciando em minhas conquistas desde a graduação. Assim como, todos os amigos que envolvem a minha felicidade e que, de alguma forma, participaram e compreenderam os momentos que vivi e não pude viver junto a eles. Da mesma forma, à minha família, envolvendo tios, tias, primos(as), sogro (Celso), sogra (Vera), cunhadas, sobrinhas, afilhados e amigos que são família.

À todos, MUITÍSSIMO Obrigada!

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Estrutura proposta do EPS extraído de <i>E. cloacae</i> , com repetidas unidades glicose (2) e galactose (2) (HUA, 2010).....	11
Figura 02: Estrutura monomérica da xantana (adaptado de BECKER, 1998), apresentando duas moléculas de glicose na cadeia principal; a cadeia secundária com duas manoses, sendo uma interna e outra externa, e uma molécula de ácido glucurônico ao centro (...) .....	12
Figura 03: Mapa genético do grupamento gênico gum denominado quanto à organização dos genes. A localização e designação dos genes são indicadas no esquema de caixas e setas, evidenciando tamanho e direção da transcrição (BECKER, 1998).....	14
Figura 04: Modelo do metabolismo da síntese da xantana, proposto por Vorhölter et al. (2008) (...).....	15
Figura 05: Curva de amplificação de um gene alvo por RT-qPCR, representando as fases de amplificação (linha de base, exponencial, linear e platô), o threshold e o ciclo de quantificação (Cq) para a amostra.....	22
<b>Capítulo I</b>	
Figura 01. Desenho ilustrativo das regiões promotoras inseridas no grupamento gênico <i>gum</i> .....	27
Tabela 01. Sequências referentes aos primers desenhados dos genes downstream às seis regiões promotoras preditas neste estudo, além da sequência do gene referência <i>acpP</i> .....	28
Figura 02: Curvas de amplificação e curvas de dissociação do PCR em tempo real do <i>primer acpP</i> , com amplificação média detectada de 13,5 ciclos.....	31
Figura 03: Curvas de amplificação e curvas de dissociação do PCR em tempo real do <i>primer gumB</i> , com amplificação média detectada de 25,8 ciclos.....	31
Figura 04: Curvas de amplificação e curvas de dissociação do PCR em tempo real do <i>primer gumC</i> , com amplificação média detectada de 29,6 ciclos.....	32
Figura 05: Curvas de amplificação e curvas de dissociação do PCR em tempo real do <i>primer gumM</i> , com amplificação média detectada de 31 ciclos.....	32
Figura 06: Gel de agarose representando a amplificação em tempo real esperada dos amplicons correspondentes aos <i>primers</i> desenhados, com marcador de peso molecular de 50pb.....	33
Tabela 02: Sequências dos <i>primers</i> para o estudo de genes relacionados à produção de xantana em <i>Xanthomonas</i> , por PCR em tempo real.....	34
<b>Capítulo II</b>	
Tabela 01. Sequências dos <i>primers</i> utilizados no estudo de genes relacionados à produção de xantana e os genes referência utilizados.....	49

Figura 01. Aspecto das colônias crescidas em meio de cultura YM ágar, à 28°C ±2°C, por 24h, sendo (A) CCMICS 351 e (B) CCMICS 482. As colônias apresentaram viscosidade aparente, com aspecto brilhoso, com morfologia celular em bacilos curtos e Gram negativas.....	53
Figura 02. Curva de crescimento das linhagens CCMICS 351 e CCMICS 482, crescidas em meio de cultura YM líquido sob as seguintes condições, 28°C ±2°C e agitação de 120rpm, dados obtidos da contagem em unidades formadoras de colônias (u.f.c.) e valores em Log.....	54
Figura 03. Avaliação da produção de goma, em temperatura de 30°C e 180rpm de agitação para as linhagens CCMICS 351 e CCMICS 482.....	55
Figura 04. Aspecto do biopolímero precipitado após extração com etanol, das linhagens CCMICS 482 em (a), e CCMICS 351 em (b).....	56
Figura 05. Dados da viscosidade aparente (mPa.s) versus Taxa de deformação (s <sup>-1</sup> ), a 25°C das soluções de goma xantana (0,2 % (p/v) ou 2000ppm), nas amostras: “CCMICS 351” e “CCMICS 482”.....	57
Figura 06. Viscosidade aparente (mPa.s) vs Tempo de produção (horas), das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), nos tempos 0, 12, 24 e 72 horas das amostras: “CCMICS 351” e “CCMICS 482”.....	57
Figura 07: Espectrometria no Infravermelho das gomas produzidas pelas linhagens bacterianas CCMICS 351 e 482 em comparação à goma xantana comercial.....	58
Figura 08. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (1H-RMN) para amostra de EPS produzido pela linhagem CCMICS 351, em condições otimizadas, obtido em água deuterada (D2O) a 70°C.....	60
Figura 09. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (1H-RMN) para amostra de EPS produzido pela linhagem CCMICS 482, em condições otimizadas, obtido em água deuterada (D2O) a 70°C.....	60
Tabela 02. Valores de estabilidade apresentados no geNorm.....	61
Figura 10. Quantificação da expressão relativa de <i>gumB</i> em CCMICS 482.....	63
Figura 11. Quantificação da expressão relativa de <i>gumC</i> em CCMICS 482.....	64
Figura 12. Quantificação da expressão relativa de <i>gumM</i> em CCMICS 482.....	65
Tabela 03. Relação da produção de xantana, viscosidade da xantana e expressão gênica dos genes <i>gumB</i> , <i>C</i> e <i>M</i> , da linhagem CCMICS 482.....	66
Figura 13. Metabolismo de transcrição dos genes <i>gumM</i> , <i>gumC</i> e <i>gumB</i> em <i>Xanthomonas arboricola</i> (CCMICS 482).....	66
Figura 14. Quantificação da expressão relativa de <i>gumB</i> em CCMICS 351.....	67
Figura 15. Quantificação da expressão relativa para <i>gumC</i> em CCMICS 351.....	68
Figura 16. Quantificação da expressão relativa de <i>gumM</i> em CCMICS 351.....	69
Tabela 04. Relação da produção de xantana, viscosidade da xantana e expressão gênica dos genes <i>gumB</i> , <i>C</i> e <i>M</i> , da linhagem CCMICS 351.....	70

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	9
2.1. Exopolissacarídeos microbianos .....	9
2.2. A Goma xantana .....	11
2.2.1. Biossíntese da xantana .....	13
2.3. Aplicação da goma xantana .....	16
2.4. O Gênero <i>Xanthomonas</i> .....	18
2.5. Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR) em Tempo Real.	20
3. OBJETIVO GERAL .....	23
3.1. Objetivos específicos .....	23
Capítulo I:	
Estudos <i>in silico</i> e para expressão gênica de promotores secundários do operon gum, relacionados à produção de goma xantana.....	24
Resumo .....	24
Abstract .....	24
1. Introdução .....	25
2. Material e Métodos .....	26
2.1. Determinação de promotores secundários .....	26
2.2. Desenho dos primers .....	27
2.3. PCR em tempo real e eletroforese em gel de agarose .....	28
3. Resultados e Discussão .....	30
3.1. Seleção dos genes baseados na localização das regiões promotoras.....	30
3.2. Amplificação por PCR em tempo real, eficiência e análise por eletroforese em gel de agarose .....	30
3.3. Primers determinados para uso em RT-qPCR, envolvidos na biossíntese da xantana .....	33
4. Conclusão .....	35
5. Referências .....	35



## Capítulo II:

Estudo de linhagens bacterianas na produção de goma xantana e a análise da expressão gênica diferencial por PCR em tempo real .....	40
Resumo .....	40
Abstract .....	40
1. Introdução .....	41
2. Material e Métodos .....	44
2.1. Obtenção e caracterização das linhagens bacterianas.....	44
2.2. Estudos de produção e caracterização da goma xantana utilizando as linhagens bacterianas CCMICS 482 ( <i>Xanthomonas arboricola</i> ) e CCMICS 351 ( <i>Enterobacter cloacae</i> ) .....	45
2.2.1 Curva de crescimento .....	45
2.3. Caracterização e análise da goma xantana .....	46
2.3.1. Produção de goma xantana .....	46
2.3.2. Extração e quantificação da xantana .....	46
2.3.3. Análise da viscosidade .....	47
2.3.4. Análise de Espectrometria na região do infravermelho .....	47
2.3.5. Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ...	48
2.4. Análise da Expressão gênica .....	48
2.4.1. Seleção dos genes e primers estudados.....	49
2.4.2. Extração de RNA .....	50
2.4.3. Conversão de RNA para cDNA .....	50
2.4.4. PCR quantitativo em Tempo Real .....	51
2.4.5. Expressão diferencial .....	51
3. Resultados e Discussão.....	52
3.1. Obtenção e caracterização das linhagens bacterianas.....	52
3.2. Estudos com as linhagens bacterianas selecionadas: CCMICS 482 ( <i>Xanthomonas arboricola</i> ) e CCMICS 351 ( <i>Enterobacter cloacae</i> ).....	53
3.2.1. Curva de crescimento .....	53
3.3. Caracterização da goma xantana .....	54
3.3.1. Produção e quantificação da goma xantana .....	55
3.3.2. Análise da viscosidade da xantana .....	56

3.3.3 Caracterização da goma xantana por espectroscopia de IR.....	58
3.3.4 Caracterização da goma xantana por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN <sup>1</sup> H) .....	59
3.4. Análises da expressão gênica .....	61
3.4.1. Análise dos primers .....	61
3.4.2. Caracterização do RNA extraído .....	61
3.4.3. Quantificação da expressão relativa da CCMICS 482 .....	62
3.4.4. Quantificação da expressão relativa da CCMICS 351 .....	66
4. Conclusão .....	70
4.5. Referências .....	70
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
5. REFERÊNCIAS .....	78
APÊNDICE A .....	85
APÊNDICE B .....	86
APÊNDICE C.....	87

## 1. INTRODUÇÃO

Os biopolímeros microbianos têm sido amplamente estudados, principalmente, devido as suas vantagens frente aos polímeros sintéticos, por se tratar de produtos biodegradáveis e capazes de oferecer melhores propriedades reológicas na aplicação industrial. Dentre eles, alguns como xantana, dextrana, gelana, alginato e outros exopolissacarídeos (EPS), têm sido utilizados industrialmente. Contudo, a goma xantana representa o polímero mais rentável para aplicação industrial, destacada por suas propriedades pseudoplásticas (ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da deformação do fluido), alta viscosidade em baixas concentrações, estabilidade em amplas faixas de pH e em altas temperaturas e também pela produção em larga escala.

A xantana é um biopolímero produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*, com estrutura primária constituída de duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico. Sua biossíntese é determinada pela codificação de um grupamento gênico denominado “*gum*”, composto por 12 genes, designados de “*gumB*” ao “*gumM*”. Um promotor único, *upstream* ao *gumB*, é responsável para o desencadeamento da síntese do polímero, apesar dos 12 genes apresentarem diferentes funções na síntese da xantana. Fato que permite questionamento de um padrão de expressão gênica diferenciado desses genes, já que a goma xantana pode apresentar propriedades particulares quando produzida por linhagens e condições diferentes.

O gênero *Xanthomonas* compreende espécies fitopatogênicas, bacilos Gram-negativos e móveis por flagelo único. A taxonomia do grupo, principalmente dentro do gênero tem gerado diversas revisões, com base na homologia do DNA. Uniformidades morfológicas e fisiológicas dentro desse gênero tem dificultado o estabelecimento de uma taxonomia estável, tanto na diversidade fenotípica quanto nas relações evolutivas. Algumas espécies sofreram alterações em sua nomenclatura, como *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* que já foi classificada como *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. As bactérias classificadas como do gênero *Xanthomonas*, apresentam-se em sua maioria como fitopatogênicas. A produção de EPS está relacionada com sua sobrevivência, proteção ao dessecação, concentração de minerais e nutrientes, redução do contato com moléculas hidrofóbicas ou carregadas, e aumento da fixação na superfície do vegetal hospedeiro.

A análise da expressão diferencial pelo método quantitativo de amplificação por PCR em tempo real, ou PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), representa um grande avanço nos métodos moleculares atuais. Em uma reação da PCR em tempo real consegue-se monitorar a amplificação durante cada ciclo da reação da PCR, e os níveis de transcritos (RNAm) de uma determinada amostra caracteriza a quantificação da sua expressão.

No intuito de enriquecer o conhecimento a respeito da produção de xantana por linhagens de *Xanthomonas*, relacionando às tendências moleculares de classificação e caracterização, desenvolveu-se o estudo do grupamento gênico *gum* e seu comportamento de expressão por RT-qPCR, e a consequente produção da goma xantana, onde foram realizados testes para a caracterização estrutural, química e propriedades reológicas.

O presente estudo está estruturado em dois capítulos, antecidos pela revisão de literatura. O primeiro capítulo apresenta os resultados obtidos no estudo do grupamento gênico *gum*, com determinação de possíveis regiões promotoras na síntese da xantana e os iniciadores correspondentes para um estudo de expressão gênica. No segundo capítulo, encontra-se a caracterização das linhagens bacterianas estudadas e de seus respectivos EPS, seguida da análise de expressão gênica relacionada com a síntese de xantana por RT-qPCR.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Exopolissacarídeos microbianos**

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio extracelular (SUTHERLAND, 1998). Os exopolissacarídeos, também denominados de biopolímeros ou gomas, têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (MOREIRA, 2003) e apresentam-se como alternativa às gomas tradicionais, com um visível interesse por suas propriedades reológicas, sendo utilizados amplamente como espessantes, gelificantes e estabilizantes nas indústrias de alimentos, farmacêutica, química e petroquímica (PACE, 1991).

Na produção de EPS por bactérias Gram-negativas, a estrutura de muitos polissacarídeos é relativamente simples, formados de homopolissacarídeos (normalmente polímeros compostos de D-glicose) ou heteropolissacarídeos. Este último é normalmente composto de unidades repetidas e alinhadas desde dissacarídeos até octassacarídeos, compostos de dois a quatro tipos de monossacarídeos diferentes e muitos contêm grupos acetila e piruvato. Dentre esses polissacarídeos vários são economicamente viáveis e bastante utilizados, como a xantana e a gelana (SUTHERLAND, 2001).

Os biopolímeros microbianos apresentam algumas vantagens em relação às gomas vegetais, tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno, além de ser um produto biodegradável (SUTHERLAND, 2001). Atualmente a xantana é o EPS com maior estabilidade entre os existentes no mercado, por formar soluções aquosas de alta viscosidade, extremamente pseudoplásticas, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da deformação do fluido (FORESTI, 2003). A viscosidade, como parâmetro de qualidade, é influenciada pelo tipo das cepas, composição do meio de fermentação e pelas condições operacionais utilizadas na produção (BRANDÃO, 2008).

O progresso na utilização, caracterização e identificação de exopolissacarídeos sintetizados por micro-organismos vêm sendo observado nas últimas décadas e inúmeros têm sido produzidos e utilizados comercialmente, entre eles: dextrana, xantana, curdulana, alginato bacteriano, zanflo, gelana, welana, escleroglucana, pululana, celulose bacteriana, entre outros (CAMPBELL *et al.*, 2003; KALOGINANNIS *et al.*, 2003; GIAVASIS *et al.*, 2003; MAUGERI, 2001;; SÁ-CORREIA, 2002). Além disso, polissacarídeos com atividade flocculante, sintetizados por micro-organismos, têm sido extensivamente explorados para aplicação industrial (YOKOI, 1997), no intuito de substituir grandes polímeros orgânicos flocculantes, como a poliacrilamida que não é facilmente degradada e pode ser prejudicial ao homem (PRASERTSAN, 2008). Entre os flocculantes microbianos, alguns têm sido investigados, como: polissacarídeo-proteína, glicoproteínas, ácido poliglutâmico e a xantana (YOKOI, 1997), e caracterizados como sendo produzidos por uma única espécie ou gênero, como EPS obtido de um novo isolado de *Enterobacter cloacae*, com elevada atividade de flocculação (PRASERTSAN, 2006).

Como exemplo de bactérias produtoras de EPS, *E. cloacae* é uma Gram-negativa, anaeróbia facultativa (NAIK, 2012) e produz um EPS composto por glicose, manose e galactose (XU et al., 2009), além da presença do grupo piruvil (WANG, 2012). Contudo, sua estrutura difere, em parte, das estruturas apresentadas por outros autores como Meade (1994), que inclui glicose, galactose, ácido glucurônico, fucose e acetil; e Hua (2010) que propõe repetidas unidades de glicose e galactose, ilustrada por ele, a estrutura está representada na Figura 01.

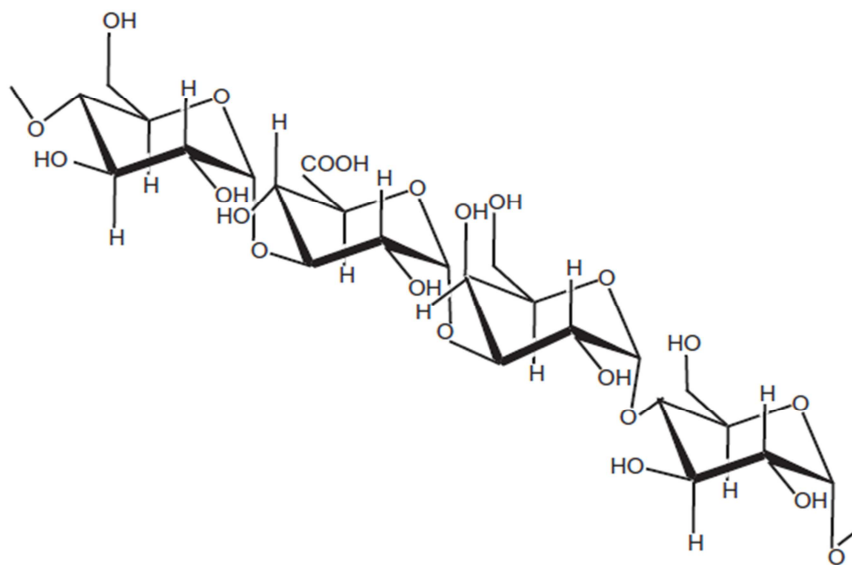


Figura 01. Estrutura monomérica do EPS extraído de *E. cloacae*, com repetidas unidades glicose (2) e galactose (2), proposta por HUA (2010).

## 2.2. A goma xantana

A xantana é um polímero do tipo poli- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glicopirranose, assemelhando-se à celulose, mas com ramificações alternadas nas posições C-3 (PRADELLA, 2006). Possui estrutura primária formada por unidades repetidas de pentassacarídeo, onde a cadeia linear é formada por duas unidades de glicose, e o trissacarídeo das ramificações por duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico. Em aproximadamente metade das unidades de D-manose terminal, um resíduo de ácido pirúvico está ligado nas posições 4 e 6, já a unidade de D-manose não terminal carrega um grupo acetil na posição 6 (NERY, 2008). A Figura 02, adaptada de BECKER (1998), representa a estrutura monomérica da goma xantana.

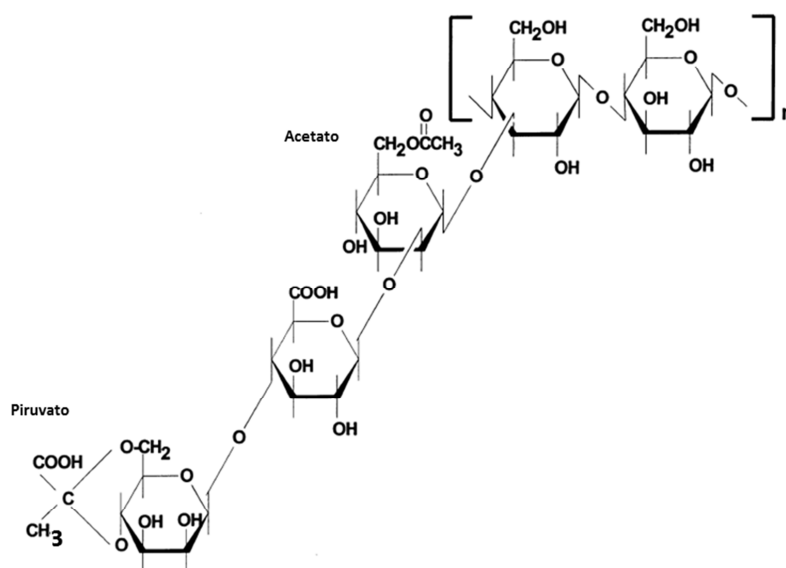


Figura 02. Estrutura monomérica da xantana (adaptado de BECKER, 1998), apresentando duas moléculas de glicose na cadeia principal; a cadeia secundária com duas manoses, sendo uma interna e outra externa, e uma molécula de ácido glucurônico ao centro. Além disso, a xantana pode apresentar em sua estrutura, resíduos de acetato e piruvato ligados às manoses interna e externa, respectivamente.

Os ácidos glucorônico, pirúvico e acético conferem ionicidade à xantana e o que está relacionado à conformação molecular (MISAKI, 1993). O conteúdo de piruvato e acetato na xantana influenciam diretamente às interações intra e intermoleculares da xantana e, conseqüentemente, interferem nas suas propriedades reológicas, como a viscosidade (GARCIA-OCHOA et al., 2000). Segundo Silveira (2008), o grau de acetilação e piruvatação, bem como a viscosidade, aumenta com o tempo de fermentação. Porém, como afirma Pinto (2011), alguns autores consideram que a presença dos grupos acetil e piruvil aumenta a viscosidade da solução (CHEETHAM, 1989; TAKO, 1984; SMITH, 1981), enquanto outros afirmam que não há influência ou papel significativo desses grupos com relação direta à viscosidade da xantana (SHATWELL, 1990; CALLET, 1987; BRADSHAW, 1983). Assim, ainda são necessários estudos que esclareçam os verdadeiros papéis desses grupos nas propriedades reológicas da xantana, permitindo novas aplicações para esses biopolímeros (PINTO, 2011).

O peso molecular da xantana varia de 2 a  $12 \times 10^6$  Da, dependendo da preparação da amostra e do método utilizado na análise. É produzida pelo cultivo de *Xanthomonas* em meio contendo carboidratos e pode sempre ser usada na presença de eletrólitos.

Embora não seja um agente de geleificação, a goma xantana pode formar gel elástico e termorreversível quando combinado com outro tipo de goma, como a locusta. Altas viscosidades são encontradas quando combinadas com a goma guar. A goma xantana é completamente solúvel em água, apresenta altas viscosidades a baixas concentrações e excelente estabilidade ao calor e variações de pH. A viscosidade permanece inalterada variando a temperatura de 0 a 100°C e em valores de pH entre 1 a 13 (PRADELLA, 2006).

Do ponto de vista econômico, a xantana é o polissacarídeo microbiano mais importante, com uma produção mundial de cerca de 40 a 50 mil t/ano, movimentando um mercado de aproximadamente 270 milhões de dólares anualmente, e o crescimento da demanda está estimado a uma taxa contínua de 5 a 10% ao ano (PRADELLA, 2006). Segundo Rosalam & England (2006), as maiores vantagens da xantana frente a outras gomas são: (1) alta viscosidade em baixas concentrações; (2) estabilidade em amplas faixas de pH, em altas concentrações de eletrólitos (150g.L<sup>-1</sup> NaCl) e em temperaturas acima de 90°C; (3) grande escala de produção em curto espaço de tempo por processo fermentativo e (4) suas propriedades pseudoplásticas.

Apesar do grande mercado consumidor de xantana e de suas diferentes aplicações e potencialidades, poucos são os países que a produzem. A xantana utilizada no Brasil ainda é importada na sua totalidade, entretanto o país possui os insumos básicos utilizados durante o processo, como o açúcar de cana e o etanol, o que o torna potencial centro para a produção deste polímero (BORGES, 2009).

### **2.2.1. Biossíntese da xantana**

A biossíntese da xantana consiste, principalmente, numa montagem passo à passo da estrutura e a ligação das subunidades pentassacarídicas para posterior polimerização e exportação (IELPI, 1993). As enzimas exigidas para esse processo são codificadas por uma região do genoma de *Xanthomonas* nomeada “xpsI” ou “gum” (KATZEN, 1998). Esta região é composta por 12 genes, designados de “*gumB*” ao “*gumM*”, com aproximadamente 12 kb (Figura 03). A transcrição do grupamento gênico *gum* apresenta-se dirigida por um promotor localizado *upstream* ao primeiro gene, “*gumB*” (KATZEN, 1996; VOJNOV et al., 2001; VORHÖLTER et al., 2008).



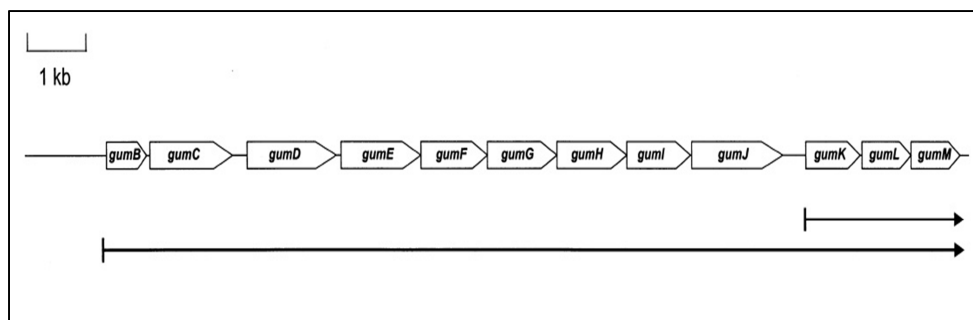


Figura 03. Mapa genético do grupamento gênico *gum* denominado quanto à organização dos genes. A localização e designação dos genes são indicadas no esquema de caixas e setas, evidenciando tamanho e direção da transcrição (BECKER, 1998).

A produção de precursores UDP-glicose, UDP-ácido glucurônico e GDP-manose a partir da conversão de açúcares simples para precursores derivados de açúcares nucleotídeos, precede a etapa inicial da síntese da xantana. Assim, ocorre a transferência dos monossacarídeos, a partir do nucleotídeo correspondente para o lipídeo carregador, para formar a unidade pentassacarídica. As subunidades de pentassacarídeos são fixadas no interior da membrana, com a ligação do fosfato poliprenol e a adição dos grupos acetil e piruvato, então ocorre a polimerização de unidades repetidas de pentassacarídeos e a secreção do biopolímero (IELPI et al, 1993).

Segundo Vorhölter et al. (2008), a síntese da xantana ocorre na face interior da membrana celular, onde repetidas unidades pentassacarídicas definidas em glicose-glicose-manose-glucoronato-manose são formadas a partir da ação das glicosiltransferases. Estas enzimas são codificadas pelos genes: *gumD*, *gumM*, *gumH*, *gumK* e *gumI*. As unidades de manose podem ser acetiladas, em variados graus, por enzimas codificadas pelos genes *gumF* (manose interna) e *gumG* (manose externa); e apenas a manose externa pode sofrer piruvilação a partir da codificação do gene *gumL*. Essas proteínas envolvidas na síntese de unidades de repetição já apresentam funções estabelecidas com base em dados experimentais (KATZEN et al., 1998), porém ainda existe necessidade de validar a exata função dos genes *gumBCEJ*, apesar de se conhecer a relação desses com a exportação e polimerização da xantana (VORHÖLTER et al., 2008). Ainda segundo o modelo de Vorhölter et al. (2008), representado na Figura 04, o gene *gumJ* é responsável pela exportação das unidades monoméricas formadas, para a face externa da membrana celular interna. Aqui o gene *gumE* pode realizar a polimerização, enquanto em contato com o *gumC* e *gumB*, ancorados na membrana

interna e externa, respectivamente, permite a exportação da xantana para o meio externo (VORHÖLTER, 2008; VOJNOV, 1998; BECKER, 1998).

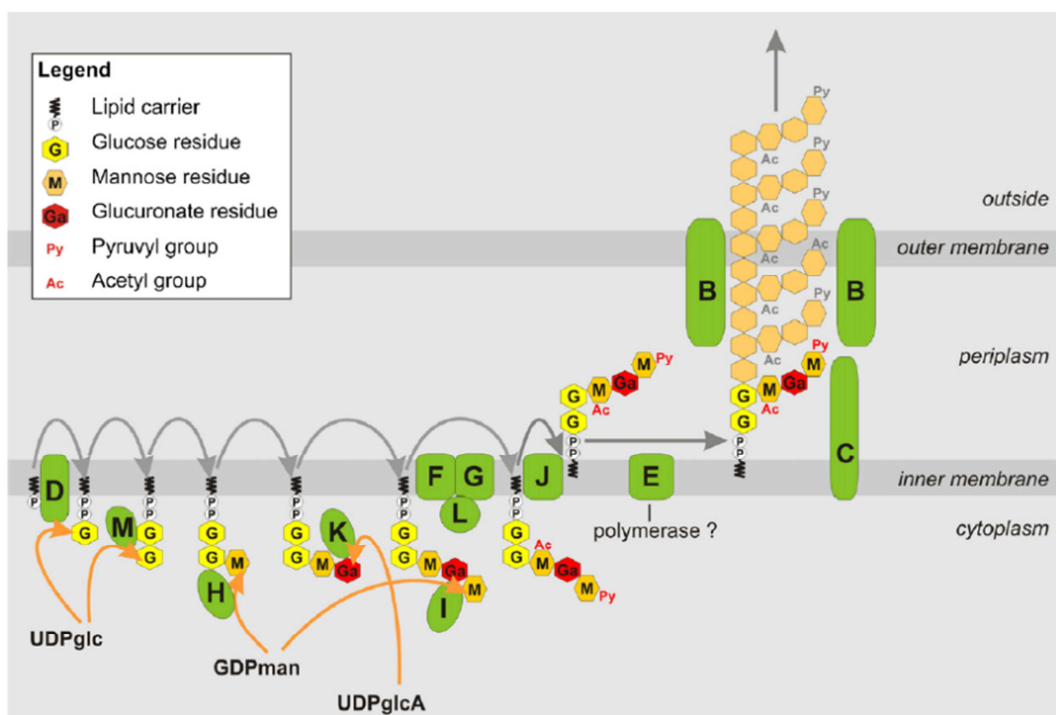


Figura 04. Modelo do metabolismo da síntese da xantana, proposto por Vorhölder et al. (2008). As proteínas codificadas pelos genes (●), demonstram: reações de glicosiltransferases por *gumD*, que transfere a glicose-fosfato a partir da UDP-glicose (UDP-glc); quatro reações subsequentes por *gumM*, *gumH*, *gumK* e *gumL* adicionando sequencialmente o segundo resíduo de glicose, dois resíduos de manose e o resíduo de ácido glucurônico de UDP-glc, GDP-manose (GDP-man) e Udp-glucuronato (UDP-glcA) para formar a estrutura de carboidrato das repetidas unidades de xantana; a última manose adicionada piruvatada pelo *gumL*, e ambas as manoses acetiladas por *gumF* e *gumG*; as repetidas unidades transportadas por *gumJ* para a face externa da membrana interna; xantana polimerizada por *gumE*; unidades de repetição translocadas até *gumC*, determinando o tamanho da cadeia; exportação da xantana madura por *gumB*, proteína da membrana externa.

De acordo com Sutherland (2001), o processo descrito de polimerização e secreção do exopolissacarídeo (EPS) pela membrana celular, passagem pelo periplasma, membrana exterior e excreção para o meio extracelular, ainda deve ser melhor elucidado. Apesar de alguns autores descreverem o processo de polimerização das unidades pentassacarídicas ocorrendo no interior da célula para em seguida ocorrer a secreção do biopolímero para o meio externo (SUTHERLAND, 2001; KATZEN et al., 1998), Köplin et al. (1992) apresenta as unidades pentassacarídicas sendo secretadas e polimerizadas no ambiente extracelular, ocasionando a formação do biopolímero.

### 2.3. Aplicação da goma xantana

A goma xantana é largamente empregada na indústria alimentícia como espessante, geleificante, estabilizante, agente suspensivo e auxiliar de emulsificação. Em cosméticos e produtos farmacêuticos em geral, é utilizada principalmente como espessante e estabilizante (PRADELLA, 2006). Na indústria petrolífera, sua utilização se tornou crescente como fluido de perfuração de poços e na recuperação terciária do petróleo (ROSALAM & ENGLAND, 2006; BORGES, 2009).

O petróleo, atualmente, responde pela maior parte da energia consumida no mundo e sua procura tem levado a exploração, cada vez maior, em fronteiras de difícil acesso. Criando assim, uma tendência de valorização do petróleo, em geral, devido ao acelerado aumento do risco de sua escassez (MUSTAFA, 2003). Na maioria dos reservatórios ativos já foram implementados métodos para aumentar a produção e recuperar mais petróleo do que suas energias naturais permitiriam. Estes métodos, basicamente injeção de água ou gás natural, conhecidos como recuperação secundária, têm tecnologias dominadas e de largo uso. Porém, só conseguem recuperar uma fração do total existente nas jazidas, elevando a recuperação média. O restante do óleo fica retido nos poros das rochas, a menos que sejam empregados métodos especiais de recuperação (MUSTAFA, 2003).

Métodos especiais de recuperação de petróleo, denominadas EOR (Enhanced Oil Recovery), tendem a ter cada vez maior importância na exploração de poços de petróleo, principalmente, devido a valorizada busca de maior rendimento dos poços. Dessa forma, torna-se necessário a aplicação de tecnologias avançadas, como a recuperação terciária com base na adição de polímeros à água de injeção para transformá-la em um fluido que se desloque dentro do meio poroso onde o óleo se deposita. Aumentando então, a recuperação do petróleo explorado, a partir da atuação em pontos onde o processo convencional não foi eficaz (RAMKRISHNA, 2008).

Nos chamados poços surgentes, a produção de óleo durante o primeiro estágio é obtida devido à pressão natural do reservatório. A quantidade de óleo produzida pela energia do reservatório, assim como pelo bombeamento de poços para auxiliar no escoamento natural, é conhecida como recuperação primária. A eficiência da recuperação de óleo nesse primeiro estágio se limita a uma faixa entre 10 e 30% do volume total de petróleo disponível, dependendo da natureza do reservatório. Portanto, mais de 70% do óleo inicialmente contido no reservatório estão disponíveis para

técnicas secundárias e terciárias de recuperação de óleo. Durante o segundo estágio de recuperação, água ou gases podem ser injetados com a finalidade de extrair o óleo das rochas porosas. Porém, esses fluidos tendem a percorrer as regiões mais permeáveis, deixando quantidades substanciais de óleo na formação (VOSSOUGH, 2000; MOGHADASI et al., 2004). Pode-se dizer que um método especial de recuperação é empregado para atuar nos pontos onde o processo convencional falhou. As baixas recuperações resultantes de um processo convencional de injeção de fluidos podem ser creditadas basicamente a dois principais aspectos: alta viscosidade do óleo do reservatório e elevadas tensões interfaciais entre o fluido injetado e o óleo. No caso de um reservatório com óleo de alta viscosidade, pode-se adicionar polímeros à água de injeção para transformá-la em um fluido que se desloque dentro do meio poroso com a mesma mobilidade que o óleo (THOMAS et al., 2001).

Quando a viscosidade do fluido injetado é muito menor que a do fluido a ser deslocado, o primeiro se move muito mais facilmente no meio poroso, encontrando caminhos preferenciais e se dirigindo rapidamente para poços de produção. O óleo fica retido porque o fluido injetado não se propaga adequadamente no reservatório, ficando grandes volumes de rocha nos quais o deslocamento não se processou. No caso de altas tensões interfaciais, a capacidade do fluido injetado de desalojar o óleo do reservatório para fora dos poros é bastante reduzida, deixando saturações residuais elevadas de óleo nas regiões já contatadas pelo fluido injetado (THOMAS et al., 2001).

É fácil vislumbrar que, no quadro mundial atual, os métodos especiais de recuperação (EOR) tenderão a ter cada vez maior importância. Assim exige a aplicação de tecnologias avançadas e dispendiosas que frequentemente inibem suas aplicações. Com relação ao Brasil, para sustentar a atual capacidade de produção de petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano, que vem sendo explorado comercialmente desde a década de 50, a indústria petrolífera deverá ampliar o uso das técnicas especiais de recuperação. Estudos realizados por técnicos da indústria petrolífera brasileira, em relação as propriedades das rochas e dos fluidos existentes nos reservatórios baianos, concluíram que os métodos de recuperação avançada de petróleo mais adequados para estas jazidas são: injeção de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) em sua forma miscível e de soluções de polímeros. Ambos os métodos já vêm sendo utilizados, porém em pequena escala (MUSTAFA, 2003).

Fluidos à base de água são os mais utilizados na maioria das perfurações em todo mundo, por serem considerados ecologicamente seguros, biodegradáveis,

apresentarem baixa toxicidade e baixa bioacumulação (BORGES, 2009). A principal função da água neste tipo de fluido é prover o meio de dispersão para os materiais coloidais, principalmente argilas e polímeros. Para isto, os polímeros como a xantana, devem apresentar alta viscosidade em baixas concentrações, comportamento pseudoplástico e estabilidade da viscosidade à salinidade, temperatura e condições alcalinas; de modo que apresente fácil injeção, mantenha os cascalhos em suspensão, facilitando a remoção destes e estabilize as paredes do poço. Os polímeros mais utilizados na formulação do fluido de perfuração à base de água (como CMC, PAC e PHPA) são polímeros muito sensíveis às condições de alta salinidade, baixando sua eficiência. Desta forma, a goma xantana passou a ser amplamente utilizada para este propósito, pois suas soluções são estáveis à variação do pH, força iônica e temperatura (BORGES, 2009).

#### **2.4. O gênero *Xanthomonas***

A taxonomia do gênero *Xanthomonas* tem sido extensivamente revisada com base na homologia do DNA, gerando muitas vezes, confusões de nomenclatura (MAYER, 2008). De acordo com a moderna classificação filogenética de bactérias, baseada em comparações de sequências nucleotídicas, principalmente do rRNA 16S, o gênero *Xanthomonas* pertence ao filo “*Proteobacteria*”, classe “*Gammaproteobacteria*”, ordem “*Xanthomonadales*” e família “*Xanthomonadaceae*” (GARRITY, 2005; MHEDBI-HAJRI, 2011).

O gênero *Xanthomonas* compreende espécies Gram-negativas, classificadas como bastonetes, com 0,4-0,7 µm de largura e 0,7-1,8 µm de comprimento, e móveis por flagelo único (1,7-3 µm de comprimento), a maioria das espécies são fitopatogênicas (WIERZBICKI, 2004). São quimio-organotrófico e estritamente aeróbio, com um tipo de metabolismo respiratório que requer oxigênio como acceptor de elétrons terminal e resistentes à estreptomicina (GARCÍA-OCHOA, 2000). Suas colônias são normalmente amarelas, lisas e viscosas (ROTTAVA, 2005). São essencialmente fitopatogênicas, com exceção da *Xanthomonas maltophila* (GARCÍA-OCHOA, 2000). São capazes de provocar importantes doenças numa extensa variedade de plantas cultivadas (herbáceas e lenhosas), bem como em plantas nativas. As espécies desse gênero podem provocar doenças em pelo menos 124 espécies de plantas

monocotiledóneas e 268 de dicotiledóneas (CHAN & GOODWIN, 1999), incluindo árvores frutíferas, solanáceas, brassicáceas e gramíneas, com uma grande variedade de sintomas, incluindo necroses, cancos e pintas, que afetam vários órgãos da planta (CRUZ, 2009).

A maioria dos membros do gênero *Xanthomonas* produz um pigmento amarelo ligado à membrana chamado xantomonadina (STARR, 1977). Embora seja uma característica importante para identificação do gênero, algumas linhagens podem não apresentar a pigmentação. A ausência da xantomonadina não exclui o organismo do gênero se outras características estão de acordo (GARRITY, 2005).

Inúmeras espécies de *Xanthomonas*, sendo *Xanthomonas campestris* a mais comumente estudada, produzem exopolissacarídeos (EPS). Por serem, em sua maioria, bactérias essencialmente fitopatogênicas, a produção de EPS está relacionada com sua sobrevivência, proteção do dessecamento, concentração de minerais e nutrientes, redução do contato com moléculas hidrofóbicas ou carregadas, e aumento da fixação na superfície do vegetal hospedeiro, pois este é um ambiente não favorável a sobrevivência da célula bacteriana (DUNGER, 2007; ROTTAVA, 2005; BREWIN, 1991). Além disso, o EPS está relacionado com a invasão e a patogenicidade, atuando nas interações planta-bactéria auxiliando o movimento da bactéria através dos tecidos vegetais, promovendo seu crescimento nos espaços intercelulares e ajudando na proteção contra as defesas da planta (DUNGER, 2007; ROTTAVA, 2005). A goma xantana, EPS produzido por espécies do gênero *Xanthomonas*, é um polissacarídeo de grande interesse nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de petróleo.

Na classificação descrita por Vauterin et al. (1995), em que o gênero *Xanthomonas* era formado por apenas 20 espécies, as linhagens bacteriana pertencentes a espécie *campestris* seriam somente aquelas oriundas de crucíferas, por conta disso, a bactéria *Xanthomonas campestris* pv *pruni* passou a ser identificada como *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*. Esse patovar é o agente causal da mancha bacteriana, um dos mais importantes doenças do pêssego, nectarina, ameixa japonesa, damasco, e amêndoa (RITCHIE, 1995). A xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* foi classificada por Borges (2009) como sendo de baixa concentração de sais e comportamento reológico esperado para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo quando utilizadas em solução salina, independente da temperatura.

Uniformidades morfológica e fisiológica dentro de *Xanthomonas* tem dificultado o estabelecimento de uma taxonomia estável tanto na diversidade fenotípica e quanto

nas relações evolutivas dentro do gênero (HAYWARD, 1993; STARR, 1981). A taxonomia proposta por Vauterin (1995) foi fundamentada e refinada por Rademaker (2005). Com base na genotipagem molecular, 20 espécies (grupos genômicos) são reconhecidas, em que cada um compreende diversos patovares. Neste âmbito, encontram-se exemplos tanto de evolução convergente aparente no que diz respeito a características patogênicas, quanto de evolução divergente (RADEMAKER, 2005). Ao estabelecer relações genéticas moleculares entre mais de 140 membros conhecidos do gênero com características patogênicas distintas, a taxonomia atual está direcionada para comparações que identificam determinantes únicas relacionadas com a especificidade ao tecido do hospedeiro, bem como fatores de patogenicidade (BOGDANOVE, 2011).

No início de 2008, o estudo genômico de Vorholter (2008) apresentou o sequenciamento completo da cepa *X. campestris pv. campestris* B100 e relatou a existência dos sequenciamentos dos genomas de outras seis cepas de *Xanthomonas*. Dentre essas, estão a *X. campestris pv. campestris* ATCC 33913 (da SILVA et al., 2002), *X. campestris pv. campestris* 8004 (QIAN et al., 2005), *X. campestris pv. vesicatoria* 85-10 (THIEME et al., 2005), *X. oryzae pv. oryzae* KACC10331 (LEE et al., 2005), *X. oryzae pv. oryzae* MAFF 311018 (OCHIAI et al., 2005) e *X. axonopodis pv. citri* strain 306 (da Silva et al., 2002). Todos esses genomas estão depositados nos bancos de dados, compreendem um cromossomo circular, que varia de 4.940.217 a 5.178.466 pares de base (pb) e alto conteúdo de G+C de 63.7-65% (VORHOLTER, 2008). Pouco tempo depois, Salzberg (2008) apresentou o genoma completo da *X. oryzae pv. oryzae* PXO99A, com 5.240.075 bp e 63.6% de conteúdo de G+C.

## **2.5. Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR) em Tempo Real**

Estudos de expressão gênica por diversos métodos, como microarranjos de DNA, Northern blot, recombinação genética, sequenciamento e PCR quantitativo, têm permitido a análise de genes envolvidos em variados processos biológicos, desde o desenvolvimento dos organismos a suas interações com fatores ambientais (DONSON, 2002; BREYNE & ZABEAU, 2001; SAMBROOK & RUSSELL, 2001). De acordo com Gachon (2004), o método melhor empregado para avaliação da expressão gênica é a amplificação quantitativa de transcritos reversos, ou PCR quantitativo em tempo real

(RT-qPCR). A amplificação por PCR em tempo real, uma variante do PCR convencional, representa um grande avanço nos métodos moleculares atuais, principalmente por permitir sensivelmente a quantificação da expressão gênica (LADEIRA, 2011), em diferentes tipos de amostras e condições ambientais, com alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (HEID, 1996; BUSTIN, 2000; SHIPLEY, 2006).

No PCR em tempo real existe a detecção da amplificação de um PCR comum, por meio da captação de um sinal fluorescente, de forma específica (sondas marcadas) ou não específica (intercalantes de DNA). O Sybr Green é o exemplo de detecção não específica, no qual fluoróforos se ligam à fita-dupla de DNA, emitindo fluorescência. O TaqMan e o Molecular Beacon são exemplos de sondas altamente específicas a sequência alvo, liberando fluorescência apenas na presença do produto de PCR de interesse. Dentre eles, o Sybr Green é o mais intensivamente utilizado devido ao baixo custo e a facilidade no desenvolvimento do ensaio (SHIPLEY, 2006). A captação do sinal de fluorescência ocorre progressivamente de acordo com o número de ciclos, devido a progressão de cópias de DNA. Assim, fotodetectores do aparelho de qPCR captam os sinais de fluorescência e convertem em gráficos por um *software* que captura e analisa os dados (VALASEK, 2005). Contudo, Wong (2005) acrescenta a importância de ser utilizado um fluoróforo passivo (ROX) a fim de corrigir possíveis flutuações no sinal de fluorescência da amostra.

A reação da PCR em tempo real consegue monitorar a produção dos resultados da amplificação durante cada ciclo da reação, que gera cópias de um molde de DNA de forma exponencial, seguindo quatro fases demonstradas na Figura 05: linha de base (baseline), exponencial, linear e platô (plateau). A linha de base corresponde ao momento em que o sinal de fluorescência está abaixo do nível detectável pelo equipamento, enquanto que a fase exponencial é compreendida pela detecção inicial do sinal de amplificação até a taxa exponencial máxima, que determina o *threshold*. Este limiar, em que todas as amostras podem ser comparadas, resulta no valor de Cq (ciclo de quantificação) ou Ct (*cycle threshold*), que representa o número de ciclos suficientes para gerar fluorescência que atinja esse ponto. Na fase linear, a eficiência da amplificação começa a cair discretamente, apesar da linha reta, até a fase platô, que tem a amplificação cessada nos ciclos restantes (SHIPLEY, 2006; WONG, 2005; GINZINGER, 2002).



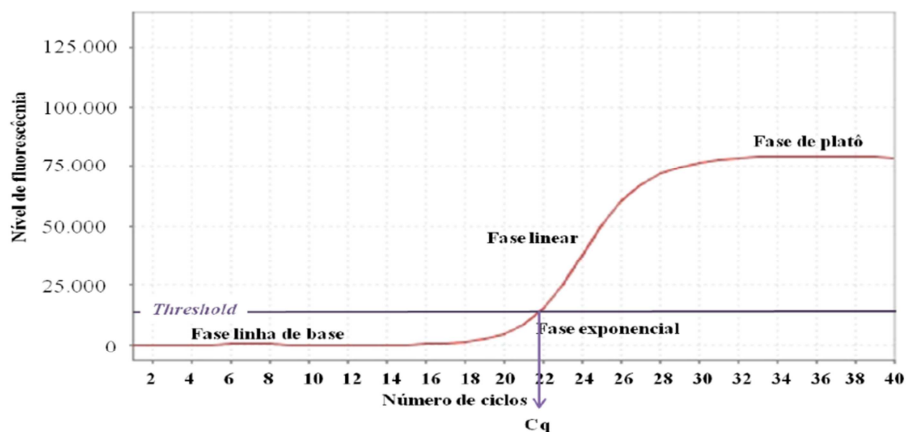


Figura 05. Curva de amplificação de um gene alvo por RT-qPCR, representando as fases de amplificação (linha de base, exponencial, linear e platô), o *threshold* e o ciclo de quantificação (Cq) para a amostra (BORGES, 2011).

Os métodos de quantificação do PCR em tempo real podem ser classificados como absolutos ou relativos. A quantificação absoluta necessita da construção de uma curva padrão baseada em um número de cópias conhecido da molécula, enquanto a quantificação relativa se baseia num grupo experimental controle para calcular a diferença de expressão (PEIRSON, 2003; BUSTIN, 2002).

Na análise da expressão gênica, com base nos níveis de transcritos (RNAm) de uma determinada amostra por RT-qPCR, deve haver uma etapa inicial em que ocorre a síntese de cDNA. Este é produto da ação da enzima transcriptase reversa (RT) sobre as moléculas de RNAm da amostra, que pode também caracterizar o termo RT-PCR em tempo real (BORGES, 2011). O método para gerar o cDNA inclui o uso de random hexamer, oligo-dT ou um gene específico iniciador, usando um dos vários tipos de transcriptase reversa (GINZINGER, 2002).

A padronização de alguns parâmetros para a quantificação por RT-qPCR é necessária, como a qualidade e quantidade de RNA, a eficiência do cDNA e sua amplificação, atividade transcricional e o uso de genes referência (*housekeeping*) adequados (BUSTIN, 2002; GINZINGER, 2002).

## 2. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo estudar e compreender os bioprocessos envolvidos na biossíntese de goma xantana, através da expressão gênica por RT-qPCR, visando a otimização da produção deste biopolímero por linhagens de *Xanthomonas*.

### 2.1. Objetivos específicos

- Análise *in silico* do grupamento gênico *gum* quanto à expressão diferencial dos genes inseridos nessa região;
- Desenho dos *primers*, selecionados a partir da predição de regiões promotoras envolvidas com a biossíntese de xantana, para análise de expressão gênica em PCR em tempo real;
- Estudo da produção de xantana utilizando processos físico-químicos de otimização nas linhagens de *Xanthomonas*;
- Análise da expressão diferencial de genes inseridos no grupamento gênico *gum*, durante a fermentação e produção da xantana.

## Capítulo I.

### Estudos *in silico* e para expressão gênica de promotores secundários no grupamento gênico *gum*, relacionados à produção de goma xantana.

#### RESUMO

A goma xantana é um biopolímero largamente utilizado nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de petróleo, e é sintetizada, naturalmente, por bactérias do gênero *Xanthomonas*. A biossíntese da xantana envolve 12 genes inseridos no grupamento gênico *gum* (denominados *gumB* a *gumM*), contudo, o estudo de sua expressão gênica pode ser baseado apenas nas regiões promotoras que conduzem sua transcrição. Baseado em estudos *in silico* de bioinformática, foram determinados promotores inseridos em seis regiões, *upstream* aos genes *gumB C F H L* e *M*. *Primers* para estas regiões foram então desenhados e sintetizados com base em parâmetros aplicados a PCR em tempo real e verificados por esta técnica, utilizando a sequência de uma linhagem de *Xanthomonas arboricola* como molde. Foi observado a especificidade dos *primers* desenhados para os genes *gumB*, *C* e *M*, que representam-se essenciais para estudos da expressão de genes que codificam moléculas relacionadas com a estrutura e a reologia da goma xantana.

#### ABSTRACT

Xanthan gum is a biopolymer widely used in food, pharmaceutical and oil industry, it is synthesized naturally by bacteria for the genus *Xanthomonas*. The xanthan biosynthesis involves 12 genes inserted at the gum gene cluster (called *gumB* to *gumM*), however, study of its gene expression profile can be based only on the promoter regions that drive its transcription. Based on studies conducted by bioinformatics *in silico*, promoters inserted into six regions were investigated, the upstream genes *gumB*, *C*, *F*, *H*, *L* and *M*. The primers for these regions were then designed and synthesized based on the parameters applied to real-time PCR and were verified by this technique using the *Xanthomonas* strain sequence as template. It was observed specificity for the primers designed to the *gumB*, *C* and *M* genes that are important for studying genes expression encoding by structural proteins, related with the structure and rheology of the xanthan gum.

## 1. Introdução

A goma xantana é largamente empregada na indústria alimentícia como espessante, geleificante, estabilizante, agente suspensivo e auxiliar de emulsificação. Em cosméticos e produtos farmacêuticos em geral, é utilizada principalmente como espessante e estabilizante (PRADELLA, 2006). Na indústria petrolífera, sua utilização se tornou crescente, sendo empregada como fluido de perfuração de poços e na recuperação terciária do petróleo (ROSALAM & ENGLAND, 2006; BORGES, 2009). A produção de goma xantana na natureza é realizada por bactérias do gênero *Xanthomonas*, família “*Xanthomonadaceae*”, que compreende espécies Gram-negativas, sendo na maioria espécies fitopatogênicas (WIERZBICKI, 2004). Entre as características mais relevantes desse gênero, está a produção do exopolissacarídeo (EPS) xantana (ROTTAVA, 2005; DUNGER, 2007). A goma xantana apresenta capacidade de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis que representam propriedades reológicas únicas (LUVIELMO, 2007; FONTANIELLA et al., 2002).

A goma xantana é um biopolímero que possui estrutura primária formada por unidades repetidas de pentassacarídeo, onde a cadeia linear é formada por duas unidades de glicose, e o trissacarídeo das ramificações por duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico (NERY, 2008). A biossíntese da xantana consiste, principalmente, numa montagem passo a passo da estrutura e a ligação das subunidades pentassacarídicas para posterior polimerização e exportação. As enzimas exigidas para esse processo são codificadas por uma região do genoma de *Xanthomonas* nomeada *gum*, composta por 12 genes, designados de “*gumB*” ao “*gumM*”, com aproximadamente 12 kb. A transcrição do grupamento gênico *gum* mostrou-se, até então, dirigida por um promotor localizado *upstream* ao primeiro gene, “*gumB*” (KATZEN, 1996; VOJNOV et al., 2001; VORHÖLTER et al., 2008).

No intuito de simplificar uma análise de expressão dos genes relacionados à biossíntese da xantana, este trabalho propõe o estudo de possíveis promotores inseridos na região *gum*, com auxílio de ferramentas da bioinformática. Dessa forma, objetivou-se determinar possíveis regiões promotoras inseridas em *gum* e a síntese de *primers* correspondentes, específicos para *Xanthomonas*, para análise por RT-PCR.

## 2. Material e Métodos

A linhagem bacteriana CCMICS 482 estudada neste experimento, utilizada em estudos anteriores para a produção de goma xantana e identificada como *Xanthomonas arboricola*, está depositada na Coleção de Culturas de Micro-organismos do ICS (CCMICS).

### 2.1. Determinação de promotores secundários

A fim de inferir regiões que podem sofrer variação de expressão no processo de biossíntese da goma, a seleção das regiões para análise quanto à expressão gênica foi baseada em possíveis regiões promotoras inseridas no grupamento gênico *gum*. Para isto, a região *gum* foi analisada *in silico* (BPROM e SAK) (GORDON et al., 2003), que permitem o reconhecimento de regiões promotoras a partir do fator sigma70 em bactérias. Também chamado de fator sigma principal ( $\sigma^{70}$ ), subunidades da RNA polimerase são responsáveis por reconhecer sequências consenso do DNA em famílias de promotores específicos (GRUBER & GROSS, 2003).

As sequências analisadas foram obtidas com base em oito diferentes linhagens com genomas completos registrados em bancos de dados públicos: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913 (da SILVA et al., 2002), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. B100 (VORHOLTER, 2008), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. 8004 (QIAN et al., 2005), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* str. 85-10 (THIEME et al., 2005), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 (LEE et al., 2005), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A (SALZBERG, 2008), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* MAFF 311018 (OCHIAI et al., 2005) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 (da SILVA et al., 2002).

Seis regiões promotoras foram indicadas, *upstream* aos genes *gumB*, *gumC*, *gumF*, *gumH*, *gumL* e *gumM* (Figura 01), e esses genes, selecionadas para o desenho dos *primers*.

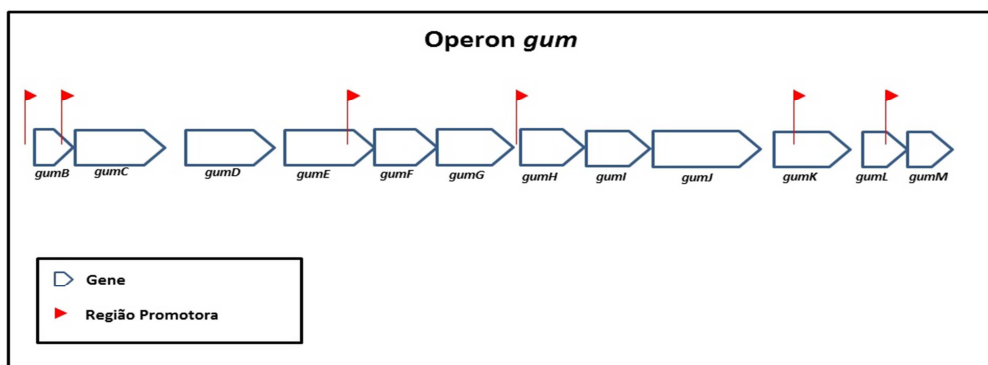


Figura 01. Desenho ilustrativo com as seis possíveis regiões promotoras indicadas para este estudo do grupamento gênico *gum*.

## 2.2. Desenho dos *primers*

Os genes selecionados para o desenho dos *primers* encontram-se *downstream* às regiões promotoras previstas anteriormente. Os *primers* específicos aos genes *gumB*, *C* e *M* foram desenhados para amplificação por PCR em tempo real. A fim de se obter maior fidelidade ao gênero *Xanthomonas* nos *primers* desenhados, suas sequências se basearam no alinhamento das oito linhagens de *Xanthomonas* registradas em banco de dados públicos, as mesmas descritas no item interior para predição dos promotores.

As sequências, para cada gene selecionado de acordo com as regiões promotoras, foram alinhadas por ClustalW e desenhadas de acordo com parâmetros ajustados para aplicação em PCR em tempo real. A temperatura de *melting* ótima foi ajustada para 60°C (variando de 59°C a 61°C), oligonucleotídeos com 20pb (variando de 18pb a 23pb), amplicons com 70 a 160 pb e concentração de GC de 50% (variação de 30-80%). Os *primers* foram desenhados e selecionados quanto à homogeneidade e estabilidade em relação às oito sequências analisadas. Por fim, os selecionados foram verificados quanto à especificidade ao gênero *Xanthomonas* por *Primer-BLAST*. A Tabela 01 apresenta as sequências desenhadas.

Tabela 01. Sequências referentes aos *primers* desenhados dos genes *downstream* às seis regiões promotoras previstas neste estudo, além da sequência do gene referência *acpP*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon
<i>gumB F</i>	GTTCGACCTGACCGAGATCG	61°C	119pb
<i>gumB R</i>	TCAGTTCCAGCATGGTGC	59°C	
<i>gumC F</i>	GATCAATGGCGAAGTCATCA	59,6°C	152pb
<i>gumC R</i>	TGAGCATGTTGTAGCGGATG	60,8°C	
<i>gumF F</i>	GGGTTCGTTGATGGTGATCT	59,8°C	130pb
<i>gumF R</i>	CGCAACACCAGACAGTACAAA	59,8°C	
<i>gumH F</i>	GGACCATGCTGTATTTCTGGG	62°C	109pb
<i>gumH R</i>	GCAATGATCAACCGCCATTG	60°C	
<i>gumL F</i>	AATCCTTGCCGAAGCCTATG	60°C	74pb
<i>gumL R</i>	TCGTACTIONGAAACGGTCTTCG	61°C	
<i>gumM F</i>	ACCGACCTGATTCCGTACCT	60,7°C	150pb
<i>gumM R</i>	GCCATACCCATCGCACAT	60,3°C	
<i>acpP F</i>	GGAAGAGGAAGTCACCACCA	60°C	104pb
<i>acpP R</i>	CGCACTCGAACTCTTCTTCC	60,1°C	

O programa BioEdit versão 7.0.9.0 foi utilizado para análise das sequências que fundamentaram o desenho dos *primers* e o *software* online “*Primer3*” v.0.4.0 foi utilizado para o desenho dos *primers* (YOU, 2008).

### 2.3. PCR em tempo real e eletroforese em gel de agarose

A técnica do PCR em tempo real foi utilizada a fim de validar os *primers*, determinando a especificidade e a eficiência dos mesmos. Utilizando o cDNA da CCMICS 482, *Xanthomonas arboricola*, os *primers* foram analisados quanto a especificidade na curva de dissociação, no tempo e na eficiência de amplificação.

Todas as reações de qPCR foram realizadas em duplicata, no aparelho ABI 7500 da Applied Biosystems. As reações da PCR seguiram os seguintes parâmetros: pré-aquecimento a 50° por 2 minutos, desnaturação a 95° por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação e quantificação, sendo 15 segundos a 95° e 60 segundos a 60°. Por fim, foi seguido de um período de dissociação de 60 segundos a 95° para certificação de que os

pares de oligonucleotídeos usados produziram um único produto e apresentavam um produto específico desejado (temperatura 80-85°C) (VALERA, 2006).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o kit SYBR Green PCR Master MIX (Applied Biosystems), que contém SYBR Green dye, AmpliTaq Gold DNA polimerase, dNTPs (dUTP), referência passiva (ROX) e tampão otimizado. Para reação de PCR, foram adicionados 10µl de SYBR Green PCR Master MIX, 4µl de água, 0,5µl de cada *primer* a ser estudado (*forward* e *reverse*) e 5µl de cDNA da amostra, diluído 5 vezes. As reações foram realizadas em placas de polipropileno para 96 reações (96-Well Optical Reaction Plate – Applied Biosystems) cobertas com adesivos para microplacas (MicroAmp Optical Adhesive Film – Applied Biosystems). As placas foram centrifugadas a 25°C por 3 minutos a 4000rpm, e então submetidos à reação. Curvas de amplificação e dissociação geradas pelo sistema foram usadas para a análise. Em todos os casos, os controles negativos, com água ao invés de cDNA, para a transcrição reversa foram incluídos. Além disso, foram acrescentados controles negativos com RNA de cada amostra, ao invés de cDNA, para verificar a ausência de contaminação por DNA nestes.

A eficiência de amplificação para cada *primer* foi realizada com cDNAs da linhagem CCMICS 482. As amostras de cDNA passaram por um processo de diluição seriada (0x, 2x, 4x, 8x, e 16x) e foram submetidas à amplificação. Para cada tratamento, os valores de Ct, representados em função do log da concentração do valor inicial, determina a construção de uma reta de regressão que permite estimar as eficiências de amplificação. O resultado da validação da eficiência é dado por um valor chamado de *slope* que deve estar entre -3,1 a -3, 7. Estes valores de *slope* refletem uma eficiência de amplificação satisfatória entre 85 a 115% (FERNANDES, 2006).

A fim de observar os amplicons dos DNAs amplificados, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 3%, com adição de brometo de etídio (0,5µg/mL, concentração final), em tampão TBE 0,5X (Tris-borate-EDTA e água ultra pura). As amostras foram adicionadas ao gel num volume de 5µL junto à 2µL do tampão de carregamento (2,5mg/mL de azul de bromofenol e 400mg/mL de sacarose). A imagem do gel foi revelada em fotodocumentador sob luz ultravioleta, podendo observar as bandas correspondentes aos amplicons para cada *primer*.



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Seleção dos genes baseados na localização das regiões promotoras

A seleção dos genes, relacionados com a produção da goma xantana, para análise da diferença de expressão foi realizada com base na localização das regiões promotoras *upstream* aos genes inseridos na região *gum*. As seis regiões promotoras determinadas, de acordo com registros em bancos de dados públicos e descritas por Vorhölter et al. (2008), estão relacionados com diferentes funções: *gumB* (proteína de exportação/início da biossíntese da xantana); *gumC* (proteína determinante do comprimento da cadeia); *gumF* (acetiltransferase); *gumH* (manosiltransferase/glicosiltransferase); *gumL* (piruviltransferase); *gumM* (glicosiltransferase).

As possíveis regiões promotoras inseridas no grupamento gênico *gum* estão apresentadas no esquema da Figura 01, o que possibilita inferir que alguns genes como o *gumB*, o *gumL* e o *gumM* são transcritos isoladamente por promotores específicos. O *gumC*, *gumD* e *gumE* têm o mesmo promotor; assim como o *gumF* e *gumG* são transcritos juntos; da mesma forma que a região promotora para *gumH*, *gumI* e *gumJ*, também é a mesma.

A possibilidade de existirem seis regiões promotoras inseridas em *gum* não corresponde, em parte, aos resultados apresentados Katzen (1996), Vojnov (2001) e Vorhölter et al. (2008), que sugerem a existência de apenas duas regiões promotoras na região *gum*, uma *upstream* ao *gumB* e um promotor mais fraco *upstream* a *gumK*. Contudo, diferentes resultados são apresentados por LEE (2008) em seu estudo com *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, quando apresenta a existência de dois promotores internos no grupamento gênico *gum*, *upstreams* a *gumH* e a *gumM*. LEE (2008) também baseou suas análises de predição de promotores pelo fator sigma 70.

#### 3.2. Amplificação por PCR em tempo real, eficiência e análise por eletroforese em gel de agarose.

Dentre os *primers* sintetizados neste estudo, quatro pares, incluindo a do gene referência *acpP*, e dos genes *upstream* as regiões promotoras determinadas *gumB*,

*gumC* e *gumM*, obtiveram amplificação e especificidade esperada no PCR em tempo real. Esses quatro *primers* foram amplificados no PCR em tempo real e apresentaram curva de dissociação específica com a formação de um único pico. Nas Figuras 02 a 05 são demonstrados os resultados do PCR em tempo real para cada *primer*, utilizando o cDNA diluído 5x, da linhagem CCMICS 482, *Xanthomonas arboricola*, como molde. Os demais *primers* desenhados, utilizando os mesmos parâmetros, referentes aos genes *gumF* (não houve amplificação), *gumH* (apresentou-se como *primer-dimer*) e *gumL* (não obteve amplificação específica), não apresentaram resultados adequados aos parâmetros para PCR em tempo real (APENDICE A).

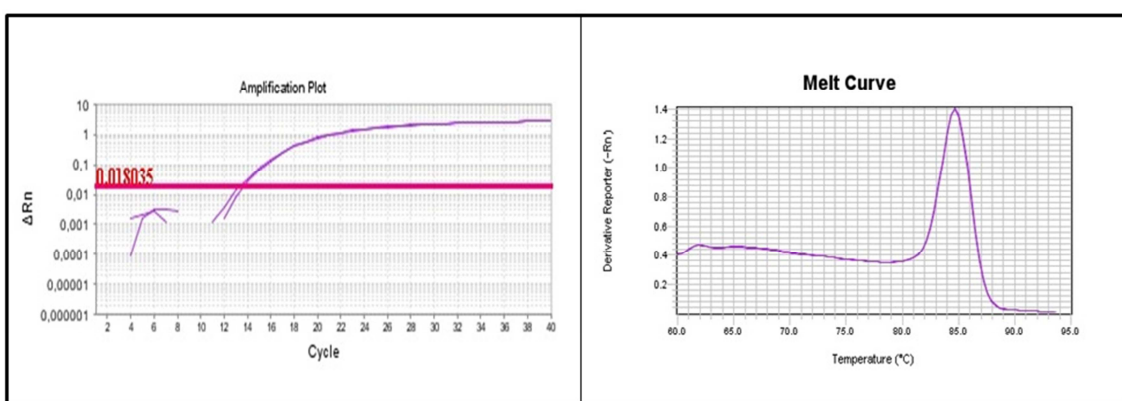


Figura 02. Curvas de amplificação e curvas de dissociação do PCR em tempo real do *primer acpP*, com amplificação média detectada de 13,5 ciclos.

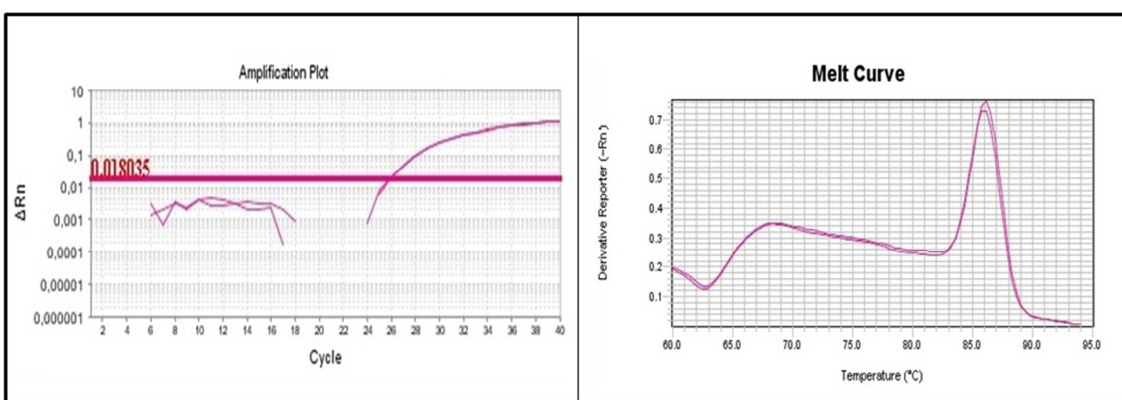


Figura 03. Curvas de amplificação e curvas de dissociação do PCR em tempo real do *primer gumB*, com amplificação média detectada de 25,8 ciclos.

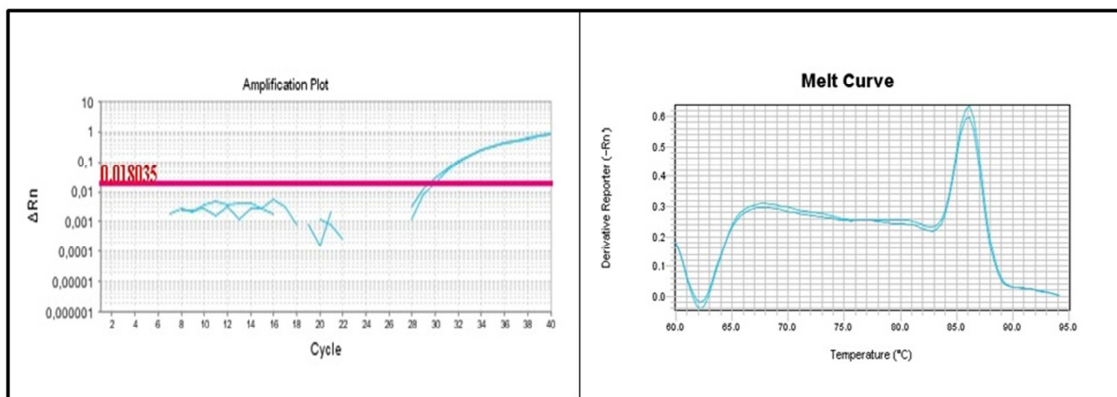


Figura 04. Curvas de amplificação e curvas de dissociação do PCR em tempo real do *primer gumC*, com amplificação média detectada de 29,6 ciclos.

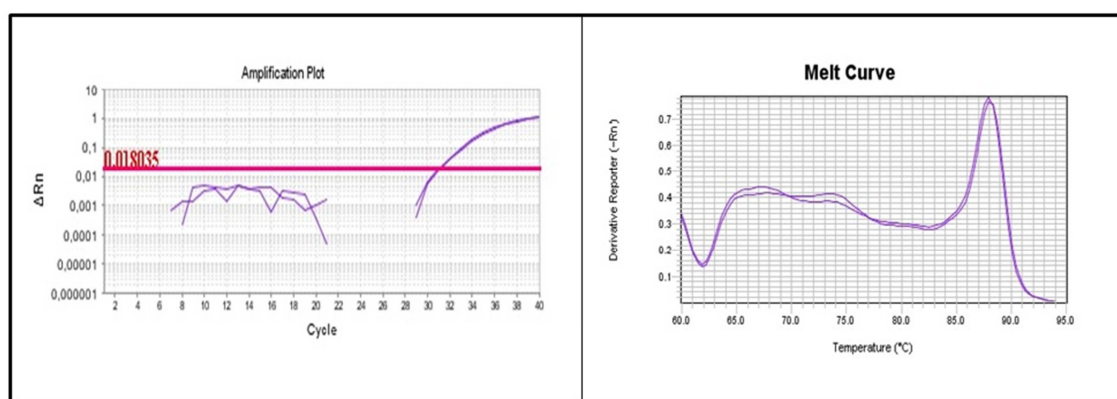


Figura 05. Curvas de amplificação e curvas de dissociação do PCR em tempo real do *primer gumM*, com amplificação média detectada de 31 ciclos.

De acordo com Luu (2010), valores de Ct abaixo de 29 representam fortes reações positivas indicativas de ácidos nucleicos alvo abundantes na amostra; valores de Ct entre 30 e 37 representam reações positivas indicativas de quantidades moderadas de ácidos nucleicos alvo; por fim, Cts entre 38 e 40 são reações fracas, indicativas de quantidades mínimas de ácido nucléico alvo que poderia representar uma contaminação. Um valor de Ct de 38 ou superior não significa amplificação e este valor não pode ser incluído nos cálculos.

Sendo assim, os *primers* podem ser considerados válidos para o uso de análise de expressão pela técnica de PCR em tempo real. Considerando ainda, a correspondência dos amplicons indicados no desenho dos *primers*, apresentada na Figura 06.

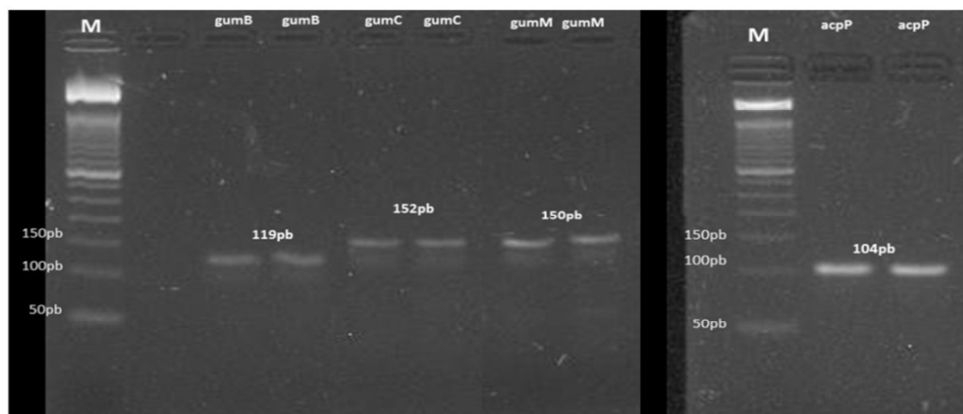


Figura 06. Gel de agarose representando a amplificação em tempo real esperada dos amplicons correspondentes aos *primers* desenhados, com marcador de peso molecular de 50pb.

Os *primers* desenhados obtiveram produtos de amplificação em tamanhos esperados, sendo: 104pb para *acpP*, 119pb para *gumB*, 152pb para *gumC* e 150pb para *gumM*. Além disso, os *primers* apresentaram eficiência de amplificação dentro do limite de 85% a 115% (FERNANDES, 2006), onde o *acpP* apresentou eficiência de 108%, o *gumB* de 114%, *gumC* de 98% e o *gumM* de 92%. Determinando assim, a indicação dos *primers* para uso em PCR em tempo real e estudo parcial da expressão gênica com base em três regiões promotoras determinadas.

### 3.3. *Primers* determinados para uso em RT-qPCR, envolvidos na biossíntese da xantana

Para o presente trabalho, foram estudados *primers* relacionados a três genes *downstream* a regiões promotoras determinadas anteriormente (Tabela 02). Além desses, foram sintetizadas sequências iniciadoras do gene referência *acpP*, para o gênero *Xanthomonas*. Os *primers* para o gene *acpP* também foram desenhados de acordo com os parâmetros já descritos para PCR em tempo real. Este gene já foi descrito como gene referência em estudo com *Pseudomonas* por Lenz (2008) e representa uma proteína transportadora de ácidos graxos na biossíntese dos mesmos, presente também em espécies de *Xanthomonas* (DA SILVA, 2002; HUANG, 2000).

Tabela 02. Sequências dos *primers* para o estudo de genes relacionados à produção de xantana em *Xanthomonas*, por PCR em tempo real.

Genes alvos:	Sequência dos <i>primers</i>		Referência
	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	
<i>gumB</i>	GTTTCGACCTGACCGAGATCG	TCAGTTCCAGCATGGTGC	Neste estudo
<i>gumC</i>	GATCAATGGCGAAGTCATCA	TGAGCATGTTGTAGCGGATG	Neste estudo
<i>gumM</i>	ACCGACCTGATTCCGTACCT	GCCATACCCATCGCACAT	Neste estudo
<i>gumB</i>	GAGAAAATGGTGGCCGAC	CTTCTCAATCTCGGCCAG	Yoon, 2007
<i>gumC</i>	TGTCCGAATCAAGGCCGA	GTCCAGCAACGTATCGGT	Yoon, 2007
<i>gumM</i>	AATGCCACGTCTCTTCGG	GTATTGGCGAAGAACACCC	Yoon, 2007
<i>gumB</i>	ATCCTGAGATCTATGGCGG	GCCACACCATCACAAGAGG	Palmieri, 2010
<i>gumM</i>	GCATATGGAATGGATGTATCG	CAGGTGCGGAAGAACC	Palmieri, 2010
<i>gumD</i>	GGCGCAGGTGAATGGTTT	TCGTACTIONGATACGCTTCTTCATC	Golmohammadi, 2012

Sequências de *primers* correspondentes a *gumB*, *C* e *M*, para aplicação em RT-PCR, foram também apresentadas em YOON (2007). Contudo a especificidade desses oligonucleotídeos, para o gênero *Xanthomonas*, foi indicada exclusivamente para linhagens de *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* em análise no *Primer-BLAST* (NCBI). Os *primers* desenhados no presente estudo apresentaram ampla correlação, indicando identidade com diferentes cepas de *Xanthomonas campestris pv. campestris*, *Xanthomonas campestris pv. raphani*, *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*, *Xanthomonas axonopodis pv. citri*, *Xanthomonas axonopodis pv. citrumelo*, *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*, *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Estes resultados podem estar relacionados ao uso de diferentes sequências no desenho dos *primers*, como descrito na metodologia, item 2.2, deste estudo.

A análise de expressão por outras tecnologias como recombinação genética ou a técnica do *microarranjo de DNA*, são também utilizados e conseqüentemente, uma grande parte dos trabalhos que apresentam o desenho de *primers* para estudos relacionados com a produção de xantana, não são aplicados à análise por RT-PCR. Pieri (2003) apresentou *primers* para o estudo de expressão do *gumC* em *Xyllela*, para análise por clonagem da região de interesse para transformação em *E.coli*. Além disso, a técnica não se restringe a análise de expressão, como Berg (2005), que utilizou *primers* específicos para detecção de *Xanthomonas campestris* por PCR em tempo real.

#### 4. Conclusão

Com base na hipótese apresentada, foi possível observar que alguns genes são transcritos isoladamente por promotores específicos, enquanto outros têm o mesmo promotor ou são transcritos simultaneamente. Os três genes, *gumB*, *gumC* e *gumM*, caracterizados como *downstream* de regiões promotoras, inseridas no grupamento gênico *gum*, desenhados neste trabalho, podem ser estratégicos no estudo da expressão gênica na produção de xantana por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Apesar de que, outros três genes, *gumF*, *gumH* e *gumL*, não estudados em mais detalhe neste trabalho, são essenciais para complementar estudos de análise de expressão na produção de xantana. Além disso, foram desenhados os *primers* para o gene referência *acpP*, que respondeu como esperado nas análises de amplificação no PCR em tempo real.

#### 5. Referências

- BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. **Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective**. Appl. Microbiol Biotechnol. n.50. p.145-152. 1998.
- BERG, T.; TESORIERO, L.; HAILSTONES, D. L. **A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas**. Letters in Applied Microbiology n.42 p.624–630. 2006.
- BORGES, C. D.; VENDRUSCULO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. **Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola pv pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo**. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 19. nº 2. p. 160-165. 2009.
- BUSTIN S. A. **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays**. Journal of Molecular Endocrinology n.25. p.169–193. 2000.
- CHAN, J. & GOODWIN, P. **The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris***. Biotechnology Advances. N.17. p.489-508. 1999.
- Da SILVA, A.C., 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., *et al.* **Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities**. Nature n.417. p.459–463. 2002.
- DONSON, J.; FANG, Y.; ESPIRITU-SANTO, G.; XING, W.; SALAZAR, A.; MIYAMOTO, S.; ARMENDAREZ, V.; VOLKMUTH, W. **Comprehensive gene**

**expression analysis by transcript profiling.** Plant Molecular Biology. N.48. p.75–97. 2002.

DUNGER, G., RELING, V.M., TONDO, M.L., BARRERAS, M., IELPI, L., ORELLANO, E.G., OTTADO, J. **Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival.** Arch. Microbiol. N.188, p.127–135. 2007.

FERNANDES, A. M. **Expressão dos genes que codificam as proteínas anexina-1 e galectina-1 nos pólipos rinossinusais e sua modulação pelo glicocorticoide.** Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. 2006.

FONSECA, E. L.; FREITAS, F. S.; VICENTE, A. C. P. **Pc promoter from class 2 integrons and the cassette transcription pattern it evokes.** J Antimicrob Chemother, n.66. p.797–801. 2011.

FONTANIELLA, B.; RODRÍGUES, C.W.; PIÑÓN, D.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.-E. **Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*.** Journal of Chromatography B, n.770. p.275-81. 2002.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. **Real-time PCR: what relevance to plant studies?** Journal of Experimental Botany. Vol. 55. N.402, p.1445–1454. 2004.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. **Xanthan gum: production, recovery, and properties.** Biotechnology Advances. N.18. p.549-579. 2000.

GOLMOHAMMADI, M.; LLOP, P.; SCUDERI, G.; GELL, I.; GRAHAM, J. H.; CUBERO, J. **mRNA from selected genes is useful for specific detection and quantification of viable *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** Plant Pathology, n.61, p.479–488. 2012.

GORDON, L.; CHERVONENKIS, A. Y.; GAMMERMAN, A. J.; SHAHMURADOV, I. A.; SOLOVYEV, V. V. **Sequence alignment kernel for recognition of promoter regions.** Bioinformatics. vol. 19. N.15. p.1964–1971. 2003.

GRUBER, T. M.; GROSS, C. A. **Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space.** Annu. Rev. Microbiol. N.57. p.441–66. 2003.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J., et al. **Real time quantitative PCR.** Genome Res. N.6. p.986-994. 1996.

HUANG, G.; ZHANG, L.; BIRCH, R. G. **Characterization of the acyl carrier protein gene and the fab gene locus in *Xanthomonas albilineans*.** FEMS Microbiology Letters. N.193. p.129-136. 2000.

KATZEN, F.; BECKER, A.; ZORREGUIETA, A.; PÜHLER A.; IELPI, L. **Promoter Analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum Operon Directing Biosynthesis of the Xanthan Polysaccharide.** Journal of Bacteriology, vol. 178. N.14. p.4313-4318. 1996.

- LADEIRA, P. R. S.; ISSAC, C.; FERREIRA, M. C. **Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real**. Rev Med (São Paulo), jan.-mar.; n.90(1). p.47-51. 2011.
- LEE, B.M., PARK, Y.J., PARK, D.S., KANG, H.W., KIM, J.G., SONG, E.S., PARK, I.C., YOON, U.H., HAHN, J.H., KOO, B.S., *et al.* **The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice**. Nucleic Acids Res. N.33. p.577–586. 2005.
- LEE, C. K.; LEE, B. M. **Identification of new internal promoters of the *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* *gum* gene cluster**. Biotechnol Lett, n.30. p.521–527. 2008.
- LENZ, A. P.; WILLIAMSON, K. S.; PITTS, B.; STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. **Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms**. Applied And Environmental Microbiology. vol. 74. n.14. p.4463–4471. 2008.
- LUU, T. N. **A rat model of fetal alcohol syndrome: molecular and behavioral analysis**. Masters thesis - Graduate Program in Microbiology and Molecular Genetics. The State University of New Jersey and University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Brunswick - NJ. 2010.
- LUVIELMO, M. M.; VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas. v. 28. N.2. p.161-172. Londrina. 2007.
- MAYER, L.; VENDRUSCOLO, C. T.; SILVA, W. P.; MOURA, A. B. **Produção, propriedades reológicas e composição química da xantana produzida por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli***. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. v. 02. n. 02. p.87-95. 2008.
- NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. **Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade**. Química Nova. Vol. 31. N.08. p.1937-1941. 2008.
- PALMIERI, A. C. B.; AMARAL, A. M.; HOMEM, R. A.; MACHADO, M. A. **Differential expression of pathogenicity- and virulence-related genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* under copper stress**. Genetics and Molecular Biology, n.33, 2, p.348-353. 2010.
- PIERI, C.; BELTRAMINI, L. M.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; VETTORE, A. L.; DA SILVA, F. R.; ARRUDA, P.; OLIVA, G.; DE SOUZA, D. H. F. **Overexpression, purification, and biochemical characterization of *gumC*, an enzyme involved in the biosynthesis of exopolysaccharide by *Xylella fastidiosa***. Protein Expression and Purification, 34. p.223–228. 2004.
- PRADELLA, J.G.C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Relatório técnico n. 84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo. 2006.



- OCHIAI, H., INOUE, Y., TAKEYA, M., SASAKI, A., KAKU, H. **Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity.** Jpn. Agric. Res. Q. 39, p.275–287. 2005.
- QIAN, W., JIA, Y., REN, S.X., HE, Y.Q., FENG, J.X., LU, L.F., SUN, Q., YING, G., TANG, D.J., TANG, H., *et al.* **Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** Genome Res. N.15, p.757–767. 2005.
- RANI, T. S.; BAPI, R. S. **Analysis of n-gram based promoter recognition methods and application to whole genome promoter prediction.** In Silico Biology n.9, S1–S16. 2009.
- ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). Arechim. RS. 2005.
- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. **Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp.** Enzyme and Microbial Technology. v.39. p.197-207. 2006.
- SALZBERG SL, SOMMER DD, SCHATZ MC, PHILLIPPY AM, RABINOWICZ PD, TSUGE S, FURUTANI A, OCHIAI H, DELCHER AL, KELLEY D, **Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A.** BMC Genomics, n.9. p.204. 2008.
- SHIPLEY, G.L. **Chapter 1: An Introduction to Real-Time PCR.** In Real-Time PCR (Dorak MT (Ed)), New York, Taylor & Francis Group. 2006.
- THIEME, F., KOEBNIK, R., BEKEL, T., BERGER, C., BOCH, J., BUTTNER, D., CALDANA, C., GAIGALAT, L., GOESMANN, A., KAY, S., *et al.* **Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence.** J. Bacteriol. N.187, p.7254–7266. 2005.
- VALERA, E. T. **Análise do perfil de expressão de genes relacionados à resistência múltipla a drogas em tumores do sistema nervoso central por PCR quantitativa.** TESE de doutoramento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto. 2006.
- VOJNOV, A. A.; ZORREGUIETA, A.; DOW, J. M.; DANIELS, M. J.; DANKERTL, M. A. **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. N.144, p.1487-1493. 1998.
- VOJNOV, A. A.; SLATER, H.; DANIELS, M. J.; DOW, J. M. **Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta.** Molecular Plant-Microbe Interactions. vol. 14. N.6, p.768–774. 2001.

VORHÖLTER, F. J., SCHNEIKER, S., GOESMANN, A., KRAUSE, L., BEKEL, T., KAISER, O., LINKE, B., PATSCHKOWSKI, T., RÜCKERT, C., SCHMID, J., *et al.* **The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis.** J Biotechnol n.134. p.33-45. 2008.

WANG, W. B.; CHEN, I. C.; JIANG, S. S.; CHEN, H. R.; HSU, C. Y.; HSUEH, P. R.; HSU, W. B.; LIAW, S. J. **Role of *rppa* in the regulation of polymyxin B susceptibility, swarming, and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*.** Infection and Immunity, p.2051–2062. 2008.

WIERZBICKI, R. **Identificação de raças de *Xanthomonas* spp. patogênicas a pimentão do estado de São Paulo.** Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

YOON, K. H.; CHO, J. Y. **Transcriptional analysis of the gum gene cluster from *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*.** Biotechnol Lett. N.29. p.95–103. 2007.

YOU, F.M.; HUO, N.; GU, Y. Q.; LUO, M.; MA, Y.; HANE, D.; LAZO, G. R.; DVORAK, J.; ANDERSON, O. D. **BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design.** BMC Bioinformatics, n.9. p.253. 2008.

## Capítulo II:

### Estudo de linhagens bacterianas na produção de goma xantana e a análise da expressão gênica diferencial por PCR em tempo real

#### RESUMO

Exopolissacarídeos oriundos de micro-organismos representam uma alternativa aos polímeros tradicionais, devido às vantagens de suas propriedades reológicas além de ser um produto biodegradável. A goma xantana é um dos polímeros de maior importância utilizados, por exemplo, para aplicação na indústria petrolífera atuando em MEOR (Recuperação Melhorada de Petróleo por Micro-organismos). A biossíntese da xantana consiste na codificação de uma região do genoma de *Xanthomonas* nomeada *gum*, composta por 12 genes designados de “*gumB*” ao “*gumM*”. A partir do estudo comparativo entre duas linhagens bacterianas CCMICS 482 (*Xanthomonas arboricola*) e CCMICS 351 (*Enterobacter cloacae*), desenvolveu-se uma análise da expressão gênica diferencial (por RT-qPCR) de três regiões, designadas como *upstream* de regiões promotoras no grupamento gênico *gum*: *gumB*, *gumC* e *gumM*. No intuito de relacionar os resultados de melhor expressão gênica com a maior produção e qualidade do exopolissacarídeo, este estudo visou uma proposta metodológica para seleção de linhagens produtoras de xantana. Dessa forma, foi possível determinar a quantificação relativa das regiões *gumB*, *gumC* e *gumM* pela *X. arboricola* em diferentes tempos de fermentação, e confirmar a ordem metabólica dos genes citados (*B*, *C* e *M*). Os resultados obtidos a partir de técnicas espectrométricas mostraram que apesar de ser observada uma estrutura análoga entre as gomas produzidas pelas bactérias *X. arboricola* e *E. cloacae*, quando estudado por ressonância magnética nuclear foi confirmado que os biopolímeros são diferentes, corroborando os resultados encontrados através do RT-qPCR.

#### ABSTRACT

Exopolysaccharides from microorganisms represent an alternative to traditional polymers, due to their rheological properties besides the advantage to be a biodegradable product. Xanthan gum is one of the most important polymers used, e.g., for application in the oil industry acting in MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery).

The xanthan biosynthesis consists by the coding region of *Xanthomonas* genome, comprising 12 genes designated "*gumB*" to "*gumM*". From the comparative study between two bacterial strains CCMICS 482 (*Xanthomonas arboricola*) and CCMICS 351 (*Enterobacter cloacae*), an analysis of differential expression gene (RT-qPCR) was developed in three regions, designated as *usptream* of promoter regions in *gum* cluster: *gumB*, *gumC* and *gumM*. In order to relate the best gene expression results with a better production and qualification of exopolysaccharide, this study aimed to use methods for selecting strains that produce xanthan. Thus, it was possible to determine relative quantification of genes *gumB*, *gumC* and *gumM* from *X. arboricola* by fermentation in regular time, and confirm the metabolic order of this genes (*B*, *C* and *M*). The results using spectrometric techniques revealed an analogous structure was observed between gum produced by *X. arboricola* and *E. cloacae*, although the biopolymers are different as confirmed by nuclear magnetic resonance and corroborated by the findings of RT-qPCR.

## 1. Introdução

Os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares, produzidos por fungos e bactérias, os quais podem ser encontrados ligados à superfície celular ou liberados no meio externo extracelular (SUTHERLAND, 1998). A goma xantana está entre os polissacarídeos economicamente viáveis e utilizados nas indústrias de alimentos, farmácia, química e petróleo (SUTHERLAND, 2001; PACE, 1991). Os biopolímeros, também conhecidos como EPS ou gomas, apresentam a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (MOREIRA, 2003), e são utilizados como uma alternativa aos polímeros tradicionais geralmente de origem química, devido à vantagem de suas propriedades reológicas em um produto biodegradável (FARIA, 2005; SUTHERLAND, 2001; PACE, 1991).

Podemos apresentar uma vasta variedade de biopolímeros que vem sendo produzidos e utilizados comercialmente, entre eles: dextrana, xantana, curdulana, alginato bacteriano, zanflo, gelana, welana, escleroglucana, pululana, celulose bacteriana, entre outros (CAMPBELL *et al.*, 2003; KALOGINANNIS *et al.*, 2003; GIAVASIS *et al.*, 2003; MAUGERI, 2001; SÁ-CORREIA, 2002). Além disso, polissacarídeos com atividade flocculante, sintetizados por micro-organismos, têm sido

extensivamente explorados para aplicação industrial (YOKOI, 1997), no intuito de substituir grandes polímeros orgânicos flocculantes, como a poliacrilamida que não é facilmente degradada e pode ser prejudicial ao meio ambiente e aos seres humanos (PRASERTSAN, 2008). Entre os flocculantes microbianos, alguns têm sido investigados, como: polissacarídeo-proteína, glicoproteínas, ácido poliglutâmico e a xantana (YOKOI, 1997), e caracterizados como sendo produzidos por uma única espécie ou gênero, como EPS obtido de um novo isolado de *Enterobacter cloacae*, com elevada atividade de flocculação (PRASERTSAN, 2006).

A goma xantana é um dos polímeros de maior importância, por exemplo, para aplicação na indústria petrolífera atuando em MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery). A goma apresenta capacidade de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis que lhe fornecem propriedades reológicas únicas, sendo completamente solúvel em água gelada ou quente, produtora de altas viscosidades a baixas concentrações e apresentando excelente estabilidade ao calor e variações do valor de pH. Essas são as maiores vantagens da xantana frente a outras gomas, além da grande escala de produção em curto espaço de tempo por processo fermentativo e pelas propriedades pseudoplásticas. Dessa forma a goma xantana representa um biopolímero de aplicação ideal à recuperação terciária em poços de petróleo, auxiliando, principalmente, na extração do óleo retido nas rochas (ROSALAM & ENGLAND, 2006; BORGES, 2009). Dentre as aplicações da goma xantana, atualmente, a indústria de petróleo tem ganhado destaque por responder pela maior parte da energia consumida no mundo civilizado e sua procura tem levado a exploração cada vez maior em fronteiras de difícil acesso (MUSTAFA, 2003). Por esse motivo, métodos especiais de recuperação, denominadas EOR (Enhanced Oil Recovery), tendem a ter cada vez maior importância na exploração de poços de petróleo. A aplicação de tecnologias avançadas, como a recuperação terciária, com base na adição de biopolímeros, como a xantana, à água de injeção para transformá-la em um fluido que se desloque dentro do meio poroso onde o óleo se deposita, torna-se fundamental (VOSSOUGH, 2000; MOGHADASI et al., 2004).

Os microrganismos responsáveis pela produção da goma xantana são bactérias do gênero *Xanthomonas*, da família “*Xanthomonadaceae*” (GARRITY, 2005; MHEDBI-HAJRI, 2011). Caracterizam-se como espécies de bactérias aeróbicas, Gram-negativas, sendo, em sua maioria, fitopatogênicas (WIERZBICKI, 2004). Inúmeras espécies do gênero *Xanthomonas*, como *Xanthomonas campestris* produzem

exopolissacarídeo (EPS) denominado como goma xantana, que serve como um fator relacionado com a patogenicidade e também como uma estratégia de defesa, quando na superfície do vegetal (DUNGER, 2007; ROTTAVA, 2005; BREWIN, 1991). Na classificação descrita por Vauterin et al (1995), em que o gênero *Xanthomonas* era formado por apenas 20 espécies, as bactérias da espécie *campestris* seriam somente aquelas oriundas de crucíferas, por conta disso, a bactéria *Xanthomonas campestris pv pruni* passou a ser identificada como *Xanthomonas arboricola pv pruni*. Esse patovar é o agente causal da mancha bacteriana, um dos mais importantes doenças do pêssego, nectarina, ameixa japonesa, damasco, e amêndoa (RITCHIE, 1995). A xantana produzida pela *Xanthomonas arboricola* foi classificada por Borges (2009) como sendo de baixa concentração de sais e comportamento reológico esperado para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo quando utilizadas em solução salina, independente da temperatura.

A biossíntese da xantana consiste, principalmente, numa montagem passo a passo da estrutura, inclui a ligação das subunidades pentassacarídicas para posterior polimerização e exportação (IELPI, 1993). As enzimas exigidas para esse processo são codificadas por uma região do genoma de *Xanthomonas* nomeada “xpsI” ou “gum” (KATZEN, 1998). Esta região é composta por 12 genes, designados de “*gumB*” ao “*gumM*”, com aproximadamente 12 kb. A transcrição do grupamento gênico *gum* mostrou-se dirigida por um promotor localizado *upstream* ao primeiro gene, “*gumB*” (KATZEN, 1996; VOJNOV et al., 2001; VORHÖLTER et al., 2008). Segundo Vorhölter et al. (2008), a síntese da xantana ocorre na face interior da membrana celular interna, onde repetidas unidades pentassacarídicas definidas em glicose-glicose-manose-glucoronato-manose são formadas a partir da ação das glicosiltransferases. Estas enzimas são codificadas pelos genes: *gumD*, *gumM*, *gumH*, *gumK* e *gumI*. As unidades de manose podem ser acetiladas, em variados graus, por enzimas codificadas pelos genes *gumF* (manose interna) e *gumG* (manose externa); e apenas a manose externa pode ser piruvilada a partir da codificação do gene *gumL*. Essas proteínas envolvidas na síntese de unidades de repetição já apresentam funções estabelecidas com base em dados experimentais (KATZEN et al., 1998), porém ainda existe necessidade de validar a exata função dos genes *gumBCEJ*, apesar de se conhecer a relação desses com a exportação e polimerização da xantana (VORHÖLTER, 2008). Ainda segundo o modelo de Vorhölter et al. (2008), o gene *gumJ* é responsável pela exportação das unidades monoméricas formadas, para a face externa da membrana celular interna.

Neste ponto o gene *gumE* pode realizar a polimerização, enquanto em contato com o *gumC* e *gumB*, ancorados na membrana interna e externa, respectivamente, permite a exportação da xantana para o meio externo (VORHÖLTER, 2008; VOJNOV, 1998; BECKER, 1998).

Estudos de expressão gênica por diversos métodos têm permitido a análise de genes envolvidos em variados processos biológicos, desde o crescimento de organismos a suas interações com fatores ambientais (DONSON, 2002). De acordo com Gachon (2004), o método melhor empregado para avaliação da expressão gênica é a amplificação quantitativa de transcritos reversos, ou PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). A amplificação por PCR em tempo real, uma variante do PCR convencional, representa um grande avanço nos métodos moleculares atuais, principalmente por permitir sensivelmente a quantificação da expressão gênica (LADEIRA, 2011), em diferentes tipos de amostras e condições ambientais, com alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (HEID, 1996; BUSTIN, 2000; SHIPLEY, 2006). A análise da expressão gênica, por RT-qPCR, é baseada nos níveis de transcritos (RNAm) de uma determinada amostra, que é quantificada pela emissão de fluorescência detectada no aparelho (SHIPLEY, 2006).

No intuito de contribuir com estudos relacionados à biossíntese da goma xantana, o presente trabalho propõe uma análise de expressão gênica dos genes relacionados a essa síntese, a fim de sugerir um método simplificado de seleção de bactérias produtoras de xantana.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Obtenção e caracterização das linhagens bacterianas**

As linhagens bacterianas para o presente estudo foram selecionadas da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM), na Universidade Federal da Bahia (UFBA). Foram analisadas quatro linhagens da coleção de culturas “CCMICS” (Coleção de culturas de Micro-organismos do ICS), a fim de selecionar linhagens, principalmente, as do gênero *Xanthomonas* ou produtoras de exopolissacarídeos, com ênfase na goma xantana.

As bactérias foram reativadas em meio de cultura padrão para o gênero *Xanthomonas* denominado YM (Yeast-Malt), com a seguinte composição em g.L<sup>-1</sup>: 3g extrato de levedura, 3g extrato de malte, 5g peptona e 10g glicose. Após a obtenção de cultura pura, as linhagens foram analisadas quanto à morfologia, coloração de Gram, caracterização das colônias e formação de exopolissacarídeo (EPS). Em seguida, as linhagens previamente selecionadas, foram submetidas à análise molecular, por sequenciamento. E então, identificadas a partir da similaridade entre sequências descritas em bancos de dados públicos, como o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sendo CCMICS 482 *Xanthomonas arboricola* e CCMICS 351 *Enterobacter cloacae*.

## **2.2 Estudos de produção e caracterização da goma xantana utilizando as linhagens bacterianas CCMICS 482 (*Xanthomonas arboricola*) e CCMICS 351 (*Enterobacter cloacae*).**

### **2.2.1. Curva de crescimento**

A curva de crescimento foi realizada pelas linhagens selecionadas, CCMICS 482 e CCMICS 351, para a produção e análise do biopolímero e o estudo comparativo de expressão gênica. Para a construção da curva, o experimento foi realizado em triplicata, utilizando o meio YM líquido, incubação em agitador orbital (Shaker - Innova 4080), com temperatura controlada de 28°C ± 2°C e rotação de 120rpm. O inóculo inicial (D.O.<sub>560nm</sub> = +- 0,2) foi de 1,5mL (1%) em 150mL do meio de cultura. Foram retiradas alíquotas a cada 4 horas, inicialmente, prosseguindo com retiradas a cada 12 horas a partir do período de 24 horas de crescimento.

A avaliação do crescimento celular foi realizada por leitura de absorbância e contagem expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Para a análise da densidade óptica, foi utilizado o Espectrofotômetro SP-22, (Bioespectro), num comprimento de onda de 560nm e um branco representado pelo meio de cultura YM sem inóculo. Para a contagem de UFC, foi utilizado meio de cultura YM ágar para a semeadura das culturas e diluição seriada com solução salina 0,9%. A contagem das colônias foi feita após um período de 16 a 24 horas após a semeadura. A construção das curvas foi realizada de acordo com os valores de absorbância e da contagem por diluição seriada (dados em Log).



## **2.3. Caracterização e análise da goma xantana**

### **2.3.1. Produção de goma xantana**

As linhagens foram analisadas quanto à produção de goma xantana, a fim de quantificar e qualificar o polímero sintetizado. Para isto, seguiu-se o seguinte protocolo: a cultura bacteriana foi incubada por 24 horas em meio de cultura YM, a uma temperatura de 28 °C e rotação de 120rpm; em seguida, a cultura foi re-inoculada em meio YM sob as mesmas condições e período; após de 24 horas de crescimento, a cultura foi, então, inoculada em meio de produção para produção de xantana por 72 horas. O meio de produção foi MPII, com a composição referente a 1 litro: 1,5g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 2,5g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 20g (2%) sacarose (BORGES, 2008 modificado). Após o inóculo da cultura bacteriana em meio de produção, o mesmo foi incubado em estufa à 30°C, sob agitação de 180rpm por 72 horas. Em seguida, a goma foi extraída para quantificação e qualificação.

### **2.3.2. Extração e quantificação da xantana**

Após a produção, a goma xantana foi extraída do meio por centrifugação a 5500 rpm por 40 minutos à 4°C, a fim de separar as células da goma; o sobrenadante foi colocado em um novo tubo e adicionado álcool etílico absoluto (99,5%) numa proporção de 1:3 e armazenado sob refrigeração à 4 °C por um período de 12 a 18 horas; e posteriormente a amostra foi novamente centrifugada a 7000 rpm (4°C por 30 minutos); então o sobrenadante foi descartado e o “pellet” recuperado para quantificação após transferência para placa de Petri pequena. A goma foi submetida ao processo de secagem em estufa à 50 °C ( $\pm 5$  °C) por 48 horas, e levada ao dessecador até peso constante e quantificada por peso (gramas). Em seguida macerada para armazenamento.

### 2.3.3. Análise da viscosidade

As análises da viscosidade das amostras foram realizadas em Reômetro Brookfield rotacional, modelo DV-III ULTRA, à temperatura de 25°C. As soluções aquosas foram preparadas na concentração de 0,2 % (p/v), 2000ppm, em água destilada, solubilizadas por agitação sob aquecimento e armazenadas à 4°C até o momento da análise. Para a análise, foram utilizados 8mL da solução, com Spindle n°18 (SC4-18) e os parâmetros ajustados no *software* Rheocalc. A taxa de cisalhamento foi de 01 a 71 s<sup>-1</sup>, com intervalos de 05 s<sup>-1</sup>, em 15 ciclos, num intervalo de tempo de 10 segundos. Os ensaios foram realizados em triplicata, nos tempos 0, 12, 24 e 72 horas, para ambas as linhagens, CCMICS 482 e CCMICS 351.

### 2.3.4. Análise de Espectrometria na região do infravermelho

A espectrometria é um processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia (FARIA, 2005) e através da espectroscopia no infravermelho podem-se identificar compostos orgânicos e inorgânicos. Esta análise tem sido amplamente empregada para identificação de biopolímeros, entre outras utilidades, como análise de misturas complexas. A radiação infravermelha (IR) corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das micro-ondas. A porção de maior utilidade está situada entre 4000 cm<sup>-1</sup> e 400 cm<sup>-1</sup> (SILVERSTEIN et al., 2006).

As amostras de goma, produzidas pelas duas linhagens estudadas, foram analisadas a partir da trituração com brometo de potássio (KBr) em pó, preparadas pastilhas por prensa à vácuo e levadas para análise no espectrofotômetro (BOMEM, MB-102). Como padrão foi utilizado goma xantana comercial. Uma vez determinados os espectrogramas das gomas pesquisadas e da xantana comercial, a comparação dos vários picos, e a consulta em tabelas constitui boa prova de identificação das estruturas moleculares do composto (FARIA, 2005).

### 2.3.5. Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas no estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução (KAISER, 2000). Para a química de carboidratos se tornou uma ferramenta largamente utilizada; e com os avanços de técnicas de RMN bidimensional, se torna imprescindível sua utilização, principalmente na elucidação estrutural de polissacarídeos com estruturas complexas (SOUZA, 2009). A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) estuda a microestrutura dos polímeros, de forma versátil e confiável. Esta técnica permite realizar estudos de polímeros tanto em solução, como em gel ou no estado sólido (CANEVAROLO, 2003). Dentre as técnicas de RMN utilizadas estão a do hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e de carbono ( $^{13}\text{C}$ ), correlações homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) e heteronuclear ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ).

Os EPSs estudados, produzidos pela CCMICS 351 e 482, foram avaliados pela técnica da Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN  $^1\text{H}$ ) sendo, portanto, identificados em último estágio por deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) comuns ao núcleo de hidrogênio como a presença de prótons  $\alpha$ -anoméricos e prótons de carbonos  $\beta$  de hexoses ou pentoses, prótons de carbonos conectados a oxigênio, prótons de ácidos glucurônicos, próton de H6 de rarnose e prótons pertencentes ao grupamento acetila.

Os espectros de RMN-H das amostras de EPS, produzidas em condições otimizadas, foram determinados em Espectrômetro Bruker DRX-500, operando a 500MHz para  $^1\text{H}$  e água deuterada como solvente. As análises foram realizadas em temperatura de  $70^\circ\text{C}$  e o procedimento adotado consta que aproximadamente 5 mg de amostra foi solubilizada em 0,6 mL de água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

### 2.4. Análise da Expressão gênica

As amostras para extração de RNA foram coletadas durante a produção de xantana em meio MPPII, nos tempos de 0, 12, 24 e 72 horas, das linhagens CCMICS 351 e CCMICS 482. As amostras tiveram o RNA extraído, convertido em cDNA e então amplificadas em RT-qPCR para o estudo da expressão gênica.

### 2.4.1. Seleção dos genes e *primers* estudados

As regiões analisadas no presente estudo estão relacionadas com a biossíntese da goma xantana, neste caso, inseridas no grupamento gênico *gum* em bactérias do gênero *Xanthomonas*. As sequências gênicas utilizadas para o desenho dos *primers* foram selecionadas e caracterizadas no Capítulo I, de acordo com a predição de regiões promotoras da região *gum*. Três genes, *downstream* as regiões promotoras, foram selecionados e *primers* específicos a eles foram desenhados, *gumB*, *gumC* e *gumM*. Além destes, a Tabela 01 apresenta os genes referência utilizados na análise da expressão, por quantificação relativa.

**Tabela 01.** Sequências dos *primers* utilizados no estudo de genes relacionados à produção de xantana e os genes referência utilizados.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Enzima
<b>Genes alvos:</b>		
<i>gumB</i> F	AAAAATGATTGCGCGGTTC	Proteína exportação na biossíntese da xantana
<i>gumB</i> R	CATCCGAGCGATACACCAC	
<i>gumC</i> F	GATCAATGGCGAAGTCATCA	Proteína determinante do comprimento da cadeia
<i>gumC</i> R	TGAGCATGTTGTAGCGGATG	
<i>gumM</i> F	ACCGACCTGATTCCGTACCT	Glicosiltransferase
<i>gumM</i> R	GCCATACCCATCGCACAT	
<b>Genes referências:</b>		
<i>AcpP</i> F	GGAAGAGGAAGTCACCACCA	Proteína transportadora de ácidos graxos.
<i>AcpP</i> R	CGCACTCGAACTCTTCTTCC	
<i>proC</i> F	CAGGCCGGGCAGTTGCTGTC	Pirrolina-5-carboxilato redutase
<i>proC</i> R	GGTCAGGCGCGAGGCTGTCT	

O gene referência *acpP*, já foi descrito em estudo com *Pseudomonas* por Lenz (2008) e representa uma proteína transportadora de ácidos graxos na biossíntese dos mesmos, presente também em espécies de *Xanthomonas* (DA SILVA, 2002; HUANG, 2000). O segundo gene referência, gene *ProC* (pirrolina-5-carboxilato redutase), envolvido na biossíntese de aminoácido, já foi classificado com estável em outras espécies (SAVLI, 2003).

### 2.4.2. Extração de RNA

As amostras foram coletadas durante o intervalo de produção em frascos do tipo *Erlenmeyers*, sob agitação e temperatura descritos anteriormente, nos tempos de crescimento entre 0 a 72 horas, com intervalos de 12 e 24 horas. A cada alíquota, foram retirados 1,5mL da cultura, centrifugados a 14000g por 2-5 minutos para coleta das células e lavadas duas vezes com tampão PBS (1x). Em seguida, as mesmas foram submetidas à extração de RNA e purificação com o Kit *SV Total RNA Isolation System* Promega, que inclui a etapa da DNase, conforme as instruções do fabricante. O RNA extraído foi armazenado em ultra freezer, -80°C.

Após a extração e purificação, a quantidade e a qualidade do RNA foram estimadas por leitura em espectrofotômetro “Smart-Spec Bio-Rad”, medindo a absorbância nos comprimentos de onda 260nm e 280nm. A quantidade de RNA total presente nas soluções foi estimada em  $A_{260nm}$ . No comprimento de onda de 280nm mediu-se a quantidade de proteínas e polifenóis das amostras. A pureza das amostras foi determinada pela razão espectral  $A_{260}:A_{280}$ , que deve compreender um intervalo recomendado de 1,8 a 2,0 para garantir a qualidade do RNA extraído na síntese do cDNA (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

A fim de verificar a integridade do RNA extraído, as amostras foram observadas em eletroforese em gel de agarose a 1%, com adição de brometo de etídio (0,5µg/mL, concentração final), em tampão TBE 0,5X (Tris-borate-EDTA e água ultra pura). As amostras de RNA foram adicionadas ao gel num volume de 5µL junto à 2µL do tampão de carregamento (2,5mg/mL de azul de bromofenol e 400mg/mL de sacarose). O gel foi observado em sistema de fotodocumentação no espectro da luz ultravioleta, podendo ser observado as respectivas bandas correspondentes às subunidades 16S, 23S e 5S do RNA ribossomal.

### 2.4.3. Conversão de RNA para cDNA

Após a obtenção do RNA, foi realizado a síntese do cDNA com o Kit SuperScript II Reverse Transcriptase - Invitrogen, seguindo os passos conforme o protocolo original, utilizando Random *primer* (IDT), dNTPs, DTT, 5X First-Strand

Buffer, Superscript II® (200 U/μL) e água ultra pura tratada com DEPC. Após a conversão, o cDNA foi armazenado em temperatura de -20°C.

#### 2.4.4. PCR quantitativo em tempo real

Todas as reações de qPCR foram realizadas em triplicatas técnicas, no aparelho ABI 7500 da Applied Biosystems. As reações da PCR seguiram os seguintes parâmetros: pré-aquecimento a 50° por 2 minutos, desnaturação a 95° por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação e quantificação (15 segundos a 95° e 60 segundos a 60°), seguidos de um período de dissociação de 60 segundos a 95° para certificação de que os pares de oligonucleotídeos usados produziram um único produto.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o kit SYBR Green PCR Master MIX (Applied Biosystems), que contém SYBR Green dye, AmpliTaq Gold DNA polimerase, dNTPs (dUTP), referência passiva (ROX) e tampão otimizado. Para reação de PCR, foram adicionados 10μL de SYBR Green PCR Master MIX, 4μl de água, 0,5μl de cada *primer* a ser estudado (sense e anti-sense) e 5μL de cDNA da amostra, diluído 20 vezes. As reações foram realizadas em placas de polipropileno para 96 reações (96-Well Optical Reaction Plate – Applied Biosystems) cobertas com adesivos para microplacas (MicroAmp Optical Adhesive Film – Applied Biosystems). As placas foram centrifugadas a 25°C por 3 minutos a 4000rpm, e então submetidos à reação. Curvas de amplificação e dissociação geradas pelo sistema foram usadas para a análise. Para todas as amostras testadas, controles negativos com água, ao invés de cDNA, para a transcrição reversa foram incluídos. Da mesma maneira, foram também acrescentados controles negativos com amostras de RNA extraído, de cada tratamento, a fim de verificar a ausência de DNA nestes.

#### 2.4.5. Expressão diferencial

A eficiência de amplificação para cada *primer* foi realizada com um *pool* de cDNAs de cada tratamento das amostras, diluídos 20 vezes. As amostras de cDNA, em triplicatas técnicas, passaram por um processo de diluição seriada (0x, 2x, 4x, 8x, e 16x) e foram submetidas à amplificação. Para cada diluição, os valores de Ct, representados

em função do log da concentração do valor inicial, determina a construção de uma reta de regressão que permite estimar as eficiências de amplificação. O resultado da validação da eficiência é dado por um valor (*slope*) que deve estar entre -3,1 a -3, 7, calculado na fórmula:  $E = 10^{(-1/slope)}$ . Estes valores de *slope* refletem uma eficiência de amplificação satisfatória entre 85 a 115% (HELLEMANS et al., 2007).

Para análise de estabilidade dos genes referência, foi utilizado o *software geNorm* que calcula o coeficiente de variação (CV) e o valor de estabilidade do gene (M), baseado na média geométrica dos genes testados e na média da variação de um gene contra o outro nas diferentes amostras (VANDESOMPELE et al., 2002). Genes com alta estabilidade entre todas as repetições biológicas e tratamentos devem apresentar valor do geNorm  $M \leq 0,5$  (HELLEMANS et al., 2007).

A quantificação da expressão gênica entre as amostras biológicas foi dada pelo método de quantificação relativa, onde um calibrador (amostra controle, correspondente ao tempo 0h) é comparado às amostras tratadas (tempos 12h, 24h e 72h) e a razão da expressão entre elas é calculada. Para determinar a quantificação relativa do gene alvo em relação ao gene referência, foi utilizado o modelo matemático descrito por PFAFFL (2001). A relação da expressão relativa do gene alvo é calculada com base na eficiência (E) e a variação de Ct de uma amostra tratada e a amostra controle, e expressa em comparação ao gene referência.

A análise estatística foi realizada após uma transformação logarítmica dos dados de expressão relativa normalizados. Os dados de qPCR não são lineares e, tipicamente, sofrem uma variação heterogênea sobre as replicatas biológicas (RIEU & POWERS, 2009). Dessa forma, os dados referidos foram transformados em logaritmos na base 2 para, então, possibilitar o estudo estatístico por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunett, com significação dos dados a 5% de probabilidade.

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Obtenção e caracterização das linhagens bacterianas**

A partir das linhagens isoladas da coleção de culturas de micro-organismos do ICS (CCMICS) a CCMICS 351 (*Enterobacter cloacae*) e a CCMICS 482 (*Xanthomonas*

*arboricola*) foram selecionadas, sendo a primeira com baixa produção de EPS e a última com alta produção. No intuito de uma análise comparativa da produção e caracterização da goma xantana em relação à expressão gênica diferencial, essas duas linhagens delinearam um desafio para esse estudo. A Figura 01 apresenta a imagem das colônias caracterizadas das linhagens CCMICS 351 e 482.

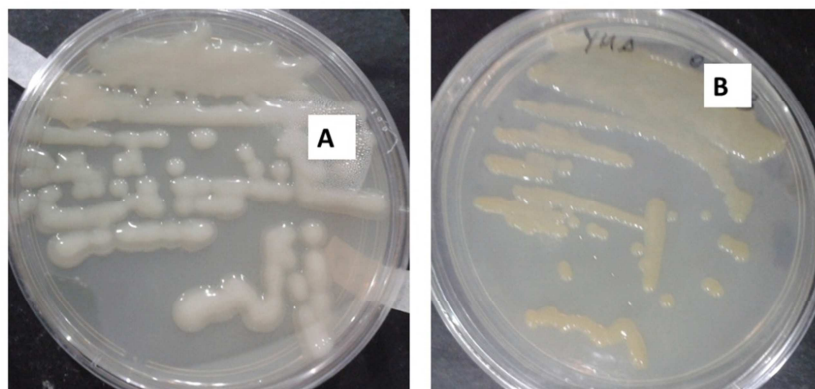


Figura 01. Aspecto das colônias crescidas em meio de cultura YM ágar, à  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 24h, sendo (A) CCMICS 351 e (B) CCMICS 482. As colônias apresentaram-se viscosas, com aspecto brilhoso, com morfologia celular em bacilos curtos e Gram negativas.

### **3.2. Estudos com as linhagens bacterianas selecionadas: CCMICS 482 (*Xanthomonas arboricola*) e CCMICS 351 (*Enterobacter cloacae*).**

#### **3.2.1. Curva de crescimento**

As bactérias estudadas, CCMICS 351 (*E. cloacae*) e CCMICS 482 (*X. arboricola*), obtiveram curvas de crescimento similares, construídas com base na absorvância por densidade óptica (D.O.) (Apêndice C), num comprimento de onda de 560nm, e com base na contagem em placas por unidades formadoras de colônia (UFC), demonstradas na Figura 02. As duas linhagens apresentaram fase lag de 0 a 4 horas e uma fase Log (exponencial) até, aproximadamente, 24 horas de crescimento. Neste momento se inicia a fase estacionária, que se mantém até 72 horas de crescimento. Apesar de estarem em mesmas condições de crescimento, não corroboram com o comportamento das linhagens de *Xanthomonas* estudadas por Rottava (2005) que só



alcançam a fase estacionária com 40 horas de crescimento. Diferente de Ponce (2007) que ao trabalhar com *E. cloacae* obteve curva de crescimento semelhante a apresentada.

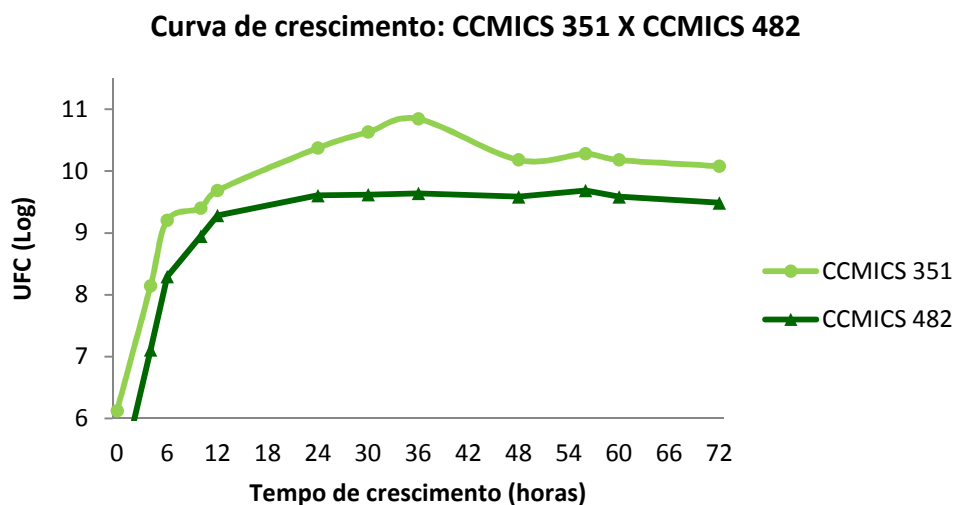


Figura 02. Curva de crescimento das linhagens CCMICS 351 e CCMICS 482, crescidas em meio de cultura YM líquido sob as seguintes condições, 28°C ±2°C e agitação de 120rpm, dados obtidos da contagem em unidades formadoras de colônias (u.f.c.) e valores em Log.

A análise das curvas de crescimento mostrou que a linhagem CCMICS 351 apresentou um número de células maior que a linhagem CCMICS 482. A linhagem CCMICS 351 apresentou um número de células de aproximadamente  $10^{10}$  u.f.c./mL no tempo de 24 horas de crescimento, enquanto a CCMICS 482 apresentou  $10^9$  u.f.c./mL no mesmo tempo, que representa o momento de inóculo para a produção de goma xantana. Com base nisso, procedeu-se os ensaios de produção de goma xantana, considerando a coerência no crescimento das linhagens trabalhadas, o que permitiu uma padronização do inóculo inicial da produção, e conhecimento do comportamento metabólico.

### 3.3. Caracterização da goma xantana

As amostras foram submetidas a análises de produção e caracterização padrão para bactérias do gênero *Xanthomonas* que produzem xantana. Essa padronização permitiu relacionar o estudo das linhagens com a análise molecular.

### 3.3.1. Produção e quantificação da goma xantana

Utilizando as mesmas linhagens CCMICS 351 e CCMICS 482, foram realizados os ensaios de produção de goma xantana em condições similares, 30°C sob agitação orbital (180rpm). Na Figura 03 está representada a produção de goma pelas duas amostras, a partir dos seus valores médios de taxa de produção. Fica evidente a alta produção do biopolímero por CCMIC 482 em relação à CCMICS 351, chegando a ser 20 vezes maior no período de 72 horas de crescimento, em relação ao período inicial.

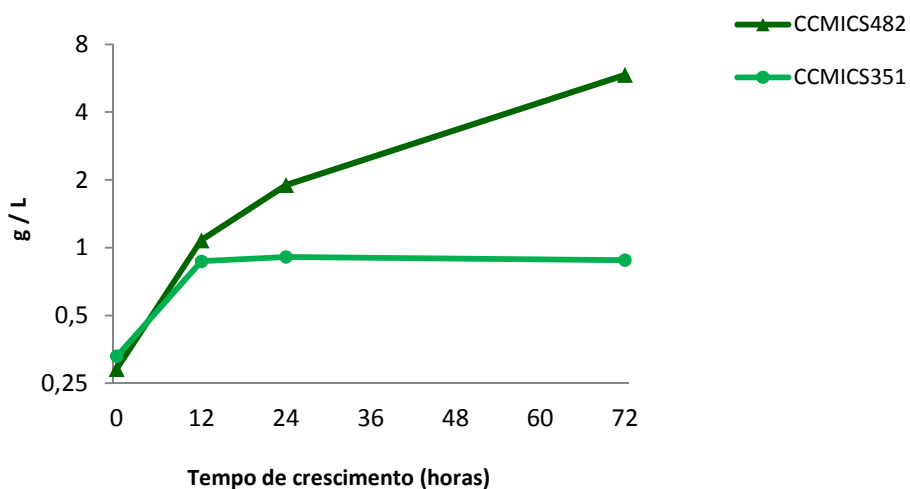


Figura 03. Avaliação da produção de goma, em temperatura de 30°C e 180rpm de agitação para as linhagens CCMICS 351 e CCMICS 482.

Para verificação da produção de xantana, em meio MP11, com 72 horas de fermentação, a CCMICS 482 alcançou  $5,86\text{g.L}^{-1}$ , corroborando ao encontrado por Mayer (2008) em *Xanthomonas*. Contudo, a produção de biopolímeros pode ser influenciada pela linhagem e condições utilizadas na produção, tornando comum taxas de produtividade maiores no mesmo meio de fermentação, como encontradas por Rottava (2005). O comportamento de produção da CCMICS 482 condiz com Borges (2008), que obteve a máxima produção de xantana ocorrendo também na fase estacionária de crescimento, que neste caso, correspondeu ao período posterior a 24 horas de crescimento. Contudo, CCMICS 351 se mostrou estável após o período de 12 a 24 horas.

A linhagem CCMICS 351 obteve uma taxa de produção bastante inferior quando comparada com a 482, com 72 horas de fermentação, a produção apresentou uma taxa de  $0,9\text{g.L}^{-1}$ . Num meio de produção variado, por diferentes fontes de carbono, e sob as condições de indução, 30°C e 200rpm de agitação, Prasertsan (2008) variou sua

produção de EPS por *E. cloacae* de 2,23 a 7,28 g.L<sup>-1</sup>. A baixa produtividade de CCMICS 351 pode estar relacionada às condições aplicadas na produção e crescimento, direcionadas para produção de xantana por bactérias do gênero *Xanthomonas*.

Antes da secagem e maceração da goma para pesagem, foi possível no aspecto visual observar a diferença entre a produção nas duas linhagens (Figura 04).

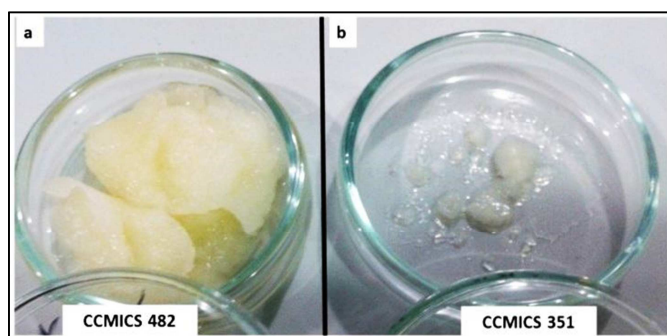


Figura 04. Aspecto visual dos biopolímeros precipitados após extração com etanol, das linhagens CCMICS 482 em (a), e CCMICS 351 em (b).

A *E. cloacae* representa uma bactéria Gram-negativa, morfologia bacilos e anaeróbia facultativa (NAIK, 2012), produz um EPS composto por glicose, manose e galactose (XU et al., 2009), além da presença do grupo piruvil (WANG, 2012). O que difere, em parte, das estruturas apresentadas por Meade (1994), que inclui glicose, galactose, ácido glucurônico, fucose e acetil; ou por Hua (2010) que propõe uma estrutura de repetidas unidades de glicose e galactose apenas.

### 3.3.2. Análise da viscosidade da xantana

Ambas as amostras analisadas apresentaram um comportamento pseudoplástico, de acordo com a Figura 05, como é característico de muitos biopolímeros, em especial da xantana. Os valores apresentados são inferiores aos normalmente encontrados em goma xantana comercial, pois o intervalo sobre a taxa de cisalhamento aplicada no fluido foi elevado (5 s<sup>-1</sup>), com o intuito de evidenciar a diferença da viscosidade entre as amostras.

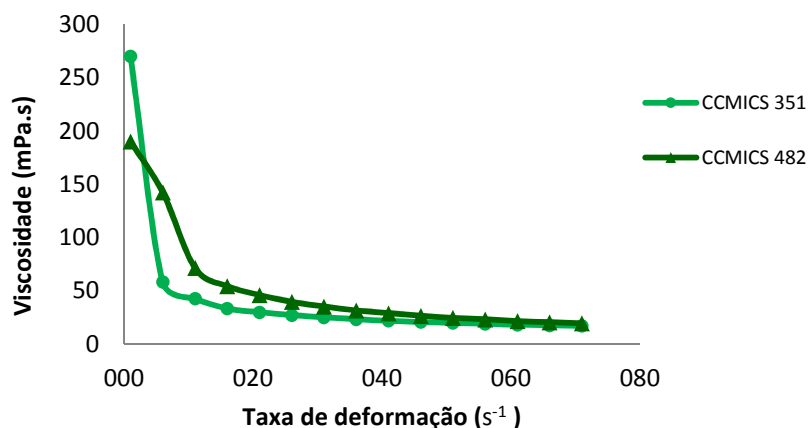


Figura 05. Dados da viscosidade aparente (mPa.s) *versus* Taxa de deformação (s<sup>-1</sup>), a 25°C das soluções de EPS (0,2 % (p/v) ou 2000ppm), nas amostras: “CCMICS 351” e “CCMICS 482”.

A viscosidade aparente das gomas analisadas entre as linhagens obteve uma discreta diferença entre às amostras no final da fermentação, sendo 19,04mPa.s a viscosidade referente a CCMICS 351 e 23,24mPa.s a viscosidade da CCMICS 482, ambas numa taxa de cisalhamento de 56 s<sup>-1</sup>. Além das análises comparadas entre as amostras no final da produção, foi possível avaliar a diferença da viscosidade nos períodos de 0, 12, 24 e 72 horas do tempo de inoculo para cada linhagem. A Figura 06 apresenta a progressão da viscosidade das duas linhagens, evidenciando a alta da CCMICS 482 no tempo 24 horas.

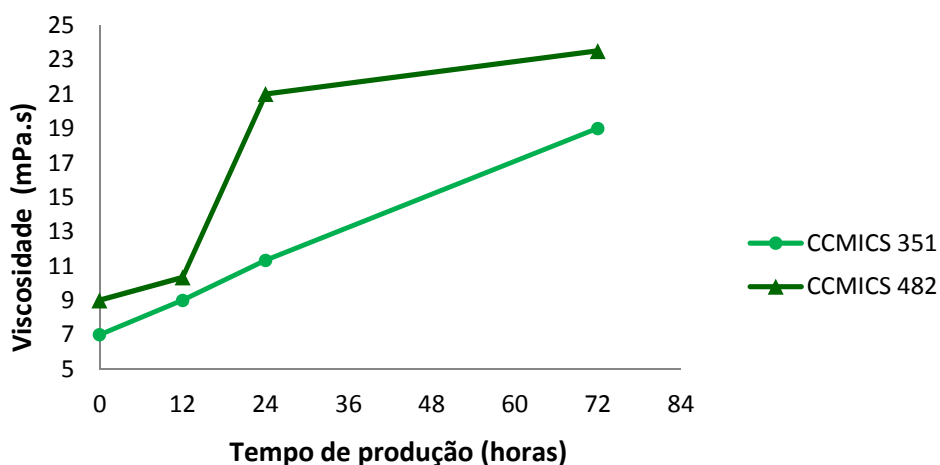


Figura 06. Viscosidade aparente (mPa.s) vs Tempo de produção (horas), das soluções de EPS (1,0 % p/v), nos tempos 0, 12, 24 e 72 horas das amostras: “CCMICS 351” e “CCMICS 482”.

As análises de viscosidade apresentadas mostram o aumento da viscosidade proporcional ao aumento da produção da goma xantana. Silveira (2008) também

observou esse comportamento da xantana, onde o aumento da viscosidade ocorre junto ao tempo de fermentação, por *Xanthomonas sp.* em meio de produção. Importante destacar os maiores valores da CCMICS 482 frente a CCMICS351. Meade (1994) comparou o comportamento do EPS produzido por *E. cloacae* e xantana, onde aquela apresentou menor viscosidade e estabilidade em diferentes condições, em relação a xantana.

### 3.3.3 Caracterização da goma xantana por espectroscopia de IR.

Apesar de não representar uma espécie do gênero *Xanthomonas*, a linhagem CCMICS 351 produziu um EPS muito semelhante à goma xantana por análises de Espectrometria no infravermelho em relação à goma comercial e à *Xanthomonas arboricola* (CCMICS 482). A Figura 07 apresenta a similaridade das gomas produzidas pelas linhagens CCMICS 351 e 482 em relação à goma comercial.

Uma vez determinados os espectrogramas das gomas pesquisadas e da xantana comercial, a comparação dos vários picos, e a consulta em tabelas constitui boa prova de identificação das estruturas moleculares do composto. O espectro de infravermelho permitiu detectar similaridades ou diferenças na estrutura química da goma produzida no laboratório e da comercial.

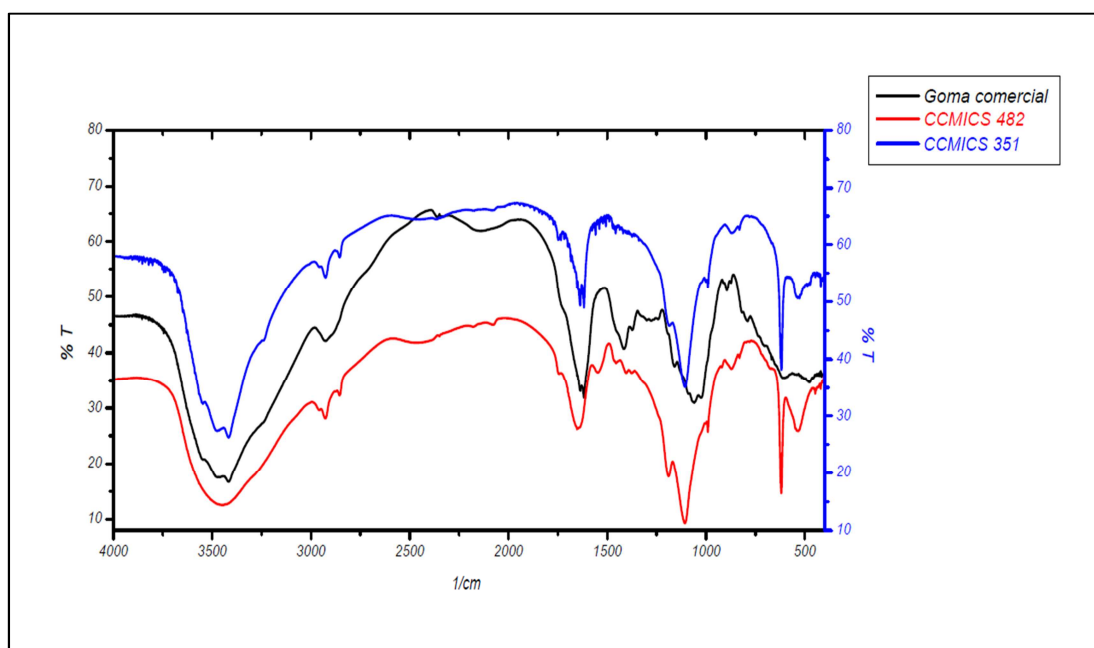


Figura 07. Espectrometria no Infravermelho das gomas produzidas pelas linhagens bacterianas CCMICS 351 e 482 em comparação à goma xantana comercial.

Analisando os espectros das gomas produzidas pelas linhagens CCMICS 351 e 482 e da goma comercial, foi possível observar similaridades entre os picos determinados. Na Figura 07, pode-se observar a deformação axial de grupos hidroxilas em bandas formadas entre 3200 e 3450  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo a presença de álcoois e fenóis associados por ligação de hidrogênio. Mostra-se evidente também as bandas em torno 2850 e 2960  $\text{cm}^{-1}$  que atribuem deformação axial da ligação C-H (carbonos primários e secundários). A banda característica da deformação axial da carbonila (C=O) de ésteres, ácidos carboxílicos, aldeídos e cetonas apareceu em 1710  $\text{cm}^{-1}$  a 1730  $\text{cm}^{-1}$ . Na região entre 1530 a 1650  $\text{cm}^{-1}$  observou-se a banda característica de deformação axial de C=O de enóis ( $\beta$ -dicetonas). Em 1050 a 1150  $\text{cm}^{-1}$  notou-se uma deformação axial de C-O, típica de éteres, álcoois, fenóis, ácidos graxos, ésteres e anidridos. As similaridades são evidentes na espectrometria na região do infravermelho de goma xantana apresentada por Barbosa (2007), contudo, às espectrometrias do EPS produzido por *E. cloacae* nos estudos de Naik (2012), Jin (2010) e Prasertsan (2006) apresentaram significativas diferenças.

### **3.3.4 Caracterização da goma xantana por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN $^1\text{H}$ )**

Por análise da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN  $^1\text{H}$ ), foi possível determinar que, apesar dos polímeros apresentarem-se semelhantes, são considerados produtos diferentes produzidos pelas linhagens CCMICS 351 e CCMICS 482, Figuras 08 e 09 respectivamente.

Na figura 08, foi possível observar prótons de carbonos  $\beta$  de hexoses (4,663; 4,677; 4,707 ppm); prótons de carbonos conectados a oxigênio (4,176 ppm); prótons de ácidos glucurônicos (1,800; 2,265; 2,400; 2,524 ppm); próton de H6 de ramnose (1,239 ppm); prótons podendo representar o grupamento acetila (1,239; 1,800 ppm).

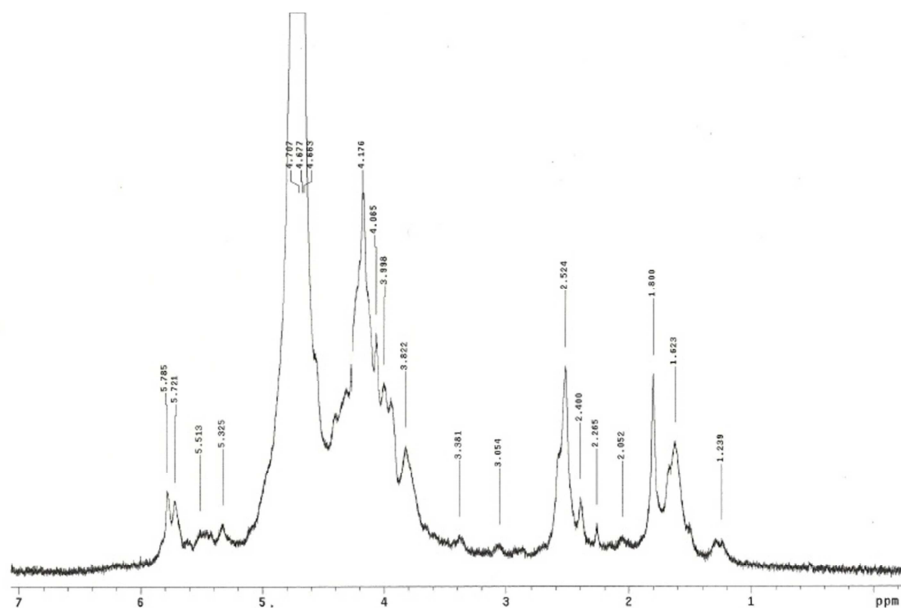


Figura 08. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton ( $^1\text{H}$ -RMN) para amostra de EPS produzido pela linhagem CCMICS 351, em condições otimizadas, obtido em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) a  $70^\circ\text{C}$ .

A figura 09 demonstra a presença de Prótons de carbonos  $\beta$  de hexoses (4,667; 4,670; 4,680; 4,684; 4,710 ppm); Prótons de carbonos conectados a oxigênio (4,044 ppm); Prótons de ácidos glucurônicos (1,839; 2,160;  $\sim 2,600$  ppm); Próton de H6 de ramnose ( $\sim 1,300$  ppm); prótons podendo representar o grupamento acetila ( $\sim 1,300$ ; 1,838 ppm).

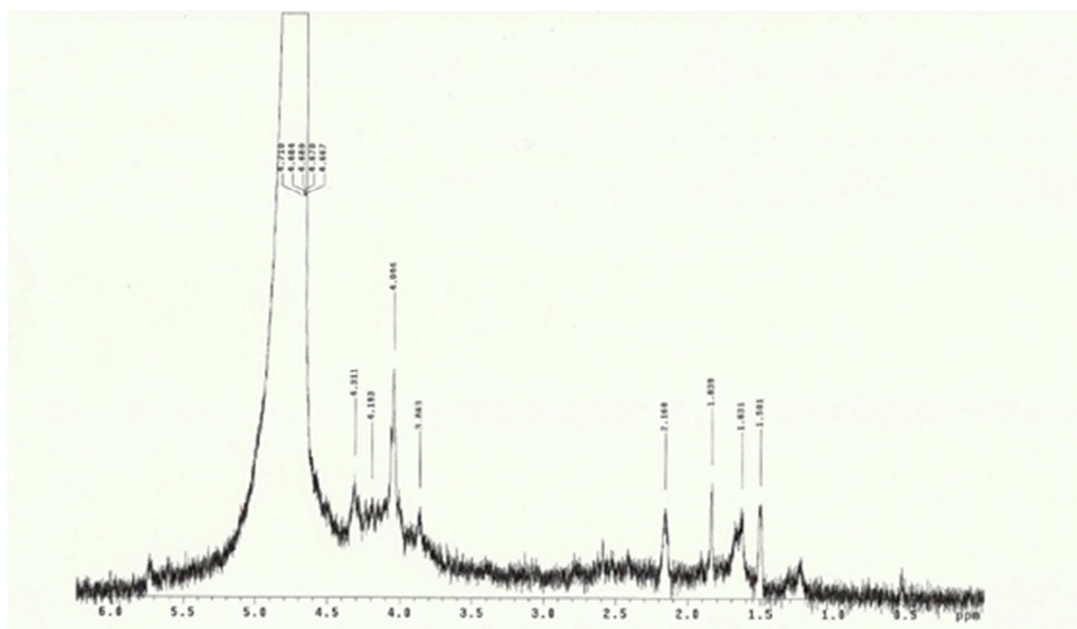


Figura 09. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton ( $^1\text{H}$ -RMN) para amostra de EPS produzido pela linhagem CCMICS 482, em condições otimizadas, obtido em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) a  $70^\circ\text{C}$ .

Apesar de apresentarem picos com valores correspondentes, alguns sinais obtidos na análise da CCMICS 351 não são evidentes em 482, como 5,782 e 5,721 ppm também registrados em espectro de RMN-H de *E. cloacae* por (WANG, 2012). Todos os sinais detectados são compatíveis com os obtidos por Faria (2009), de goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris*. Apesar de encontrarmos, comumente, estudos que utilizam o RMN  $^1\text{H}$  para caracterizar teores de acetato e piruvato em xantana (FARIA, 2009, CHEETHAM, 1992) a espectroscopia de RMN é a técnica que proporciona um maior número de informações, tanto qualitativas quanto quantitativas, sobre a microestrutura dos polímeros (ESCHER, 2004). A técnica por RMN pode ser ainda estudada para outros núcleos além do hidrogênio ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ), tendo o estudo de  $^{13}\text{C}$  em polissacarídeos permitir obtenção de informações estruturais mais claras, como a variação da composição química (OSIRO, 2011).

### 3.4. Análises da expressão gênica

#### 3.4.1. Análise dos *primers*

A eficiência de amplificação dos *primers* apresentaram-se dentro do limite de 85 a 115% (HELLEMANS et al., 2007), sendo o *acpP* com eficiência de 108%, *proC* 108%, *gumB* 114%, *gumC* 98% e o *gumM* 92%. Além disso, os *primers* foram avaliados quanto a estabilidade no *software* geNorm, e os *genes referência* *acpP* e *proC* foram selecionados com melhor estabilidade, sendo  $M \leq 0,5$  (Tabela 02).

**Tabela 02.** Valores de estabilidade dos *primers* estudados em análise pelo *software* geNorm.

Gene Referência	M	CV
<i>acpP</i>	0,496	0,164
<i>proC</i>	0,496	0,181
<b>Média</b>	0,496	0,173

#### 3.4.2. Caracterização do RNA extraído

Na extração do RNA obtiveram-se amostras com boa qualidade, onde a razão A260/280 variou de 1.8 a 2.0, indicando ausência de contaminação protéica e/ou



composto fenólicos. O RNA observado em gel de agarose se apresentou íntegro, evidenciando as duas subunidades, e não houve detecção de DNA aparente. Além disso, o RNA extraído foi submetido à amplificação em PCR em tempo real, em que não houve detecção de amplificação das amostras. Dessa forma, sem contaminação nas amostras de RNA extraído, não existiu possibilidade de interferência nas reações de transcriptase reversa e RT-qPCR.

A concentração dos RNAs extraídos variou de 110µg/mL a 300µg/mL, sendo utilizado para a síntese de cDNA um valor padronizado de 1µg de RNA para cada amostra. Sendo assim, a amplificação quantitativa por PCR em tempo real pôde ser estudada para relacionar as taxas de expressão.

### 3.4.3. Quantificação da expressão relativa da CCMICS 482

Análises de transcrição mostraram que os genes *gum* são, sobretudo, expressos em conjunto a partir de um promotor *upstream* ao primeiro gene, o *gumB* (KATZEN, 1996; VOJNOV, 2001; VORHÖLTER, 2008). Contudo, os demais genes estudados que integram o grupamento gênico *gum* respondem de forma particular na síntese do polímero xantana, com funções diferenciadas. O gene *gumB* codifica a proteína responsável por exportar a xantana para o meio externo (VORHOLTER, 2008; VOJNOV, 1998; BECKER, 1998).

De acordo com a análise de expressão diferencial, entre os tempos (tratamentos) 0, 12, 24 e 72 horas, foi possível verificar que a expressão do gene *gumB*, apesar de não apresentar diferença significativa (assim como em *gumC* e *gumM*), respondeu de acordo com a taxa de produção e viscosidade da goma xantana, aumentando em relação ao número de células e fermentação. A relação do aumento da viscosidade junto à taxa de produção foi apresentada em alguns trabalhos, como os de Silveira (2008) e Garcia-Ochoa (2000), e estão relacionados com a expressão do *gumB*, porém não diretamente com *gumC* e *gumM*. A Figura 10 apresenta uma correlação positiva do *gumB* entre os quatro tratamentos.

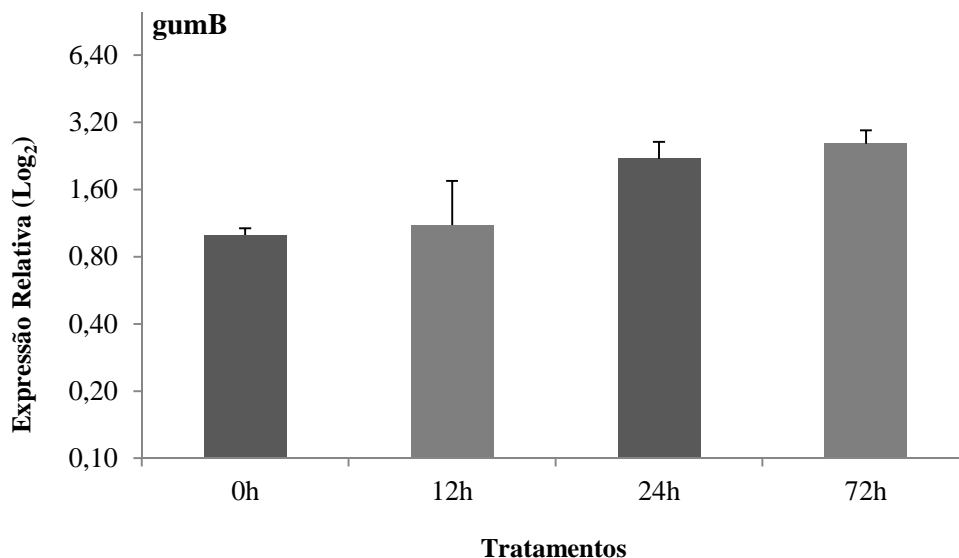


Figura 10. Quantificação da expressão relativa de *gumB* em CCMICS 482.

De uma forma linear, com comparação ao tempo zero, com 12 horas de produção, *gumB* apresentou uma taxa de expressão 1,1x maior, com 24 horas 2,2x mais expresso e com 72 horas 2,6x mais expresso. Contudo, a análise das médias dos valores de expressão, pelo teste de Dunnett, os tratamentos não apresentaram diferença significativa em relação ao tempo zero. Apesar dos valores de produção de goma em 24h e 72h serem considerados diferentes significativamente.

O gene *gumC* representa a função da proteína determinante do comprimento da cadeia e antecede a ação do *gumB* no transporte para a membrana externa (VORHOLTER, 2008. Importante ressaltar que o peso molecular ou comprimento da cadeia está diretamente relacionado à viscosidade do biopolímero (LUVIELMO, 2009). A Figura 11 apresenta o comportamento da expressão gênica do *gumC*, onde os tratamentos de tempos 12 e 72 horas mostram-se 1,2x e 1,1x menos expressos que o tempo zero, respectivamente. Com 24 horas de produção/fermentação e crescimento celular, a expressão apresenta seu maior valor, sendo 1,5x mais expresso que o calibrador.

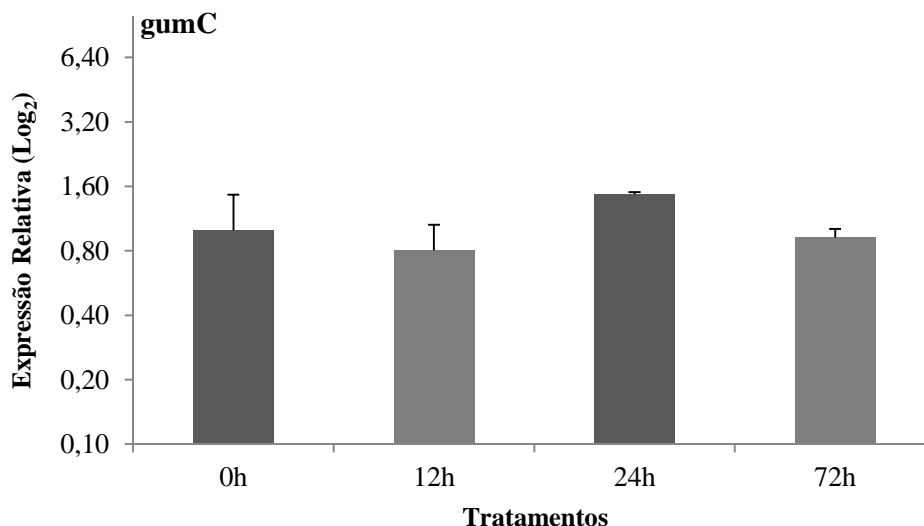


Figura 11. Quantificação da expressão relativa de *gumC* em CCMICS 482.

O calibrador, representado pelo crescimento bacteriano em meio de cultura YM por 24 horas, sem a indução dos nutrientes do meio de produção, obteve maior taxa de expressão que os tratamentos 12h e 72h (em meio de produção), assim como 24h em meio de produção também foi mais expresso. O que infere na relação de maior expressão desse gene estar relacionada ao tempo de crescimento em 24 horas. A relação do *gumC* com a viscosidade, é reforçada quando os valores da viscosidade, demonstrados na Figura 06, apresentaram destaque com 24 horas, que mantém um discreto aumento até 72h. A maior indução do *gumC* ocorreu em 24h, apesar da maior viscosidade ocorrer em 72h. O que qualifica a estabilidade da goma em manter a viscosidade, entre outros fatores, no uso para aplicação industrial (BORGES, 2009). A xantana é o polissacarídeo com maior estabilidade entre os existentes no mercado, em especial, por formar soluções aquosas de alta viscosidade (FORESTI, 2003).

De acordo com os resultados apresentados no Capítulo 1, os genes *gumC*, *gumD* e *gumE* são induzidos a partir de uma mesma região promotora, e portanto, de forma conjunta, respondem ao mesmo comportamento de expressão. Com a maior indução ocorrendo em 24h, o *gumD* codifica glicosiltransferases, envolvidas na primeira etapa da síntese da xantana (VORHOLTER, 2008; GOLMOHAMMADI, 2012), e o *gumE* antecede a ação de *gumC* na polimerização do exopolissacarídeo (VORHOLTER, 2008; KATZEN, 1998).

A análise do *gumM* apresenta, em relação ao calibrador, maior expressão também em 24 horas, com 1,8x a mais, e o tratamento 72h horas apenas 1,1x mais

expresso. Contudo 12h obteve uma expressão reprimida em  $-3,7x$  em relação ao tempo zero (Figura 12). Importante ressaltar que o *gumM* é responsável pela síntese de glicosiltransferases, com ação no início da síntese do biopolímero, junto ao *gumD* (VORHOLTER, 2008).

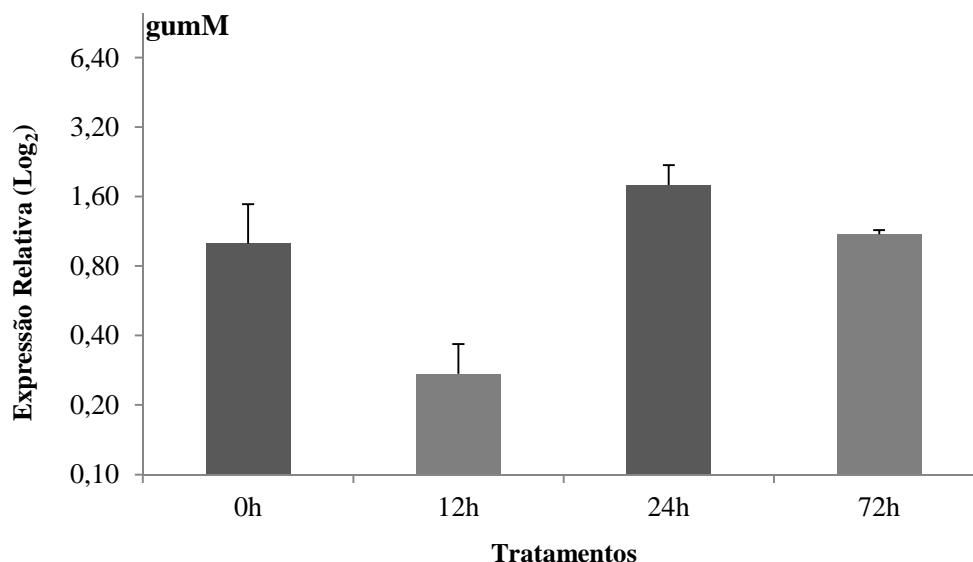


Figura 12. Quantificação da expressão relativa de *gumM* em CCMICS 482.

Apesar de Katzen (1996) sugerir a presença de um promotor secundário *upstream* a *gumK*, que correlacionaria o *gumL* e *M* à mesma indução, no Capítulo I o *gumM* foi caracterizado com um promotor isolado, *upstream* a ele, sem expressão conjunta de outros genes. Contudo, o metabolismo de transcrição de glicosiltransferases pelos genes *gumM* e *gumD*, iniciando a síntese da xantana, ocorre mais expressivamente em 24 horas de fermentação da goma.

A Tabela 03 apresenta um resumo dos perfis de expressão dos genes *gum B*, *C* e *M*, relacionando-os às taxas de produção e viscosidade em cada tratamento, representados pelos tempos 0, 12, 24 e 72 horas. Observa-se a coerência da maior taxa de produção corresponder a maior expressão do *gumB* (em 72h), apesar de não serem proporcionais. Enquanto isso, *gumC* e *gumM* obtiveram maiores valores de expressão em 24h, não correspondendo diretamente a outros valores.

Tabela 03. Relação da produção de xantana, viscosidade da xantana e expressão gênica dos genes *gumB*, *C e M*, da linhagem CCMICS 482.

Tratamentos	Produção	Viscosidade	Expressão gênica		
			<i>gumB</i>	<i>gumC</i>	<i>gumM</i>
0h	1x	1x	1x	1x	1x
12h	3x	1,1x	1,1x	-1,2x	-3,7x
24h	6x	2,3x	2,2x	1,5x	1,8x
72h	20x	2,6x	2,6x	-1,1x	1,1x

Por outro lado, a análise desses resultados corroboram com o modelo sugerido por Vorhölter et al. (2008), considerando os valores de maior expressão associados ao tempo de crescimento das células. Na ordem de transcrição, *gumM*, *gumC* e *gumB*, a Figura 13 representa esta associação, sendo: *gumM* apresentando maior expressão em 24h, seguido por *gumC*, porém, o *gumB* só apresenta sua expressão de maior valor em 72h.

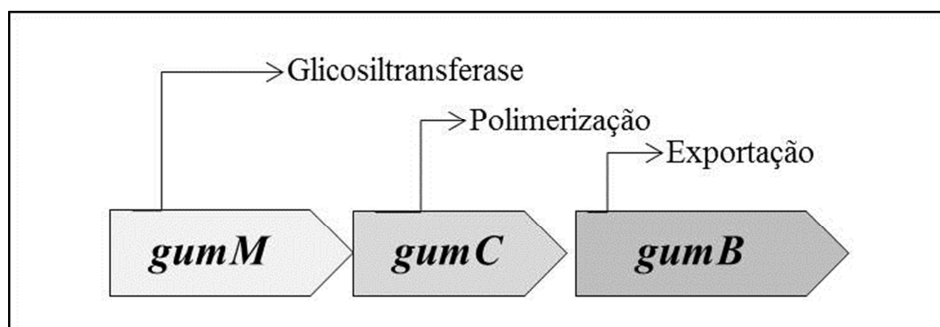


Figura 13. Metabolismo de transcrição dos genes *gumM*, *gumC* e *gumB* em *Xanthomonas arboricola* (CCMICS 482).

#### 3.4.4. Quantificação da expressão relativa da CCMICS 351

A linhagem CCMICS 351, apesar de não representar uma espécie do gênero *Xanthomonas*, produziu um biopolímero similar à xantana e obteve amplificação positiva dos *primers* referentes a três genes envolvidos na biossíntese de xantana, *gumB*, *gumC* e *gumM*. Porém, os perfis de expressão foram, em parte, distintos em relação à linhagem CCMICS 482, o que é esperado, inclusive, entre diferentes espécies de

*Xanthomonas*. Além disso, os valores de Ct da CCMICS 351 foram mais tardios que os de CCMICS 482, chegando a ter até sete ciclos a mais num mesmo tratamento.

O valor de Ct (cycle threshold) corresponde ao número de ciclos necessários para detectar o sinal de fluorescência emitido com a amplificação da amostra alvo. Assim, os níveis de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucléico alvo e, conseqüentemente, a expressão. Isto é, quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade de ácido nucléico alvo na amostra (DORAK, 2006; LUU, 2010). De acordo com Luu (2010), valores de Ct abaixo de 29 representam fortes reações positivas indicativas de ácido nucleico alvo abundante na amostra; valores de Ct entre 30 e 37 representam reações positivas indicativas de quantidades moderadas de ácido nucleico alvo; por fim, Cts entre 38 e 40 são reações fracas, indicativos de quantidades mínimas de ácido nucléico alvo que poderia representar uma contaminação. Um valor de Ct de 38 ou superior não significa amplificação e este valor não pode ser incluído nos cálculos. A linhagem CCMICS 482 obteve maiores taxas na produção e viscosidade em relação à CCMICS 351, e apresentou uma média dos valores de Ct de 26,9 ciclos, enquanto a CCMICS 351 obteve uma média de 34,4 ciclos, variando de acordo com o gene analisado.

Na análise da expressão gênica da CCMICS 351, o comportamento para *gumB* apresentou-se similar ao da CCMICS 482, apesar dos altos valores de Ct. Em relação ao calibrador, com 12 horas, a expressão foi 1,8x maior; em 24h, 2,5x maior expressão e com 72 horas, 4,2x mais expresso (Figura 14). Neste caso, apenas o tratamento de 72h obteve diferença significativa pelo teste de Dunnett.

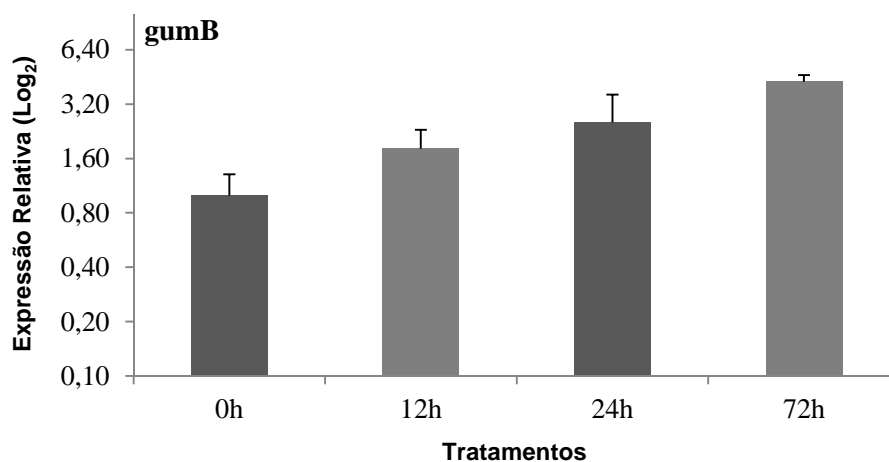


Figura 14. Quantificação da expressão relativa de *gumB* em CCMICS 351.

Os valores de expressão representados na Figura 14 não apresentam relação direta com as taxas de produção da goma pela CCMICS 351, que teve a maior produção, mesmo que discreta, com 24 horas de fermentação. Porém, os valores de viscosidade se equivalem, com o maior valor em 72 horas. A Tabela 04 possibilita essa observação com maior clareza, assim como para os outros genes.

A análise da expressão do *gumC* obteve o maior valor com 24 horas, apresentando uma diferença de 4,5x maior expressão que o tempo zero; em 12 horas foi 1,7x maior e em 72 horas houve um aumento de 2,0x em relação ao tempo zero (Figura 15). Os valores apresentados, assim como em *gumM*, não apresentaram diferença significativa em relação ao calibrador com base no teste de Dunnett.

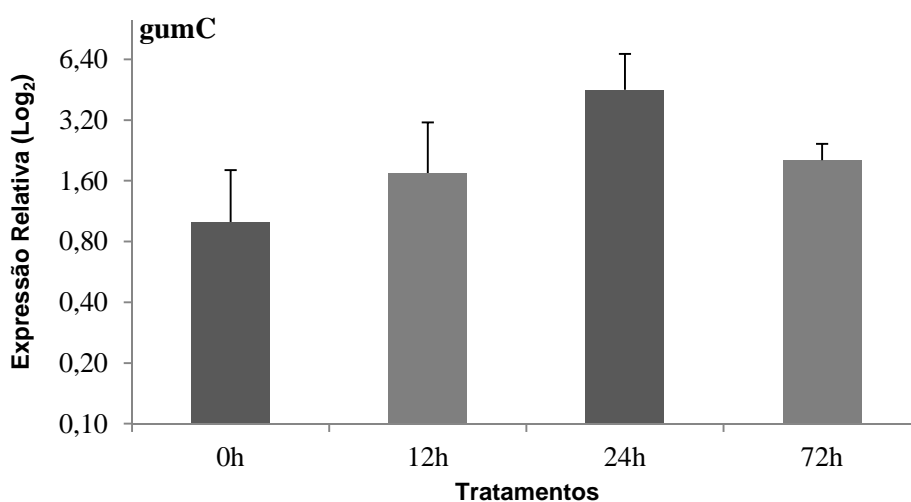


Figura 15. Quantificação da expressão relativa de *gumC* em CCMICS 351.

A análise de expressão do *gumC* em CCMICS 351 reforça a discussão feita para CCMICS 482, em que a maior indução ocorre com 24 horas mantendo o metabolismo para uma maior viscosidade em 72 horas de fermentação. Contudo, outros genes como *gum F*, *G* e *L*, responsáveis pela acetilação e piruvatação do polímero (KATZEN et al., 1998; VORHÖLTER, 2008), estão também, diretamente, relacionados com a viscosidade da goma (GARCIA-OCHOA et al., 2000; SILVEIRA, 2008). Sendo assim, a variação da viscosidade nos tratamentos (ou tempos) estudados não pode ser baseada apenas pela indução do *gumC*, nem tão pouco, é possível sugerir o grau de influência do mesmo na viscosidade, sem uma análise conjunta com os outros genes.

O comportamento do *gumM* mostrou-se estável nos tempos 12 e 24 horas, sendo ambos 2,6x mais expresso que o calibrador (0h). Com 72 horas a expressão apresentou

aumento de 3,6x em relação ao tempo inicial (Figura 16), desviando dos resultados da CCMICS 482.

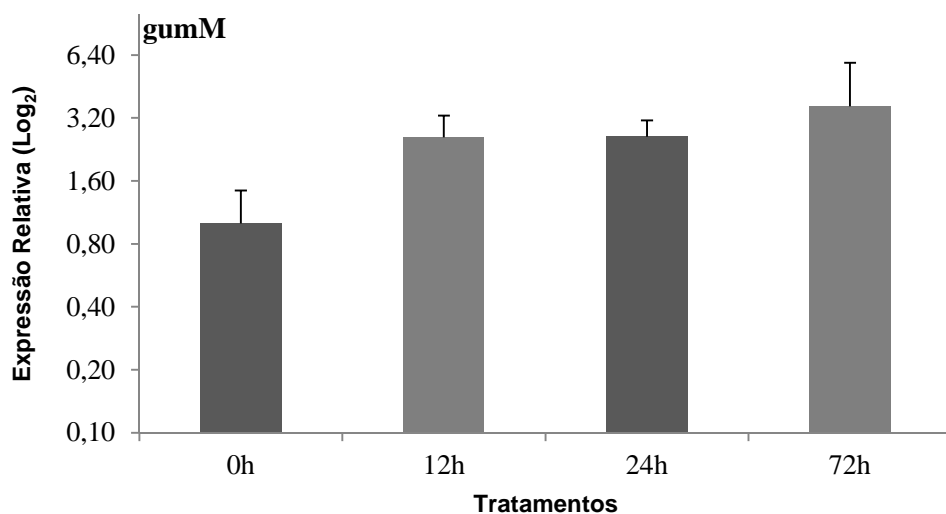


Figura 16. Quantificação da expressão relativa de *gumM* em CCMICS 351.

O gene *gumM* é responsável pela codificação da enzima glicosiltransferase (Vorhölter et al., 2008), devendo ser, diferente do apresentado, diretamente proporcional à produção de EPS, que apresenta glicose em sua estrutura (HUA, 2010). A Tabela 04 apresenta um resumo dos perfis de expressão dos genes *gumB*, *C* e *M*, em CCMICS 351, relacionando-os às taxas de produção e viscosidade em cada tratamento, representados pelos tempos 0, 12, 24 e 72 horas.

Tabela 04. Relação da produção de xantana, viscosidade da xantana e expressão gênica dos genes *gumB*, *C* e *M*, da linhagem CCMICS 351.

Tratamentos	Produção	Viscosidade	Expressão gênica		
			<i>gumB</i>	<i>gumC</i>	<i>gumM</i>
<b>0h</b>	1x	1x	1x	1x	1x
<b>12h</b>	2,6x	1,3x	1,8x	1,7x	2,6x
<b>24h</b>	2,8x	1,6x	2,5	4,5x	2,6x
<b>72h</b>	2,7x	2,7x	4,2	2,0x	3,6x

Em todos os genes estudados na CCMICS 351, o comportamento não foi coerente com as taxas de produção e viscosidade, e os valores de Ct apresentaram-se muito tardios em relação à linhagem de *Xanthomonas*. Apesar de haver amplificação dos genes relacionados com a produção de uma goma similar a xantana por CCMICS



351, *Enterobacter cloacae*, os baixos valores de produção e viscosidade condizem com a amplificação tardia detectada e também não corroboram os estudos de expressão, sendo necessários novos trabalhos para elucidar a presença de genes similares ou mesmo com funções homólogas na linhagem de *E. cloacae* CCMICS351.

#### 4. Conclusão

Apesar de bastante defendida a teoria de existir um promotor único para a região *gum*, *upstream* a *gumB*, foi possível observar que os genes estudados apresentam perfis de expressão gênica diferenciados. Por conta disso, a possibilidade de existir regiões promotoras secundárias é fortalecida e deve ser mais explorada. A técnica de RT-qPCR foi eficiente no estudo de expressão diferenciada em genes envolvidos na síntese de xantana, porém pode ser associada a outras técnicas, como recombinação gênica bacteriana, permitindo melhores conclusões.

Além disso, a expressão dos genes selecionados para o presente estudo (*gumB*, *C* e *M*), relacionados à síntese da goma xantana, não apresentam uma relação direta com a produção e viscosidade da goma em 72 horas de fermentação. Implicando num comportamento de expressão diferenciada e anterior ao metabolismo de síntese e polimerização da xantana. Não apenas desses, como, provavelmente, nos demais genes inseridos no grupamento gênico *gum*.

#### 5. Referências

- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos**. Ed. UFV. Viçosa, p.13-60. 2007.
- BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. **Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective**. Appl. Microbiol Biotechnol. N.50. p.145-152. 1998.
- BORGES, C. D.; MOREIRA, A. DA S.; VENDRUSCULO, C. T.; AYUB M. A. Z. **Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101**. Revista Argentina de Microbiología. N.40. p.81-85. 2008.
- BORGES, C. D.; VENDRUSCULO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. **Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv**

**pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo.** Polímeros: Ciência e Tecnologia. vol. 19. N.2. p.160-165. 2009.

BREWING, N.J. **Development of the legume root nodule.** Annual Review Cell Biology. v.7. p.191-226, 1991.

BUSTIN S. A. **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** Journal of Molecular Endocrinology n.25. p.169–193. 2000.

CAMPBELL, B. S.; MCDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. **Why do exopolysaccharide yields from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation?** Enzyme and Microbial Technology. N.33. p.104–112. 2003.

CANEVAROLO, Jr. S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros.** São Paulo: Editora Artliber. 2003.

CHEETHAM, N. W. H.; MASHIMBA, E. N. M. **Proton and carbon-13 NMR studies on xanthan derivatives.** Carbohydrate Polymers. N.17. p.127-136. 1992.

DA SILVA, A.C., 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., *et al.* **Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities.** Nature. N.417. p. 459–463. 2002.

DONSON, J.; FANG, Y.; ESPIRITU-SANTO, G.; WEIMEI, X.; SALAZAR, A.; MIYAMOTO, S.; ARMENDAREZ, V.; VOLKMUTH, W. **Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling.** Plant Molecular Biology. N.48. p.75–97. 2002.

DORAK, M. T. **Real-Time PCR.** New York, Taylor & Francis Group. 2006.

DUNGER, G., RELLING, V.M., TONDO, M.L., BARRERAS, M., IELPI, L., ORELLANO, E.G., OTTADO, J. **Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival.** Arch. Microbiol. N.188, p.127–135. 2007.

ESCHER, F. F. N. **Determinação da microestrutura e relação com as propriedades dos terpolímeros de etileno-propileno- $\alpha$ -olefinas.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em química, UFRGS. Porto alegre, 2004.

FARIA, S. **Produção de goma xantana empregando caldo de cana por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* NRRL B-1459.** Uberlândia. 119 f. Dissertação - (Mestrado em Engenharia Química), Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. 2005.

FARIA, S. **Otimização da produção e caracterização de goma xantana empregando caldo de cana.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2009.

- FORESTI, A. P. **Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* em meios modificados.** Dissertação - Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2003.
- GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. **Real-time PCR: what relevance to plant studies?** Journal of Experimental Botany. vol.55, n.402, p.1445–1454. 2004.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. **Xanthan gum: production, recovery, and properties.** Biotechnology Advances. N.18. p.549-579, 2000.
- GARRITY, G. M.; BRENNER D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology.** Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. 2005.
- GIAVASIS, I.; ROBERTSON, I. MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. **Simultaneous and rapid monitoring of biomass and biopolymer production by *Sphingomonas paucimobilis* using Fourier transform-near infrared spectroscopy.** Biotechnology Letters. N.25. p.975–979. 2003.
- GOLMOHAMMADI, M.; LLOP, P.; SCUDERI, G.; GELL, I.; GRAHAM, J. H.; CUBERO, J. **mRNA from selected genes is useful for specific detection and quantification of viable *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** Plant Pathology, n.61, p.479–488. 2012.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. **Real Time Quantitative PCR.** Genome Research. N.6. p.986-994. 1996.
- HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; De PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. **qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.** Genome Biology. Vol. 8. 2. R19. 2007.
- HUA, X.; WU, Z.; ZHANG, H.; LU, D.; WANG, M.; LIU, Y.; LIU, Z. **Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier.** Chemosphere. N.80. p.951–956. 2010.
- HUANG, G.; ZHANG, L.; BIRCH, R. G. **Characterization of the acyl carrier protein gene and the fab gene locus in *Xanthomonas albilineans*.** FEMS Microbiology Letters 193. P.129-136. 2000.
- IELPI, L.; COUSO, R. O.; DANKERT, M. A. **Sequential Assembly and Polymerization of the Polyprenol-Linked Pentasaccharide Repeating Unit of the Xanthan Polysaccharide in *Xanthomonas campestris*.** Journal of Bacteriology, p.2490-2500, vol. 175, nº.9, 1993.
- JIN, M.; WANG, Y.; XU, C.; LU, Z.; HUANG, M.; WANG, Y. **Preparation and biological activities of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae* Z0206.** Carbohydrate Polymers n.81, p.607–611. 2010.

KAISER, C. R. **RMN 2d**: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, 23(2). 2000.n.

KALOGINANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A.; SKARACIS, G. N. **Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses**. *Process Biochemistry*. N.39. p.249-256. 2003.

KATZEN, F.; BECKER, A.; ZORREGUIETA, A.; PÜHLER A.; IELPI, L. **Promoter Analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum Operon Directing Biosynthesis of the Xanthan Polysaccharide**. *Journal of Bacteriology*. p.4313-4318. vol. 178. nº.14. 1996.

KATZEN, F.; FERREIRO, D. U.; ODDO, C. G.; IELMINI, M. V.; BECKER, A.; PÜHLER A.; IELPI, L. ***Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence**. *Journal of Bacteriology*, p.1607-1617.vol. 180. n.7. 1998.

LADEIRA, P. R. S.; ISSAC, C.; FERREIRA, M. C. **Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real**. *Rev Med (São Paulo)*, jan.-mar.; 90(1):47-51. 2011.

LENZ, A. P.; WILLIAMSON, K. S.; PITTS, B.; STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. **Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms**. *Applied And Environmental Microbiology*, vol. 74, n. 14, p.4463–4471. 2008.

LUU, T. N. **A rat model of fetal alcohol syndrome: molecular and behavioral analysis**. *Masters thesis - Graduate Program in Microbiology and Molecular Genetics*. The State University of New Jersey and University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Brunswick - NJ. 2010.

LUVIELMO, M. M.; VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana**. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 28, n.2, p.161-172. Londrina, 2007.

MOGHADASI, J.; MÜLLER-STEINHAGENC, H.; JAMIALAHMADI, M.; SHARIF A. **Theoretical and experimental study of particle movement and deposition in porous media during water injection**. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, n.43, p.163–181. 2004.

MAUGERI, F. **Produção de polissacarídeos**. In: LIMA, U. A.; AQUARENO, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Editora Edgard Bolcher Ltda.. v. 3. 2001.

MAYER, L.; VENDRUSCOLO, C. T.; SILVA, W. P.; MOURA, A. B. **Produção, propriedades reológicas e composição química da xantana produzida por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli***. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 02, n. 02. p. 87-95, 2008.

- MEADE, M. J.; TANENBAUM, S. W.; NAKAS, J. P. **Optimization of novel extracellular polysaccharide production by an *Enterobacter* sp. on Wood Hydrolysates.** Applied and Environmental Microbiology, p. 1367-1369. 1994.
- MHEDBI-HAJRI N., JACQUES M.A., KOEBNIK R. **Adhesion mechanisms of plant-pathogenic Xanthomonadaceae.** Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 715, 71-89. 2011.
- MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. **Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, 23:2, p.300-305, 2003.
- MUSTAFA, G. S.; SOUZA, A. O. A. B.; ROCHA, P. S. M. V. **Utilização de emissões industriais gasosas para rejuvenescimento de campos maduros de petróleo.** Engenharia Sanitária e Ambiental. Vol. 8 – N. 4. p.209-21, 2003.
- NAIK, M. M.; PANDEY, A.; DUBEY, S. K. **Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B.** Biodegradation. N.23. p.775–783. 2012.
- OSIRO, D.; FRANCO, R. W. A.; COLNAGO, L. A. **Spectroscopic characterization of the exopolysaccharide of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Cu<sup>2+</sup> resistance mechanism.** J. Braz. Chem. Soc., vol. 22. N.7. 2011.
- PACE, G. W. **Polímeros Microbianos.** In BULLOCK, J. & KRISTIANSEN, B. Biotecnologia Básica. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1991.
- PFAFFL, M. W. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** Nucleic acids research, v. 29, n. 9, p. e45. 2001.
- PIERI, C.; BELTRAMINI, L. M.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; VETTORE, A. L.; DA SILVA, F. R.; ARRUDA, P.; OLIVA, G.; DE SOUZA, D. H. F. **Overexpression, purification, and biochemical characterization of *gumC*, an enzyme involved in the biosynthesis.** Protein Expression and Purification, n.34. p.223–228. 2004.
- PONCE, A. R. **Características fenotípicas controladas pelo sistema *Quorum sensing* em *Enterobacter cloacae*.** Dissertação, Programa de Pós-graduação em microbiologia agrícola, Universidade Federal de Viçosa. 2007.
- PRASERTSAN, P.; DERMLIM, W.; DOELLE, H.; KENNEDY, J. F. **Screening, characterization and flocculating property of carbohydrate polymer from newly isolated *Enterobacter cloacae* WD7.** Carbohydrate Polymers, n.66, p.289–297. 2006.
- PRASERTSAN, P.; WICHENCHOT, S.; DOELLE, H.; KENNEDY, J. F. **Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7.** Carbohydrate Polymers, n.71, p.468–475. 2008.
- RIEU, I.; POWERS, S. J. **Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics.** The Plant cell, v. 21, n. 4, p.1031-1033. 2009.

- RITCHIE, D. F. **Bacterial spot**, p. 50–52. In: Compendium of Stone Fruit Diseases. APS Press, St Paul (US). 1995.
- ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). Arechim, RS, 2005.
- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. **Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. Enzyme and Microbial Technology**. v.39, p.197-207, 2006.
- SÁ-CORREIA, I.; FIALHO, A. M.; VIDEIRA, P.; MOREIRA, L. M.; MARQUES, A. R.; ALBANO, H. **Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: Genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, n.29, p.170–176. 2002.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001.
- SAVLI, H.; KARADENIZLI, A.; KOLAYLI, F.; GUNDES, S.; OZBECK, U. VAHABOGLU, H. **Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR**. Journal of Medical Microbiology, n.52, p.403–408. 2003.
- SHIPLEY, G.L. **Chapter 1: An Introduction to Real-Time PCR**. In Real-Time PCR (Dorak MT (Ed)), New York, Taylor & Francis Group. 2006.
- SILVEIRA, C. F.; PREICHARDT, L. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCULO, C. T. **Modificações químicas em xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* promovidas por tratamento térmico**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v.02, n.02: p.32-41, 2008.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Livros Técnicos e Científicos. 2006.
- SOUZA, C. F. **Galactomanana de sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *Ferrea*: estrutura, modificação química e caracterização de propriedades**. Dissertação, Mestrado em Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.
- SUTHERLAND, I. W. **Novel and established applications of microbial polysaccharides**. Trends in Biotechnology, Limerick, v.16, p.41-46, 1998.
- SUTHERLAND, I. W. **Microbial polysaccharides from gram-negative**. International Dairy Journal, Barking, n.11, p.663-674, 2001.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N. V.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes**. Genome Biology, vol. 3 n7. 2002.

- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. **Reclassification of *Xanthomonas***. International journal of systematic bacteriology, v.45, n.3, p.472–489, 1995.
- VOJNOV, A. A.; ZORREGUIETA, A.; DOW, J. M.; DANIELS, M. J.; DANKERTL, M. A. **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, n.144, p.1487-1493. 1998.
- VOJNOV, A. A.; SLATER, H.; DANIELS, M. J.; DOW, J. M. **Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta**. Molecular Plant-Microbe Interactions, vol. 14, n.6, p.768–774. 2001.
- VORHÖLTER, F. J., SCHNEIKER, S., GOESMANN, A., KRAUSE, L., BEKEL, T., KAISER, O., LINKE, B., PATSCHKOWSKI, T., RÜCKERT, C., SCHMID, J., *et al.* **The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis**. J Biotechnol n.134. p.33-45. 2008.
- VOSSOUGH, S. **Profile modification using in situ gelation technology - a review**. Journal of Petroleum Science and Engineering, n.26. p.199–209. 2000.
- WANG, F.; YANG, H.; WU, G.; WANG, Y. **Identification of pyruvyl groups in a novel microbial polysaccharide**. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(34), p.6379-6385. 2012.
- WIERZBICKI, R. **Identificação de raças de *Xanthomonas* spp. patogênicas a pimentão do estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiróz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.
- XU, C.L.; WANG, Y. Z.; JIN, M. L.; YANG, X. Q. **Preparation, characterization and immunomodulatory activity of selenium-enriched exopolysaccharide produced by bacterium *Enterobacter cloacae* Z0206**. Bioresour. Technol. N.100. p.2095-2097. 2009.
- YOKOI, H.; YOSHIDA, T.; MORI, S.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. **Biopolymer flocculant produced by an *Enterobacter* sp.** Biotechnology Letters, Vol. 19, n.6, p.569–573. 1997.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A análise de expressão diferencial dos genes relacionados à produção de xantana, com base em possíveis regiões promotoras inseridas no grupamento gênico *gum*, representa uma boa estratégia metodológica na triagem de linhagens produtoras de xantana por RT-qPCR.
- A compreensão da taxa de expressão nos genes que compreendem o grupamento gênico *gum*, permite novos direcionamentos no melhoramento genético em bactérias que possibilitem altas produções e alta qualidade de xantana.
- O uso da técnica de RT-qPCR mostrou-se eficiente na análise de expressão diferencial de genes relacionados à produção de xantana.
- *Enterobacter cloacae* produz um exopolissacarídeo similar, em estrutura e genética, à goma xantana, porém com diferentes comportamentos, principalmente nas características de expressão gênica, apesar do trabalho ter sido realizado com primers para *Xanthomonas* spp., propriedades reológicas e informação por IR e RMN foram importantes para separar as duas gomas.
- Sugere-se, para uma análise completa e conclusiva, o estudo das seis regiões promotoras preditas como inseridas no grupamento gênico *gum*, por RT-qPCR, em diferentes linhagens de *Xanthomonas*.
- Torna-se necessário um aprofundamento nos estudos moleculares relacionados ao EPS produzido por *Enterobacter cloacae* para que haja melhor compreensão de seu comportamento.



## 5. REFERÊNCIAS

- BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. **Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective.** Appl. Microbiol Biotechnol, n.50, p.145-152. 1998.
- BOGDANOVE, A.J., KOEBNIK, R., Lu, H., FURUTANI, A. ANGIUOLI, S.V. PATIL, P.B., VAN SLUYS, M.-A. RYAN, R.P., MEYER, D.F., HAN, S., APARNA, G., *et al.* **Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp.** J. Bact. 193, 5450-5464. 2011.
- BORGES, C. D.; VENDRUSCULO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. **Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 19, nº 2, p. 160-165, 2009.
- BORGES, A. **Análise da expressão de genes relacionados à interação incompatível *Phaseolus vulgaris*/Colletotrichum lindemuthianum.** Dissertação de mestrado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP, Biblioteca digital de teses e dissertações da USP. Piracicaba, 2011.
- BRADSHAW, I. J.; NISBET, B. A.; KERR, M. H. & SUTHERLAND, I. W. **Modified xanthan – its preparation and viscosity.** Carbohydr. Polym., 3, p.23, 1983.
- BRANDÃO, L. V.; NERY1, T. B.R.; MACHADO, B. A. S.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J.I. **Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 28(Supl.): 217-222. 2008.
- BREYNE, P.; ZABEAU, M. **Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes.** Current Opinion in Plant Biology, 4:136–142. 2001.
- BREWEN, N.J. **Development of the legume root nodule.** Annual Review Cell Biology, v.7, p.191-226, 1991.
- BUSTIN, S. A. **Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.** Journal of Molecular Endocrinology 29 23–39. 2002.
- BUSTIN S. A. **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** Journal of Molecular Endocrinology 25 169–193. 2000.
- CALLET, F.; MILAS, M. & RINAUDO, M. **Influence of acetyl and pyruvate contents on rheological properties of xanthan in dilute solution.** Int. J. Biol. Macromol., 9, p.291, 1987.
- CAMPBELL, B. S.; MCDUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. **Why do exopolysaccharide yields from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation?** Enzyme and Microbial Technology, n.33, p.104–112. 2003.
- CHAN, J. & GOODWIN, P. **The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*.** Biotechnology Advances. 17: 489-508. 1999.

- CHEETHAM, N. W. H. & NORMA, N. M. N. **The effect of pyruvate on viscosity properties of xanthan.** Carbohydr. Polym., 10, p.55, 1989.
- CRUZ, J. C. C. **Diversidade genómica, patogenicidade e sensibilidade a compostos bioactivos em *Xanthomonas campestris*.** Dissertação - Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia. Universidade de Lisboa. 2009.
- DA SILVA, A.C., 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., *et al.* **Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities.** Nature n.417, p.459–463. 2002.
- DONSON, J.; FANG, Y.; ESPIRITU-SANTO, G.; WEIMEI, X.; SALAZAR, A.; MIYAMOTO, S.; ARMENDAREZ, V.; VOLKMUTH, W. **Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling.** Plant Molecular Biology, 48: 75–97. 2002.
- DUNGER, G., RELLING, V.M., TONDO, M.L., BARRERAS, M., IELPI, L., ORELLANO, E.G., OTTADO, J. **Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival.** Arch. Microbiol. 188, 127–135. 2007.
- FONTANIELLA, B.; RODRÍGUES, C.W.; PIÑÓN, D.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.-E. **Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*.** Journal of Chromatography B, 770: 275–81. 2002.
- FORESTI, A. P. **Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* em meios modificados.** Dissertação - Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2003.
- GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. **Real-time PCR: what relevance to plant studies?** Journal of Experimental Botany, vol. 55, n 402, pp. 1445–1454. 2004.
- GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. **Xanthan gum: production, recovery, and properties.** Biotechnology Advances n.18, p.549-579, 2000.
- GARRITY, G. M.; BRENNER D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology.** Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. 2005.
- GIAVASIS, I.; ROBERTSON, I. MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. **Simultaneous and rapid monitoring of biomass and biopolymer production by *Sphingomonas paucimobilis* using Fourier transform-near infrared spectroscopy.** Biotechnology Letters, 25, p.975–979, 2003.
- GINZINGER, D. G. **Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream.** Experimental Hematology n.30, p.503–512. 2002.

- HAYWARD, A.C. **The hosts of *Xanthomonas***. In *Xanthomonas* (Swings, J.G. and Civerolo, E.L., eds), pp. 1–17. London: Chapman & Hall. 1993.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. **Real Time Quantitative PCR**. *Genome Research*, 6: 986-994. 1996.
- HUA, X.; WU, Z.; ZHANG, H.; LU, D.; WANG, M.; LIU, Y.; LIU, Z. **Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier**. *Chemosphere* 80, p.951–956. 2010.
- IELPI, L.; COUSO, R. O.; DANKERT, M. A. **Sequential Assembly and Polymerization of the Polyprenol-Linked Pentasaccharide Repeating Unit of the Xanthan Polysaccharide in *Xanthomonas campestris***. *Journal of Bacteriology*, p. 2490-2500, vol. 175, n°.9, 1993.
- KALOGINANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A.; SKARACIS, G. N. **Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses**. *Process Biochemistry*, n.39, p.249-256. 2003.
- KATZEN, F.; BECKER, A.; ZORREGUIETA, A.; PÜHLER A.; IELPI, L. **Promoter Analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum Operon Directing Biosynthesis of the Xanthan Polysaccharide**. *Journal of Bacteriology*, p. 4313-4318, vol. 178, n°.14, 1996.
- KATZEN, F.; FERREIRO, D. U.; ODDO, C. G.; IELMINI, M. V.; BECKER, A.; PÜHLER A.; IELPI, L. ***Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence**. *Journal of Bacteriology*, p.1607-1617, vol. 180, n°.7, 1998.
- KÖPLIN, R.; ARNOLD, W.; HOTTE, B.; SIMON, R.; WANG, G. E.; PUHLER, A. **Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis**. *Journal Of Bacteriology*, p.191-199. 1992.
- LADEIRA, P. R. S.; ISSAC, C.; FERREIRA, M. C. **Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real**. *Rev Med (São Paulo)*, jan.-mar.; 90(1):47-51. 2011.
- LEE, B.M., PARK, Y.J., PARK, D.S., KANG, H.W., KIM, J.G., SONG, E.S., PARK, I.C., YOON, U.H., HAHN, J.H., KOO, B.S., *et al.* **The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice**. *Nucleic Acids Res.* 33, 577–586. 2005.
- LUVIELMO, M. M.; VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana**. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 28, n.2, p.161-172. Londrina, 2007.
- MAUGERI, F. **Produção de polissacarídeos**. In: LIMA, U. A.; AQUARENO, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editoea Edgard BOIcher Ltda., v. 3, 2001.

- MAYER, L.; VENDRUSCOLO, C. T.; SILVA, W. P.; MOURA, A. B. **Produção, propriedades reológicas e composição química da xantana produzida por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli***. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v. 02, n. 02: p. 87-95, 2008.
- MEADE, M. J.; TANENBAUM, S. W.; NAKAS, J. P. **Optimization of novel extracellular polysaccharide production by an *Enterobacter* sp, on Wood Hydrolysates**. Appl. Environ. Microbiol., 60(4), p.1367. 1994.
- MHEDBI-HAJRI N., JACQUES M.A., KOEBNIK R. **Adhesion mechanisms of plant-pathogenic *Xanthomonadaceae***. Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 715, 71-89. 2011.
- MISAKI, A. **Structural Aspects of Some Functional Polysaccharides**. In: NISHINARI, K.; DOI, E. Food hydrocolloids: structures, properties, and functions. New York: Plenum Press, p. 1-19, 1993.
- MOGHADASI, J.; MÜLLER-STEINHAGENC, H.; JAMIALAHMADI, M.; SHARIF A. **Theoretical and experimental study of particle movement and deposition in porous media during water injection**. Journal of Petroleum Science and Engineering, n43, p163– 181. 2004.
- MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. **Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 23:2, 300-305, 2003.
- MUSTAFA, G. S.; SOUZA, A. O. A. B.; ROCHA, P. S. M. V. **Utilização de emissões industriais gasosas para rejuvenescimento de campos maduros de petróleo**. Engenharia Sanitária e Ambiental. Vol. 8 - Nº 4 -, 209-21, 2003.
- NAIK, M. M.; PANDEY, A.; DUBEY, S. K. **Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. Biodegradation, 23, p.775–783. 2012.**
- NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. **Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade**. Química Nova, Vol. 31, n.08, p.1937-1941. 2008.
- OCHIAI, H., INOUE, Y., TAKEYA, M., SASAKI, A., KAKU, H. **Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity**. Jpn. Agric. Res. Q. 39, 275–287. 2005.
- PACE, G. W. **Polímeros Microbianos**. In BULLOCK, J. & KRISTIANSEN, B. Biotecnologia Básica. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1991.
- PEIRSON, S. N.; BUTLER, J. N.; FOSTER, R. G. **Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis**. Nucleic Acids Res., Jul 15;31(14): e73. 2003.

PINTO, E. P.; FURLAN, L.; VENDRUSCOLO, C. T. **Chemical Deacetylation Natural Xanthan (Jungbunzlauer®)**. *Polímeros*, vol. 21, n.1, p.47-52. 2011.

PRADELLA, J.G.C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos. Relatório técnico n. 84396-205**. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo. 2006.

PRASERTSAN, P.; DERMLIM, W.; DOELLE, H.; KENNEDY, J. F. **Screening, characterization and flocculating property of carbohydrate polymer from newly isolated *Enterobacter cloacae* WD7**. *Carbohydrate Polymers*, 66, p289–297. 2006.

PRASERTSAN, P.; WICHENCHOT, S.; DOELLE, H.; KENNEDY, J. F. **Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7**. *Carbohydrate Polymers*, 71, p468–475. 2008.

QIAN, W., JIA, Y., REN, S.X., HE, Y.Q., FENG, J.X., LU, L.F., SUN, Q., YING, G., TANG, D.J., TANG, H., *et al.* **Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. *Genome Res.* N.15, p.757–767. 2005.

RADEMAKER J. L. W., *et al.* **A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas***. *Phytopathology* 95:1098–1111. 2005.

RAMKRISHNA, S. **Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR**. *Progress in Energy and Combustion Science* 34, 714–724. 2008.

RITCHIE, D. F. **Bacterial spot**, p.50–52. In: *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press, St Paul (US). 1995.

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). Arechim, RS, 2005.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. **Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp**. *Enzyme and Microbial Technology*. v.39, p.197-207, 2006.

SÁ-CORREIA, I.; FIALHO, A. M.; VIDEIRA, P.; MOREIRA, L. M.; MARQUES, A. R.; ALBANO, H. **Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: Genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering**. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29, p.170–176. 2002.

SALZBERG SL, SOMMER DD, SCHATZ MC, PHILLIPPY AM, RABINOWICZ PD, TSUGE S, FURUTANI A, OCHIAI H, DELCHER AL, KELLEY D, **Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A**. *BMC Genomics*, 9:204. 2008.

SHATWELL, K. P.; SUTHERLAND, I. W.; DEA, I. C. M. & ROSS-MURPHY, S. B. **The influence of acetyl and pyruvate substituents on the helix-coil transition behaviour of xanthan**. *Carbohydr. Res.*, n.206, p.87, 1990.

SHIPLEY, G.L. **Chapter 1: An Introduction to Real-Time PCR.** In Real-Time PCR (Dorak MT (Ed)), New York, Taylor & Francis Group. 2006.

SILVEIRA, C. F.; PREICHARDT, L. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCULO, C. T. **Modificações químicas em xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* promovidas por tratamento térmico.** Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v.02, n.02: p.32-41, 2008.

SMITH, I. H.; SYMES, K. C. & LAWSON, C. J. **Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution.** Int. J. Biol. Macromol., 3, p.129, 1981.

STARR, M. P., JENKINS C. L., BUSSEY L. B., ANDREWES A. G. **Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated arylpolyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*.** Arch. Microbiol, n.113. P.1–9. 1977.

STARR, M. P. **The genus *Xanthomonas*,** p. 742–763 In Starr M. P., Stolp H., Truper H. G., Balows A., Schlegel H. G., editors. (ed.), The prokaryotes, vol. 1 Springer Verlag, Berlin, Germany. 1981.

SUTHERLAND, I. W. **Novel and established applications of microbial polysaccharides.** Trends in Biotechnology, Limerick, v.16, p.41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. **Microbial polysaccharides from gram-negative.** International Dairy Journal, Barking, n.11, p.663-674, 2001.

TAKO, M. & NAKAMURA, S. **Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media.** Agr. Biol. Chem., 48, p.2887, 1984.

THIEME, F., KOEBNIK, R., BEKEL, T., BERGER, C., BOCH, J., BUTTNER, D., CALDANA, C., GAIGALAT, L., GOESMANN, A., KAY, S., *et al.* **Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence.** J. Bacteriol. 187, 7254–7266. 2005.

THOMAS, J. E. **Fundamentos da Engenharia do Petróleo.** Petrobras, Ed. Interciência. Rio Janeiro. 2001.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. **The power of real-time PCR.** Adv Physiol Educ.; 29:151-9. 2005.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. **Reclassification of *Xanthomonas*.** International journal of systematic bacteriology, v.45, n.3, p.472 –489, 1995.

VOJNOV, A. A.; ZORREGUIETA, A.; DOW, J. M.; DANIELS, M. J.; DANKERTL, M. A. **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, p.1487-1493. 1998.

VOJNOV, A. A.; SLATER, H.; DANIELS, M. J.; DOW, J. M. **Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 14, n.6, p.768–774. 2001.

VORHÖLTER, F. J., SCHNEIKER, S., GOESMANN, A., KRAUSE, L., BEKEL, T., KAISER, O., LINKE, B., PATSCHKOWSKI, T., RÜCKERT, C., SCHMID, J., *et al.* **The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis.** *J Biotechnol* n.134. p.33-45. 2008.

VOSSOUGH, S. **Profile modification using in situ gelation technology - a review.** *Journal of Petroleum Science and Engineering*, n26, p199–209. 2000.

WANG, F.; YANG, H.; WU, G.; WANG, Y. **Identification of pyruvyl groups in a novel microbial polysaccharide.** *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 6(34), p.6379-6385. 2012.

WIERZBICKI, R. **Identificação de raças de *Xanthomonas* spp. patogênicas a pimentão do estado de São Paulo.** Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiróz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.

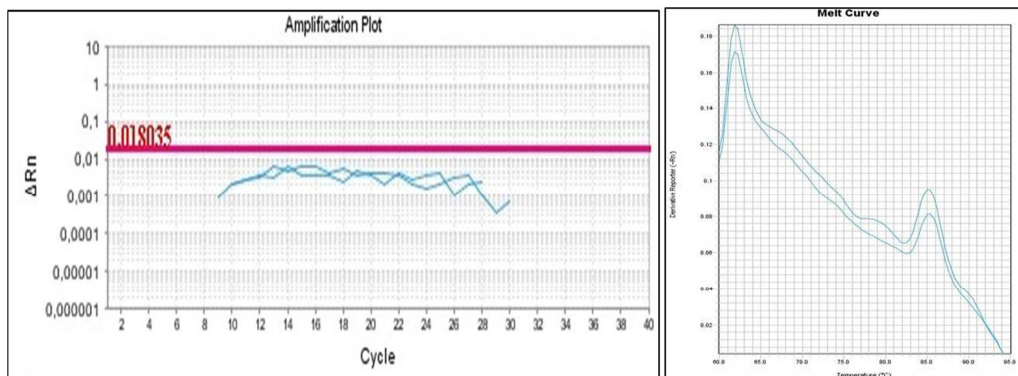
WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. **Real-time PCR for mRNA quantitation.** *BioTechniques.*; n.39. p.75-85. 2005.

XU, C. L.; WANG, Y. Z.; JIN, M. L.; YANG, X. Q. **Preparation, characterization and immunomodulatory activity of selenium-enriched exopolysaccharide produced by bacterium *Enterobacter cloacae* Z0206.** *Bioresource Technology*. N.100. p.2095–2097. 2009.

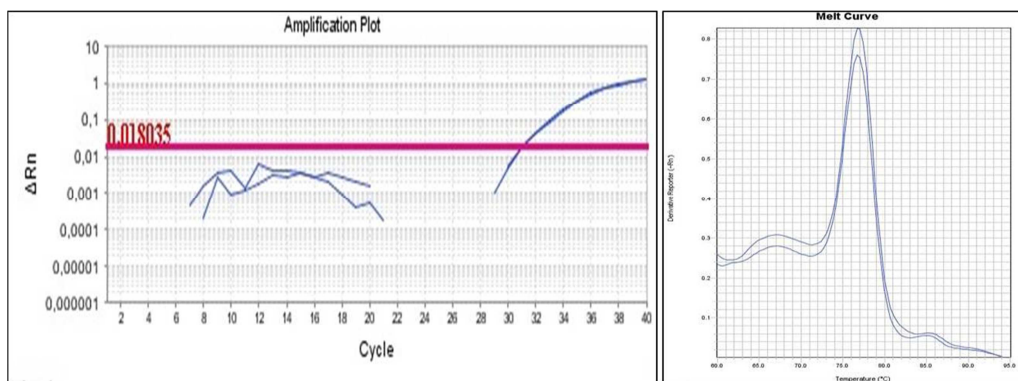
YOKOI, H.; YOSHIDA, T.; MORI, S.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. **Biopolymer flocculant produced by an *Enterobacter* sp.** *Biotechnology Letters*, Vol. 19, n.6, p.569–573. 1997.

## APÊNDICE A

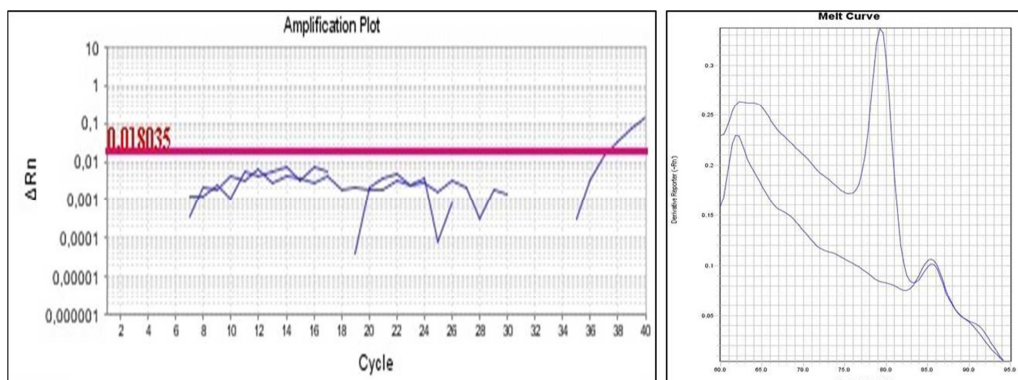
Curvas de amplificação e curvas de dissociação do PCR em tempo real dos *primers gumF*, *gumH* e *gumL*:



**Figura 01.** Resultados dos primers *gumF*: Não houve amplificação de produto específico.



**Figura 02.** Resultados dos primers *gumH*: Apesar de haver amplificação específica, o amplicons apresentou menos de 50pb, caracterizando primer-dimer.



**Figura 03.** Resultados dos primers *gumL*: Não houve amplificação de produto específico.



## APÊNDICE B

### Sequenciamento das regiões estudadas

Para isolamento do DNA bacteriano a extração do DNA bacteriano foi realizada de acordo com o protocolo adaptado de Zhou (1996). Os fragmentos de DNA extraídos foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), utilizando um protocolo de reação padrão (ou MIX) com volume final de 25 µL. No termociclador, a amostra foi submetida ao seguinte programa para amplificação: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos para as etapas seguidas de 95°C por 45 segundos, 59°C por 45 segundos e 72° por 1 minuto, e por fim, 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram purificados utilizando a enzima ExoSAP-IT (USB) de acordo com as instruções do fabricante.

A verificação da qualidade das sequências geradas e a edição de acordo com o eletroforetograma gerado foi realizada pelo software *Sequencher* 5.0. Estas foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o bancos de dados públicos, como o *GenBank/NCBI* (“*National Center for Biotechnology Information*”) e a ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST local - “*Basic Local Alignment Search Tools*”. Os *primers* utilizados para análise de sequenciamento incluem: *primers* universais de Eubacteria *fd1*-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG e *rp2*-ACGGCTACCTTGTTACGACTT, para confirmação da identidade das linhagens; *primers* desenhados no Capítulo I, relacionados com a síntese de xantana (*gumB*, *gumC* e *gumM*) para conhecimento e correlação das sequências estudadas nas linhagens CCMICS 482 e CCMICS 351.

Tabela 01: Sequenciamentos realizados para identificação das linhagens CCMICS 482 e 351, e para conhecimento das sequências amplificadas pelos *primers* de *gumB*, *gumC* e *gumM*.

Gene	Linhagem	Identidade	Correspondência	Nº acesso
<b>Euba 16S</b>	CCMICS 482 ( <i>X. arboricola</i> )	94%	<i>Xanthomonas sp.</i>	HE652100.1
<b>Euba 16S</b>	CCMICS 351 ( <i>E. cloacae</i> )	99%	<i>E. cloacae</i>	AB609039.1
<i>gumB</i>	CCMICS 482 ( <i>X. arboricola</i> )	96%	<i>Xanthomonas sp.</i>	AF427012.1
<i>gumB</i>	CCMICS 351 ( <i>E. cloacae</i> )	81%	<i>E. cloacae</i>	CP002886.1
<i>gumC</i>	CCMICS 482 ( <i>X. arboricola</i> )	92%	<i>Xanthomonas sp.</i>	AF427011.1
<i>gumM</i>	CCMICS 482 ( <i>X. arboricola</i> )	92%	<i>Xanthomonas sp.</i>	NC_010688.1
<i>gumM</i>	CCMICS 351 ( <i>E. cloacae</i> )	86%	<i>E. cloacae</i>	CP002886.1

**APÊNDICE C**

**Curva de crescimento construída por densidade óptica das linhagens CCMICS 351 e CCMICS 482.**

