

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS VIA ENZIMÁTICA ATRAVÉS DE INATIVAÇÃO E LISE CELULAR E COM CÉLULAS VIÁVEIS DE *Beijerinckia* sp. 7070¹

Ângela Nunes MOREIRA^{2,3}, Francisco A. B. DEL PINO⁴, Claire Tondo VENDRUSCOLO^{2,3,*}

RESUMO

Biopolímeros microbianos são polissacarídeos produzidos por microrganismos. A *Beijerinckia* sp. 7070 produz o biopolímero denominado clairana®. Biopolímeros microbianos podem ser produzidos utilizando enzimas purificadas (via enzimática). O objetivo desse trabalho foi avaliar a possibilidade de produzir o biopolímero clairana® via enzimática, verificar se a síntese e as enzimas envolvidas na síntese são intra e/ou extracelulares, se as enzimas permanecem ativas no meio e estudar a produção do biopolímero via enzimática, através de inativação e lise celular, e pelo processo convencional com células viáveis. As amostras foram cultivadas com a bactéria em meio líquido e submetidas à morte celular por inativação e lise celular após 30h, através de antibiótico e ultrassom, respectivamente. Amostras foram retiradas após 32, 46 e 54h de incubação, junto com amostras produzidas com células viáveis. O mesmo procedimento foi realizado em 46h e amostras foram coletadas após 48, 52 e 54h de incubação. Os polímeros foram recuperados, secos, pesados e analisados. Os resultados sugerem que é possível produzir o biopolímero clairana® via enzimática e que, provavelmente enzimas intra e extracelulares estão envolvidas, permanecendo ativas no meio e começando a atuar antes de 30h de fermentação. O processo via enzimática através de lise foi mais eficiente pois libera os polissacarídeos produzidos intracelularmente para o meio externo.

Palavras-chave: biopolímeros microbianos; enzimas; produção; via enzimática.

SUMMARY

STUDY ON THE BIOPOLYMER PRODUCTION BY ENZYMATIC PATHWAY THROUGH CELLULAR INACTIVATION AND LYSE AND WITH VIABLE CELLS BY *Beijerinckia* sp. 7070. Microbial biopolymers are polysaccharides produced by microorganisms. *Beijerinckia* sp. 7070 produces the biopolymer denominated as clairana®. Microbial biopolymers can be produced using purified enzymes (by enzymatic pathway). The aim of this work was to evaluate the possibility to produce the clairana® biopolymer using purified enzymes, to verify if the synthesis and the enzymes involved in the synthesis are intra and/or extracellular, if the enzymes remain active in the medium and to study biopolymer production by enzymatic pathway, through cellular inactivation and lyse, and through conventional process with viable cells. The samples were cultivated with bacteria in liquid medium, and subjected to cellular death through cellular inactivation and lyse after 30h, by antibiotic and ultrason, respectively. Samples were removed 32, 46 e 54h after incubation period, together with samples produced with viable cells. The same procedure was performed after 46h and samples collected after 48, 52 e 54h of incubation period. The polymers were recovered, dried, weighed and analyzed. The results suggest that it is possible to produce the clairana® biopolymer by enzymatic pathway and that, probably, intra and extracellular enzymes are involved, remaining active in the medium and beginning to act before 30h of fermentation. The enzymatic pathway process through cellular lyse is more effective, because it releases the polysaccharides intracellularly produced to medium.

Keywords: microbial biopolymers; enzymes; production; enzymatic pathway.

1 - INTRODUÇÃO

Biopolímeros microbianos são polissacarídeos produzidos por microrganismos, que têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso. O biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 é denominado clairana®. Este pode ser utilizado como agente de suspensão, gelificante, emulsificante e em produtos da linha diet e light, como substituto de gorduras ou como estruturante ou espessante [17]. Além disso, pode substituir as gomas comumente usadas na indústria de alimentos, como o amido e outros, através do desenvolvimento de produtos com propriedades praticamente idênticas ou com melhores características reológicas [14].

A produção de biopolímeros microbianos em meio líquido pode ser pelo cultivo do microrganismo em meio contendo fonte de carbono e sais minerais, processo uti-

lizado atualmente para produção de clairana®. Outro tipo de produção, em meio líquido, é por via enzimática, ou seja, utilizando enzimas purificadas (sem a ação da bactéria). As enzimas são primeiramente produzidas e purificadas e depois, utilizadas para síntese do polímero em meio contendo substrato. O processo via enzimática é utilizado na produção de dextrana [12].

Na produção de exopolissacarídeos (EPS), por bactérias Gram-positivas, enzimas lipoprotéicas extracelulares estão envolvidas e são secretadas na superfície da célula. Já a síntese de EPS (hetero e homopolissacarídeos) por bactérias Gram-negativas é intracelular [16] e instável em diferentes espécies bacterianas, como *Xanthomonas campestris* [11]. Estudos bioquímicos e fisiológicos, demonstram que a síntese de xantana é similar a biossíntese de EPS de outras bactérias Gram-negativas [10, 13]. A *Beijerinckia* sp. 7070 é uma bactéria Gram-negativa, e a sua via biossintética ainda não é conhecida.

A dextrana é produzida pela enzima dextranassacarase, uma glicosiltransferase extracelular que catalisa a clivagem da sacarose, a transferência de resíduos glicosil a partir dessa clivagem para a cadeia de crescimento da dextrana, a formação de ligações glicosídicas usando um açúcar difosfo nucleotídeo como o açúcar doador e a liberação de frutose [2, 4, 5].

¹ Recebido para publicação em 17/07/2002. Aceito para publicação em 14/01/2003 (000885).

² Universidade Federal de Pelotas - Centro de Biotecnologia - Laboratório de Biopolímeros. Cx. Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS. Tel: (053) 275-7350 claire@ufpel.tche.br

³ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

⁴ Departamento de Bioquímica - Instituto de Química e Geociências - UFPel

* A quem a correspondência deve ser enviada.

A biossíntese de xantana é mais complexa e segue os seguintes passos: (1) síntese de precursores UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose a partir da conversão de açúcares simples, (2) transferência de monossacarídeos, a partir do nucleotídeo correspondente para o lípido carregador localizado na membrana da célula, para formar a unidade pentassacarídica repetitiva, (3) adição de grupos acetil e piruvato, que são obtidos a partir de acetil-coA e fosfoenolpiruvato, respectivamente, e (4) polimerização e excreção do polissacarídeo. O local preciso do processo de polimerização e o estágio final da secreção do EPS a partir da membrana citoplasmática, envolvendo a passagem através do periplasma e membrana exterior e a excreção para o ambiente extracelular, ainda são pouco elucidados [6, 15, 16]. Alguns autores consideram que primeiro ocorre a polimerização das unidades pentassacarídicas no interior da célula, e após a excreção do polissacarídeo no exterior [3, 6, 7, 9, 16]. Já segundo KÖPLIN *et al* [10], as unidades pentassacarídicas são secretadas e após polimerizadas.

O estudo da produção de biopolímeros via enzimática é de grande importância pois, além de diminuir os riscos de contaminação, reduz os custos industriais do processo e possibilita a obtenção de produtos com melhores características.

Por isso, os objetivos desse trabalho foram: avaliar a possibilidade de produzir o biopolímero clairana® via enzimática, verificar se a síntese e as enzimas envolvidas na síntese são intra e/ou extracelulares, verificar se as enzimas envolvidas na síntese e na degradação do biopolímero permanecem ativas no meio, mesmo sem a ação de célula bacteriana e estudar a produção do biopolímero clairana® pelo processo via enzimática, através de inativação e lise celular, e pelo processo convencional com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Microrganismo e caracterização morfo-fisiológica e bioquímica

A bactéria utilizada foi a *Beijerinckia* sp. 7070 isolada por VENDRUSCOLO [17], produtora do biopolímero clairana®. Esta bactéria foi caracterizada bioquimicamente e liofilizada para ser utilizada em todo experimento.

2.2 - Antibiograma e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica da diluição em tubos

Foi realizado um antibiograma utilizando o Método de Kirby-Bauer, com o objetivo de determinar quais antibióticos inibem a reprodução celular de *Beijerinckia* sp. 7070. Foram testados os antibióticos: ácido pepimídico (20µg), amicacina (30µg), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), cloranfenicol (30µg), estreptomicina (10µg), kanamicina (30µg), oflaxacina (5µg), rifampicina (30µg), tobramicina (10µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg). Primeiramente, placas com meio yeast malt (YM) ágar foram semeadas com a bactéria e os discos coloca-

dos a uma distância de 15mm entre eles e entre as bordas da placa. As placas foram incubadas a 28°C por 24h e depois observadas para verificação da presença de halos de inibição (zonas claras ao redor dos discos). Os diâmetros desses halos foram medidos e, com o auxílio da Tabela do Boletim COBA da Sociedade Brasileira de Microbiologia [1], foi determinado se a bactéria em teste é considerada sensível, moderadamente sensível (sensibilidade intermediária) ou resistente aos antibióticos.

Para avaliar a viabilidade da produção via enzimática, é preciso obter o caldo de fermentação com as enzimas purificadas secretadas sem a presença de metabolismo celular. Por isso é necessário lisar ou inativar a bactéria. A técnica utilizada para determinação da concentração inibitória mínima, ou seja, a menor concentração de antibiótico necessária para causar a morte celular da bactéria, foi a de diluição em tubos. A tetraciclina, por ser um dos antibióticos ao qual a cepa apresentou sensibilidade e por causar inativação celular, foi adicionada em concentrações crescentes em tubos contendo o meio de crescimento YM e a bactéria. As condições do experimento foram: 28°C, 180rpm por 24h em incubador com agitação. Após esse período os tubos foram observados visualmente e os que se apresentaram turvos, indicaram crescimento celular e os límpidos, inibição do crescimento. Leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm e com os resultados, foram calculados os números aproximados de células viáveis por mL em cada concentração do antibiótico e assim, determinada a menor concentração de tetraciclina necessária para causar a inativação.

2.3 - Produção e produtividade de biopolímeros microbianos utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas

Nesta fase, os experimentos utilizaram produção via enzimática após inativação e após lise celular, e produção convencional com células viáveis. Foi realizada produção com morte celular em dois períodos (30 e 46h) com conseqüente continuação da fermentação.

A produção de biopolímeros foi realizada por fermentação aeróbica em batelada, em incubador agitador New Brunswick Scientific, modelo Innova 4230. O inóculo de 1mL de suspensão bacteriana com 1×10^{10} UFC/mL, preparado a partir de colônias de 24h de crescimento, foi acrescentado a 100mL de meio líquido de produção YM estéril, contendo (g.L⁻¹): (1) K₂HPO₄ 2,0, MgSO₄ 7H₂O 2,7, KH₂PO₄ 13,62; (2) extrato de levedura 0,2, triptose 2,0; (3) sacarose 50,0, através de metodologia de VENDRUSCOLO [17] modificada por PADILHA [12].

No tempo zero, todas amostras contendo o meio adicionado de inóculo foram submetidas às condições de incubação: 24°C, 180rpm. Após 30h de fermentação, parte dessas amostras foi submetida à morte celular através de lise, com o uso de ultrassom (amplitude de 60Hz e pulso de 3s por 10min), e inativação celular, pela adição do antibiótico tetraciclina, na concentração recomendada de 300µg/mL. Foi adicionado ainda, em ambas amos-

tras, azida sódica. Após, seguiu-se o processo de produção e amostras de meio fermentado com células lisadas, inativadas e viáveis (controles) foram retiradas simultaneamente em três tempos diferentes: 32, 46 e 54h de incubação. Outra parte das amostras foi submetida à morte celular, pelos mesmos procedimentos, em 46h, sendo as amostras retiradas em 48, 52 e 54h de incubação. Todas amostras e o experimento foram realizados em triplicata. Os meios fermentados de cada amostra foram centrifugados, para remoção das células, a 16000g, à temperatura de 4° a 14°C por 20 minutos em centrífuga refrigerada. Adicionou-se etanol 95% ao sobrenadante, na proporção de 1:4 (v/v), para recuperação dos biopolímeros, sendo estes secos em estufa a 56°C até atingir peso constante, pesados e triturados. A produção (g/L) de biopolímero das amostras com células lisadas e inativadas em 30 e 46h e viáveis retiradas em cada tempo posterior foram avaliadas pelo peso do produto seco por volume de meio. A produtividade (g/L/h) foi avaliada pelo peso do produto seco por volume de meio e pelo tempo de fermentação.

2.4 - Análise estatística

O teste aplicado foi a análise de variância ANOVA, para verificar se existem diferenças significativas entre os tratamentos. Após aplicou-se o teste de Tuckey, para verificar entre quais tratamentos ocorreu a diferença.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Caracterização morfo-fisiológica e bioquímica da *Beijerinckia* sp. 7070

Para verificar se durante a preservação da bactéria não houve modificações desta, e para caracterizar morfo-fisiologicamente e bioquimicamente a *Beijerinckia* sp. 7070 utilizada nos experimentos, foram realizados testes bioquímicos [18]. Os resultados desses testes estão na *Tabela 1*.

Não houve modificações da bactéria durante a preservação. Após essa caracterização, a bactéria foi liofilizada para ser usada em todo experimento.

3.2 - Antibiograma e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica da diluição em tubos

A *Tabela 2* apresenta os resultados do antibiograma realizado com a bactéria *Beijerinckia* sp. 7070 frente a doze antibióticos diferentes, pelo Método de Kirby-Bauer, utilizando a Tabela do Boletim COBA da Sociedade Brasileira de Microbiologia [1] como referência.

Pela *Tabela 2*, pode-se observar que a *Beijerinckia* sp. 7070 é sensível aos antibióticos: ácido pepimídico, amicacina, cefalotina, cloranfenicol, rifampicina e tetraciclina; resistente a ampicilina, kanamicina, tobramicina e vancomicina e moderadamente resistente a estreptomomicina e oflaxacina.

TABELA 1. Características morfo-fisiológicas e bioquímicas da *Beijerinckia* sp 7070.

Características	<i>Beijerinckia</i> sp. 7070
Morfologia	bastonete
Coloração de Gram	-
Motilidade	-
Coloração em meio YM	Amarela
Oxidase	-
H ₂ S em meio TSI: gás	-
ácido	+
Urease	-
Indol	-
Vermelho de metila	-
Voges proskauer	+
Citrato	+
Liquefação de gelatina	-
Fermentação oxidativa	Fermentativa
(OF) da glicose:	+
Produz gás	+
Produz ácido	
OF da sacarose:	Fermentativa
Produz gás	+
Produz ácido	+
McConkey	crece
EMB	crece

(-): negativo (+): positivo

TABELA 2. Teste de sensibilidade da *Beijerinckia* sp. 7070 frente aos seguintes antibióticos, pelo Método de Kirby-Bauer.

Antibiótico	Sensibilidade ou Resistência
Ácido pepimídico (20µg)	Sensível
Amicacina (30µg)	Sensível
Ampicilina (10µg)	Resistente
Cefalotina (30µg)	Sensível
Cloranfenicol (30µg)	Sensível
Estreptomicina (10µg)	Moderadamente sensível
Kanamicina (30µg)	Resistente
Oflaxacina (5µg)	Moderadamente sensível
Rifampicina (30µg)	Sensível
Tetraciclina (30µg)	Sensível
Tobramicina (10µg)	Resistente
Vancomicina (30µg)	Resistente

A CIM de tetraciclina para *Beijerinckia* sp. 7070 foi de 300µg/mL.

3.3 - Produção e produtividade de biopolímeros microbianos utilizando células viáveis, inativadas e lisadas

Os resultados das médias de produção das amostras de biopolímeros utilizando células inativadas e lisadas em 30h e células viáveis, retiradas em 32, 46 e 54h de incubação estão na *Figura 1*, e dos produzidos com células inativadas e lisadas em 46h e células viáveis, retirados em 48, 52 e 54h estão na *Figura 2*.

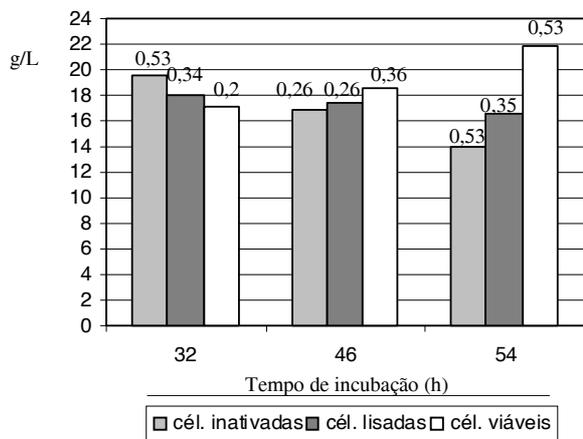


FIGURA 1. Produção de biopolímero (g/L) por células inativadas e lisadas em 30h de cultivo e por células viáveis, retiradas em 32, 46 e 54h de incubação. Os números acima de cada coluna se referem ao desvio padrão.

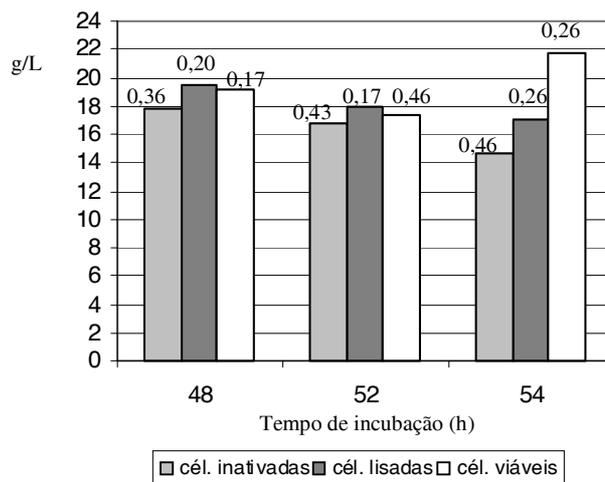


FIGURA 2. Produção de biopolímero (g/L) por células inativadas e lisadas em 46h de cultivo e por células viáveis, retiradas em 48, 52 e 54h de incubação. Os números acima de cada coluna se referem ao desvio padrão.

Na produção de biopolímeros utilizando células viáveis, inativadas e lisadas, observou-se, pela *Figura 1*, que utilizando células viáveis (controle), ocorreu um aumento progressivo na produção de biopolímero de 30 a 46h e de 46 a 54h de cultivo. Já, pela *Figura 2*, observou-se que, na verdade, entre 46 e 54h ocorreu um declínio em 52h e após um novo aumento. Os períodos de aumento na produção se devem, provavelmente, a maior presença de enzimas polimerizantes (polimerases) atuando no meio e o período de declínio, de enzimas degradadoras do polímero formado. A presença de polissacarases ou hidrolases degradadoras do EPS produzido pela bactéria é um problema encontrado tanto em laboratórios como em produções comerciais. Essas enzimas são, geralmente, produtos intracelulares localizados no periplasma. Se as células forem lisadas durante a cultura, as enzimas podem ser liberadas no meio extracelular e degradar o polímero. Outra hipótese é que essas enzimas podem ser secretadas pela célula [15].

Observou-se também, pela *Figura 1*, que as primeiras amostras retiradas (32h) após a morte celular em 30h, tanto por lise como por inativação celular, apresentaram maior produção de biopolímero do que os respectivos controles (com células viáveis), pois provavelmente neste período existiam mais polimerases atuando do que polissacarases. Já nas amostras tratadas em 46h (*Figura 2*), somente as amostras produzidas com células lisadas apresentaram maior produção de polímero do que as com células viáveis (amostras retiradas em 48 e 52h). Além disso, quase todas amostras produzidas com células lisadas com ultrassom apresentaram maior produção de biopolímero do que as inativadas por tetraciclina, sendo que a única exceção foi a amostra produzida com células inativadas em 30h retirada em 32h. A amostra produzida com células lisadas em 30h retirada em 32h e as com células lisadas em 46h retiradas em 48 e 52h apresentaram maior produção do que as amostras dos respectivos horários produzidas com células viáveis.

Esses resultados sugerem que, provavelmente, a produção por *Beijerinckia* sp. 7070 seja similar a de *Xanthomonas campestris*, onde as unidades pentasacáridicas são produzidas intracelularmente, polimerizadas e excretadas para o exterior [2, 5, 6, 8, 15]. A lise celular causou a liberação dos polissacarídeos, que estavam prontos no interior da célula, para o exterior e liberação das polimerases que, provavelmente, agiram polimerizando os oligossacarídeos também liberados.

O estágio final da secreção da xantana no ambiente extracelular, ainda não é bem esclarecido, assim como o local preciso do processo de polimerização [5, 13, 15]. Segundo KÖPLIN *et al* [10], as unidades pentasacáridicas são secretadas e após polimerizadas. Então, nesse caso a lise causaria a liberação dos oligossacarídeos e estes seriam polimerizados por polimerases extracelulares.

Os resultados também sugerem que há várias enzimas envolvidas no processo de síntese e que, provavelmente, a maioria é intracelular e já está ativa em 30 horas de fermentação. A síntese de EPS requer, então, enzimas para produção de cada açúcar nucleotídeo precursor; glicosiltransferases para as adições dos açúcares; uma ou mais polimerases, para a polimerização dos oligossacarídeos e proteínas envolvidas na exportação do polissacarídeo para o meio extracelular [2].

Em 46 horas, provavelmente maiores quantidades de polissacarídeos estavam prontos no interior da célula e foram liberados para o exterior pela lise, pois ocorreu uma maior produção de biopolímero por células lisadas do que por células viáveis tanto 2 horas (em 48h) como 6 horas após a lise (52h). E houve somente um pequeno decréscimo nessa produção após 8 horas (54h). Esse aumento na produção pode ser devido, também, a maiores quantidades de oligossacarídeos secretados através da lise, polimerizados pelas polimerases também liberadas.

A maior produção de polímero pela amostra produzida com células inativadas em 30h retirada em 32h do que pela amostra produzida com células lisadas no mesmo período sugere que em 30h, há predominância de polissacarídeos ou hidrolases no interior da célula que foram liberadas pela lise.

As Figuras 3 e 4 apresentam os resultados da produtividade dos biopolímeros (g/L/h) produzidos por células inativadas e lisadas em 30 e 46h, respectivamente e por células viáveis, retiradas nos três horários diferentes.

A produtividade das amostras produzidas com células viáveis apresentou um acentuado decréscimo de 32 a 46h e permaneceu praticamente constante de 46 a 54h, apresentando uma pequena queda em 52h. Houve uma queda progressiva na produtividade das amostras lisadas e inativadas em 30h e uma queda menos acentuada nas amostras tratadas em 46h. A produtividade das amostras produzidas com células lisadas, em geral, foi maior do que a das produzidas com células inativadas (sendo menor somente na amostra tratada em 30h retirada em

32h) e, em alguns casos, foi maior do que a das amostras produzidas com células viáveis (32 e 52h). Isso se deve, provavelmente, à liberação pela lise de polissacarídeos que estavam prontos no interior da célula e de polimerases.

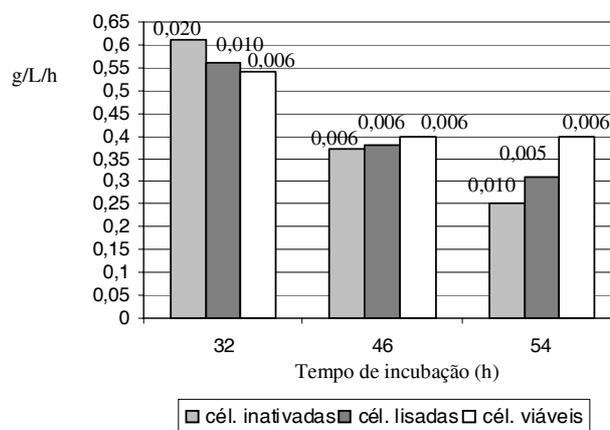


FIGURA 3. Produtividade de biopolímeros (g/L) produzidos por células inativadas e lisadas em 30h de cultivo e por células viáveis, retiradas em 32, 46 e 54h de incubação. Os números acima de cada coluna se referem ao desvio padrão.

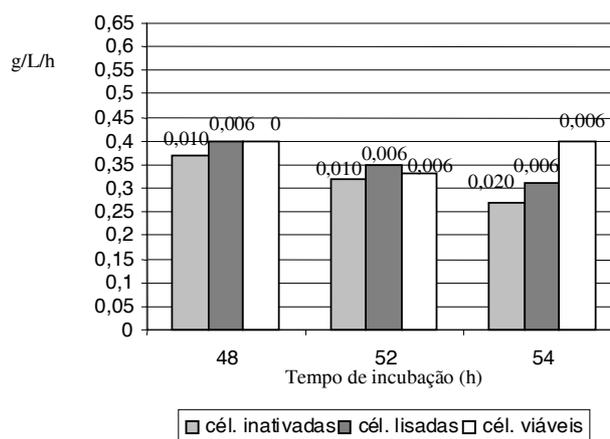


FIGURA 4. Produtividade de biopolímeros (g/L) produzidos por células inativadas e lisadas em 46h de cultivo e por células viáveis, retiradas em 48, 52 e 54h de incubação. Os números acima de cada coluna se referem ao desvio padrão.

O processo via enzimática após lise celular, além de obter maior produção e produtividade de biopolímeros, apresenta a vantagem de não necessitar da etapa de centrifugação para remoção das células.

4 - CONCLUSÕES

- Os resultados sugerem que é possível produzir o biopolímero clairana® via enzimática;
- Provavelmente a maioria das enzimas responsável pela síntese do polímero é intracelular, mas deve existir polimerases extracelulares;

- As enzimas envolvidas na síntese e na degradação do biopolímero permanecem ativas no meio, após serem liberadas e começam a atuar antes de 30h de fermentação;
- Geralmente, a quantidade de polímero produzido pelo processo via enzimática através de lise celular foi maior do que a quantidade produzida por inativação e, em alguns casos, até mesmo maior do que a quantidade produzida pelo processo convencional com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. Uma explicação para esse fato seria que a lise celular causou a liberação dos polissacarídeos, que estavam prontos no interior da célula, para o exterior e liberação das polimerases que agiram polimerizando os oligossacarídeos também liberados.
- O processo utilizando células lisadas apresenta maior potencialidade para produção, pois além de apresentar maior produção e produtividade de biopolímeros, não necessita da etapa de centrifugação para remoção das células.

5 – REFERÊNCIAS

- [1] ANTUNES, G.S. **Manual de Diagnóstico Bacteriológico**. Porto Alegre: Editora da Universidade/ UFRGS, 1991. 109p.
- [2] ARGUELLO-MORALES, M., RUSSELL, R.R.B., MONCHOIS, V. Isolation of an Active Catalytic Core of *Streptococcus downei* MFE28 GTF-I Glucosyltransferase. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.7, p.2290-2292, 1999.
- [3] COPLIN, D.L. & COOK, D. Molecular Genetics of Extracellular Polysaccharide Biosynthesis in Vascular Phytopathogenic Bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.3, n.5, p.271-279, 1990.
- [4] DOLS, M., REMAUD-SIMEON, M., WILLEMOT, R.M., VIGNON, M., MONSAN, P. Characterization of the Different Dextranase Activities Excreted in Glucose, Fructose, or Sucrose Medium by *Leuconostoc mesenteroides* Nrr1 B-1299. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.4, p. 1298-1302, 1998.
- [5] GEREMIA, R.A.E., PETRONI, A., IELPI, L., HENRISSAT, B. Towards a Classification of Glycosyltransferases Based on Amino Acid Sequence Similarities: Prokaryotic α -Mannosyltransferases. **Biochemistry Journal**, v. 318, p.133-138, 1996.
- [6] HARDING, N. E., CLEARY, J. M., IELPI, L. Genetics and Biochemistry of Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*, L. In: HUI, Y. H., KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**, VCH. P. 495-514, 1994.
- [7] HARDING, N.E., RAFFO, S., RAIMONDI, A., CLEARY, J. M., IELPI, L. Identification, Genetic and Biochemical Analysis of Genes Involved in Synthesis of Sugar Nucleotide Precursors of Xanthan Gum. **Journal of General Microbiology**, v.139, p. 447-457, 1993.
- [8] KASAPIS, S., MORRIS, E.R., GROSS, M., RUDOLPH, K. Solution Properties of Levan Polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseocola*, and its Possible Primary Role as a Blocker of Recognition during Pathogenesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 55-64, 1993.
- [9] KATSEN, F. D., FERREIRO, U., ODDO, C. G., IELMINI, M. V., BECKER, A., PUHLER, A., IELPI, L. *X. campestris* pv *campestris* Gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n.7, p 1607-1617, 1998.
- [10] KÖPLIN, R., ARNOLD, W., HÖTTE, B., SIMON, R., WANG, G.E., PÜHLER, A. Genetics of Xanthan Production in *X. campestris*: the *xanA* and *xanB* Genes are Involved In UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n.1, p.191-199, 1992.
- [11] MARTINS, L., SÁ-CORREIA, I. Temperature Profiles of Gellan Gum Synthesis and Activities of Biosynthetic Enzymes. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 20, p. 385-395, 1994.
- [12] PADILHA, F. F. Estudo da compartimentalização das enzimas para produção de biopolímeros por *Beijerinckia* sp. 7070. Pelotas, 1997. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPeL).
- [13] SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides - structure and function. **International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology**, v.113, p. 187-231, 1988.
- [14] SUTHERLAND, I.W. The role of acylation in exopolysaccharides including those for food use. **Food Biotechnology**, v.6, n. 1, p. 75-86, 1992.
- [15] SUTHERLAND, I. W. Microbial Biopolymers from Agricultural Products: Production and Potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 249-261, 1997.
- [16] SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663-674, 2001.
- [17] VENDRUSCOLO, C.T. Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil. Campinas, 1995. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [18] WILLIAMS & WILKINS. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Krieg, Baltimore. 1984.