

JUAN CAMILO RONCALLO SARMIENTO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE WEIMBERG
SOBRE O CATABOLISMO DE XILOSE NA LINHAGEM
PRODUTORA DE PHA_{MCL} *Pseudomonas* sp. LFM046**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

São Paulo
2017

JUAN CAMILO RONCALLO SARMIENTO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE WEIMBERG
SOBRE O CATABOLISMO DE XILOSE NA LINHAGEM
PRODUTORA DE PHA_{MCL} *Pseudomonas* sp. LFM046**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Roncallo Sarmiento, Juan Camilo
Avaliação da expressão de genes da via de
Weimberg sobre o catabolismo de xilose na linhagem
produtora de PHAMCL Pseudomonas sp. LFM046 / Juan
Camilo Roncallo Sarmiento; orientadora Luiziana
Ferreira da Silva. -- São Paulo, 2017.
131 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Pseudomonas LFM046. 2. Catabolismo de xilose.
3. Via de Weimberg. 4. Expressão heteróloga. I.
Ferreira da Silva, Luiziana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Juan Camilo Roncallo Sarmiento

Titulo da Dissertação/Tese: Avaliação da expressão de genes da via de Weimberg sobre o catabolismo de xilose na linhagem produtora de PHA_{MCL} *Pseudomonas* sp. LFM046

Orientador: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

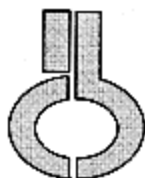
() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 686/14 referente ao projeto intitulado: "*Construção de recombinante de Pseudomonas sp. capacitando-a a utilizar xilose para produzir o polímero biodegradável*" sob a responsabilidade de **Juan Camilo Roncallo Sarmiento**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Nada disto seria possível sem o amor, paciência e sabedoria transmitida por Deus a través de todos aqueles que, fies a Ele, estiveram no meu lado. Muito obrigado a Ele e todos eles.

A meus pais, irmão e primos, que sem importar a distância, sempre devam o jeito de me infundir coragem, força, e todo o necessário para começar esta etapa, continuar quando se fraqueava, e superar toda dificuldade, além celebrar comigo as vitórias ao longo do processo e que me levaram a culminar satisfatoriamente este processo.

À Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva pela oportunidade oferecida e ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera pelas recomendações e comentários. À Dra. Marilda Keico Taciro, por sua acolhida durante o estágio, e todos os ensinamentos referentes a biorreatores.

A Karel Olavarria e Juliana C. Rezende, que dedicaram de seu tempo para me ensinar o mundo da pesquisa, e sem os quais este trabalho não teria sido possível, ou pelo menos teria sido muito mais complexo de desenvolver.

A minha família no Brasil: Mairita, Zeto G., María 3 mulheres fantásticas que trouxeram alegria, pouquíssimos momentos de desconformidade, mas que sempre primava o carinho e o respeito entre nós. Aos meus amigos no Brasil: Aleja F., Henrique, Mireia, Juliana C. Rezende, Simone Ichiwaki, Roger, Ruth, León, Juliano Cherix, Carlos Fajardo e Karen Lopez, que além de colegas foram/são amigos que fizeram amenos os tempos difíceis e sempre estiveram disponíveis para dar uma mão e ajudar, bater um papo, ou mesmo trazendo alegria. Especialmente a Henrique Oliveira, Mireia Recio, pelo tempo de trabalho tentando resolver enigmas, situações sem sentido, padronizando alguma técnica, limpando freezers ou simplesmente bater um papo entre experimentos. E a Juliana C. Rezende muito obrigado por ser colega, conselheira, guia turística, revisora, etc. o que se resume numa sincera e incondicional amizade, muito obrigado!

A todos os técnicos e colegas que passaram, ou ainda estão no laboratório de bioproductos.

A todos os que sem ter a ver no âmbito acadêmico me ajudaram neste processo, especialmente à família RC.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro.

“Obedece más a los que enseñan
que a los que mandan”

San Agustín

RESUMO

Sarmiento JCR. Avaliação da expressão de genes da via de Weimberg sobre o catabolismo de xilose na linhagem produtora de PHA_{MCL} *Pseudomonas* sp. LFM046. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016

Pseudomonas sp. LFM046 produz polímeros biodegradáveis da família dos polihidroxialcanoatos (PHA), com composição monomérica variada e com teor controlável, o que permite grande variedade de aplicações. A produção de PHA a partir de xilose, presente na hemicelulose, tem sido proposta como forma de reduzir custos de produção. No entanto, esta linhagem é incapaz de utilizar xilose eficientemente como fonte de carbono. Neste trabalho, após submeter LFM046 a subcultivos sucessivos frente a xilose como única fonte de carbono, foi selecionado o clone LFM1525, que demonstrou maior concentração de crescimento em comparação à linhagem parental, após 10 dias de incubação em meio mineral sólido com xilose como única fonte de carbono (MMX). Outra estratégia adotada foi a avaliação do operon *xylXABCD*, codificador da via de Weimberg, responsável pelo catabolismo de xilose em *Caulobacter crescentus*, na linhagem LFM046, mediante sua expressão heteróloga. Para isto, primeiro foi avaliada a proposta *in silico* pela Análise de Balanço de Fluxos (FBA), utilizando uma rede metabólica elaborada para representar a linhagem LFM046 contendo o operon, e simulando situações de produção de PHA associada e não associada ao crescimento. Estas simulações geraram distribuições de fluxos coerentes com dados relatados na literatura, indicando que, em nível estequiométrico e de balanço de massas, a proposta é factível, viabilizando-se a construção das linhagens recombinantes. A partir do plasmídeo de expressão p3cR foram construídos os vetores p3cR-X1 – contendo o operon *xylXABCD* – e p3cR-X2 – contendo o operon junto com o simporter de *Burkholderia sacchari*, *xylE*. Os recombinantes obtidos por eletrotransformação foram testados ao longo de 15 dias em diferentes meios de cultura contendo xilose. A avaliação da transcrição por *RT-PCR* das construções confirmou a funcionalidade do promotor *tac*, contudo o novo sequenciamento indicou a presença de substituições nucleotídicas no vetor p3cR-X2. Baseados nestes resultados, sugere-se que eventos pós-transcricionais tenham afetado o catabolismo de xilose. No entanto, foi evidente a melhora quanto ao consumo de xilose e produção de biomassa nos recombinantes contendo o vetor p3cR-X1. Finalmente, a partir de uma cultura de LFM046, submetida a congelamento e descongelamentos a -80 °C, foi detectado um único clone capaz de crescer em xilose. Em 2015 foi descrita *P. taiwanensis*, naturalmente capaz de utilizar a xilose pela via de Weimberg, que possui um operon composto por três genes, menor em comparação ao de *Caulobacter*, mas apresentando alta identidade com três proteínas deste. A busca no genoma de LFM046 por genes codificadores de proteínas homólogas a XylX, XylA e XylD, identificou duas proteínas com 58 e 74% de identidades com XylA, e uma proteína com 38% de identidade com XylD. Estes resultados podem subsidiar o entendimento dos resultados obtidos neste trabalho, bem como a proposição de novas estratégias para o melhoramento do uso de xilose por LFM 046.

Palavras-chave: Catabolismo de xilose. Engenharia metabólica. Via de Weimberg. *Pseudomonas* sp. LFM046. Análise de Balanço de Fluxos.

ABSTRACT

Sarmiento JCR. Evaluation of gene expression of the Weinberg pathway on the xylose catabolism in the de PHA_{MCL}-producing strain *Pseudomonas* sp. LFM046. [Master thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016

Pseudomonas sp. LFM046 produces biodegradable polymers of the family of polyhydroxyalkanoates (PHA), with varying monomer composition and controllable content, which confers wide variety of applications. The production of PHA from xylose, present in hemicellulose, has been proposed to reduce production costs. However, this strain is unable to utilize xylose efficiently as a sole carbon source. In this work, after subjecting LFM046 to successive subcultures in a mixture of glucose and xylose, the clone LFM1525 was selected, which showed higher growth compared to the parental strain after 10 days of incubation in solid mineral medium with xylose as sole carbon source (MMX) Another strategy adopted was the evaluation of *xyIXABCD* operon, coder of the Weimberg pathway, responsible for xylose catabolism in *Caulobacter crescentus*, in the LFM046 strain, through its heterologous expression. For this, first the *in silico* proposal was evaluated by Flux Balance Analysis (FBA), using a metabolic network elaborated to represent the LFM046 strain containing the operon, and simulating situations of growth associated PHA production and non-growth-associated production. These simulations generated consistent flux distributions in comparison with reported data, indicating that, at stoichiometric and mass balance levels, the proposal is feasible, enabling the construction of the recombinant strains. From the expression plasmid (p3cR), the p3cR-X1 vector – containing the operon *xyIXABCD* - and the p3cR-X2 vector – containing the operon with the symporter of *Burkholderia sacchari*, *xylE* – were constructed. The recombinants obtained by electrotransformation were tested over 15 days in different culture media containing xylose. The evaluation of transcription by *RT-PCR* confirmed the functionality of the *tac* promoter, however a new sequencing of construction p3cR-X2 indicated the presence of nucleotide substitutions. Based on these results, was suggested that post-transcriptional events have affected xylose catabolism. However, the improvement in xylose consumption and biomass production in recombinants containing the p3cR-X1 vector was evident. Finally, from a culture of LFM046, subjected to freezing and thawing at -80 °C, a single clone capable of growing in xylose was detected. In 2015, *P. taiwanensis* was described as naturally capable of using xylose by the Weimberg pathway, which has an operon composed of three proteins, reduced in comparison to operon present in *Caulobacter*, but presenting high identity with three gens of it. Searching in LFM046 genome for XylX, XylA and XylD homologous proteins, two proteins with 58 and 74% identity with XylA, and a protein with 38% identity with XylD was identified. These results can support the understanding of the results obtained in this work, as well as the proposal of new strategies for the improvement of the use of xylose by LFM 046.

Keywords: Xylose catabolism. Metabolic engineering. Weinberg pathway.
Pseudomonas sp. LFM046. Flux Balance Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Célula bacteriana contendo grânulos de PHA.....	32
Figura 2 - Fórmula química geral dos PHA.....	33
Figura 3 - Estrutura química da xilose.....	35
Figura 4 - Vias do catabolismo de xilose. Via de Dahms em azul; Via de Weimberg em verde; Via da xilose isomerase em laranja; e Via da xilose redutase em roxo	36
Figura 5 – Esquema da elaboração de um modelo baseado em dados genômicos	40
Figura 6 – Resultados das simulações geradas com o <i>core</i> construído contendo a via de Weimberg	60
Figura 7 – Fatores de conversão da fonte de carbono (xilose) em PHA obtidos considerando as diferentes velocidades específicas de crescimento de <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046.....	61
Figura 8 – Distribuição de fluxos para o acúmulo associado e não associado ao crescimento	63
Figura 9 – Estratégia empregada para clonagem dos genes de interesse nos diferentes vetores plasmídicos.....	66
Figura 10 – Perfil de migração em gel de agarose dos produtos de <i>PCR</i> para confirmar a construção do vetor pJET- <i>xyIXABCD</i>	68
Figura 11 – Perfil de migração em gel de agarose dos produtos de <i>PCR</i> do gene <i>xyIE</i> para confirmar a construção pJET- <i>xyIE</i>	69
Figura 12 – Representação da sequência sintetizada contendo as regiões reguladoras	69
Figura 13 – Perfil de migração em gel de agarose de produtos de digestão e <i>PCR</i> para confirmar a construção p3cR.....	70
Figura 14 – Mapa do plasmídeo p3cR sem inserto alvo deste trabalho e contendo o operon e o transportador	71
Figura 15 – Perfil de migração de mapas de restrição para conferir as construções p3cR-X1 e p3cR-X2 junto com a predição <i>in silico</i>	72
Figura 16 – Perfil de migração em gel de agarose mostrando a integridade do RNA total extraído da cultura de <i>Pseudomonas</i> sp. LFM1526 e LFM1527.....	74

Figura 17 – Perfil de migração em gel de agarose dos produtos de <i>PCR</i> a partir de cDNA	75
Figura 18 – Esquema dos ensaios realizados no trabalho	76
Figura 19 – Curvas de concentração de xilose em função do tempo de cultivo das linhagens de <i>Pseudomonas</i> sp. cultivadas em MMXYe	78
Figura 20 – Curvas de concentração de xilose em função do tempo de cultivo das linhagens de <i>Pseudomonas</i> sp. cultivadas em MMX.....	78
Figura 21 – Coloração de Gram das linhagens de <i>Pseudomonas</i> sp. cultivadas em MMX e meio LB	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bactérias e plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho	48
Tabela 2 – Condições da reação de PCR usando o kit Phusion High-Fidelity (NEB)	50
Tabela 3 – Condições da reação de PCR usando a enzima Taq (Promega)	50
Tabela 4 – Programas de ciclagem utilizando o kit Phusion High-Fidelity.....	51
Tabela 5 – Programas de ciclagem utilizando a enzima Taq	51
Tabela 6 – Resultados comparativos (BLASTP) de proteínas envolvidas em vias de reparo em espécies de <i>Pseudomonas</i> com proteínas presentes em <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046.....	58
Tabela 7 – Dados de concentração de xilose e biomassa, consumo de xilose e produção de biomassa e rendimentos calculados do ensaio 2.....	80
Tabela 8 – Dados de concentração de xilose e biomassa, consumo de xilose e produção de biomassa e rendimentos calculados do ensaio 3.....	82
Tabela 9 – Resultados comparativos (BLASTP) de proteínas envolvidas na via de Weimberg de <i>C. crescentus</i> e <i>P. taiwanensis</i> com proteínas presentes em <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6PG	6-fosfogluconato
µg	Micrograma
µM	Micromolar
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
BCP	Banco de células primário
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CIT	Citrato
CoA	Coenzima A
COBRA	<i>Constraint-based reconstruction and analysis</i>
DHDX	2-ceto-3-desoxi-xilonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPT	Semialdeído-α-cetoglutárico
<i>e.g.</i>	Por exemplo, do latim <i>exempli gratia</i>
E4P	Eritrose-4-fosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
<i>Epsilon</i>	Do inglês, Enhancer of Protein Synthesis Initiation
<i>etc.</i>	E o resto, do latim <i>et cetera</i>
F6P	Frutose-6-fosfato
<i>FBA</i>	Análise de Balanço de Fluxos, do inglês <i>Flux-Balance Analysis</i>
FUM	Fumarato
G6P	Glicose-6-fosfato
GA3P	Gliceraldeído-3-fosfato
H ⁺	Prótons
HB-co-HA _{MCL}	Hidroxibutirato e hidroxialcanoato de cadeia media
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICT	Isocitrato
Kan	Canamicina
Kb	Quilobases
LB	Luria Bertani
M	Molar

MAL	Malato
MM	Meio Mineral
mmol	Milimol
MMX	Meio Mineral Xilose
MMXK	Meio Mineral Xilose com Canamicina
MMXKYe	Meio Mineral Xilose com Canamicina e Extrato de levedura
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEB	New England Biolabs
NGS	Sequenciadores de nova geração, do inglês <i>Next-Generation Sequencing</i>
OAA	Oxaloacetato
OXO	α -cetogluturato
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEP	Fosfoenolpiruvato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHAMCL	Polihidroxialcanoatos com monômeros de cadeia média, do inglês <i>medium chain length</i>
PHASCL	Polihidroxialcanoatos com monômeros de cadeia curta, do inglês <i>short chain length</i>
R5P	Ribose-5-fosfato
RBS	Sítio de união o ribossomo, do inglês <i>Ribosomal Binding Site</i>
RL5P	Ribulose-5-fosfato
rpm	Revoluções por minuto

<i>RT-PCR</i>	Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa, do inglês <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
S7P	Sedoeptulose-7-fosfato
SUC	Succinato
SUC-CoA	Succinil coenzima A
TAE	Tris-acetato-EDTA
USP	Universidade de São Paulo
X5P	Xilose-5-fosfato
XLC	Xilonolactona
XNT	Xilonato

LISTA DE SIMBOLOS

~: aproximadamente

$\mu\text{g mL}^{-1}$: microgramas por mililitro

$^{\circ}\text{C}$: graus Célsius

g L^{-1} : gramas por litro

m/v: massa por volume

mg L^{-1} : miligramas por litro

mL L^{-1} : mililitro por litro

$\text{mmol gDW}^{-1} \text{h}^{-1}$: milimol por grama de massa seca de células por hora, do inglês
millimoles per gram dry cell weight per hour

ng L^{-1} : nanogramas por litro

v/v: volume por volume

$Y_{(P/S)}$: Fator de conversão de substrato a produto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1	Polihidroxicanoatos (PHA)	32
2.2	Fontes renováveis para produção de PHA	34
2.3	Catabolismo da xilose	35
2.4	Engenharia metabólica em linhagens produtoras de PHA	37
2.5	Análise de Balanço de Fluxos (FBA)	39
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivos específicos	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	Meios de cultura	44
4.2	Banco de células primário (BCP)	44
4.3	Evolução de <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046	45
4.3.1	<i>Cultivo</i>	45
4.4	Provas confirmatórias	45
4.5	Construção de recombinantes	46
4.5.1	<i>FBA</i>	46
4.5.2	<i>Linhagens, vetores e sequências</i>	47
4.5.3	<i>Manipulação de DNA</i>	49
4.5.3.1	<u>Extração e quantificação do DNA</u>	49
4.5.3.2	<u>Amplificação dos genes por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</u>	50
4.5.3.3	<u>Eletroforeses analítica de DNA</u>	52
4.5.3.4	<u>Clonagem de genes nos vetores</u>	52
4.5.3.5	<u>Digestão de DNA empregando enzimas de restrição</u>	53
4.5.3.6	<u>Validação dos genes clonados a partir do sequenciamento</u>	53
4.5.4	<i>Análise da expressão heteróloga dos genes da via de Weimberg clonados na <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 por reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR)</i>	54
4.6	Avaliação quanto ao consumo de xilose das linhagens obtidas	55
4.6.1	<i>Determinações analíticas</i>	55

4.6.1.1	<u>Concentração de biomassa produzida</u>	55
4.6.1.2	<u>Quantificação de xilose residual</u>	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	Evolução de <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046.....	57
5.2	FBA.....	59
5.3	Clonagem dos genes da via Weimberg e de um transportador de xilose em <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046	66
5.4	Validação da expressão gênica da via de Weimberg clonada na <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 por RT-PCR	73
5.5	Avaliação quanto ao consumo de xilose das linhagens obtidas	75
6	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICES	103
A	– Sequências dos iniciadores utilizados no trabalho	105
B	– Reações eliminadas e inseridas para elaboração do core utilizado nas simulações in silico no COBRA.....	107
C	– Metabólitos utilizados no COBRA	108
D	– Reações utilizadas no COBRA	110
E	– <i>Output</i> de dados do <i>loop</i> aninhado.....	113
F	– Resultado do <i>Local</i> BLAST realizado para validar a clonagem do operon <i>xyIXABCD</i>	115
G	– Resultado do <i>Local</i> BLAST realizado para validar a clonagem do gene <i>xyle</i>	115
H	– Resultado do local blast dos primeiros ~ 500 pb do operon	116
I	– Resultado do local blast dos últimos ~ 500 pb do operon	116
J	– Dados de xilose residual e consumo de xilose do ensaio 1	117
K	– Dados e curvas de xilose residual, consumo de xilose e massa seca do ensaio 2	118
L	– Dados e curvas de xilose residual, consumo de xilose e massa seca do ensaio 3	120
M	– Dados experimentais, curvas de consumo de xilose e produção de biomassa, e cálculo de fatores de conversão do ensaio 4.....	121

N – Dados experimentais, curvas de consumo de xilose e produção de biomassa, e cálculo de fatores de conversão do ensaio 5	123
O – Resultados comparativos (blastp) de proteínas envolvidas em diferentes vias de catabolismo de xilose com proteínas presentes em <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046	125
ANEXOS	127
A - Protocolo de extração de DNA genômico	129
B - Protocolo de extração de DNA plasmidial	130
C - Protocolo de purificação de bandas de DNA.....	131

1 INTRODUÇÃO

Os Polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres naturais produzidos por algumas espécies bacterianas a partir de matérias-primas renováveis e acumulados sob a forma de grânulos intracelulares, sendo utilizados por estas como reserva de carbono, energia ou equivalentes redutores por diversas bactérias (Anderson, Dawes 1990). PHA são sintetizados majoritariamente, mas não obrigatoriamente em condições de excesso de fonte de carbono e limitação de nutrientes essenciais, como por exemplo, nitrogênio, fósforo, ferro, magnésio, potássio ou oxigênio, etc. Estes grânulos podem representar até 80% em peso da biomassa bacteriana e sendo utilizados por estas quando há escassez de carbono e/ou energia para o seu crescimento celular (Prados, Maicas 2016).

Os PHA, são polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos (Valappil et al., 2006) que apresentam diferentes propriedades físicas: termoplásticas (como por exemplo os PHA de cadeia curta - PHA_{SCL}), elastoméricas (como por exemplo os PHA de cadeia média - PHA_{MCL}) ou propriedades intermediárias (PHA_{SCL} - PHA_{MCL}), dependendo do conteúdo e tipo de monômeros na cadeia principal do polímero, características que os colocam como candidatos a substituir os plásticos de origem petroquímica (Lu et al., 2004).

Uma das grandes dificuldades na produção de PHA é o valor da fonte de carbono utilizada durante a sua produção. PHA são produzidos normalmente a partir de açúcares, principalmente glicose, que são substratos de alto valor agregado, impactando no preço final do biopolímero e conseqüentemente inviabilizando este bioprocessos, tornando-o não competitivo quando comparado ao sistema de produção de baixo custo de polímeros, que usam tradicionalmente derivados de petróleo como precursores no processo (Lopes et al., 2009b; Rodríguez-Contreras et al., 2015). A fim de resolver este problema, fontes de carbono alternativas vêm sendo utilizadas, como por exemplo o bagaço de cana, que é um resíduo agroindustrial derivado da produção do etanol, que em média 25% de sua massa seca é hemicelulose. Por safra podem-se obter valores na ordem de 10^7

toneladas de xilose após hidrólise do bagaço (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Kondo et al., 2013; Laluce et al., 2012). Baseado em isto, uma análise econômica realizada no contexto de uma bioRefinaria, revelou que seria viável e sustentável a integração de dois processos: 1) a produção de PHA a partir da xilose presente no bagaço de cana e 2) a produção de etanol por leveduras sendo utilizada a glicose como fonte de carbono, reduzindo os custos com a matéria prima na produção destes bioprodutos (Raicher 2011; Silva et al., 2014).

Deste modo, xilose como matéria-prima apresenta-se como uma alternativa promissora para a geração de diversos bioprodutos, sendo estudada no Laboratório de Bioprodutos para produção de PHA (PHA_{SCL} e PHA_{MCL}) por diferentes linhagens bacterianas com o intuito de ampliar o nosso conhecimento acerca das vias metabólicas utilizadas por estas linhagens para a produção de biopolímeros (Lopes et al., 2014; Lopes et al., 2011; Lopes et al., 2009a; Lopes et al., 2009b). Estudos anteriores do grupo, tiveram como resultado o isolamento de linhagens bacterianas, em solo de canavial, acumuladoras de PHA, e entre estas, a linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046 apresentou uma alta eficiência na conversão de carboidratos a PHA_{MCL}, alcançando de 60-70% da biomassa desta (Gomez et al., 1996). Uma vez que esta linhagem não é capaz de utilizar a xilose como fonte de carbono para a produção de PHA, ferramentas de engenharia metabólica tem sido utilizadas com o objetivo de reverter esta característica nesta linhagem.

Estudos deste tipo já foram realizados anteriormente para capacitar ou mesmo melhorar a utilização da xilose em alguns microrganismos, como por exemplo, em leveduras e algumas linhagens bacterianas tais como, *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. e *Propionibacterium* sp. (Cherix 2015; Lee et al., 2016; Peng et al., 2015; Wei et al., 2016). O potencial de inserir ou modificar vias da degradação de xilose (clonando ou inativando genes) em algumas bactérias tem sido avaliado (Cherix 2015). Análises dos genomas de algumas espécies capazes de utilizar xilose indicaram a presença da via da xilose isomerase em *Burkholderia sacchari* e *E. coli* (David, Wiesmeyer 1970) e da via de Weimberg em *Herbaspirillum seropedicae* e

Caulobacter crescentus, sendo esta última amplamente descrita na literatura (Stephens et al., 2007b; Stephens et al., 2007a).

Meijnen e colaboradores (2009) obtiveram bons resultados ao clonar genes da via de Weimberg em *Pseudomonas* tolerante a solventes para capacitá-la a consumir xilose como única fonte de carbono. Este trabalho serviu como referência para o desenvolvimento deste estudo visando tornar *Pseudomonas* sp. LFM046 uma linhagem produtora de PHA_{MCL} a partir de xilose.

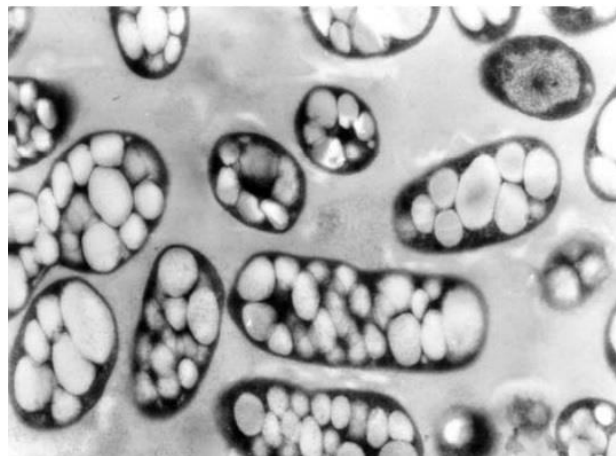
Com o intuito de economizar tempo e dinheiro com reagentes, avaliar ou mesmo prever se a inserção ou a deleção de genes, bem como outras modificações genéticas, serão viáveis à célula bacteriana, simulações *in silico* podem ser previamente realizadas. As simulações são realizadas a partir da utilização de modelos metabólicos “core” ou em escala genômica para a linhagem em estudo, construídos a partir de um conjunto de equações estequiométricas, definidas pela caracterização de proteínas inferidas a partir de dados da anotação gênica de seu genoma. Isto é conhecido como biologia de sistemas, uma área focada na construção de modelos *in silico* baseados nos metabolismos, representados pelas reações químicas dos sistemas biológicos, utilizando também a informação proveniente do genoma, validados com dados experimentais (Becker et al., 2007). Assim, testes *in vitro* podem ser realizados baseados em previsões efetuadas pelo modelo, dando indícios do possível comportamento do sistema biológico para assim antecipar diferentes situações ou até diminuir o número de testes experimentais a serem realizados.

Dado então: (1) o potencial de *Pseudomonas* sp. LFM046 na produção de PHA_{MCL}; (2) a disponibilidade de xilose oriunda de bagaço de cana; e (3) trabalhos anteriores provando que a via de Weimberg sustenta o metabolismo de outras *Pseudomonas*, o presente trabalho teve como objetivo clonar e avaliar o funcionamento de genes envolvidos na via de catabolismo de xilose, mais especificamente, genes da via de Weimberg, de *Caulobacter crescentus*, na linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os poliésteres são polímeros naturais ou sintéticos com grupos éster funcionais na cadeia principal. A maior parte dos poliésteres naturais é sintetizada por diferentes espécies de plantas e bactérias (Mokhtarzadeh et al., 2016). Um grupo de polímeros de origem bacteriana, conhecidos como PHA são acumulados em grânulos intracelulares de reserva de energia por numerosas espécies (Figura 1), mais expressivamente quando nutrientes essenciais para o crescimento, tais como nitrogênio, enxofre ou fosfatos, encontram-se em concentração limitada e existe um excesso de fonte de carbono disponível (Prados, Maicas 2016).

Figura 1 - Célula bacteriana contendo grânulos de PHA

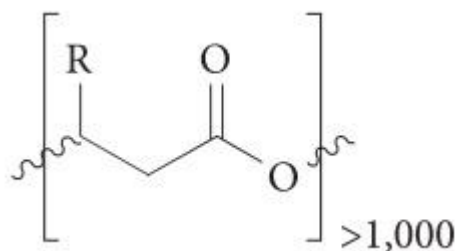


Fonte: Adaptada de Rita C. Paro Alli – IPT.

2.1 Polihidroxicarboxilatos (PHA)

Os PHA são biopoliésteres alifáticos que consistem geralmente de 3-, 4-, 5- e 6-ácidos hidroxicarboxílicos (Figura 2) (Mokhtarzadeh et al., 2016), e podem ser produzidos a partir de diversos substratos e matérias primas renováveis, como o açúcar de cana, materiais amiláceos e óleos vegetais (Anderson, Dawes 1990; Vanzin 2008).

Figura 2 - Fórmula química geral dos PHA



R: cadeia alquílica de 1-11 átomos de carbono. Fonte: adaptada de (Rehm 2010).

Desde a descoberta da primeira espécie bacteriana capaz de produzir biopolímero, *Bacillus megaterium*, são descritos na literatura mais de 300 linhagens diferentes produtoras de PHA e mais de 150 monômeros diferentes (tais como hidroxibutirato e hidroxivalerato) (Huang et al., 2016). Segundo Steinbuechel e Valentin (1995) os PHA são divididos em dois grandes grupos: PHA contendo monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL} – monômeros C3 a C5 na cadeia principal) e PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL} – monômeros C6 a C14 na cadeia principal).

Dependendo da extensão da cadeia e do tipo de monômeros na cadeia principal do polímero, estes podem apresentar diferentes propriedades físicas: PHA_{SCL} possuem propriedades termoplásticas, enquanto PHA_{MCL} apresentam propriedades elastoméricas. PHA constituídos por ambos tipos de monômeros (PHA_{SCL} e PHA_{MCL}) têm chamado muita atenção devido às propriedades intermediárias em comparação com aqueles contendo apenas um dos tipos de monômero (Lu et al., 2004). No entanto, devido à especificidade das enzimas envolvidas no acúmulo de PHA, este tipo de polímero é mais difícil de ser naturalmente acumulado em grandes quantidades (Mendonça et al., 2014; Mendonça 2010), além de ser sintetizado por um número menor de bactérias, dificultando a sua produção em escala industrial.

Outras características físicas a serem destacadas é que os PHA apresentam uma cristalinidade que varia entre 30% e 70%, temperatura de fusão de 50 °C a 180 °C, são insolúveis em água e atóxicos. Todas estas características fazem os “bioplásticos” (PHA) comercialmente relevantes e bastante atrativos, sendo vistos

como uma alternativa renovável e biodegradável para substituir plásticos derivados de petróleo (Rehm 2010; Valappil et al., 2006). Materiais produzidos com bioplásticos possuem uma grande aplicabilidade e podem ser usados na indústria de embalagens, na área médica, farmacêutica, na agricultura, indústria alimentar, como matéria-prima para produtos químicos, bem como na produção de tintas (Valappil et al., 2006).

2.2 Fontes renováveis para produção de PHA

Uma das grandes dificuldades na produção de PHA é o impacto do valor da fonte de carbono, empregada como substrato, no preço final do produto. Geralmente a produção se dá a partir de açúcares de alto custo, principalmente glicose, resultando na baixa competitividade desses bioprocessos frente aos sistemas de produção de baixo custo de polímeros, que usam tradicionalmente derivados de petróleo como precursores no processo (Lopes et al., 2009b; Rodríguez-Contreras et al., 2015). Não obstante, resíduos agrícolas como os materiais lignocelulósicos surgem como alternativa promissora para diminuir o custo de produção destes bioplásticos (Zhang et al., 2015).

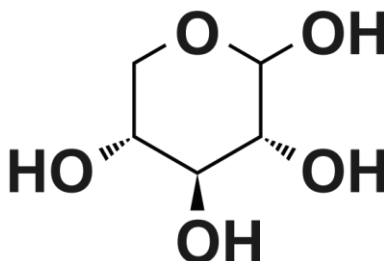
No Brasil, segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar, cerca de 666,824 milhões de toneladas de palha e bagaço de cana-de-açúcar foram geradas por safra na temporada 2015/16 (UNICA, 2016), estando todo este montante disponível para ser utilizado como matéria-prima para produção de PHA (Huang et al., 2016; Silva et al., 2014). Considera-se que em média 25% (massa seca) do bagaço de cana é hemicelulose (Canilha et al., 2012) que é composta por 70-80% de xilose (Brienzo et al., 2010; Pessoa Jr. et al., 1997), sendo que pelo menos 50% desta xilose pode ser recuperada após hidrólise do bagaço da cana, o que resulta em valores próximos da ordem de 10^7 toneladas de xilose disponíveis por safra.

Raicher (2011) realizou uma análise de viabilidade econômica da produção de PHA a partir de xilose, integrando processos de produção de etanol de primeira e segunda geração no contexto de uma biorefinaria (Raicher 2011). Se a xilose fosse

utilizada para a produção de biopolímero, a glicose poderia ser empregada de forma convencional: na fermentação de etanol por linhagens selvagens de levedura, podendo-se assim constituir um sistema no qual tanto a produção do etanol de segunda geração como a produção de PHA seja sustentável e complementar, reduzindo a competição destes produtos pelo uso da mesma fonte de carbono (Silva et al., 2014).

A xilose é o segundo açúcar mais abundante na natureza (Beall et al. 1991; Lopes et al., 2009b) (Figura 3), pode ser recuperada mais facilmente e em melhores rendimentos a partir da hemicelulose por hidrólise ácida, além de custar metade do preço do que a mesma quantidade de glicose (Huang et al., 2016; Koller et al., 2010; Sun, Cheng 2002). Contudo, apesar de alguns microrganismos nativos serem capazes de utilizar essa pentose, a maior parte dos organismos não podem consumir xilose como fonte única de carbono (Zhang et al., 2015).

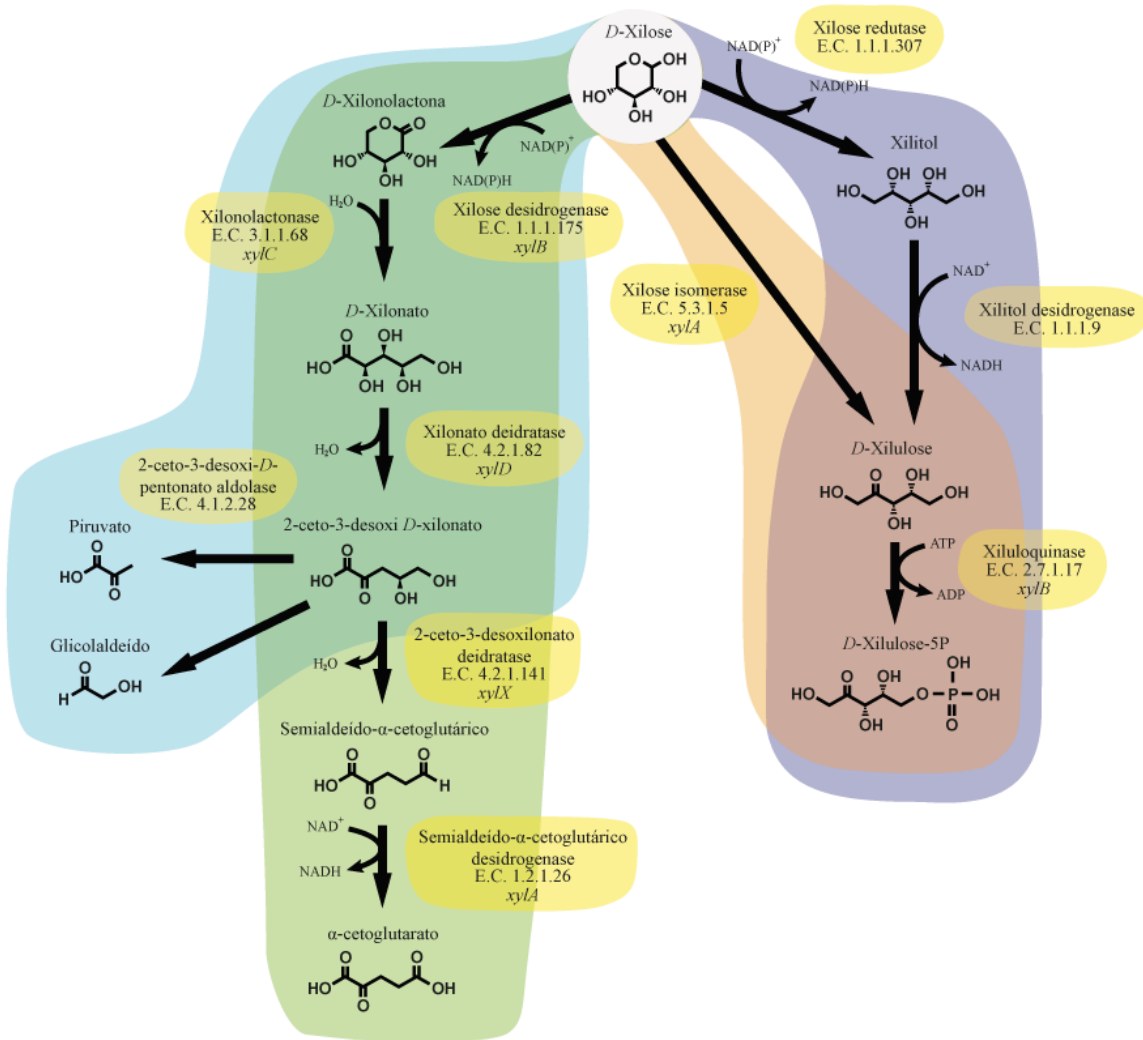
Figura 3 - Estrutura química da xilose



2.3 Catabolismo da xilose

O catabolismo eficiente da xilose por microrganismos pode ser um elemento chave em processos biotecnológicos a partir de biomassa lignocelulósica. A conversão desse carboidrato a substâncias químicas secundárias valiosas, tais como bioetanol e plásticos biodegradáveis, é de interesse comercial uma vez que podem reduzir perdas associadas a bioprocessamento da lignocelulose (Sekar et al., 2016). Atualmente são descritas na literatura quatro vias metabólicas para utilização microbiana de xilose (Figura 4).

Figura 4 - Vias do catabolismo de xilose. Via de Dahms em azul; Via de Weimberg em verde; Via da xilose isomerase em laranja; e Via da xilose redutase em roxo



Como se observa na Figura 4, a xilose pode ser degradada através da via de Dahms (em azul), onde na última reação da via ocorre a conversão de 2-ceto-3-desoxi-*D*-xilonato em piruvato e glicolaldeído (Dahms, Donald 1982). De maneira alternativa, este carboidrato pode ser metabolizado através da via de Weimberg (em verde), descrita em bactérias e archaeas, que produz o α -cetoglutarato, um intermediário principal no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Köhler et al., 2015).

Outra via presente em numerosas espécies bacterianas, incluindo *Escherichia coli*, *Bacillus* sp. e *Lactobacillus* sp., é a via da xilose isomerase (em laranja), pela qual a xilose é degradada pelas enzimas xilose isomerase e xiluloquinase. Por

último, encontra-se a via da xilose redutase (em roxo), que é uma via oxi-redutora, descrita apenas em fungos (Stephens et al., 2007a).

2.4 Engenharia metabólica em linhagens produtoras de PHA

Pseudomonas sp. vêm sendo frequentemente usadas na produção de compostos de interesse na área da saúde e industrial (Choi, Schweizer 2006; van Duuren et al., 2013; Graf, Altenbuchner 2014; Lee et al., 2006a; Le Meur et al., 2012; Molina et al., 2013; Panke et al., 1998; Poblete-Castro et al., 2012). Entre estas aplicações a produção e acúmulo de PHA_{MCL} vêm sendo muito descritas (Gomez et al., 1996; Le Meur et al., 2012; Poblete-Castro et al., 2013; Silva-Queiroz et al., 2009). Entretanto, até os dias de hoje, não se encontra descrita na literatura nenhuma espécie de *Pseudomonas* que possua a capacidade natural de consumir xilose como fonte de carbono para o acúmulo de polímeros (Gomez et al., 1996; Temple et al., 1998). Apenas recentemente foram descritos alguns genes envolvidos na via de utilização da xilose (via de Weimberg) em *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 (Köhler et al., 2015).

A linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046, isolada de solo de canavial por Gomez et al. (1996), atinge altos teores de PHA_{MCL}, alcançando cerca de 60-70% da biomassa seca, além de apresentar alta eficiência na conversão de carboidratos como glicose e frutose em este bioproduto. Não obstante, não é capaz de usar a xilose como fonte de carbono. Porém, uma abordagem biotecnológica conhecida como engenharia metabólica somada às análises de genomas, foi utilizada para melhorar o consumo de xilose em leveduras (Peng et al., 2015; Qi et al., 2015; Zhang et al., 2016), bactérias (Dunn, Rao 2015; Mohagheghi et al., 2015; Waltman et al., 2014), e capacitar microrganismos que naturalmente não possuíam a maquinaria metabólica para utilizar esta pentose (Ledesma-Amaro et al., 2016; Lee et al., 2016; Meijnen et al., 2009; van Rensburg et al., 2014; Sekar et al., 2016; Wei et al., 2016). Por esta razão, mostra-se como estratégia promissora na obtenção de linhagens de *Pseudomonas* LFM046 consumidoras de xilose, e conseqüentemente, de modo a

contribuir para a otimização da produção de bioplásticos a partir de resíduos agroindustriais.

A engenharia metabólica, usada desde finais da década de 80, é uma abordagem eficiente para o desenvolvimento de linhagens bacterianas melhoradas para serem utilizadas em escala industrial para a produção de produtos biotecnológicos de grande interesse comercial, como por exemplo os biocombustíveis, e de alto valor agregado, como os produtos farmacêuticos e químicos finos. Com a utilização de ferramentas de biologia molecular, modificações genéticas como a inserção de um gene ou genes codificadores de enzimas envolvidas em vias metabólicas inteiras de distintos hospedeiros (expressão heteróloga) permitem a construção de linhagens recombinantes capazes de produzir diferentes produtos biotecnológicos a partir de matéria prima simples, disponíveis no mercado e de baixo custo (Chen, Nielsen 2013; Keasling 2010; Liu et al., 2015; Paddon, Keasling 2014; Stephanopoulos 2012).

Desta forma, a engenharia metabólica, envolve as seguintes etapas: 1) análise da via envolvida, o produto e as interações com a função celular global; 2) síntese ou construção da linhagem recombinante com propriedades melhoradas; 3) análise da linhagem recombinante, especialmente no seu desempenho comparado com a linhagem selvagem; e 4) desenho do próximo alvo para engenharia genética (Nielsen 2001).

A partir desta abordagem, estudos focados em entender a função dos genes e os mecanismos envolvidos no crescimento, divisão celular, catabolismo e regulação metabólica de *Caulobacter crescentus* (Laub et al., 2007; Da Rocha et al., 2008; Skerker, Laub 2004; Stephens et al., 2007a), permitiram a descrição detalhada da via pela qual a xilose é consumida nesta linhagem, relatando o operon e os genes que o compõem (*xylX*, *xylA*, *xylB*, *xylC*, *xylD*), além das enzimas resultantes (2-ceto-3-desoxilonato desidratase, semialdeído- α -cetoglutárico desidrogenase, xilose desidrogenase, xilonolactonase, xilonato desidratase) e seus possíveis produtos e subprodutos intermediários (Brouns et al., 2006; Hottes et al., 2004; Meisenzahl et

al., 1997; Stephens et al., 2007b; Stephens et al., 2007a; Tsai, Alley 2001). O trabalho de Meijnen e colaboradores (2009), baseados neste estado da arte, demonstrou que é possível inserir genes responsáveis pela utilização de xilose de *C. crescentus* em uma linhagem de *Pseudomonas*. Deste modo, utilizando metodologias similares às empregadas por Meijnen (2009, 2008), foi concebida a ideia de inserir o operon *xylXABCD* em *Pseudomonas* sp. LFM046, esperando-se como resultado crescimento e/ou produção de PHA a partir da utilização de xilose como única fonte de carbono.

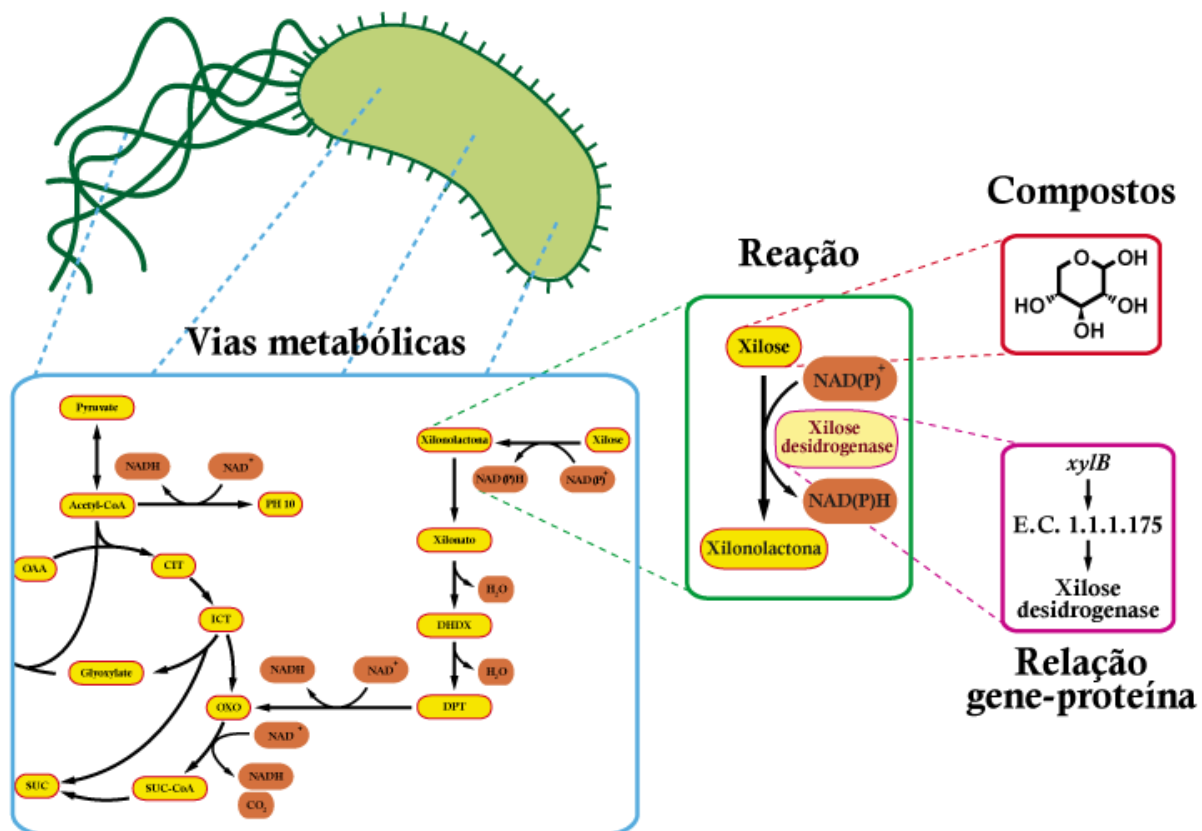
2.5 Análise de Balanço de Fluxos (FBA)

Com o avanço dos sequenciadores de nova geração (NGS) tornou-se possível o sequenciamento de genomas inteiros de microrganismos, permitindo a anotação e o acesso à sequência de genes codificadores de enzimas de interesse presentes em vias metabólicas de interesse. Adicionalmente surgiu também a área de biologia de sistemas, que tem como finalidade a compreensão de uma célula ou de um organismo no nível de sistema. No contexto de redes moleculares, o anterior pode ser resumir em: a) compreensão da estrutura de todos os componentes de uma célula/organismo até o nível molecular; b) a capacidade de prever futuros estados da célula/organismo sob condições normais; c) a capacidade de prever as respostas para um dado estímulo; d) a capacidade de estimar as mudanças no comportamento do sistema após a perturbação dos componentes ou do ambiente (Altaf-Ul-Amin et al., 2014; Becker et al., 2007). Assim, podem ser realizadas previsões através de um modelo *in silico*, dando indícios do possível comportamento do sistema biológico, antecipando diferentes situações ou diminuindo o número de testes *in vitro*.

As construções de modelos metabólicos *in silico* utilizam as informações provenientes do sequenciamento de genomas, dados da literatura e dados experimentais que validam as reações metabólicas propostas, isto é, as reações químicas dos sistemas biológicos (Figura 5). Entretanto, também é possível a elaboração de modelos usando dados experimentais que reúnam as variações

pontuais e as respostas que eles causam no sistema (Becker et al., 2007; Camacho et al., 2009; Orth et al., 2010). Modelos gerados a partir dos dados derivados de uma análise completa do sequenciamento de um genoma é chamado de modelo de escala genômica. Em oposto a isto, modelos que trabalham com um número reduzido de equações, reunindo apenas reações de interesse e de forma simplificada com sequências de reações em uma só, apresentando representações com menor complexidade, mas conservando a confiabilidade, são chamados de *core*.

Figura 5 – Esquema da elaboração de um modelo baseado em dados genômicos



De direita para a esquerda: baseados nos genes se estabelecem as reações catalisadas pelas enzimas codificadas, além dos compostos envolvidos; ao interligar-se um conjunto de reações obtêm-se um modelo ou *core*. Fonte: adaptada de (O'Brien et al., 2015).

Um *software* amplamente usado tanto para a criação de modelos como para gerar simulações, é o COBRA (do inglês *Constraint-based Reconstruction and Analysis*), que é executado no ambiente Matlab e Python. A partir da utilização do COBRA é possível (1) prever comportamentos do metabolismo em estado estacionário e em crescimento ideal dinâmico, (2) os efeitos causados pela deleção de genes, (3) amostrar a possível gama de estados metabólicos celulares e (4)

determinar os módulos de rede, tudo isto ao manipular os valores de entrada das equações estequiométricas, chamados de *inputs* (Becker et al., 2007; Ebrahim et al., 2013; O'Brien et al., 2015; Schellenberger et al., 2011).

Os *inputs* e *outputs* apresentados pelo COBRA são fluxos gerados a partir de dados plotados em milimoles por grama de massa seca de células por hora ($\text{mmol gDW}^{-1} \text{h}^{-1}$) (em inglês *millimoles per gram dry cell weight per hour*), supondo um sistema em estado estacionário, no qual a concentração de todos os metabólitos produzidos e consumidos não varia ao longo do tempo. Os fluxos são uma representação quantitativa das velocidades de reação de cada reação bioquímica na rede, que computam-se como resultados derivados dos fluxos de entrada (Becker et al., 2007; Schellenberger et al., 2011) permitindo realizar o FBA (em inglês *Flux-Balance Analysis*).

FBA se baseia na otimização de uma única equação presente no modelo (chamada de função objetivo), ou seja, no cálculo do maior fluxo possível para a equação escolhida, a partir do cálculo da distribuição de todos os fluxos das reações disponíveis no modelo utilizado estabelecendo a melhor combinação para que a função objetivo seja cumprida. Para isto o estabelecimento de restrições nos fluxos das reações de entrada de nutrientes chave, como por exemplo glicose, oxigênio, etc., ou da produção de compostos como etanol, acetato, etc., deverá ser realizado. Como a FBA baseia-se na estequiometria das reações, sua análise tem algumas limitações referentes à concentração dos metabólitos uma vez que não leva em consideração a regulação transcricional e a regulação a nível enzimático, podendo muitas vezes não representar fielmente a distribuições de fluxos que ocorre na célula bacteriana em estudo (Becker et al., 2007; Lee et al., 2006b; Orth et al., 2010). No entanto, neste trabalho o FBA foi utilizado apenas para analisar o fechamento de balanços de massa.

Para que um *core*, ou mesmo os modelos de escala genômica, sejam o mais fidedigno possível, é necessária a validação destes utilizando dados experimentais para avaliar a distribuição de fluxos das reações nas vias centrais do metabolismo.

Estes modelos podem ser validados a partir da superexpressão, *knockouts* ou silenciamento dos genes, análise do perfil transcricional de genes, testes de atividade enzimática, análises fisiológicas utilizando diferentes fontes de carbono, testes com carbono marcado com o objetivo de inferir quais vias metabólicas estão sendo utilizadas pelo microrganismo em estudo para a produção do produto de interesse, entre outros, permitindo assim estudar o impacto no fenótipo deste (Burgard et al., 2003; Poblete-Castro et al., 2013; Sauer 2003; Spagnolo et al., 2012). Um exemplo disto é o cálculo da energia não associada ao crescimento (ATPm) que é analisado experimentalmente mediante ensaios contínuos em biorreator, no qual o consumo de glicose para diferentes velocidades de crescimento conhecidas é avaliado. Com estes dados se efetua uma regressão linear, que dará como resultado o consumo de glicose para dadas taxas de crescimento, podendo ser extrapolado para crescimento igual a zero, sendo este o consumo de glicose necessário apenas para manter as funções básicas da célula sem a formação de biomassa e sem gerar produto algum (van Duuren et al., 2013; Ebert et al., 2011; Nanchen et al., 2006). Similarmente acontece com o papel que desenvolvem as transidrogenases no metabolismo bacteriano, pois catalisam reações de oxido-redução dos cofatores NAD^+ e NADP^+ , os quais são utilizados em muitas das reações do metabolismo central, como por exemplo, a produção de biomassa, na qual se consume a maioria do NADPH gerado (Sauer 2003).

Com base nesse potencial, esta ferramenta foi associada a este trabalho na sua fase inicial para avaliar *in silico* a factibilidade da proposta do trabalho, simulando situações que posteriormente seriam testadas *in vitro*, e suas respectivas distribuições de fluxos, dando uma noção do possível comportamento das recombinantes que seriam construídas.

3 OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo clonar e avaliar o funcionamento de genes envolvidos na via de catabolismo de xilose, via de Weimberg, de *Caulobacter crescentus*, na linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046.

3.1 Objetivos específicos

Foram adotadas as seguintes estratégias:

- construir uma rede metabólica *core* de *Pseudomonas* sp. LFM046 para avaliar *in silico* a inserção da via de Weimberg oriunda de *Caulobacter crescentus* no metabolismo da linhagem hospedeira;
- obter linhagens de *Pseudomonas* sp. LFM046 recombinantes expressando de forma heteróloga o operon *xyIXABCD* de *Caulobacter crescentus*, envolvidos na via de Weimberg;
- realizar a engenharia evolutiva da linhagem selvagem de *Pseudomonas* sp. LFM046 para melhorar o transporte de xilose por esta linhagem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Meios de cultura

Meio Mineral (MM). Usado na evolução de *Pseudomonas* sp. LFM046 (suplementado com 1,0 g L⁻¹ de glicose e 3,0 g L⁻¹ de xilose) e na avaliação do consumo de xilose pelas linhagens recombinantes obtidas (suplementado com 10 g L⁻¹ xilose). Composição: (NH₄)₂SO₄ 3,0 g L⁻¹; Na₂HPO₄ 3,5 g L⁻¹; KH₂PO₄ 1,5 g L⁻¹; MgSO₄ · 7H₂O Sol. 20% 1,0 mL L⁻¹; CaCl₂ · 2H₂O Sol. 1% 1,0 mL L⁻¹; Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6% 1,0 mL L⁻¹; H₃PO₄ 0,3 mg L⁻¹; CoCl₂ · 6H₂O 0,2 mg L⁻¹; ZnSO₄ · 7H₂O 0,1 mg L⁻¹; MnCl₂ · 4H₂O 30 ng L⁻¹; NaMoO₄ · 2H₂O 30 ng L⁻¹; NiCl₂ · 6H₂O 20 ng L⁻¹; CuSO₄ · 5H₂O 10 ng L⁻¹. Após autoclavar o meio, a fonte de carbono foi acrescentada segundo o caso. Para os meios sólidos foi utilizada uma concentração final de 20 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, sendo este esterilizado separadamente e posteriormente misturado com o MM e a fonte de carbono (Rocha et al., 2007). Na avaliação do consumo de xilose, em alguns meios foi adicionado extrato de levedura (1,0 g L⁻¹).

Meio Luria Bertani (LB). Meio rico usado para o cultivo de *E. coli* DH10B e de *Pseudomonas* sp. LFM046 para geração de biomassa, seleção de transformantes ou para recuperação após a eletroporação. Composição: triptona 10 g L⁻¹; extrato de levedura 5,0 g L⁻¹; NaCl 5,0 g L⁻¹. Para os meios sólidos foi adicionado 20 g L⁻¹ de ágar bacteriológico.

Os antibióticos Canamicina (Kan) e Ampicilina (Amp) (concentração no meio igual a 50 µg mL⁻¹) foram utilizados quando necessário para a seleção das linhagens portando a construção de interesse (Sambrook, Russell 2001).

4.2 Banco de células primário (BCP)

Foram produzidos bancos das linhagens utilizadas no trabalho, antes e depois de ser transformadas com alguma construção segundo o caso. Os BCPs foram

preservados em meio LB líquido suplementado com 20% (v/v) de glicerol, e conservados a -80 °C (Poutou Piñales et al., 1994).

4.3 Evolução de *Pseudomonas* sp. LFM046

A evolução da linhagem de *Pseudomonas* foi realizada como descrito a seguir.

4.3.1 Cultivo

A evolução de *Pseudomonas* sp. LFM046, com o intuito de melhorar o transporte de xilose, foi realizada mediante passagens de 100 µL de culturas crescidas em meio mineral (MM) líquido como indicado no tópico 4.1. As culturas foram incubadas em agitador rotativo a 30 °C e 150-200 rpm. Foram realizadas 4 passagens deixando tempo de incubação de 1, 2, 3 e 5 dias entre cada uma delas. Uma alíquota da última cultura líquida foi semeada em MM sólido com xilose com única fonte de carbono para evidenciar alguma melhora na capacidade da bactéria para metabolizá-la. A cultura foi incubada até observar crescimento e comparada com a linhagem parental. A linhagem obtida foi nomeada *Pseudomonas* sp. LFM1525 (Tabela 1).

4.4 Provas confirmatórias

Para confirmar se as colônias obtidas nas diferentes etapas do trabalho eram realmente *Pseudomonas* sp. LFM046 ou *Pseudomonas* sp. LFM1525, foi realizada coloração de Gram e testes bioquímicos (oxidase e catalase) para verificar o perfil fisiológico destas (MacFaddin 2000). Além disto, a análise filogenética também foi realizada a partir da amplificação do gene rRNA 16S segundo a metodologia citada no tópico 4.5.3.2, seguido do sequenciamento e análise deste como indicado na seção 4.5.3.6.

4.5 Construção de recombinantes

Para avaliar a via de Weimberg nas linhagens escolhidas foram propostas diferentes estratégias que são descritas a seguir.

4.5.1 FBA

Para avaliar se a via metabólica de degradação de xilose selecionada para a construção de recombinante se integraria à rede central do metabolismo de *Pseudomonas*, mantendo o seu balanço metabólico, foi utilizada FBA como ferramenta. Esta análise foi feita utilizando o COBRA Toolbox, executado no ambiente Matlab, para o qual foi realizada a modificação de um *core* de *E. coli* composto por 95 reações e 72 metabólitos (Becker et al., 2007; Orth et al., 2009) adaptado com o intuito de representar o *core* da linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046. As modificações realizadas devem-se à eliminação de reações que não são próprias da linhagem LFM046 (*e.g.*, reação catalisada pela fosfofrutoquinase, reações do uso do acetato e acetaldeído, produção de etanol, *etc.*), além de serem adicionadas as reações da via de Entner-Doudoroff e da produção de PHA (polihidroxidecanoato), entre outras (Apêndice B). Estas modificações se basearam em dados obtidos do *draft* do genoma de *Pseudomonas* sp. LFM046 recentemente publicado, além de outros estudos da literatura (Cardinali-Rezende et al., 2015; Diniz et al., 2004; Poblete-Castro et al., 2013; Sánchez et al., 2003; Sauer 2003).

Para a realização das simulações *in silico*, como primeira aproximação utilizou-se um *loop* aninhado (um *loop* dentro de outro *loop*) como descrito a seguir: no primeiro *loop* o fluxo de xilose era fixado entre 0,25 e 10,00 mmol gDW⁻¹ h⁻¹, aumentando 0,25 mmol gDW⁻¹ h⁻¹ a cada novo ciclo; para cada um desses valores de xilose um novo *loop* estabelecia taxas de crescimento começando em 0 h⁻¹ e crescendo em 0,05 h⁻¹ a cada ciclo até chegar a 0,75 h⁻¹. Em cada um desses cenários, e ao designar como função objetivo a produção de PHA, todas as distribuições de fluxos virtualmente possíveis foram obtidas como resultado. Baseados nisso, fixou-se o fluxo máximo das transidrogenases (4 mmol gDW⁻¹ h⁻¹) e do consumo de xilose (10 mmol gDW⁻¹ h⁻¹), além da taxa de crescimento (0 h⁻¹ e

0.4 h⁻¹) para gerar as simulações que mais poderiam aproxima-se às recombinantes obtidas.

4.5.2 Linhagens, vetores e sequências

As linhagens e plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Bactérias e plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho

Linhagem ou plasmídeo	Descrição	Referência ou fonte
Linhagens		
<i>C. crescentus</i> NA1000	Linhagem selvagem	(Evinger, Agabian 1977)
<i>E. coli</i> DH10B	Linhagem de <i>E. coli</i> para clonagem	(Simon et al., 1983)
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046	Linhagem selvagem	(Gomez et al., 1996)
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM1525	Linhagem evoluída	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM1526	<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 contendo o plasmídeo p3cR	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM1527	<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 contendo o plasmídeo p3cRX1	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM1528	<i>Pseudomonas</i> sp. LFM1525 contendo o plasmídeo p3cR	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM1529	<i>Pseudomonas</i> sp. LFM1525 contendo o plasmídeo p3cRX1	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM1530	<i>Pseudomonas</i> sp. LFM1525 contendo o plasmídeo p3cRX2	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM1536	Linhagem evoluída	Este trabalho
Plasmídeos		
pJET	Vetor de clonagem; Amp ^r	Thermo Fisher Scientific ¹
pJET-xy/XABCD	pJET portando o operon xy/XABCD de <i>C. crescentus</i>	Este trabalho
pJET-xy/IE	pJET portando o gene xy/IE de <i>B. sacchari</i>	Este trabalho
pBSK-Nova	Plasmídeo com as sequências reguladoras <i>tac</i> e RBS sintetizadas	GenOne Biotechnologies
pSEVA241	Vetor de amplo espectro e alto número de cópias; Kan ^r	(Silva-Rocha et al., 2013)
p3cR	pSEVA241 portando as sequências reguladoras <i>tac</i> e RBS; vetor de expressão	Este trabalho
p3cRX1	p3cR portando o operon xy/XABCD de <i>C. crescentus</i>	Este trabalho
p3cRX2	p3cRX1 portando o gene xy/IE de <i>B. sacchari</i>	Este trabalho
pBBR1MCS2::xy/IExy/LAB	pBBR1MCS-2 portando os genes xy/IE e xy/LAB de <i>B. sacchari</i>	Guamán (em fase de elaboração) ¹

LFM: Laboratório de Fisiologia de Microorganismos do ICB-USP; Amp^r: resistência à ampicilina; Kan^r: resistência à canamicina. ¹Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA.

¹ Guaman LP. Clonagem e super expressão dos genes do catabolismo de xilose em *Burkholderia sacchari* e avaliação do efeito no consumo e produção de polihidroxiobutirato a partir de açúcares lignocelulósicos [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O promotor *tac* (de Boer et al., 1983) e o sítio de união o ribossomo (RBS), derivado do bacteriófago T7 (*g10-L*) e a sequência Epsilon (Enhancer of Protein Synthesis Initiation) (Olins, Rangwala 1989) foram sintetizadas pela empresa GenOne Biotechnologies, Rio de Janeiro, e enviadas no plasmídeo pBSK-Nova. Posteriormente as sequências reguladoras foram transferidas ao plasmídeo pSEVA241 como descrito na seção 4.5.3.4.

Os iniciadores para amplificar o operon de interesse foram desenhados a partir da sequência do genoma de *Caulobacter crescentus* NA1000 obtida no banco de dados do *GeneBank* (GeneBank, 2015). Os iniciadores F24 e R24 foram obtidos da literatura (Silva-Rocha et al., 2013). O desenho e análise dos iniciadores foi feita *in silico* utilizando os *softwares* Serial Cloner e BioEdit (Ibis Biosciences, 2013; SerialBasics, 2013). Assim, foi possível avaliar as regiões de reconhecimento dos iniciadores e quais sítios de restrição seriam inseridos nas extremidades destes (Apêndice A), para que os amplicons fossem posteriormente inseridos nos vetores de interesse.

4.5.3 Manipulação de DNA

As metodologias e protocolos de manipulação de DNA são descritas a seguir.

4.5.3.1 Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico ou plasmidial foi extraído utilizando os kits Wizard® Genomic DNA Purification e Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Fitchburg, USA) respectivamente, seguindo as instruções do fabricante (Anexo A e Anexo B). A concentração de DNA extraído foi quantificada utilizando o aparelho NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

4.5.3.2 Amplificação dos genes por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de *PCR* foram realizadas como descrito na literatura (Sambrook, Russell 2001) utilizando kits comerciais seguindo as instruções do fabricante segundo o caso. As reações de *PCR* foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient Vapo protect (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Para a amplificação e clonagem dos fragmentos foi utilizada a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (New England Biolabs (NEB), Rowley, USA) utilizando como molde o DNA genômico ou plasmidial segundo o caso. As condições da reação e de ciclagem são descritas na Tabela 2 e na Tabela 4 respectivamente.

Para validação e seleção das colônias positivas após eletroporação, além de confirmar a inserção dos fragmentos clonados no vetor, foram utilizadas reações de *PCR* utilizando *Taq* DNA polimerase, presente no GoTaq Green Master Mix (Promega). As condições da reação e de ciclagem são descritas na Tabela 3 e na Tabela 5 respectivamente.

Tabela 2 – Condições da reação de PCR usando o kit Phusion High-Fidelity (NEB)

Reagentes	Concentração	Volume (μL)
Água livre de DNase	-	30
Phusion GC Buffer ¹	5X	10
DNA	25-50 ng μL^{-1}	2
Desoxinucleotídeos	10 mM	1
Dimetilsulfóxido (DMSO) ¹	100% (v/v)	1,5
Iniciadores (cada um)	10 μM	2,5
Phusion DNA polimerase ¹	2000 U mL^{-1}	0,5

¹ Reagente da marca NEB.

Tabela 3 – Condições da reação de PCR usando a enzima Taq (Promega)

Reagentes	Concentração	Volume (μL)
Água livre de DNase	-	1
DMSO ¹	50% (v/v)	1
Iniciadores (cada um)	10 μM	1
DNA	25-50 ng μL^{-1}	1
GoTaq® Green Master Mix	2X	5

¹ Reagente da marca Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha.

Tabela 4 – Programas de ciclagem utilizando o kit Phusion High-Fidelity

Gene amplificado	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo
<i>xy/ABCDEFGHI</i>	98	1,5 min	98	15 s	69	20 s	72	3 min 10 s	72	10 min
<i>xy/ID</i>	98	1,5 min	98	15 s	70	20 s	72	1 min	72	6 min
<i>xy/IE</i>	98	30 s	98	10 s	64	20 s	72	1 min	72	5 min

Para todas as reações da tabela o número de ciclos foi de 30.

Tabela 5 – Programas de ciclagem utilizando a enzima Taq

Gene amplificado	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo
<i>xy/IXA</i>	95	5 min	95	50 s	68	30 s	72	3 min	72	10 min
<i>xy/ID</i>	95	5 min	95	50 s	68	30 s	72	2 min	72	8 min
<i>xy/IE</i>	95	5 min	95	30 s	62	20 s	72	2 min 30s	72	5 min
<i>tac/RBS</i>	95	5 min	95	30 s	57	30 s	72	30 s	72	3 min
rRNA 16S	95	5 min	95	30 s	49	30 s	72	1 min 30 s	72	6 min
F24 – R24	95	5 min	95	30 s	61	20 s	72	Variável ¹	72	Variável ¹
<i>xy/X fw</i> – RT_PCR rev	95	5 min	95	30 s	66	20 s	72	1 min	72	3 min
RT_PCR fw – <i>xy/ID</i> rev	95	5 min	95	30 s	66	20 s	72	1 min	72	3 min

Para todas as reações da tabela o número de ciclos foi de 30. ¹Dependo do inserto presente no plasmídeo o tempo de amplificação pode variar segundo o caso.

4.5.3.3 Eletroforeses analítica de DNA

Todos os plasmídeos e os produtos de *PCR* foram analisados eletroforeticamente em gel de agarose 1% (m/v) preparado em TAE (Tris-HCl base 4.84 g L⁻¹, ácido acético glacial 1.142 mL L⁻¹, EDTA 0.5 M, pH 8), e corados com SYBR® Safe (Thermo Fisher Scientific) segundo o fabricante, submetido a 3 volt cm⁻¹ durante ~ 1 h (0.002 cm² volt⁻¹ seg⁻¹), utilizando uma fonte de energia General Electric - EPS 301 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Como marcador de peso molecular foi empregado GeneRuler 1 Kb DNA Ladder ou GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta a um comprimento de onda de 312 nm (Sambrook, Russell 2001). Quando necessário, os produtos de *PCR* e DNA visualizados em géis de agarose foram purificados da banda empregando o kit Wizard® SV Gel and *PCR* Clean-Up System (Promega) seguindo as indicações do fabricante (Anexo C).

4.5.3.4 Clonagem de genes nos vetores

Todos os produtos de *PCR* foram analisados, purificados e quantificados (concentração de DNA) como indicado no tópico 4.5.3.3 e 4.5.3.1, respectivamente. Para a reação de ligação foi mantida uma relação molar de 1:3 entre o plasmídeo pJET (Thermo Fisher Scientific) e os amplicons dos genes (*xyiXABCD* e *xyiE*) a serem clonados, respectivamente. A enzima utilizada foi a T₄ DNA ligase (NEB) segundo as condições do fabricante. A reação de ligação foi incubada por ~ 12 h a 16 °C e em seguida armazenada a -20 °C até o momento em que estas fossem eletroporadas nas células eletrocompetentes.

Células eletrocompetentes das linhagens *Pseudomonas* sp. LFM046 e LFM1525, além de *E. coli* DH10B foram preparadas segundo Choi e Schweizer (2006) e Jeong e Epstein (2005) respectivamente. Para transformação das células eletrocompetentes foi adicionado 1 uL de plasmídeo ou do produto de ligação à cubeta de eletroporação Gene Pulser/MicroPulser de 0,1 cm ou 0,2 cm (Bio-rad, California, USA) para *E. coli* ou *Pseudomonas* respectivamente; em seguida, 100 µL de células eletrocompentes foram pipetadas suavemente para homogeneizar-se

com o material genético. As condições de eletroporação foram utilizadas seguindo protocolos de programas pré estabelecidos presentes no sistema de eletroporação Gene Pulser Xcell (Bio-rad) foram utilizados para cada uma das bactérias. Após o pulso adicionou-se 1,0 mL de meio LB às células eletroporadas que foram incubadas a 37 °C por 1 h no caso de *E. coli* e a 30 °C por 2 h no caso de *Pseudomonas* em agitador rotativo sob agitação de 150 rpm. Concluído o tempo de recuperação, as células foram semeadas em meio LB sólido com antibiótico e incubadas até observar crescimento a 37 ou 30 °C dependendo do microrganismo. Para a validação dos clones obtidos foram realizadas *PCR* das colônias crescidas nas placas - resistentes ao antibiótico.

Tanto o operon *xyIXABCD* de *C. crescentus* como o transportador *xylE* de *B. sacchari*, após ser amplificado e purificado foram ligados ao plasmídeo de clonagem pJET (Thermo Fisher Scientific) seguindo o protocolo descrito acima. O plasmídeo pBSK-Nova foi digerido como descrito na seção 4.5.3.5 para purificar as sequências de interesse e serem ligadas ao plasmídeo pSEVA241, criando o vetor de expressão p3cR; seguindo o mesmo procedimento o operon responsável da via de Weimberg, e o gene *xylE*, foram purificados a partir dos plasmídeos pJET-*xyIXABCD* e pJET-*xylE* respectivamente, e ligados ao vetor de expressão, obtendo o vetor p3cRX1 e o vetor p3cRX2 (Tabela 1).

4.5.3.5 Digestão de DNA empregando enzimas de restrição

Na construção dos diferentes plasmídeos, como para a validação das construções, foram utilizadas enzimas de restrição FastDigest (Thermo Fisher Scientific) seguindo as indicações da literatura (Sambrook, Russell 2001), além de orientações dos fabricantes.

4.5.3.6 Validação dos genes clonados a partir do sequenciamento

A validação dos genes clonados também foi realizada por *PCR*. Os amplicons foram purificados e posteriormente sequenciados no Instituto de Genoma Humano da Universidade de São Paulo segundo a metodologia de Sanger (Sanger et al.,

1977). Na preparação das reações foi utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) e tratadas no equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA); os primers utilizados encontram-se no Apêndice A. Os resultados do sequenciamento foram analisados no programa ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, 2003) e comparadas com a base de dados do *GeneBank* mediante o *software* Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (GeneBank, 2015). No caso da validação do gene rRNA 16S, as sequências também foram comparadas com o *draft* do genoma de *Pseudomonas* sp. LFM046.

4.5.4 *Análise da expressão heteróloga dos genes da via de Weimberg clonados na Pseudomonas sp. LFM046 por reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR)*

A extração de RNA foi realizada a partir de culturas de *Pseudomonas* sp. LFM1526 (controle negativo) e LFM1527 crescidos por 6 h em meio LB com canamicina. Para isto, 6 mL de cultura foram coletados em tubos de microcentrifuga de 2,0 mL, e centrifugados a 5000 g por 7 min. para recuperar a biomassa; 1 mL de TRIzol® Reagent (Life Technologies, Carlsbad, USA) foi utilizado para resuspende e estabilizar as amostras. O kit Direct-zol™ RNA MicroPrep (Zymo Research, Irvine, USA) foi utilizado seguindo as indicações do fabricante. A concentração de RNA foi analisada utilizando o aparelho NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare) e sua integridade avaliada por gel de agarose 1% (m/v) segundo a seção 4.5.3.3 com algumas modificações: o TAE 1X utilizado tanto na preparação do gel como na corrida foi preparado com água MiliQ estéril e TAE 50X para RNA (Thermo Fisher Scientific). O RNA extraído foi armazenado a -80 °C.

A reação de transcrição reversa realizou-se usando 2 µg de RNA de cada uma das amostras com um volume final de reação de 20 µL. O kit usado foi SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, USA) seguindo as indicações do fabricante. Para cada uma das amostras foram obtidas uma concentração de 100 ng µL⁻¹ de cDNA que foi posteriormente armazenado a -20 °C.

4.6 Avaliação quanto ao consumo de xilose das linhagens obtidas

A avaliação do consumo de xilose foi realizada em MM líquido contendo xilose como única fonte de carbono (MMX). Adicionalmente, foram testados meios suplementados com antibiótico (Kan) (MMXK) e com extrato de levedura (MMXKYe). As culturas foram incubadas a 30 °C em agitador rotativo numa agitação de 150-200 rpm para ensaio realizados em erlenmeyers de 125 mL, e 230-250 rpm para ensaio realizados em tubos falcon de 50 mL. Como controles foram utilizadas as linhagens sem os plasmídeos, e as linhagens transformadas com o vetor p3cR.

4.6.1 Determinações analíticas

Nos ensaios foram realizadas amostragens no tempo zero e nos dias 3, 6, 10 e 15 para a análise de: concentração de biomassa e da concentração da fonte de carbono segundo as metodologias descritas a seguir.

4.6.1.1 Concentração de biomassa produzida

Nas culturas realizadas em tubos de 50 mL, todo o volume foi tratado. No ensaio efetuado em Erlenmeyer de 125 mL foram utilizados 10 mL da cultura para o tratamento. As amostras foram centrifugadas a 8000 g durante 15 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore 0,45 µm, previamente taradas, e utilizado na dosagem de açúcares (4.6.1.2), enquanto o *pellet* foi ressuspensão e filtrado na mesma membrana recuperando toda a biomassa presente na amostra; o conjunto foi submetido à secagem em estufa a 105 °C seguindo a metodologia gravimétrica (Gomez et al., 1996).

4.6.1.2 Quantificação de xilose residual

O produto da filtração do item 4.6.1.1 foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência HPLC segundo Mendonça e colaboradores (2014) no equipamento HPLC da marca DIONEX (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) equipado com uma coluna de separação de açúcar marca Aminex HPX-

87H. Na detecção foi utilizado um refractômetro diferencial Shodex RI-101. Diluições foram feitas quando necessário.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Evolução de *Pseudomonas* sp. LFM046

A avaliação do consumo de xilose para a linhagem evoluída por passagens sucessivas foi realizada em meio MMX sólido (meio MM com 10 g L⁻¹ de xilose como única fonte de carbono) semeando-se a linhagem de *Pseudomonas* sp. evoluída (linhagem LFM1525 - Tabela 1) junto com a linhagem parental (linhagem selvagem). Após 10 dias de incubação, o local da semeadura da linhagem LFM1525 apresentava o crescimento de pequenas colônias de morfologia redonda lisa, cor creme brilhante e forma definida, enquanto que a semeadura da linhagem parental apresentou um crescimento irregular difuso ao longo da placa, de morfologia pouco definida. Reider Apel e colaboradores (2016) realizaram um procedimento similar com *Saccharomyces cerevisiae*, cultivando-a sucessivamente em meio sintético definido suplementado com aminoácidos e 2% de xilose. Em seu trabalho, estes obtiveram colônias capazes de utilizar xilose. Análises moleculares evidenciaram a presença de uma mutação no transportador Hxt7, o qual nativamente possui afinidade por hexoses, e que passou a transportar inespecificamente pentoses. Desta forma, acreditamos que podem ter acontecido mutações (simples ou múltiplas) em algum dos transportadores da LFM046, permitindo a entrada de xilose e utilização desta pela linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046.

Saumaa e colaboradores (2007) descreveram que situações de escassez de nutrientes e estresse oxidativo geraram danos no DNA de *Pseudomonas putida* PaW85, ativando o mecanismo de reparo de DNA realizado pelas proteínas MutY, MutM e MutT desta linhagem. Outra proteína envolvida no mecanismo de reparo de DNA é RecA, relatada em *Pseudomonas aeruginosa* quando em estresse oxidativo em biofilmes (Boles, Singh 2008). Estes autores relataram a relação entre eventos mutagênicos e estresse oxidativo com o reparo de DNA, especificamente associados à quebra da dupla fita de DNA causada por este tipo de estresse espécies de *Pseudomonas* e outras bactérias (Bohr 2002; Boles, Singh 2008; Rowe et al., 2008; Saumaa et al., 2007).

Proteínas de reparo homólogas a todas estas citadas anteriormente foram buscadas no genoma da linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046 – usando o *software* BLASTP – submetido e anotado no RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*). Os resultados apresentam-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados comparativos (BLASTP) de proteínas envolvidas em vias de reparo em espécies de *Pseudomonas* com proteínas presentes em *Pseudomonas* sp. LFM046

Origem	/ Proteína	Tamanho aa \ Identidade (%)	Proteína homóloga em LFM046
<i>P. putida</i> BIRD-1	/ MutY	290/355 \ 81	<i>A/G-specific adenine glycosylase</i>
	/ MutM	236/270 \ 87	<i>Formamidopyrimidine-DNA glycosylase</i>
	/ RecA	312/352 \ 88	<i>RecA protein</i>
<i>P. fluorescens</i> F113	/ MutY	286/355 \ 80	<i>A/G-specific adenine glycosylase</i>
	/ MutM	236/269 \ 87	<i>Formamidopyrimidine-DNA glycosylase</i>
	/ MutT	224/309 \ 72	<i>Mutator mutT protein</i>
	/ RecA	307/350 \ 87	<i>RecA protein</i>
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	/ MutY	305/354 \ 86	<i>A/G-specific adenine glycosylase</i>
	/ MutM	240/270 \ 88	<i>Formamidopyrimidine-DNA glycosylase</i>
	/ MutT	230/309 \ 74	<i>Mutator mutT protein</i>
	/ RecA	319/346 \ 92	<i>RecA protein</i>

Das quatro proteínas procuradas, duas foram anotadas com o mesmo nome (Tabela 6) pelo que pode-se dizer que existe uma alta probabilidade tanto estas como aquelas com alta porcentagem de identidade, também estejam envolvidas em vias de reparo do DNA na linhagem LFM046, assim como em eventos de mutagênese derivados destes processos de reparo. Por isto, pode ser que através da ação de alguma destas enzimas que apresentaram alto grau de identidade,

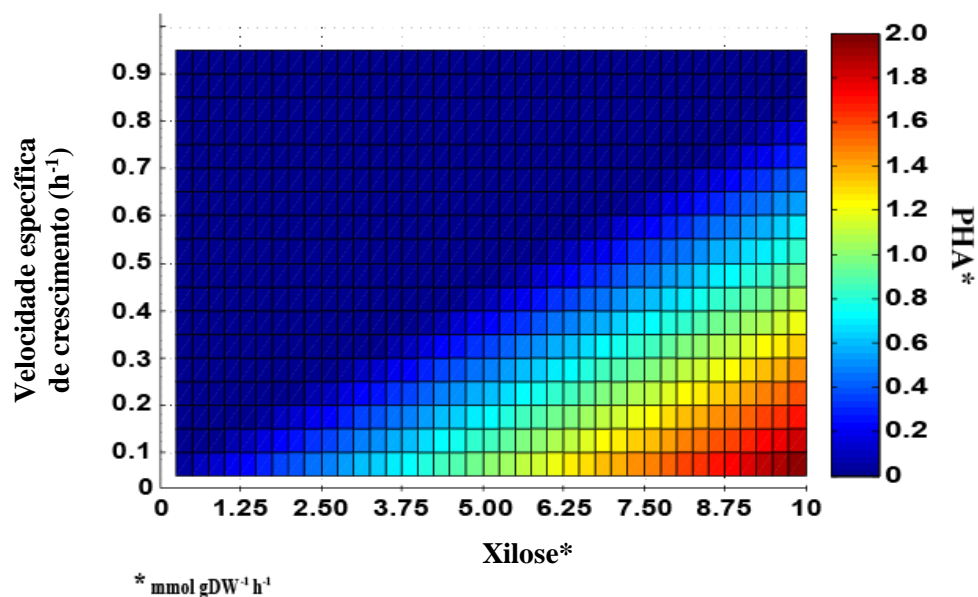
possa ter acontecido uma ou várias mutações que deram como resultado linhagens com um genótipo mais apropriado para metabolizar as pentoses como única fonte de carbono.

5.2 FBA

Para realização de simulações *in silico* (FBA), a fim de analisar o fluxo na via de Weimberg para o catabolismo de xilose por *Pseudomonas* sp. LFM046 e, conseqüentemente, para a formação de biomassa e produção de PHA, foi necessária a construção de um *core* baseado no genoma sequenciado desta linhagem e modificações no *core* já existente para *E. coli* (Orth et al., 2009), adicionando e removendo reações a este segundo o item 4.5.1. O *core* construído apresentou um total de 109 reações e 85 metabólitos (Apêndice C e Apêndice D).

O modelo de *Pseudomonas* sp. LFM046 contendo a via de Weimberg foi submetido no COBRA, colocando como primeira restrição a consideração que as transidrogenases atuariam com um fluxo de até 4 mmol gDW⁻¹ h⁻¹. Este valor foi considerado como base, pois estudos moleculares e *in silico* demonstraram ser o fluxo máximo de atuação das transidrogenases (UdhA e PntAB) em *E. coli* (Riemer et al., 2013; Sauer 2003). Com este parâmetro fixo realizou-se a primeira simulação *in silico*, o *loop* aninhado, gerando uma série de fluxos na via de catabolismo da xilose, nas vias envolvidas na formação de biomassa (taxa de crescimento) e produção de PHA (Apêndice E). Todos os cenários possíveis relacionando as distribuições de fluxos nestas vias são representados na Figura 6.

Figura 6 – Resultados das simulações geradas com o *core* construído contendo a via de Weimberg



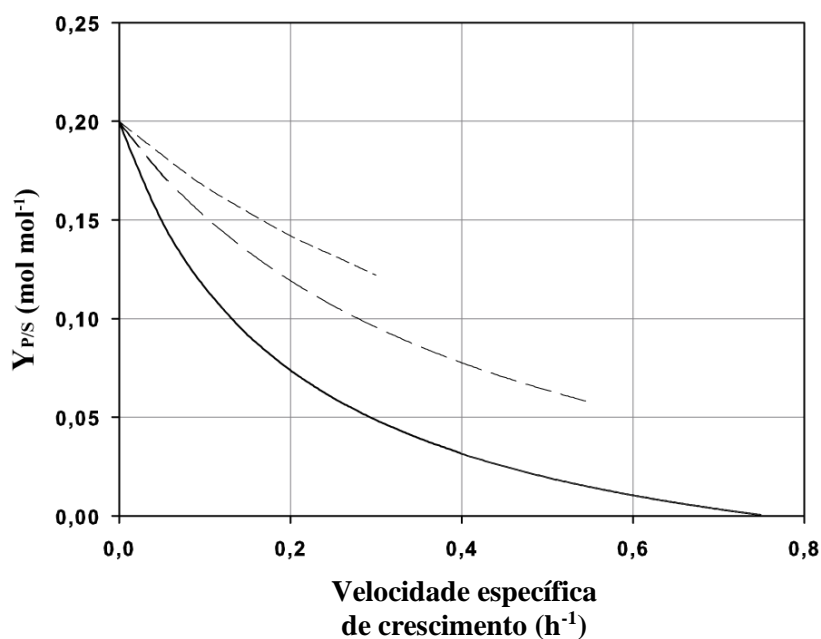
Segundo Orth e colaboradores (2010) o fato de que um modelo proposto fosse executável indica o fechamento de balanços de massas, ou seja, tudo aquilo que é produzido é utilizado ou excretado pelo microrganismo. Apesar disto parecer básico, ao adicionar uma nova reação, ou mesmo uma via metabólica inteira ao modelo, como por exemplo neste caso a via de Weimberg, alguns dos metabólitos envolvidos poderiam ser acumulados, desbalanceando a proporção entre estes, e conseqüentemente, inviabilizando a distribuição de fluxos e a simulação no modelo. Deve-se levar em consideração que a inserção de toda uma via de catabolismo tem uma altíssima chance de desestabilizar a rede metabólica, não só pelas implicações que têm as interações no nível químico com as demais reações, mas também pela probabilidade de existirem múltiplos compostos que não sejam produzidos ou utilizados na rede, ou uma sintaxe errada em alguma das reações, acarretando a inviabilidade do modelo *core*.

As diferentes distribuições geradas a partir dos parâmetros estabelecidos permitiram inferir o comportamento que *Pseudomonas* sp. LFM046 poderia adotar tanto na presença da xilose, como na conversão do carbono proveniente desta só em PHA, só em biomassa, ou as duas ao mesmo tempo. Não obstante, o modelo gerado ainda poderia contemplar cenários biologicamente improváveis, *e.g.*, atingir

taxas de crescimento maiores a $0,65 \text{ h}^{-1}$, pois essa é a maior taxa de crescimento descrita para linhagens bacterianas na literatura (Diniz et al., 2004). No entanto, condições prováveis foram apresentadas nas simulações realizadas no modelo gerado, como por exemplo: com uma velocidade de crescimento igual a $0,2 \text{ h}^{-1}$ foram atingidos diferentes fluxos de acúmulo de PHA conforme foi aumentado ou diminuído o fluxo de consumo de xilose; assim, em uma taxa de $0,2 \text{ h}^{-1}$ tem-se valores desde 0 até $1,4 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de PHA produzido quando o fluxo de catabolismo de xilose foi de $2,5 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ou $10 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Este comportamento também foi relatado para *Pseudomonas* sp. LFM046 em ensaio realizados em biorreatores operados de forma contínua, em que ao variar a vazão específica de alimentação de glicose/frutose a porcentagem de PHA acumulado nas células diminuiu ou aumentou segundo o caso (Taciro 2008).

Para entender um pouco mais a relação entre estas três variáveis (taxa de crescimento, velocidade de produção de PHA e velocidade de consumo de xilose) foi calculado o fator de conversão da fonte de carbono em polímero, isto em diferentes taxas de crescimento (Figura 7).

Figura 7 – Fatores de conversão da fonte de carbono (xilose) em PHA obtidos considerando as diferentes velocidades específicas de crescimento de *Pseudomonas* sp. LFM046



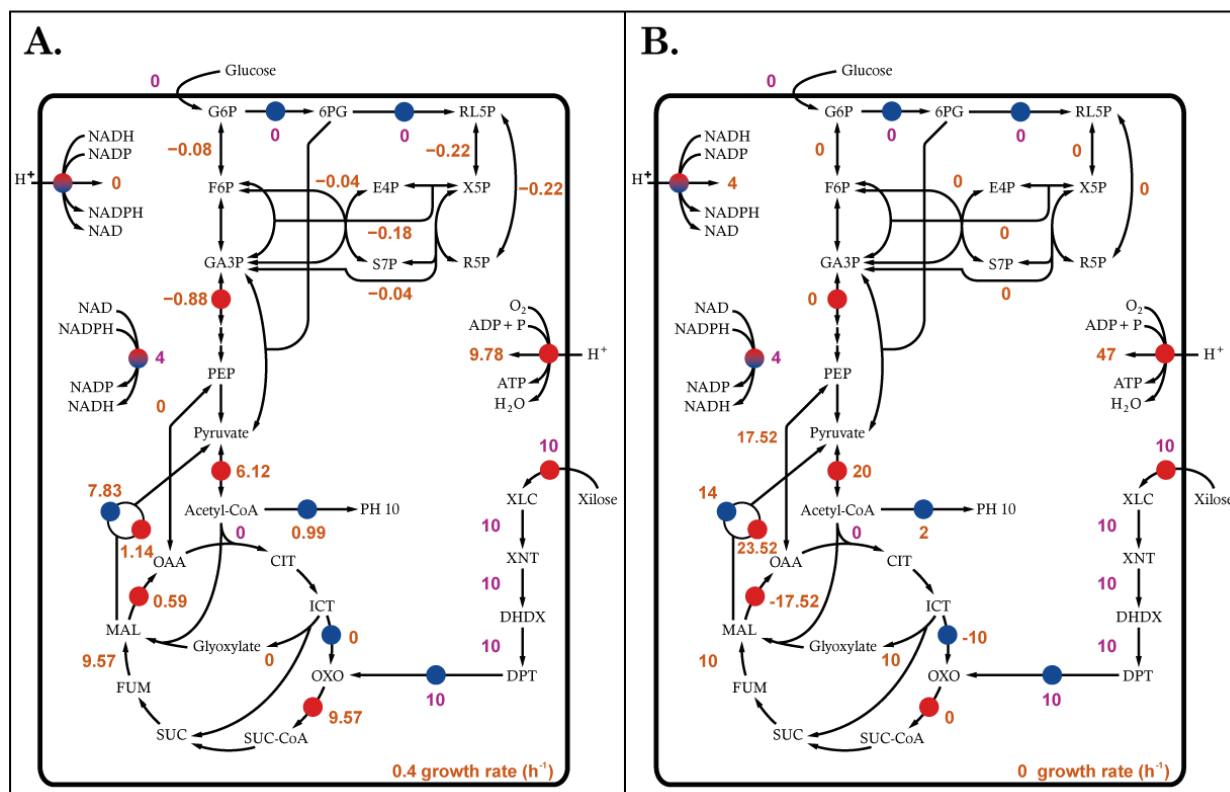
Na Figura 7 observa-se uma diminuição no rendimento de PHA produzido a partir da xilose (representada pelas três curvas de conversão) conforme aumenta a taxa de crescimento celular da LFM046. Se tomarmos como referência uma taxa de formação de biomassa de $0,2 \text{ h}^{-1}$ serão obtidos fatores de conversão com valores de aproximadamente 0,07, 0,12 e 0,14 (mol/mol), indicando que o fluxo de entrada de xilose pode ser distribuído entre diversas vias metabólicas para essa taxa de biomassa. Por outro lado, à medida que o valor da taxa de crescimento aumenta se restringem as possibilidades (o número de vias, ou caminhos) em que o fluxo de consumo de xilose pode ser distribuído, pois a cada simulação se encaminha mais carbono para gerar todos os intermediários necessários para a formação de mais biomassa. Por isto, para taxas de crescimento superiores a aproximadamente $0,55 \text{ h}^{-1}$, só um valor de fator de conversão é obtido, sendo cada vez menor a quantidade de xilose disponível para produzir PHA até ser alcançado o máximo teórico de crescimento de aproximadamente $0,75 \text{ h}^{-1}$, condição em que toda a fonte de carbono é utilizada para gerar biomassa.

A partir dos resultados obtidos nas simulações realizadas, somados aos dados experimentais descritos no item 4.5.1, foram escolhidas condições que permitiram inferir o comportamento da LFM046 nas seguintes condições experimentais usuais: A) Produção de PHA associado ao crescimento, e B) Produção de PHA não associado ao crescimento (Figura 8). Para esta análise, quando a produção do polímero está associada ao crescimento, com uma velocidade de formação de biomassa de $0,4 \text{ h}^{-1}$, são possíveis dois fatores de conversão segundo a Figura 7, dependendo do fluxo de entrada da xilose como da velocidade em que é produzido o polímero, neste caso, o fluxo de xilose foi fixado em $10 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Puchałka e colaboradores (2008), utilizando dados obtidos em cultivos com carbono marcado, realizaram simulações da distribuição de fluxos nas vias centrais do metabolismo de *Pseudomonas putida* KT2440, utilizando uma ferramenta similar ao FBA, o FVA (Análise de Variabilidade de Fluxo, do inglês *Flux Variability Analysis*). FVA é uma metodologia que identifica os fluxos mínimos e

máximos possíveis através de uma reação particular, levando em consideração valores que são forçados a serem próximos, ou igual ao seu valor ótimo (Mahadevan, Schilling 2003; Orth et al., 2010).

Figura 8 – Distribuição de fluxos para o acúmulo associado e não associado ao crescimento



Esferas de cores azul e vermelho representam a utilização de NADP^+ e NAD^+ respectivamente. Esferas com as duas cores, representam as transidrogenases que reduzem um cofator pela oxidação do outro segundo o caso. O sinal negativo em alguns dos fluxos representa a direção da reação -direção oposta à qual foi definida (Apêndice D). Os fluxos em roxo não mudaram nas duas distribuições apresentadas. Glucose: glicose; G6P: glicose-6-fosfato; 6PG: 6-fosfogluconato; RL5P: ribulose-5-fosfato; X5P: xilose-5-fosfato; R5P: ribose-5-fosfato; E4P: eritrose-4-fosfato; S7P: sedoepulose-7-fosfato; F6P: frutose-6-fosfato; GA3P: gliceraldeído-3-fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; Pyruvate: piruvato; CIT: citrato; ICT: isocitrato; OXO: α -cetoglutarato; Acetyl-CoA: acetil coenzima A; SUC-CoA: succinil coenzima A; SUC: succinato; FUM: fumarato; MAL: malato; OAA: oxaloacetato; NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida); NADP: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADPH: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida); H^+ : prótons; XLC: xilonolactona; XNT: xilonato; DHDX: 2-ceto-3-desoxi-xilonato; DPT: semialdeído- α -cetoglutárico.

Análises realizadas por Puchalka e colaboradores (2008) utilizando carbono marcado, na reação catalisada pela ribulose-5 fosfato 3-epimerase ($-0,09 \pm 0,04 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$), em comparação com os dados apresentados na Figura 8A ($-0,22 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$), permitiram observar que ambas acontecem no mesmo sentido. Além disto, na distribuição de fluxos gerada pelo nosso modelo, o fluxo de $-0,22$

mmol gDW⁻¹ h⁻¹ é depois encaminhado à formação de ribose-5-fosfato utilizada para produzir aminoácidos (histidina, fenilalanina, triptofano) e nucleotídeos; o fluxo da glicose-6-fosfato isomerase direcionado para gerar glicose-6-fosfato (direção oposta à qual foi definida a reação) que, em condições normais é utilizada para produzir glicogênio e lipopolissacarídeos, metabólitos essenciais para geração de precursores para a produção de biomassa (Hua et al., 2003; Noor et al., 2010).

Como se pode observar na Figura 8A, na reação catalisada pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase o fluxo estimado foi de 6,12 mmol gDW⁻¹ h⁻¹, enquanto a medição feita com carbono marcado por Puchałka e colaboradores (2008) foi de 8,39 ± 0,97 mmol gDW⁻¹ h⁻¹. Embora os valores difiram entre si, estes são próximos, se considerarmos que o fluxo foi maior do que nas reações mencionadas acima (ribulose-5 fosfato 3-epimerase e glicose-6-fosfato isomerase), além de acontecer no mesmo sentido. Algo semelhante aconteceu com as reações catalisadas pela α -cetoglutarato desidrogenase em conjunto com a succinil-CoA sintetase, as quais encontram-se juntas no modelo de Puchałka e colaboradores (2008) (9,57 mmol gDW⁻¹ h⁻¹ no fluxo da LFM046 e 6,50 ± 0,97 mmol gDW⁻¹ h⁻¹ nas medições com carbono marcado da literatura), e com a isocitrato-liase (com fluxo de 0 mmol gDW⁻¹ h⁻¹ tanto nas simulações rede da LFM046 como nos dados da literatura). Talvez, a mudança na magnitude das reações seja devida à fonte de carbono utilizada para alimentar a rede - uma utiliza glicose e a outra xilose - o que implica distribuições diferentes do carbono para chegar até a mesma reação. O impacto da fonte de carbono levou a diferenças substanciais, uma vez que cada uma destas vai utilizar vias metabólicas diferentes, ou mesmo com fluxos diferentes. Na produção de fosfoenolpiruvato a partir de gliceraldeído-3-fosfato no estudo de Puchałka e colaboradores (2008) as medições indicam valores em torno de 5 a 6 mmol gDW⁻¹ h⁻¹ dado que esta é a principal via que direciona o carbono até o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, enquanto que na rede proposta para *Pseudomonas* sp. LFM046 recombinante, o carbono entra diretamente no ciclo de Krebs após ser transportado pela via Weimberg, para posteriormente fornecer os precursores necessários para a produção de biomassa.

Na rede em que somente o polímero é produzido na LFM046 (Figura 8B), quase não se observam fluxos com valor negativo, confirmando a teoria de que todos aqueles que se encontravam na parte alta do gráfico eram imprescindíveis para satisfazer a exigência da taxa de crescimento. Contudo, os valores anteriormente comparados com os dados da literatura, neste caso encontram-se afastados uns dos outros, pois para atingir o objetivo da máxima produção de PHA é necessário que todo o carbono seja encaminhado até acetil coenzima A, que posteriormente será utilizada como precursor na formação dos monômeros do polímero.

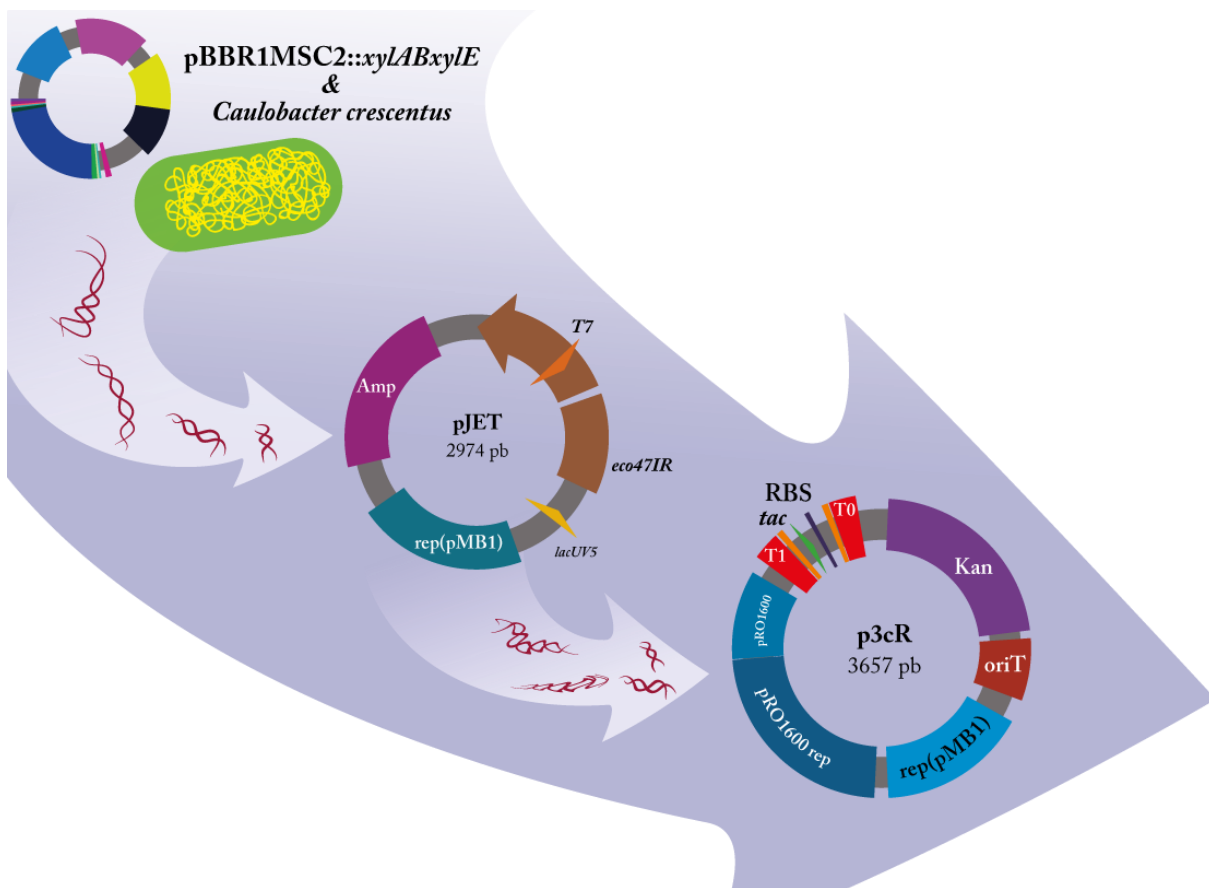
Observa-se também altos fluxos nas reações em que os cofatores são utilizados (fosfoenolpiruvato carboxilase, piruvato desidrogenase, enzima málica NAD^+ e NADP^+ dependente), isto deve-se ao fato de que quase a totalidade do carbono fornecido deverá ser utilizado em vias que geram como subprodutos alta quantidade de cofatores (principalmente na via de Weimberg e de produção de PHA), forçando a rede a distribuí-los em outras vias que possam utilizá-los na mesma velocidade em que são produzidos, para manter assim o equilíbrio do sistema.

Analisando este cenário, observa-se como a produção exclusiva de PHA implica um esforço para toda a rede em termos do balanço de massas para a geração de todos precursores que são necessários para a produção deste polímero, assim como a metabolização dos subprodutos. Pelo fato de as simulações serem realizadas utilizando o *core* construído, as implicações deste esforço só são apreciáveis nas vias centrais do metabolismo, porém é possível que seus efeitos repercutam em outras vias metabólicas desta linhagem e na regulação destas. Não obstante, as simulações indicam a possibilidade do acúmulo sob as duas circunstâncias. Assim, baseados nestes resultados, a construção dos recombinantes foi considerada viável e será discutido no próximo tópico.

5.3 Clonagem dos genes da via Weimberg e de um transportador de xilose em *Pseudomonas* sp. LFM046

A fim de capacitar a *Pseudomonas* sp. LFM046 a consumir xilose como fonte de carbono para a produção de PHA_{MCL} foi realizada a clonagem do operon *xylXABCD* (genes da via de Weimberg) de *C. crescentus*, e do gene *xylE* (codifica a enzima XylE transportadora de xilose para dentro da célula) de *Burkholderia sacchari*. A Figura 9 resume a estratégia utilizada para realização das clonagens.

Figura 9 – Estratégia empregada para clonagem dos genes de interesse nos diferentes vetores plasmidiano



Como estratégia para a clonagem do operon *xylXABCD* e do gene *xylE* provenientes de *C. crescentus* e do plasmídeo pBBR1MCS2::*xylABxylE* respectivamente, foram amplificadas com polimerase de alta fidelidade e ligadas no vetor comercial de clonagem pJET (Thermo Fisher Scientific) do qual foram posteriormente recuperadas por digestão com enzimas de restrição para ser inseridas no vetor de expressão p3cR. Algumas informações dos plasmídeos também são apresentadas na figura: (1) no plasmídeo pJET se apresenta a marca de resistência a ampicilina (Amp), a origem de replicação rep(pMB1) de alto número de cópias, o promotor *lacUV5* que transcreve o gene *eco471IR*, o qual se encontra segmentado pelo corte da enzima *EcoRV*; no gene *eco471IR* encontra-se o promotor T7. (2) no plasmídeo p3cR se apresenta a marca de resistência a canamicina (Kan), a origem de replicação junto com a proteína para a replicação do plasmídeo pRO1600, além da origem rep(pMB1); a origem de transferência (oriT), os terminadores de transcrição T1 e T0 e entre eles o promotor *tac* e o RBS sintetizados.

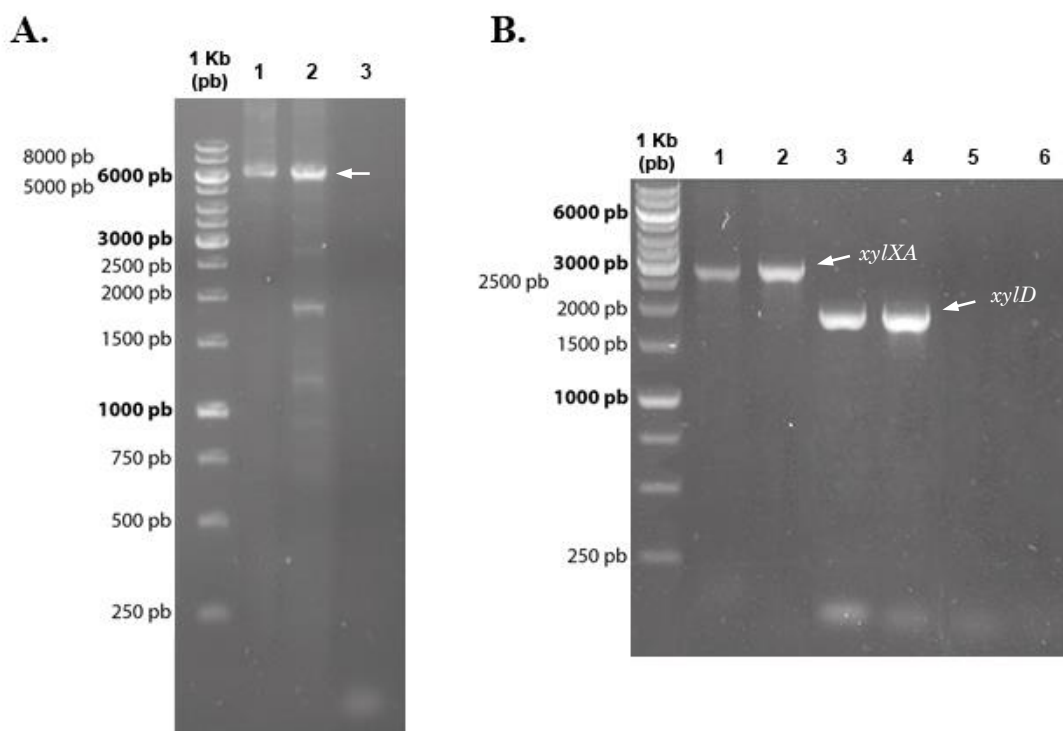
A primeira etapa do trabalho consistiu no desenho de iniciadores para a amplificação dos genes de interesse. Às extremidades 3' e 5' dos iniciadores foram adicionados sítios de reconhecimento de diferentes enzimas de restrição (FastDigest *KpnI* e FastDigest *XbaI*, Thermo Fisher Scientific), que não cortassem internamente nenhum dos genes presentes no operon a ser amplificado e posteriormente clonado; que possibilitasse a inserção dos genes na orientação correta para a transcrição pelo promotor *tac* presente no vetor construído; e além disto, para evitar a recircularização do vetor no momento da ligação. Para a amplificação e inserção do gene *xylE* no vetor em construção, os iniciadores foram desenhados contendo em suas extremidades apenas o sítio de reconhecimento da enzima *XbaI*, permitindo que este gene fosse inserido no vetor nas duas direções. Devido a isto, e para evitar a recircularização do vetor utilizou-se a enzima fosfatase que tem como função romper o enlace do grupo fosfato das extremidades 3' livres deste, após a digestão com enzimas de restrição.

Uma vez que a estratégia para a clonagem foi determinada e os iniciadores desenhados realizou-se a padronização da amplificação do operon *xyIXABCD* e do gene *xylE*.

Após determinar a melhor temperatura de anelamento dos iniciadores específicos para amplificar o operon, um fragmento de 6.122 pb foi obtido, o amplicon foi purificado do gel de agarose, ligado no vetor p3cR e transformado por eletrotransformação em *E. coli* DH10B. Inicialmente, todas as construções foram inseridas em *E. coli* devido a sua facilidade de manuseio, rápido crescimento e replicação do plasmídeo, para posteriormente serem transformados em *Pseudomonas* sp. LFM046 e LFM1525. Para validação dos clones obtidos foi realizada a *PCR* de colônia utilizando iniciadores que amplificavam o operon inteiro, os dois primeiros genes (*xylXA*) e o último gene (*xylD*) deste, a fim de confirmar a ligação do operon inteiro no vetor.

Na Figura 10A apresenta-se o perfil de migração em eletroforese da *PCR* confirmatória da obtenção do clone contendo o plasmídeo pJET-*xyIXABCD*. Na Figura 10B observam-se os amplicons dos genes *xyIXA* (2.608 pb), e *xyID* (1.789 pb).

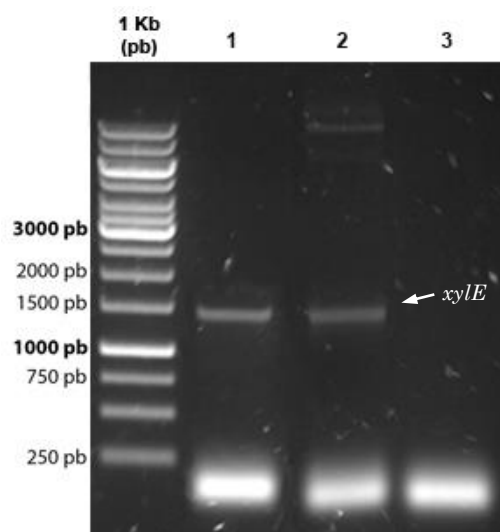
Figura 10 – Perfil de migração em gel de agarose dos produtos de *PCR* para confirmar a construção do vetor pJET-*xyIXABCD*



A. *PCR* do operon e seus controles; 1- plasmídeo extraído de colônia resistente; 2- DNA genômico de *C. crescentus* (controle positivo); 3- produto de *PCR* sem amostra (controle negativo). **B.** *PCR* dos genes *xyIXA* e *xyID*, e seus controles; 1- genes *xyIXA* amplificados diretamente da colônia resistente; 2- genes *xyIXA* amplificados a partir de DNA genômico de *C. crescentus* (controle positivo); 3- gene *xyID* amplificado diretamente da colônia resistente; 4- gene *xyID* amplificado a partir de DNA genômico de *C. crescentus* (controle positivo); 5- controle negativo – genes *xyIXA*; 6- controle negativo – gene *xyID*.

Da mesma forma, foi realizada e avaliada a clonagem do gene *xyIE* no plasmídeo pJET (Figura 11). O gene *xyIE* foi amplificado a partir do plasmídeo pBBR1MCS2::*xyIExyIAB* o qual conservava o RBS nativo de *Burkholderia sacchari*, mas sem promotor. Como observado na Figura 11, as bandas que se encontram entre 1.000 pb e 1.500 pb coincidem com o tamanho esperado para o transportador (~ 1.419 pb).

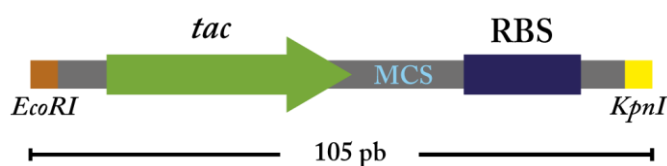
Figura 11 – Perfil de migração em gel de agarose dos produtos de *PCR* do gene *xylE* para confirmar a construção pJET-*xylE*



1- plasmídeo pBBR1MCS2::*xylE**xylAB* (controle positivo); 2- *PCR* realizada diretamente da colônia resistente; 3- controle negativo da *PCR*.

Paralelamente à clonagem de genes, foi realizada a construção do vetor de expressão p3cR pela transferência das sequências reguladoras sintetizadas (*tac* e o RBS T7 (*g10-L*) Epsilon) do plasmídeo pBSK-Nova ao plasmídeo pSEVA241. No desenho das sequências reguladoras sete sequências de reconhecimento por enzimas de restrição foram adicionadas, cinco destas localizadas entre o promotor o e RBS (*Hind*III, *Sall*, *Xho*I, *Sac*I e *Bam*HI) caso se optasse por utilizar só o promotor. Os outros dois sítios de reconhecimento de enzimas de restrição (*Eco*RV e *Kpn*I) foram adicionados flanqueando a construção para permitir que, após as montagens, esta pudesse ser transferida por inteiro para o vetor pSEVA241 (Figura 12).

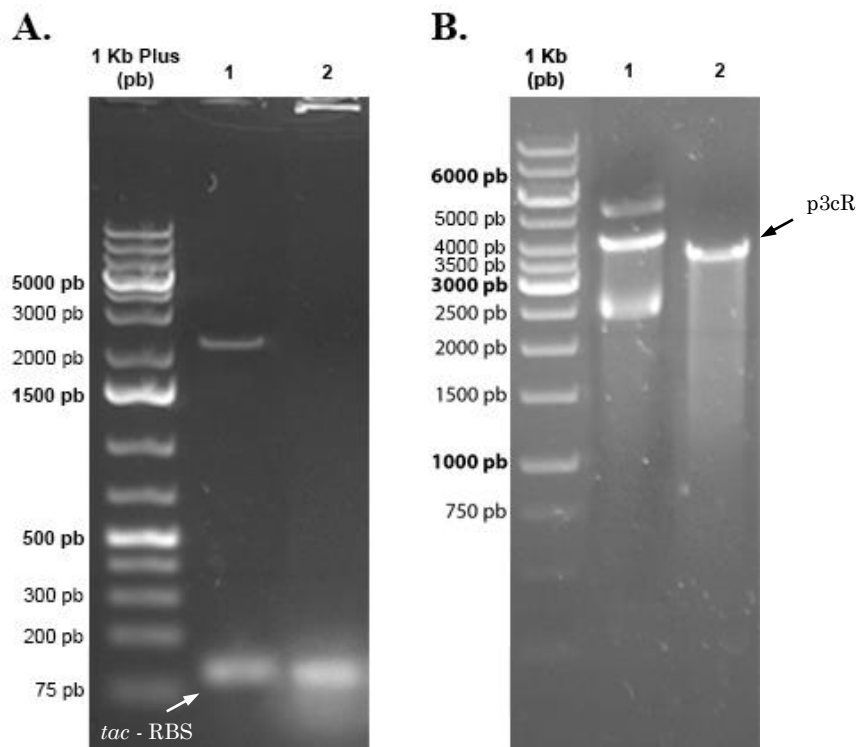
Figura 12 – Representação da sequência sintetizada contendo as regiões reguladoras



Na figura se apresentam os cinco sítios de corte para as enzimas de restrição mencionadas como MCS do inglês *Multiple Cloning Site* (sítio múltiplo de clonagem).

A avaliação da construção do vetor p3cR foi realizada por *PCR* e digestão enzimática (Figura 13). Nesta se observam as bandas resultantes após tratar o plasmídeo pBSK-Nova com as enzimas de restrição *EcoRI* e *KpnI*, além do amplificado por *PCR* utilizando como molde o vetor p3cR (Figura 13A); como última prova confirmatória foi realizada uma reação de digestão utilizando uma das enzimas que reconhecesse sítios de restrição únicos presentes no sítio múltiplo de clonagem (MCS), situado entre o promotor *tac* e o RBS sintetizados (Figura 13B), utilizando-se a enzima *XhoI* para este teste.

Figura 13 – Perfil de migração em gel de agarose de produtos de digestão e *PCR* para confirmar a construção p3cR



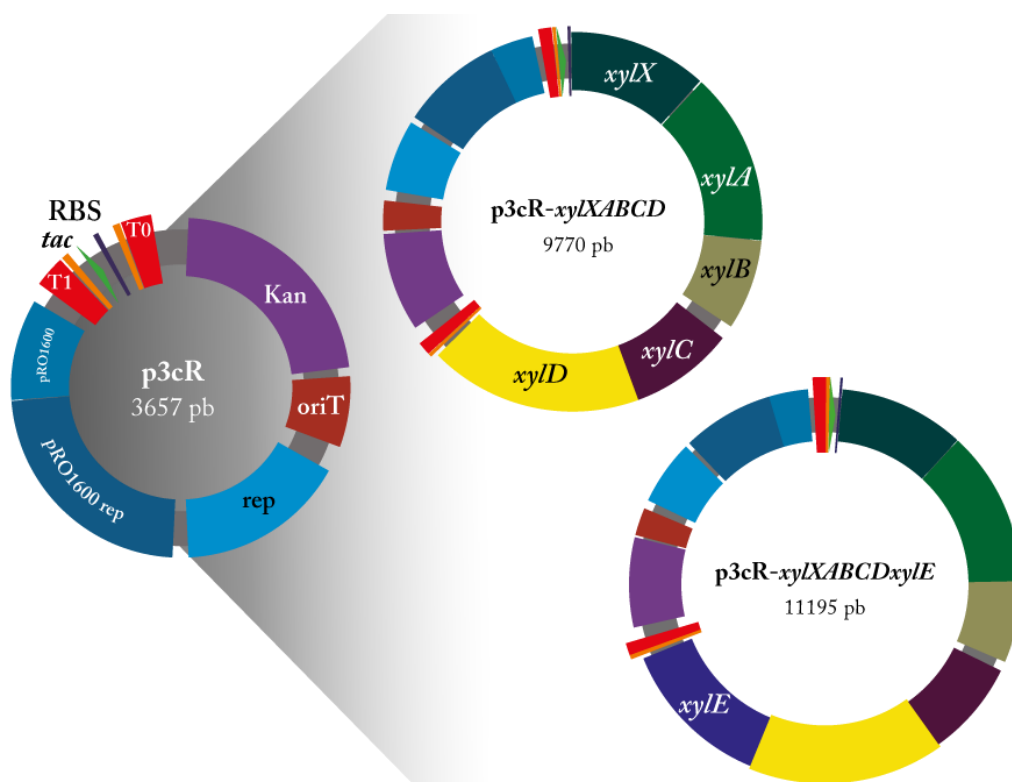
A. 1- plasmídeo pBSK-Nova digerido com *EcoRI* e *KpnI*; 2- *PCR* das seqüências reguladoras realizada diretamente da colônia resistente. **B.** 1- vetor p3cR sem digerir (controle negativo); 2- vetor p3cR digerido com a enzima *XhoI*.

As bandas observadas na Figura 13A encontram-se entre 75 e 200 pb, sendo que o fragmento de DNA sintetizado é de ~ 105 pb, coincidindo com o perfil de bandas esperado. No caso da Figura 13B, na canaleta 1 encontra-se o controle negativo da digestão – DNA plasmidial sem digerir –, apreciando-se as três conformações do plasmídeo, enquanto que na canaleta 2 este encontra-se linearizado pelo corte feito com a enzima *XhoI*. O único sítio de reconhecimento

para esta enzima encontra-se localizado entre promotor *tac* e o RBS sintetizados, assim a linearização do vetor só pode acontecer se o fragmento sintetizado foi ligado com sucesso ao *backbone*, com isto demonstrou-se a construção do vetor de expressão p3cR.

Com o vetor de expressão construído e os genes no plasmídeo de clonagem, foi realizada a transferência destes ao vetor p3cR (Figura 14).

Figura 14 – Mapa do plasmídeo p3cR sem inserto alvo deste trabalho e contendo o operon e o transportador

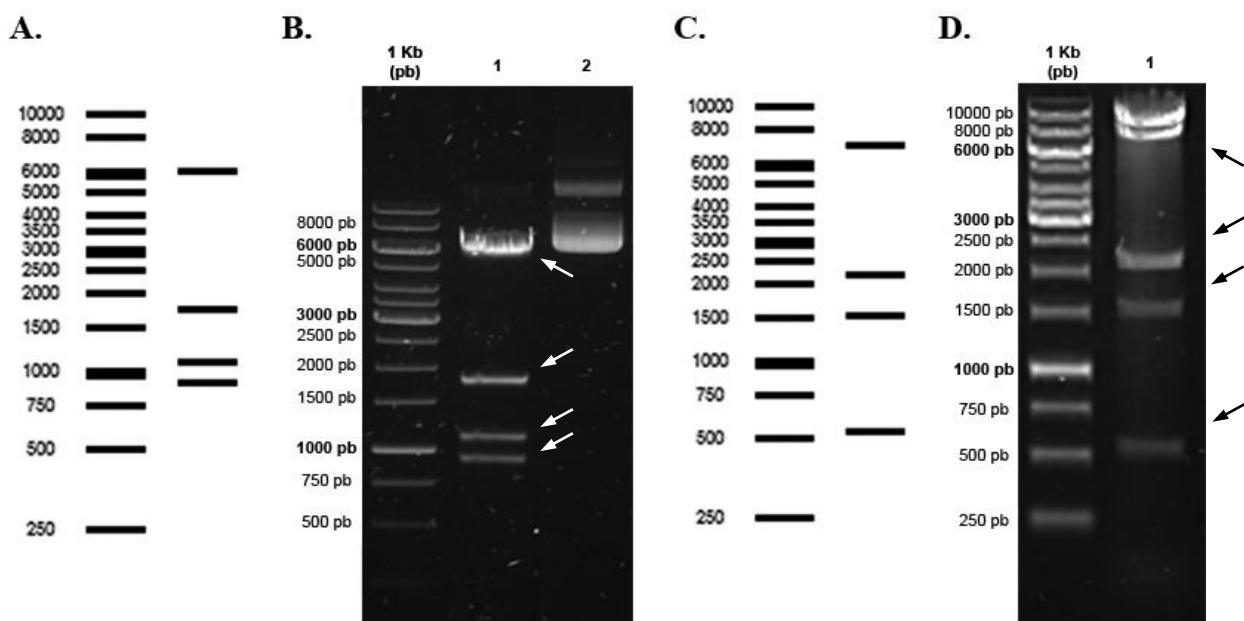


De esquerda para a direita: mapa do plasmídeo p3cR vazio, ao qual foi inserido o operon *xyLXABCD* (p3cR-X1) e posteriormente adicionou-se o transportador *xyLE* (p3cR-X2).

Em relação às construções da Figura 14, após as confirmações preliminares por *PCR* realizadas diretamente a partir de colônias obtidas e resistentes ao antibiótico, estas foram verificadas por reações de digestão e os perfis de restrição comparados com mapas de restrição realizados *in silico* (Figura 15). O uso de mapas de restrição ajuda na validação das construções, pois o perfil de bandas esperado tem que coincidir após as reações de digestão, facilitando assim a

identificação das construções desejadas e conseqüentemente validação das construções. Na confirmação do vetor p3cR-X1 foram obtidas quatro bandas após a digestão com a enzima *Xho*I, todas estas encontrando-se entre os tamanhos esperados conforme se observa no mapa de restrição (Figura 15A e B). Para confirmar a construção p3cR-X2, foram utilizadas duas enzimas - *Rru*I e *Pst*I - as quais deram como resultado cinco bandas, das quais 4 coincidem com o mapa de restrição. A banda que não coincide com o perfil esperado encontra-se perto de 10.000 pb e corresponde ao vetor linearizado que sofreu digestão parcial (Figura 15C e D).

Figura 15 – Perfil de migração de mapas de restrição para conferir as construções p3cR-X1 e p3cR-X2 junto com a predição *in silico*



A. Mapa de restrição *in silico* do plasmídeo p3cR-X1. **B.** Perfil de migração em gel de agarose de produtos de digestão do plasmídeo p3cR-X1. 1- vetor após reação com a enzima *Xho*I; 2- vetor sem digerir (controle negativo). **C.** Mapa de restrição *in silico* do plasmídeo p3cR-X2. **D.** Perfil de migração em gel de agarose de produtos de digestão do plasmídeo p3cR-X2. 1- vetor após reação com as enzimas *Rru*I e *Pst*I.

Utilizando os iniciadores desenhados ao longo da construção (6.122 pb) (Apêndice A), foram avaliados os genes clonados por sequenciamento. No Apêndice F e Apêndice G são apresentados os resultados comparativo do BLAST entre o *contig* resultante do sequenciamento com as seqüências FASTA depositadas nos bancos de dados cujos genes foram utilizados.

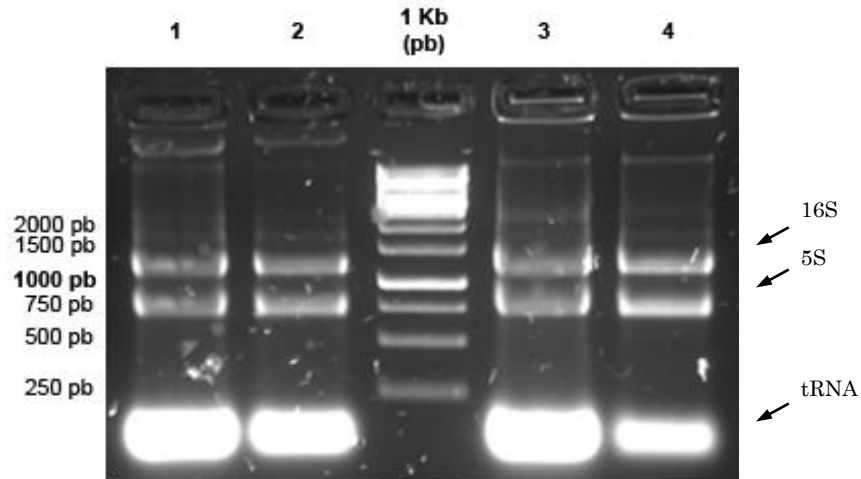
Com o sequenciamento de Sanger foi possível validar a integridade da sequência completa do operon e das sequências reguladoras clonadas no vetor. Estas não apresentaram nenhuma substituição, inserção ou deleção de base que poderia ter sido gerado durante o processo de amplificação e/ou ligação no vetor de clonagem/expressão e que pudesse interferir na expressão destes nos ensaios de consumo de xilose (Apêndice F e Apêndice G). No entanto, na construção portando o operon junto ao transportador, foram encontradas substituições de nucleotídeos no último gene do operon (*xyID*) e no gene do transportador, *xyIE*. No gene *xyID* dois dos três nucleotídeos que codificavam o códon de parada da tradução foram eliminados, além de terem sido inseridos cinco nucleotídeos, causando uma prolongação de cinco aminoácidos a mais na proteína resultante. Isto pode ocasionar mudanças na estrutura secundária da proteína, afetando a atividade enzimática desta. No gene *xyIE* uma alanina foi substituída por uma valina. No entanto estes aminoácidos são neutros apolares, alfa-aminoácidos e o ponto isoelétrico destes ocorre em pH 6,0, diferindo apenas pelo comprimento da cadeia principal (4 carbonos na valina com um grupo metila na posição 3, enquanto que a cadeia da alanina se compõe de 3 carbonos sem radicais), de modo que suas características não são muito diferentes, provavelmente não afetando na função da proteína, como foi observado anteriormente por Berg e colaboradores (2002). Uma vez que a clonagem de todos os genes de interesse no vetor de expressão foi confirmada, estes foram inseridos por eletrotransformação em *Pseudomonas* sp. LFM046 e testes para avaliar a expressão gênica nesta linhagem foram realizados.

5.4 Validação da expressão gênica da via de Weimberg clonada na *Pseudomonas* sp. LFM046 por RT-PCR

Foram realizadas culturas da linhagem LFM046 portando os vetores p3cR-X1 e p3cR (linhagens de *Pseudomonas* sp. LFM1527 e LFM1526 respectivamente - Tabela 1) a partir das quais foi realizada a extração de RNA total em duplicata biológica. A integridade do RNA total extraído apresenta-se na Figura 16. No gel de agarose pode-se observar as bandas correspondentes à subunidade 5S e 16S localizadas entre 750 e 1.000 pb e entre 1.000 e 1.500 pb respectivamente; na parte

baixa do gel encontram-se os RNAs transportadores, os quais, por serem de menor peso molecular, migram mais rápido no gel de agarose.

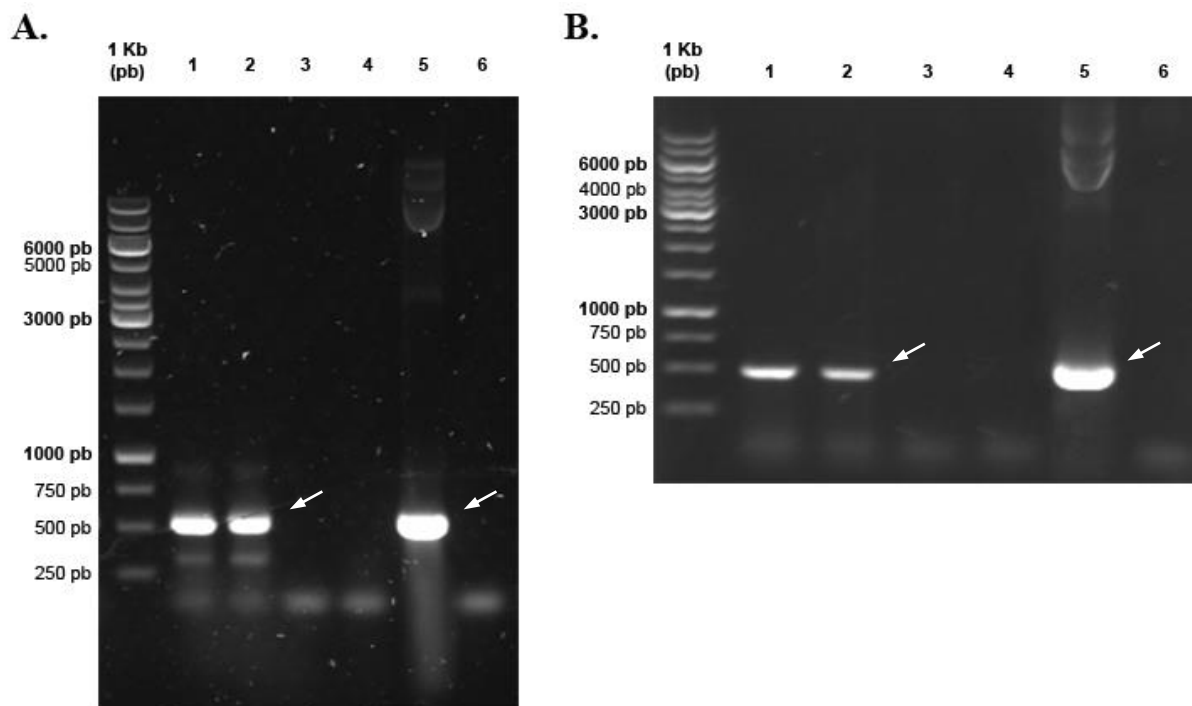
Figura 16 – Perfil de migração em gel de agarose mostrando a integridade do RNA total extraído da cultura de *Pseudomonas* sp. LFM1526 e LFM1527



1 e 2- *Pseudomonas* sp. LFM1527; 3 e 4- *Pseudomonas* sp. LFM1526.

Para avaliar a transcrição dos genes da via de Weimberg clonados em *Pseudomonas* sp. LFM046 foram desenhados iniciadores que amplificasse os primeiros ~ 500 pb do gene *xylX* (o primeiro gene do operon) e os últimos ~ 500 pb do gene *xylD* (o último gene do operon) (Apêndice A) o que significaria uma transcrição completa de todo o operon clonado. Utilizando como molde o cDNA, junto com os iniciadores desenhados, foi avaliada a transcrição mediante uma reação de *PCR*, pois esperava-se amplificação apenas nas reações em que o cDNA proveniente da linhagem LFM1527 fosse utilizado como molde, como observado na Figura 17; assim os amplicons encontram-se no tamanho desejado e na mesma altura do gel que o controle positivo.

Figura 17 – Perfil de migração em gel de agarose dos produtos de *PCR* a partir de cDNA



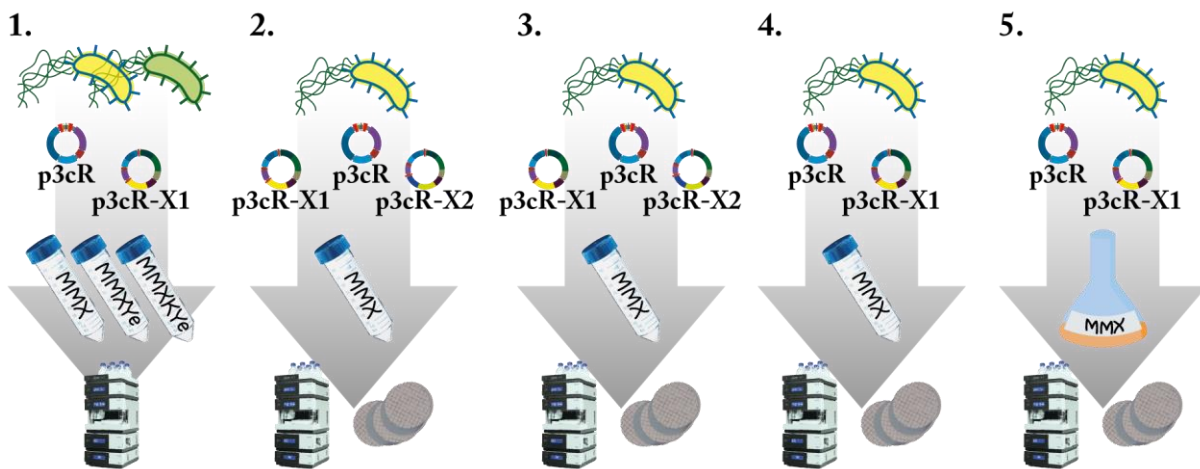
A. Produtos de *PCR* dos primeiros ~ 500 pb do operon. **1 e 2-** *Pseudomonas* sp. LFM1527; **3 e 4-** *Pseudomonas* sp. LFM1526 com o vetor p3cR; **5-** plasmídeo p3cR-X1 (controle positivo); **6-** Controle negativo da *PCR*. **B.** Produtos de *PCR* dos últimos ~ 500 pb do operon. **1 e 2-** *Pseudomonas* sp. LFM1527; **3 e 4-** *Pseudomonas* sp. LFM1526; **5-** plasmídeo p3cR-X1 (controle positivo); **6-** Controle negativo da *PCR*.

Como último passo para confirmar a transcrição do operon, os amplicons foram purificados do gel de agarose e validados por reação de sequenciamento, obtendo-se uma coincidência de 100% para as duas regiões (tanto nos primeiros ~ 500 pb como nos últimos ~ 500 pb de operon) (Apêndice H e Apêndice I). Com isto comprovou-se que o promotor foi expresso na *Pseudomonas* sp. LFM046.

5.5 Avaliação quanto ao consumo de xilose das linhagens obtidas

As construções p3cR, p3cR-X1 e p3cR-X2 foram eletroporadas nas linhagens LFM046 e LFM1525 com as quais foram realizados os seguintes ensaios de consumo de xilose em meio MM: três ensaios realizados em tubos falcon de 50 mL e um ensaio em erlenmeyer de 125 mL (Figura 18).

Figura 18 – Esquema dos ensaios realizados no trabalho



De cima para baixo: representações das linhagens de *Pseudomonas* sp. LFM046 (verde) e LFM1525 (amarela). Construções utilizadas em cada ensaio: vetor p3cR (vetor vazio) – controle –, p3cR-X1 (vetor p3cR contendo o operon *xyIXABCD*), p3cR-X2 (vetor p3cR contendo o operon *xyIXABCD* e o transportador *xyIE*). Meios de cultura utilizados: MMX (meio mineral com 10 g L⁻¹ de xilose), MMXYe (MMX suplementado com 1 g L⁻¹ de extrato de levedura), MMXK (MMX com canamicina) e MMXKYe (MMXYe com canamicina). Recipiente em que foi realizado o ensaio (tubos falcon ou erlenmeyer). Análises realizadas nas amostras: quantificação de açúcares residuais – foto HPLC - e/ou massa seca - metodologia gravimétrica – foto filtros.

Em uma caracterização preliminar da linhagem LFM046, esta foi estriada em MMX sólido e após 15 dias de incubação a 30 °C não foi possível observar colônias redondas e de forma bem definida, mas sim um crescimento difuso e pouco definido, só perceptível porque o meio ficou levemente mais opaco. Isto também foi observado por Gomez e colaboradores (1996) quando descreveram que a linhagem LFM046 seria uma bactéria xilose negativa. Assim, decidiu-se realizar diferentes ensaios de cultivo com o intuito de definir qual linhagem (parental ou evoluída portando a via de Weimberg) e qual meio de cultura em que todas as análises seriam realizadas (consumo da fonte de carbono, velocidade de crescimento, produção de PHA e fatores de conversão). Para isto, duas hipóteses foram avaliadas: (1) a xilose poderia oferecer uma pressão seletiva suficiente que impedisse a perda do vetor; (2) o extrato de levedura poderia afetar a adaptação das linhagens recombinantes nas condições de cultivo. Nicolò e colaboradores (2014) relataram que 1,0 g L⁻¹ de extrato de levedura diminuía a fase de adaptação de *Pseudomonas mediterranea*, quando o consumo de xilose por esta linhagem avaliou-se.

Pelo anteriormente dito, o meio MMX suplementado com extrato de levedura não foi testado pois o extrato de levedura poderia ser usado como fonte de carbono nas primeiras gerações celulares, não existindo uma pressão seletiva que evitasse que o plasmídeo se perdesse nessas gerações.

Para isto realizou-se o ensaio 1 da Figura 18. No Apêndice J se apresentam os resultados deste experimento. A partir dos resultados obtidos no experimento curvas de consumo de xilose foram realizadas (Figura 19 e Figura 20). Nestas é possível observar o efeito do plasmídeo p3cR-X1 nas linhagens LFM1527 e LFM1529 que apresentaram maior consumo de xilose. No meio MMXYe as linhagens consumiram em torno de 3,36 e 2,87 g L⁻¹ respectivamente, enquanto que em MMX consumiram em torno de 2,74 e 2,95 g L⁻¹ respectivamente. Este resultado corroborou o que já havia sido sugerido anteriormente em relação as duas hipóteses já discutidas neste trabalho: (1) o fato da bactéria ter a obrigação de utilizar os genes presente no plasmídeo para metabolizar a xilose, faz desta fonte de carbono uma pressão seletiva que impediu a eliminação do plasmídeo; (2) o maior consumo de xilose foi obtido no meio que continha extrato de levedura na sua composição, porém o comportamento das linhagens durante seu crescimento e consumo de xilose em meios com e sem este composto não foram diferentes. Aliás, Nicolò e colaboradores (2014) adicionaram o extrato de levedura como recurso para eliminar a fase de adaptação da *Pseudomonas mediterranea*, mas esta fase não foi visível no gráfico de consumo de xilose (Figura 19). Contudo, neste trabalho, o maior consumo de xilose foi observado quando as linhagens foram crescidas no meio de cultura contendo extrato de levedura. Não obstante, o consumo sobressaliente pode ser atribuído a uma maior população consumindo xilose e não a um “estimulo positivo” pelo extrato de levedura ao metabolismo da bactéria, pois para isto seria necessário que a linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046 conseguisse utilizar mais eficientemente a xilose.

Figura 19 – Curvas de concentração de xilose em função do tempo de cultivo das linhagens de *Pseudomonas* sp. cultivadas em MMXYe

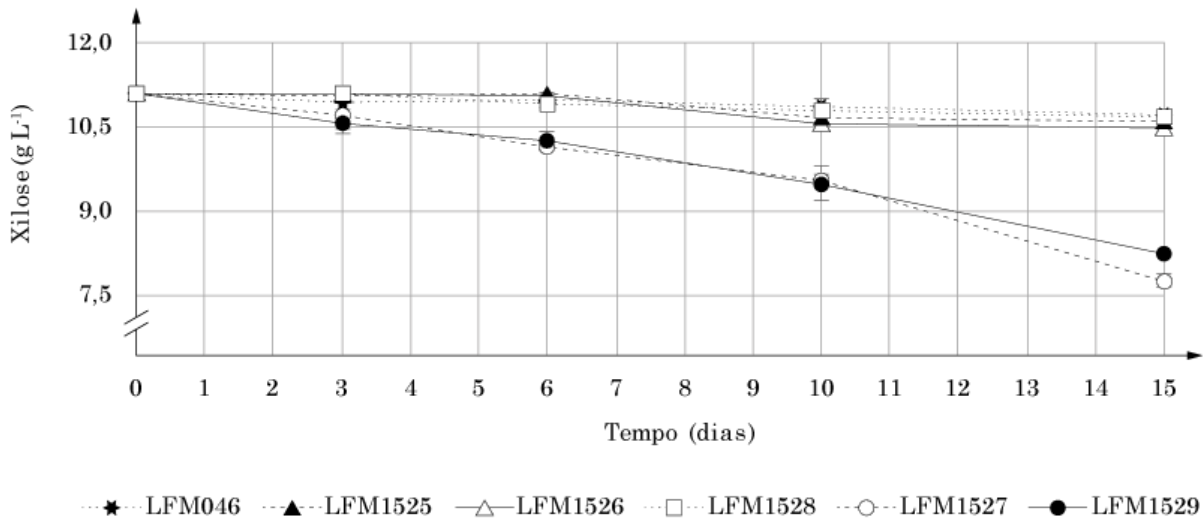
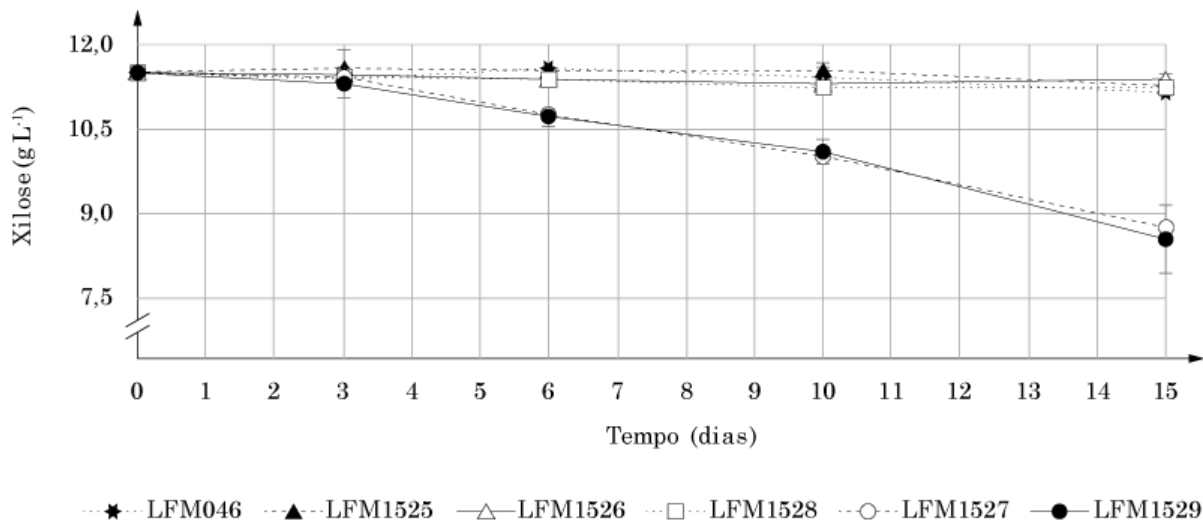


Figura 20 – Curvas de concentração de xilose em função do tempo de cultivo das linhagens de *Pseudomonas* sp. cultivadas em MMX



Baseado em estes resultados, as condições de cultivo (MMX) e a linhagem LFM1525 foram escolhidos para serem realizados o resto de ensaios.

Uma vez que foi observado inicialmente um baixo consumo de xilose por estas linhagens (Apêndice J), pensou-se que o transporte da pentose ao interior da célula poderia ser a principal causa para este fenômeno acontecer. Isto ocorreu pois no operon oriundo de *Caulobacter* não se encontra nenhum gene que codifique para um transportador, nesta linhagem o transporte de xilose não se associa a um transportador específico para esta fonte de carbono e sim a transportadores com

atividade inespecífica (Stephens et al., 2007a). Este fenômeno também foi observado na linhagem selvagem *Pseudomonas taiwanensis* e nas linhagens engenheiradas *Pseudomonas putida* KT2440 e *Pseudomonas putida* S12 (Köhler et al., 2015; Meijnen et al., 2009; Le Meur et al., 2012). Transportadores de hexoses em leveduras selvagens e modificados por engenharia evolutiva para melhorar a eficiência da assimilação da xilose e que podem transportar esta fonte de carbono, também foram descritos anteriormente (Farwick et al., 2014; Hamacher et al., 2002; Reider Apel et al., 2016). Além disto, na literatura, vários trabalhos relatam a expressão heteróloga de transportadores de xilose para melhorar o consumo desta fonte de carbono em linhagens em que o crescimento ou produção de algum produto de interesse vê-se limitado pela ineficiência dos transportadores nativos (Dunn, Rao 2014; Park et al., 2012; Saloheimo et al., 2007; Wang et al., 2013; Wei et al., 2016; Young et al., 2012). Baseados nestes trabalhos e com a colaboração de Guamán² (dados ainda não publicados) que disponibilizou o plasmídeo pBBR1MSC2::*xylABxylE*, cujo gene *xylE* de *Burkholderia sacchari*, que codifica para um simporter com afinidade por pentoses, foi utilizado neste trabalho para a construção do vector p3cR-X2. Com esta construção realizou-se o ensaio 2 (Figura 18) com o intuito de avaliar o consumo de xilose na linhagem LFM1525 no MMX, dosando a xilose residual e quantificando a biomassa. Com os dados obtidos neste ensaio foram construídas as curvas de consumo de xilose, e de massa seca – biomassa (Apêndice K), o que se resume na Tabela 7.

² Guaman LP. Clonagem e super expressão dos genes do catabolismo de xilose em *Burkholderia sacchari* e avaliação do efeito no consumo e produção de polihidroxibutirato a partir de açúcares lignocelulósicos [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016

Tabela 7 – Dados de concentração de xilose e biomassa, consumo de xilose e produção de biomassa e rendimentos calculados do ensaio 2

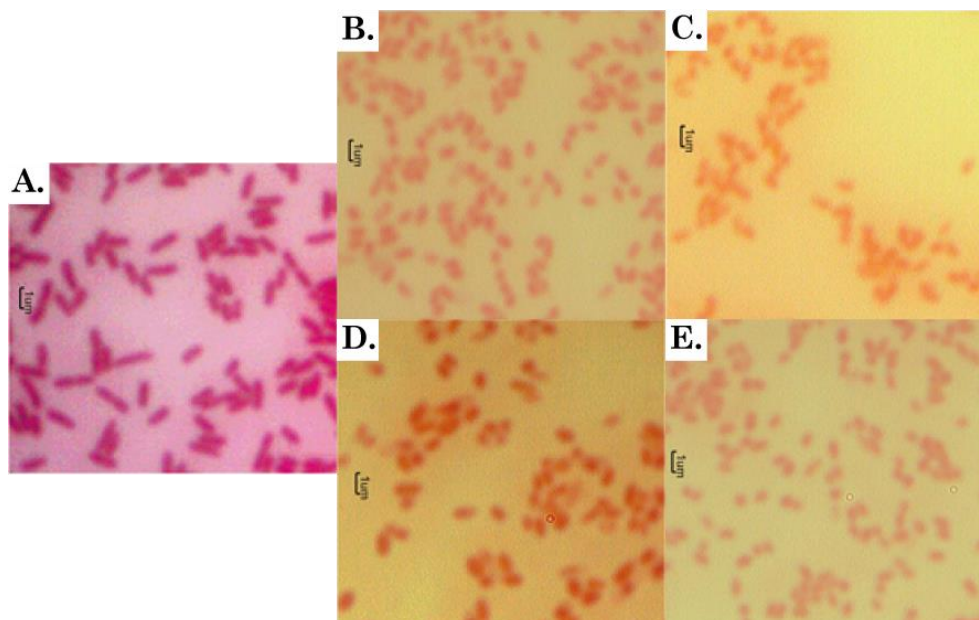
Linhagem	Variável	g L ⁻¹			Y _{x/s} (g g ⁻¹)
		T ₀	T ₁₅	Δ	
LFM1525	Massa seca	0,223 ± 0,01	0,110 ± 0,01	-0,113 ± 0,01	-0,61
	Xilose	9,94 ± 0,12	9,76 ± 0,07	0,19 ± 0,10	
LFM1528	Massa seca	0,263 ± 0,02	0,133 ± 0,02	-0,130 ± 0,02	0,52
	Xilose	9,84 ± 0,05	10,09 ± 0,23	-0,25 ± 0,17	
LFM1529	Massa seca	0,210 ± 0,01	0,445 ± 0,02	0,235 ± 0,02	0,14
	Xilose	9,78 ± 0,05	8,04 ± 0,45	1,74 ± 0,32	
LFM1530	Massa seca	0,187 ± 0,02	0,305 ± 0,04	0,118 ± 0,03	0,04
	Xilose	10,02 ± 0,09	7,04 ± 0,76	2,99 ± 0,54	

Dados de xilose residual e massa seca medida no tempo zero e no dia 15. Δ: xilose consumida ou biomassa produzida pela linhagem. Y(x/s): fator de conversão de substrato em biomassa.

Embora os fatores de conversão indiquem que a melhor linhagem é a LFM1528, o consumo de xilose e a biomassa produzida – coluna delta (Δ) da Tabela 7 – foram negativos para esta linhagem, o que resultou em um fator de conversão positivo. Este fenômeno deve-se a: (1) ao baixo consumo de xilose e aos erros em cada uma das amostragens, podendo gerar este tipo de dado; (2) ao estresse gerado pela expressão heteróloga da via de Weimberg para o consumo da xilose, levando a ativação de mecanismos de defesa por esta linhagem, o que pode ter ocasionado na diminuição do tamanho de suas células, como foi observado por microscopia óptica de amostras provenientes das culturas do ensaio 2 (Figura 21). Na Figura 21 observa-se o efeito provocado pelas condições de cultivo nas linhagens recombinantes (Figura 21B - E), sendo evidente uma diminuição do tamanho das células, comportamento observado até mesmo nas culturas do ensaio 5. A partir da análise comparativa das células bacterianas que apresentaram uma morfologia como observado na Figura 21A (correspondentes à amostra zero do ensaio), com a morfologia apresentada pelas linhagens após os ensaios (Figura 21B ou C), mesmo havendo apresentado crescimento ao longo do experimento, a diferença de tamanho pode ter alterado os resultados referentes ao seu peso celular, que variou nos ensaios, neste caso em detrimento da população proveniente do MMX. Contudo, este teste simples também permite apreciar o efeito que a expressão heteróloga da via de Weimberg pode causar no comportamento celular desta linhagem e consequentemente na sua morfologia e crescimento. Isto pode ser observado, por exemplo, na linhagem LFM1529, que apresentou o maior tamanho, como

observado na Figura 21D, e que em conjunto com a linhagem LFM1530 atingiram os maiores valores referentes ao consumo de xilose e produções de biomassa.

Figura 21 – Coloração de Gram das linhagens de *Pseudomonas* sp. cultivadas em MMX e meio LB



A. Linhagem LFM1525 (cultivada em meio LB). B. Linhagem LFM1525. C. Linhagem LFM1528. D. Linhagem LFM1529. E. Linhagem LFM1530.

Neste experimento observou-se que a biomassa gerada pela linhagem LFM1530 atingiu em 6 dias o máximo alcançado pela linhagem LFM1529 ($\sim 0,440 \text{ g L}^{-1}$), mas com um consumo menor da fonte de carbono (aproximadamente $0,5 \text{ g L}^{-1}$ menos de xilose) (Apêndice K). Estes resultados indicam que a melhora no rendimento pode ser atribuída à presença do transportador XylE nesta linhagem. Para confirmar esta observação realizou-se o ensaio 3 em que foram avaliados os mesmos parâmetros (consumo de xilose e formação de biomassa), mas em 6 dias. Com os dados obtidos neste ensaio foram produzidas as curvas de consumo de xilose e de massa seca – biomassa (Apêndice L), o que se resume na Tabela 8.

Tabela 8 – Dados de concentração de xilose e biomassa, consumo de xilose e produção de biomassa e rendimentos calculados do ensaio 3

Linhagem	Variável	g L ⁻¹			Y _{x/s} (g g ⁻¹)
		T ₀	T ₆	Δ	
LFM1525	Massa seca	0,228 ± 0,01	0,188 ± 0,02	-0,040 ± 0,01	-0,08
	Xilose	9,58 ± 0,48	9,08 ± 0,30	0,51 ± 0,40	
LFM1528	Massa seca	0,235 ± 0,02	0,168 ± 0,01	-0,067 ± 0,01	-0,30
	Xilose	9,43 ± 0,07	9,20 ± 0,11	0,23 ± 0,09	
LFM1529	Massa seca	0,230 ± 0,01	0,320 ± 0,02	0,090 ± 0,02	0,07
	Xilose	9,43 ± 0,16	8,17 ± 0,25	1,26 ± 0,21	
LFM1530	Massa seca	0,215 ± 0,01	0,178 ± 0,03	-0,037 ± 0,02	-14,67
	Xilose	9,30 ± 0,08	9,30 ± 0,55	0,00 ± 0,39	

Dados de xilose residual e massa seca medida no tempo zero e no dia 6. Δ: xilose consumida ou biomassa produzida pela linhagem. Y(x/s): fator de conversão de substrato em biomassa.

Na Tabela 8 observam-se valores de delta (Δ) negativos, neste caso unicamente para a biomassa produzida, o que também afetou o cálculo dos fatores de conversão. Baseados nos resultados obtidos, a linhagem LFM1530 foi desconsiderada, pois estes foram incongruentes, uma vez que seu comportamento foi similar ao observado nos controles. Assim, decidiu-se continuar os ensaios de cultivo com a linhagem LFM1529, pois embora os valores de consumo e produção de biomassa não foram reproduzíveis, seu comportamento era congruente.

Com a tentativa de caracterizar o comportamento da linhagem LFM1529 realizou-se o ensaio 4 e 5, avaliando os mesmos parâmetros (consumo de xilose e formação de biomassa), durante 15 dias com a diferença de que o ensaio 5 foi realizado em erlenmeyers de 125 mL e como controle somente foi utilizada a linhagem LFM1528. Utilizando os dados obtidos nestes ensaios realizaram-se as mesmas análises e cálculos realizados nos ensaios anteriores (curvas de consumo de xilose e produção de biomassa, assim como o cálculo de fatores de conversão) (Apêndice M e Apêndice N), nos quais os resultados se repetiram: deltas (Δ) negativos, causando fatores de conversão negativos e de alto valor (quando calculado com dois Δ de valor negativos), impossibilitando a caracterização da linhagem LFM1529. No entanto, a tendência geral era a mesma: os controles não se afastavam ou oscilavam entorno do valor inicial (t₀), enquanto que a linhagem com a construção p3cR-X1 apresentava melhores consumos de xilose e produções

de biomassa. Desta forma, é clara a diferença que faz a expressão heteróloga dos genes da via de Weimberg e do transportador *xylE* nestas linhagens.

Como estratégia para tentar identificar os possíveis pontos críticos que poderiam estar relacionados em que a expressão do operon poderia ver-se afetada, foram realizados testes moleculares, como sequenciamento das construções e *RT-PCR* das linhagens LFM1526 e LFM1527 (seções 4.5.3.6 e 4.5.4 respectivamente). Os dados apresentados na seção 5.4 como resultado da *RT-PCR* permitiram comprovar a funcionalidade do promotor *tac* na linhagem LFM046, o que elimina a hipóteses de que os genes não estivessem sendo transcritos. No entanto, se todos, ou alguns deles, estão sendo traduzidos e formando proteínas é uma variável que não foi comprovada no trabalho.

Meijnen e colaboradores (2009) expressaram de forma heteróloga este mesmo operon em *Pseudomonas putida* S12, relatando que XylD foi a única enzima necessária para capacitar a S12 a consumir xilose, atingindo velocidades específicas de crescimento de 0,11 h⁻¹, a menor velocidade apresentada nas recombinantes obtidas em seu experimento. Entanto, neste mesmo trabalho, observou-se que se outras enzimas do operon *xylXABCD* eram expressas em conjunto – XylX e XylA – esta velocidade aumentava. Em *Pseudomonas taiwanensis*, foram descritos 4 genes compondo o operon responsável pela via de Weimberg, sendo um deles o regulador e os outros três, enzimas envolvidas no catabolismo de xilose (PVLB_18550, PVLB_18560 e PVLB_18565) (Köhler et al., 2015). Mediante o BLASTP foram comparadas as cinco proteínas de *C. crescentus* com as três proteínas de *P. taiwanensis*, obtendo-se 28% de identidade entre a PVLB_18550 e XylA; 57% de identidade entre a PVLB_18560 e XylX; e 64% de identidade entre a PVLB_18565 e XylD, sendo estas 3 proteínas as relatadas por Meijnen e colaboradores (2009). Estas enzimas catalisam os últimos três passos da via de Weimberg (Figura 4), em que o xilonato é levado até α -cetogluturato, sendo este um metabólito principal no ciclo dos ácidos tricarbóxicos.

Utilizando a mesma ferramenta comparativa (BLASTP), estas proteínas foram procuradas no genoma da *Pseudomonas* sp. LFM046, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados comparativos (BLASTP) de proteínas envolvidas na via de Weimberg de *C. crescentus* e *P. taiwanensis* com proteínas presentes em *Pseudomonas* sp. LFM046

Proteína / Origem	Tamanho aa \ Identidade (%)	Proteína homóloga em LFM046
XylA / <i>C. crescentus</i>	277/470 \ 58	2-cetoglutárico-semialdeído desidrogenase
PVLB_18550 / <i>P. taiwanensis</i>	392/526 \ 74	Cetoglutarato-semialdeído desidrogenase
XylD / <i>C. crescentus</i>	226/582 \ 38	Di-hidroxi-ácido desidratase
PVLB_18565 / <i>P. taiwanensis</i>	220/572 \ 38	Di-hidroxi-ácido desidratase

Na Tabela 9, as duas proteínas que apresentaram identidade com XylA e PVLB_18550, foram anotadas no genoma da LFM046 como catalizadoras da mesma reação (EC 1.2.1.26), sendo esta a última reação da via de Weimberg em que é produzido o α -cetoglutarato (Figura 4). Com base nisto, podemos inferir que esta reação poderia ser catalisada por alguma destas enzimas presentes nesta linhagem caso a proteína XylA não estivesse sendo corretamente expressa. Contudo, seriam essenciais proteínas homólogas a XylD ou PVLB_18565 e a XylX ou PVLB_18560, para que a via ocorresse naturalmente na LFM046. Por esta razão, a expressão heteróloga destas duas enzimas é imprescindível para que o catabolismo de xilose acontecesse na LFM046 pela via de Weimberg. Correlacionando estes resultados com os dados experimentais, duas hipóteses são prováveis: (1) eventos após a transcrição fizeram com que alguma das proteínas necessárias não fosse traduzida ou não fosse funcional, afetando o consumo de xilose e crescimento. Para desenvolver esta análise devemos considerar o baixo valor de identidade apresentada entre as enzimas XylD e PVLB_18565 com a di-hidroxi-ácido desidratase (Tabela 9), o que poderia explicar o crescimento reduzido da linhagem selvagem em MMX sólido após 15 dias de incubação (Batista et al., 2016). No entanto, os resultados apresentados anteriormente (ensaios de avaliação do consumo de xilose e produção de biomassa), demonstraram o efeito que tem a expressão do operon *xylXABCD*, melhorando o desempenho das linhagens que o continham em relação aos controles que não o possuíam (Apêndices J - N).

Baseados nestes resultados, mesmo que estas enzimas fossem expressas em baixa quantidade, as proteínas XylD e/ou a proteína XylX, podem estar melhorando o desempenho das linhagens. Isto supondo que estas seriam as principais responsáveis pela capacitação no consumo de xilose. Contudo, para esclarecer esta hipótese, as enzimas XylD e XylX provenientes de *C. crescentus* teriam que ser comparadas às de *Pseudomonas* LFM1527 ou LFM1529, mediante ensaios de atividade enzimática. A segunda hipótese seria: (2) se o operon é transcrito e traduzido gerando proteínas funcionais, o fator limitante seria a quantidade de xilose intracelular, devido à baixa especificidade dos transportadores inespecíficos nativos da linhagem. Devido a isto, neste trabalho, com o intuito de minimizar o impacto deste fator, a evolução da linhagem LFM046 foi realizada em conjunto com a inserção do gene *xylE* em uma das construções produzidas. Entretanto, devido às substituições de nucleotídeos observadas na construção presente no vetor p3cR-X2 produzido – em que o último gene (*xylD*) e a sequências do transportador (*xylE*) foram afetadas – não foi possível descartar esta hipótese.

Outra hipótese levantada neste trabalho ocorreu quando foi realizada uma semeadura de um BCP da linhagem LFM046, estocada em -80 °C em MMX sólido. Após 3 dias de crescimento a 30 °C observou-se uma colônia com crescimento sobressaliente e possuindo uma coloração diferente da coloração característica da linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046. Testes bioquímicos realizados nesta colônia (oxidase, catalase e coloração de Gram) somados ao sequenciamento do gene rRNA 16S indicaram ser a linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046. A mudança na coloração desta linhagem poderia ser explicada devido a possíveis danos gerados ao DNA desta linhagem e seu subsequente reparo como descrito no item 5.1. Estes danos poderiam ter sido causados por espécies reativas de oxigênio, as quais têm sido encontradas em diferentes células durante a criopreservação, referindo-se a isto como “criodanos” mutagênicos no DNA (Baumber et al., 2003; Chatterjee, Gagnon 2001; Labbe et al., 2001; Park et al., 1998; Todorova et al., 2012; Zilli et al., 2003), o que pode ter ocorrido devido a esta linhagem ter sido preservada a -80 °C. Esta linhagem foi nomeada como LFM1536.

Enzimas pertencentes às outras vias metabólicas de xilose (via da xilose isomerase, da xilose redutase e a via Dahms) também foram procuradas no genoma da *Pseudomonas* sp. LFM046 usando o BLASTP com o intuito de comparar as identidades obtidas com outras proteínas de cada uma das vias de Weimberg. Os resultados são apresentados no Apêndice O. Para a enzima xilose isomerase não foi encontrada nenhuma proteína homóloga na LFM046, todas as demais apresentaram porcentagens de identidade inferiores ao obtido para XylD. Assim, é possível que a linhagem LFM1536 utilize a via de Weimberg como via catabólica de xilose. Além de esta possível mudança, podem ter acontecido também alterações em genes codificadores para transportadores que aumentaram sua afinidade pela xilose devido aos “criodanos” mutagênicos, obtendo-se uma linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046 capaz de utilizar xilose como única fonte de carbono nativamente. No entanto, mais testes seriam necessários para assim identificar qual via de fato está sendo usada no catabolismo desta fonte de carbono por esta linhagem, além de ensaios que determinem a velocidade de consumo de xilose, a velocidade específica de crescimento, produção de PHA, entre outros.

6 CONCLUSÃO

A pressão seletiva exercida durante a engenharia evolutiva resultou em uma melhora no consumo de xilose em comparação com a linhagem selvagem, embora o consumo de xilose apresentado pela linhagem LFM1525 continue ineficiente.

As simulações realizadas com o *core* construído para a *Pseudomonas* sp. LFM046 contendo a via de Weimberg demonstraram que, no nível estequiométrico, e de balanço de massas dos metabólitos, a via de Weimberg pode sustentar o metabolismo da linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046. Entretanto, as análises de cultivo em MM contendo xilose evidenciou que, apesar da baixa velocidade de consumo e crescimento, a construção favorece o consumo de xilose e produção de biomassa pela linhagem recombinante. Apesar disto, mais elementos, como por exemplo, a otimização de códons, regulação da expressão ou indução da via, assim como transportadores eficientes de xilose, são necessários para construir uma recombinante com a capacidade de gerar dados que permitam a avaliação do modelo construído. Estes resultados nos fazem inferir que talvez, eventos pós-transcricionais podem ter acontecido, alterando a funcionalidade das enzimas resultantes ou mesmo impedindo a tradução do RNAm. Talvez, a baixa velocidade de consumo de xilose e produção de biomassa sejam o resultado destes eventos.

A obtenção de um clone xil⁺ (LFM1536) a partir de uma amostra congelada abre novas perspectivas de estudo sobre eventos mutagênicos espontâneos que levaram à obtenção deste fenótipo.

REFERÊNCIAS*

Altaf-UI-Amin M, Afendi FM, Kiboi SK, Kanaya S, Altaf-UI-Amin M, Afendi FM, et al. Systems biology in the context of big data and networks. Biomed Res. Int. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014:428570.

Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol Rev. 1990;54(4):450–72.

Batista FAH, Seraphim T V., Santos CA, Gonzaga MR, Barbosa LRS, Ramos CHI, et al. Low sequence identity but high structural and functional conservation: The case of Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop/Sti1) of *Leishmania braziliensis*. Arch. Biochem. Biophys. 2016;600:12–22.

Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. J. Androl. Blackwell Publishing Ltd; 8 de julho de 2003;24(4):621–8.

Beall DS, Ohta K, Ingram LO. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; julho de 1991;38(3):296–303.

Becker SA, Feist AM, Mo ML, Hannum G, Palsson BØ, Herrgard MJ. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. Nat. Protoc. janeiro de 2007;2(3):727–38.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Proteins Are Built from a Repertoire of 20 Amino Acids. Biochemistry. 5th editio. New York: W H Freeman; 2002. p. 18–23.

de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. janeiro de 1983;80(1):21–5.

Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. Free Radic. Biol. Med. 2002;32(9):804–12.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [2016 May 25]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Boles BR, Singh PK. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*; 26 de agosto de 2008;105(34):12503–8.

Brienzo M, Carvalho W, Milagres AM. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;162(4):1195–205.

Brouns SJ, Walther J, Snijders AP, van de Werken HJ, Willemsen HL, Worm P, et al. Identification of the missing links in prokaryotic pentose oxidation pathways: evidence for enzyme recruitment. *J Biol Chem*. 2006;281(37):27378–88.

Burgard AP, Pharkya P, Maranas CD. Optknock: A bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnol. Bioeng*. 20 de dezembro de 2003;84(6):647–57.

Camacho DM, Collins JJ, Bonneau R, Camacho D, Licona PV, Mendes P, et al. Systems biology strikes gold. *Cell*. Elsevier; 3 de abril de 2009;137(1):24–6.

Canilha L, Kumar Chandel A, dos Santos Milessi TS, Fernandes Antunes FA, da Costa Freitas WL, das Graças Almeida Felipe M, et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:989572.

Cardinali-Rezende J, Alexandrino PMR, Nahat RATP, Sant’Ana DPV, Silva LF, Gomez JGC, et al. Draft Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain LFM046, a Producer of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate. *Genome Announc*. 20 de agosto de 2015;3(4):e00966-15.

Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev*. John Wiley & Sons, Inc.; agosto de 2001;59(4):451–8.

Chen Y, Nielsen J. Advances in metabolic pathway and strain engineering paving the way for sustainable production of chemical building blocks. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2013;24(6):965–72.

Cherix, J. Avaliação de genes para o catabolismo de xilose e seu potencial para geração de bioprodutos [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015. 139p.

Choi K-H, Schweizer HP. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. Nat. Protoc. janeiro de 2006;1(1):153–61.

Dahms AS, Donald A. 2-Keto-3-deoxy-d-xylonate aldolase (3-deoxy-d-pentulosonic acid aldolase). Methods Enzymol. 1982;90 Pt E:269–72.

David JD, Wiesmeyer H. Control of xylose metabolism in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 24 de março de 1970;201(3):497–9.

Diniz SC, Taciro MK, Gomez JGC, Pradella JG da C, da Cruz Pradella JG. High-Cell-Density Cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Production From Sugarcane Carbohydrates. Appl. Biochem. Biotechnol. Humana Press; outubro de 2004;119(1):51–70.

Dunn KL, Rao C V. Expression of a xylose-specific transporter improves ethanol production by metabolically engineered *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer Berlin Heidelberg; 17 de agosto de 2014;98(15):6897–905.

Dunn KL, Rao C V. High-throughput sequencing reveals adaptation-induced mutations in pentose-fermenting strains of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Bioeng. novembro de 2015;112(11):2228–40.

van Duuren JBJH, Puchałka J, Mars AE, Bücker R, Eggink G, Wittmann C, et al. Reconciling in vivo and in silico key biological parameters of *Pseudomonas putida* KT2440 during growth on glucose under carbon-limited condition. BMC Biotechnol. janeiro de 2013;13:93.

Ebert BE, Kurth F, Grund M, Blank LM, Schmid A. Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to increased NADH and ATP demand. Appl. Environ. Microbiol. setembro de 2011;77(18):6597–605.

Ebrahim A, Lerman JA, Palsson BO, Hyduke DR. COBRApy: COntstraints-Based Reconstruction and Analysis for Python. BMC Syst. Biol. BioMed Central; 8 de agosto de 2013;7:74.

Evinger M, Agabian N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. J. Bacteriol. outubro de 1977;132(1):294–301.

Farwick A, Bruder S, Schadeweg V, Oreb M, Boles E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*; 2014;111(14):5159–64.

Gomez JGC, Rodrigues MFA, Alli RCP, Torres BB, Netto CLB, Oliveira MS, et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24 de julho de 1996;45(6):785–91.

Graf N, Altenbuchner J. Genetic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for rapid and high-yield production of vanillin from ferulic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* janeiro de 2014;98(1):137–49.

Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Jeppsson M, Gorwa-Grauslund MF. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;108:147–77.

Hamacher T, Becker J, Gárdonyi M, Hahn-Hägerdal B, Boles E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology. Microbiology Society*; 1 de setembro de 2002;148(Pt 9):2783–8.

Hottes AK, Meewan M, Yang D, Arana N, Romero P, McAdams HH, et al. Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. *J Bacteriol.* 2004;186(5):1448–61.

Hua Q, Yang C, Baba T, Mori H, Shimizu K. Responses of the Central Metabolism in *Escherichia coli* to Phosphoglucose Isomerase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Knockouts. *J. Bacteriol.* 2003;185(24):7053–67.

Huang L, Liu C, Liu Y, Jia X. The composition analysis and preliminary cultivation optimization of a PHA-producing microbial consortium with xylose as a sole carbon source. *Waste Manag.* junho de 2016;52:77–85.

Ibis Biosciences: BioEdit. Version 7.2.5 [software]. 2013 Dez 11 [citado 2015 Jun 10]. Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>.

Jeong Y, Epstein DJ. Modification and Production of BAC Transgenes. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. p. 23.11.1-23.11.15.

Keasling JD. Manufacturing Molecules Through Metabolic Engineering. *Science* (80-.). 2010;1355(6009):1355–8.

Köhler KAK, Blank LM, Frick O, Schmid A. D-Xylose assimilation via the Weimberg pathway by solvent-tolerant *Pseudomonas taiwanensis* VLB120. *Environ. Microbiol.* janeiro de 2015;17(1):156–70.

Koller M, Atlić A, Dias M, Reiterer A, Braunegg G. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 85–119.

Kondo A, Ishii J, Hara KY, Hasunuma T, Matsuda F. Development of microbial cell factories for bio-refinery through synthetic bioengineering. *J Biotechnol.* 2013;163(2):204–16.

Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maisse G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev.* John Wiley & Sons, Inc.; novembro de 2001;60(3):397–404.

Laluce C, Schenberg AC, Gallardo JC, Coradello LF, Pombeiro-Sponchiado SR. Advances and developments in strategies to improve strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processes to obtain the lignocellulosic ethanol--a review. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;166(8):1908–26.

Laub MT, Shapiro L, McAdams HH. Systems biology of *Caulobacter*. *Annu Rev Genet.* 2007;41:429–41.

Ledesma-Amaro R, Lazar Z, Rakicka M, Guo Z, Fouchard F, Coq A-MC-L, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to produce chemicals and fuels from xylose. *Metab. Eng.* 2016;38:115–24.

Lee B-U, Hong J-H, Kahng H-Y, Oh K-H. Construction of an *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vector containing an aminoglycoside phosphotransferase gene and a lacZ” Gene for alpha-complementation. *J. Microbiol.* dezembro de 2006a;44(6):671–3.

Lee J, Saddler JN, Um Y, Woo HM. Adaptive evolution and metabolic engineering of a cellobiose- and xylose- negative *Corynebacterium glutamicum* that co-utilizes cellobiose and xylose. *Microb. Cell Fact.* 2016;15(1):20.

Lee JM, Gianchandani EP, Papin JA. Flux balance analysis in the era of metabolomics. *Brief. Bioinform.* junho de 2006b;7(2):140–50.

Liu Y, Shin H, Li J, Liu L. Toward metabolic engineering in the context of system biology and synthetic biology: advances and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer Berlin Heidelberg; 31 de fevereiro de 2015;99(3):1109–18.

Lopes MSG, Gomez JGC, Silva LF. Cloning and overexpression of the xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and production of polyhydroxybutyrate from xylose. *Can. J. Microbiol.* 17 de agosto de 2009a;55(8):1012–5.

Lopes MSG, Gomez JGC, Taciro MK, Mendonça TT, Silva LF. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous removal of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* setembro de 2014;41(9):1353–63.

Lopes MSG, Gosset G, Rocha RCS, Gomez JGC, Ferreira da Silva L. PHB Biosynthesis in catabolite repression mutant of *Burkholderia sacchari*. *Curr. Microbiol.* outubro de 2011;63(4):319–26.

Lopes MSG, Rocha RCS, Zanotto SP, Gomez JGC, Silva LF da. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2 de junho de 2009b;25(10):1751–6.

Lu XY, Wu Q, Chen GQ. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with flexible 3-hydroxyhexanoate content in *Aeromonas hydrophila* CGMCC 0911. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer-Verlag; 2004;64(1):41–5.

MacFaddin JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria.* 3d ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

Mahadevan R, Schilling CH. The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metab. Eng.* 2003;5(4):264–76.

Meijnen JP, De Winde JH, Ruijssenaars HJ. Engineering *Pseudomonas putida* S12 for efficient utilization of D-xylose and L-arabinose. *Appl. Environ. Microbiol.* agosto de 2008;74(16):5031–7.

Meijnen JP, De Winde JH, Ruijssenaars HJ. Establishment of oxidative D-xylose metabolism in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* maio de 2009;75(9):2784–91.

Meisenzahl AC, Shapiro L, Jenal U. Isolation and characterization of a xylose-dependent promoter from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 1997;179:592–600.

Mendonça TT. Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHX)] [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010. 139p.

Mendonça TT, Gomez JGC, Buffoni E, Sánchez Rodriguez RJ, Schripsema J, Lopes MSG, et al. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* 2014;116:815–29.

Le Meur S, Zinn M, Egli T, Thöny-Meyer L, Ren Q, Anderson A, et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT2440. *BMC Biotechnol. BioMed Central*; 22 de janeiro de 2012;12(1):53.

Mohagheghi A, Linger JG, Yang S, Smith H, Dowe N, Zhang M, et al. Improving a recombinant *Zymomonas mobilis* strain 8b through continuous adaptation on dilute acid pretreated corn stover hydrolysate. *Biotechnol. Biofuels.* 2015;8:55.

Mokhtarzadeh A, Alibakhshi A, Hejazi M, Omid Y, Ezzati Nazhad Dolatabadi J. Bacterial-derived biopolymers: Advanced natural nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *TrAC Trends Anal. Chem.* setembro de 2016;82:367–84.

Molina G, Pimentel MR, Pastore GM. *Pseudomonas*: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* março de 2013;97(5):1851–64.

Nanchen A, Schicker A, Sauer U. Nonlinear dependency of intracellular fluxes on growth rate in miniaturized continuous cultures of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* fevereiro de 2006;72(2):1164–72.

National center for Biotechnology Information. GenBank. [database]. [Acesso em: 20 nov. 2015]. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/.

Nicolò MS, Franco D, Camarda V, Gullace R, Rizzo MG, Fragalà M, et al. Integrated microbial process for bioconversion of crude glycerol from biodiesel into biosurfactants and PHAs. *Chem. Eng. Trans.* 2014;38:187–92.

Nielsen J. Metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. p. 263–83.

Noor E, Eden E, Milo R, Alon U. Central Carbon Metabolism as a Minimal Biochemical Walk between Precursors for Biomass and Energy. *Mol. Cell.* 2010;39(5):809–20.

O'Brien EJ, Monk JM, Palsson BO. Using Genome-scale Models to Predict Biological Capabilities. *Cell.* 21 de maio de 2015;161(5):971–87.

Olins PO, Rangwala SH. A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the *lacZ* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 15 de outubro de 1989;264(29):16973–6.

Orth JD, Fleming RMT, Palsson BØ. Reconstruction and Use of Microbial Metabolic Networks: the Core *Escherichia coli* Metabolic Model as an Educational Guide. *EcoSal Plus. asm Pub2Web*; 3 de dezembro de 2009;1(10).

Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol. Nature Research*; março de 2010;28(3):245–8.

Paddon CJ, Keasling JD. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat. Rev. Microbiol. Nature Research*; 1 de abril de 2014;12(5):355–67.

Panke S, Witholt B, Schmid A, Wubbolts MG. Towards a biocatalyst for (S)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas* sp. strain VLB120. *Appl Env. Microbiol.* 1998;64(6):2032–43.

Park J-I, Grant CM, Davies MJ, Dawes IW. The Cytoplasmic Cu,Zn Superoxide Dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* Is Required for Resistance to Freeze-Thaw Stress: GENERATION OF FREE RADICALS DURING FREEZING AND THAWING. *J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 4 de setembro de 1998;273(36):22921–8.

Park Y-C, Jun SY, Seo J-H. Construction and characterization of recombinant *Bacillus subtilis* JY123 able to transport xylose efficiently. *J. Biotechnol.* 2012.

Peng B, Huang S, Liu T, Geng A. Bacterial xylose isomerases from the mammal gut Bacteroidetes cluster function in *Saccharomyces cerevisiae* for effective xylose fermentation. *Microb. Cell Fact.* 2015;14(1):70.

Pessoa Jr. A, Mancilha IM, Sato S. Acid Hydrolysis of Hemicelulose from Sugarcane Bagasse. *Brazilian J. Chem. Eng.* 1997;14(3).

Poblete-Castro I, Becker J, Dohnt K, dos Santos VM, Wittmann C. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* março de 2012;93(6):2279–90.

Poblete-Castro I, Binger D, Rodrigues A, Becker J, Martins Dos Santos V a P, Wittmann C. In-silico-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates. *Metab. Eng. Elsevier*; janeiro de 2013;15:113–23.

Poutou Piñales RA, Amador Martínez E, Candelario Frontela M. Banco de células primario (BCP): caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biotechnol. Apl.* 1994;11(1):55–9.

Prados E, Maicas S. Bacterial Production of Hydroxyalkanoates (PHA). *Univers. J. Microbiol. Res.* 2016;4(1):23–30.

Puchałka J, Oberhardt M a, Godinho M, Bielecka A, Regenhardt D, Timmis KN, et al. Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS Comput. Biol.* outubro de 2008;4(10):e1000210.

Qi X, Zha J, Liu GG, Zhang W, Li BZ, Yuan YJ. Heterologous xylose isomerase pathway and evolutionary engineering improve xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 2015;6(OCT).

Raicher G. Análise econômica da produção de polímeros biodegradáveis no contexto de uma biorefinaria a partir de cana-de-açúcar [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Bioédicas; 2011. 178p.

Rehm BHA. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* Nature Publishing Group; 28 de agosto de 2010;8(8):578–92.

Reider Apel A, Ouellet M, Szmidt-Middleton H, Keasling JD, Mukhopadhyay A. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 2016;6(January):19512.

van Rensburg E, Den Haan R, La Grange DC, Volschenk H, Van Zyl WH, Gorgens JF. Engineering recombinant organisms for next-generation ethanol production. *Biofuels From Microbes to Mol.* . 2014. p. 93–135.

Riemer SA, Rex R, Schomburg D. A metabolite-centric view on flux distributions in genome-scale metabolic models. *BMC Syst. Biol.* janeiro de 2013;7(1):33.

Rocha RCS, da Silva LF, Taciro MK, Pradella JGC. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 de julho de 2007;24(3):427–31.

Da Rocha RP, Paquola ACDM, Marques MDV, Menck CFM, Galhardo RS. Characterization of the SOS regulon of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 2008;190(4):1209–18.

Rodríguez-Contreras A, Koller M, Miranda-De Sousa Dias M, Calafell-Monfort M, Braunegg G, Soledad M, et al. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. *Biochem. Eng. J.* 2015;94:50–7.

Rowe LA, Degtyareva N, Doetsch PW. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* 2008;45(8):1167–77.

Saloheimo A, Rauta J, Stasyk O V., Sibirny AA, Penttilä M, Ruohonen L. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer-Verlag; 2007;74(5):1041–52.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. ed. Cold Spring Harb. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 v.

Sánchez RJ, Schripsema J, da Silva LF, Taciro MK, Pradella JG., Gomez JGC. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHA_{mc}) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. *Eur. Polym. J.* julho de 2003;39(7):1385–94.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* dezembro de 1977;74(12):5463–7.

Sauer U. The Soluble and Membrane-bound Transhydrogenases UdhA and PntAB Have Divergent Functions in NADPH Metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 20 de novembro de 2003;279(8):6613–9.

Sauma S, Tover A, Tark M, Tegova R, Kivisaar M. Oxidative DNA damage defense systems in avoidance of stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol. American Society for Microbiology (ASM)*; agosto de 2007;189(15):5504–14.

Schellenberger J, Que R, Fleming RMT, Thiele I, Orth JD, Feist AM, et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat. Protoc. Nature Publishing Group*; 4 de setembro de 2011;6(9):1290–307.

Sekar R, Shin HD, DiChristina TJ. Activation of an Otherwise Silent Xylose Metabolic Pathway in *Shewanella oneidensis*. Löffler FE, organizador. *Appl. Environ. Microbiol.* 1 de julho de 2016;82(13):3996–4005.

SerialBasics: Serial Cloner. Version 2.6.1 [software]. 2013 Abr 3 [citado 2015 Jul 22]. Disponível em: http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html.

Silva LF, Taciro MK, Raicher G, Piccoli RAM, Mendonça TT, Lopes MSG, et al. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *Int. J. Biol. Macromol.* 18 de julho de 2014;

Silva-Queiroz SR, Silva LF, Pradella JGC, Pereira EM, Gomez JGC. PHAMCL biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *J. Biotechnol.* 2009;143:111–8.

Silva-Rocha R, Martínez-García E, Martinez-Garcia E, Calles B, Chavarria M, Arce-Rodriguez A, et al. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res.* 23 de novembro de 2013;41(D1):D666–75.

Simon R, Priefer U, Pühler A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology.* 1983. p. 784–91.

Skerker JM, Laub MT. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;2:325–37.

Spagnolo J, Bigot S, Denis Y, Bordi C, de Bentzmann S. Development of a genetic tool for activating chromosomal expression of cryptic or tightly regulated loci in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plasmid*. Elsevier Inc.; maio de 2012;67(3):245–51.

Steinbuchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995. p. 219–28.

Stephanopoulos G. *Synthetic Biology and Metabolic Engineering*. ACS Synth. Biol. American Chemical Society; 16 de novembro de 2012;1(11):514–25.

Stephens C, Christen B, Fuchs T, Sundaram V, Watanabe K, Jenal U. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* março de 2007a;189(5):2181–5.

Stephens C, Christen B, Watanabe K, Fuchs T, Jenal U. Regulation of D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus* by a LacI-type repressor. *J. Bacteriol.* dezembro de 2007b;189(24):8828–34.

Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 2002;83(1):1–11.

Taciro, MK. Processo contínuo de produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHAMCL) sob limitação múltipla de nutrientes [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2008. 98p.

Technelysium Pty Ltd: ChromasPro. Version 2.1.2 [software]. 2003 [citado 2015 Jun 13]. Disponível em: <http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>.

Temple LM, Sage AE, Schweizer HP, Phibbs P V. Carbohydrate Catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas*. Boston, MA: Springer US; 1998. p. 35–72.

Todorova T, Pesheva M, Stamenova R, Dimitrov M, Venkov P. Mutagenic effect of freezing on nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. John Wiley & Sons, Ltd; maio de 2012;29(5):191–9.

Tsai JW, Alley MRK. Proteolysis of the *Caulobacter* McpA chemoreceptor is cell cycle regulated by a ClpX-dependent pathway. *J. Bacteriol.* 2001;183:5001–7.

Valappil SP, Misra SK, Boccaccini AR, Roy I. Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: an overview of animal testing and in vivo responses. *Expert Rev. Med. Devices.* novembro de 2006;3(6):853–68.

Vanzin C. Estudo da biossíntese de poli-3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-alcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal. [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2008. 202p.

Waltman MJ, Yang ZK, Langan P, Graham DE, Kovalevsky A. Engineering acidic *Streptomyces rubiginosus* D-xylose isomerase by rational enzyme design. *Protein Eng. Des. Sel.* 2014;27(2):59–64.

Wang C, Shen Y, Hou J, Suo F, Bao X. An assay for functional xylose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal. Biochem.* 2013;442(2):241–8.

Wei P, Lin M, Wang Z, Fu H, Yang H, Jiang W, et al. Metabolic engineering of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for xylose fermentation. *Bioresour. Technol.* novembro de 2016;219:91–7.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol. American Society for Microbiology (ASM)*; janeiro de 1991;173(2):697–703.

Young EM, Comer AD, Huang H, Alper HS. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 2012;14(4):401–11.

Zhang B, Li N, Wang Z, Tang Y-J, Chen T, Zhao X. Inverse metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for xylose utilization based on adaptive evolution and whole-genome sequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer Berlin Heidelberg; 22 de janeiro de 2015;99(2):885–96.

Zhang G-C, Kong II, Wei N, Peng D, Turner TL, Sung BH, et al. Optimization of an acetate reduction pathway for producing cellulosic ethanol by engineered yeast. *Biotechnol. Bioeng.* dezembro de 2016;113(12):2587–96.

Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Storelli C, Vilella S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*. 2003;47(3):227–35.

APÊNDICES

A – Sequências dos iniciadores utilizados no trabalho

(continua)

Nome	Sequência (5'→3')	Características ou referência
<i>tac</i> /RBS fw	GCGACGAATTAATGAGCTGTTGACAATTA	<i>EcoRI</i> ; Iniciador <i>forward</i> da região reguladora
<i>tac</i> /RBS rev	GCTGTGGTACCGACTCCTTACTAAAAGTTAA	<i>KpnI</i> ; Iniciador <i>reverse</i> da região reguladora
<i>xyI</i> X fw	CATGGTACCGTGGGCGTGAGTGAATTCCT	<i>KpnI</i> ; Iniciador <i>forward</i> do gene <i>xyI</i> X
<i>xyI</i> A rev	GTCACGCAATTGTTACGACCACGAGTAGGAGGTTTT	<i>MunI</i> ; Iniciador <i>reverse</i> do gene <i>xyI</i> A
<i>xyI</i> D rev	ATCACTTCTAGATCAAGTGGTTGTGGCGGGGC	<i>XbaI</i> ; Iniciador <i>reverse</i> do gene <i>xyI</i> D
seq_1 fw	CGTTTATTTGATGCCTT	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_2 fw	CCGGTCAAGCTGTTGGCC	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_3 fw	CGACGTCAATCTGCGGGA	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_4 fw	CCAAGCCGTGGACGTTCCG	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_5 fw	GGTGAAGCCCTGGCCCGT	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_6 fw	CGCTGATCGTCTGGACG	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_7 fw	AGCTACGAAGAGGGCGCTG	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_8 fw	GCTCTTGAGGCCGAGCTG	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_9 fw	CAAGACCAAGGCCAGGA	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_10 fw	CACCCCGCCACCGCGGAG	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_11 fw	CAAGCGGTCTTCGTGCA	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_12 fw	ATGAACTACGGGATCACG	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_13 fw	TCTGGGCTCGCGCGCA	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_14 fw	GTCAACATGCAGCCGGCC	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>

A – Sequências dos iniciadores utilizados no trabalho

(conclusão)

Nome	Sequência (5'→3')	Características ou referência
seq_16 fw	GCCCACGGCCAGTCAGGCTC	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_17 fw	GCTTTTCATGCTCGACAT	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_18 fw	ATGGAAAAGCGCCCTCGGAC	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
seq_19 fw	CTGCATCTAACCCGGGCGA	Iniciador para sequenciamento <i>forward</i>
<i>xyIE</i> fw	ACGTCATCTAGACTCTGATGCATGCCGAAAG	<i>Xba</i> I; Iniciador <i>forward</i> do gene <i>xyIE</i>
<i>xyIE</i> rev	GACTCATCTTAGACTGCGGCTAGTGTGAAAACC	<i>Xba</i> I; Iniciador <i>reverse</i> do gene <i>xyIE</i>
RT_PCR fw	CCATCGTGTTCGACGGGCTCGGAC	Iniciador confirmatório <i>forward</i>
RT_PCR rev	GCCACTTTCAGATACCTGCGACACAGG	Iniciador confirmatório <i>reverse</i>
F24	CGCCAGGGTTTCCCAAGTCACCGAC	(Silva-Rocha et al. 2013)
R24	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA	(Silva-Rocha et al. 2013)
27f	AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG	(Weisburg et al. 1991)
1492r	GGTTAACCTTGTTACGACTT	(Weisburg et al. 1991)

As enzimas de restrição presentes nos iniciadores se destacam em negrito.

B – Reações eliminadas e inseridas para elaboração do *core* utilizado nas simulações *in silico* no COBRA

Reações eliminadas do *core* de *E. coli*:

- Acetaldehyde dehydrogenase
- Acetate kinase
- Alcohol dehydrogenase
- Ethanol reversible transport via proton symport
- Formate exchange
- Formate transport via proton symport (uptake only)
- Formate transport via diffusion
- Phosphofructokinase
- Pyruvate formate lyase
- Biomass function
- Phosphogluconate dehydrogenase

Reações acrescentadas ao *core* de *E. coli*:

- Glucose 1-dehydrogenase
- Gluconolactonase
- Gluconate 2-dehydrogenase
- 2-ketogluconate kinase
- Phosphogluconate 2-dehydrogenase
- Gluconate kinase
- Entner-Doudoroff pathway
- Sulfidrisation
- Biomass formation
- Maintenance ATP
- Xylose dehydrogenase
- Xylonolactonase
- Xylonate dehydratase
- 2-keto-3-deoxylonate dehydratase
- α -ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase

C – Metabólitos utilizados no COBRA

(continua)

Metabólito	Nome do metabólito
'13dpg[c]'	'3-Phospho-D-glyceroyl-phosphate'
'2pg[c]'	'D-Glycerate-2-phosphate'
'3pg[c]'	'3-Phospho-D-glycerate'
'6pgc[c]'	'6-Phospho-D-gluconate'
'6pgl[c]'	'6-phospho-D-glucono-1-5-lactone'
'ac[c]'	'Acetate'
'ac[e]'	'Acetate'
'acald[c]'	'Acetaldehyde'
'acald[e]'	'Acetaldehyde'
'accoa[c]'	'Acetyl-CoA'
'acon_C[c]'	'cis-Aconitate'
'actp[c]'	'Acetyl-phosphate'
'adp[c]'	'ADP'
'akg[c]'	'2-Oxoglutarate'
'akg[e]'	'2-Oxoglutarate'
'amp[c]'	'AMP'
'atp[c]'	'ATP'
'cit[c]'	'Citrate'
'co2[c]'	'CO2'
'co2[e]'	'CO2'
'coa[c]'	'Coenzyme-A'
'dhap[c]'	'Dihydroxyacetone-phosphate'
'e4p[c]'	'D-Erythrose-4-phosphate'
'etoh[e]'	'Ethanol'
'f6p[c]'	'D-Fructose-6-phosphate'
'fdp[c]'	'D-Fructose-1-6-bisphosphate'
'fru[e]'	'D-Fructose'
'fum[c]'	'Fumarate'
'fum[e]'	'Fumarate'
'g3p[c]'	'Glyceraldehyde-3-phosphate'
'g6p[c]'	'D-Glucose-6-phosphate'
'glc_D[e]'	'D-Glucose'
'gln_L[c]'	'L-Glutamine'
'gln_L[e]'	'L-Glutamine'
'glu_L[c]'	'L-Glutamate'
'glu_L[e]'	'L-Glutamate'
'glx[c]'	'Glyoxylate'
'h2o[c]'	'H2O'
'h2o[e]'	'H2O'
'h[c]'	'H'
'h[e]'	'H'
'icit[c]'	'Isocitrate'
'lac_D[c]'	'D-Lactate'
'lac_D[e]'	'D-Lactate'
'mal_L[c]'	'L-Malate'
'mal_L[e]'	'L-Malate'
'nad[c]'	'Nicotinamide-adenine-dinucleotide'
'nadh[c]'	'Nicotinamide-adenine-dinucleotide-reduced'
'nadp[c]'	'Nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate'
'nadph[c]'	'Nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate-reduced'
'nh4[c]'	'Ammonium'
'nh4[e]'	'Ammonium'
'o2[c]'	'O2'

C – Metabólitos utilizados no COBRA

(conclusão)

Metabólito	Nome do metabólito
'o2[e]'	'O2'
'oaa[c]'	'Oxaloacetate'
'pep[c]'	'Phosphoenolpyruvate'
'pi[c]'	'Phosphate'
'pi[e]'	'Phosphate'
'pyr[c]'	'Pyruvate'
'pyr[e]'	'Pyruvate'
'q8[c]'	'Ubiquinone-8'
'q8h2[c]'	'Ubiquinol-8'
'r5p[c]'	'alpha-D-Ribose-5-phosphate'
'ru5p_D[c]'	'D-Ribulose-5-phosphate'
's7p[c]'	'Sedoheptulose-7-phosphate'
'succ[c]'	'Succinate'
'succ[e]'	'Succinate'
'succoa[c]'	'Succinyl-CoA'
'xu5p_D[c]'	'D-Xylulose-5-phosphate'
'gluco15lactona[c]'	'gluco15lactona[c]'
'gluconato[c]'	'gluconato[c]'
'akgluconato[c]'	'akgluconato[c]'
'ak6Pgluconato'	'ak6Pgluconato'
'KDPG[c]'	'KDPG[c]'
'so4[e]'	'so4[e]'
'so4[c]'	'so4[c]'
'H2S[c]'	'H2S[c]'
'xil_D[e]'	'xil_D[e]'
'xilonolactona[c]'	'xilonolactona[c]'
'xilonato[c]'	'xilonato[c]'
'2K3DoxiXilonato[c]'	'2K3DoxiXilonato[c]'
'alfaketoglutarico_semialdehido[c]'	'alfaketoglutarico_semialdehido[c]'
'HB[c]'	'HB[c]'
'PH_10[c]'	'PH_10[c]'
'glicolaldehido[c]'	'glicolaldehido[c]'

D – Reações utilizadas no COBRA

(continua)

Nome da Reação	Equação estequiométrica	
ACALDt	acald[e]	<=> acald[c]
ACONTa	cit[c]	<=> acon_C[c] + h2o[c]
ACONTb	acon_C[c] + h2o[c]	<=> icit[c]
ACt2r	ac[e] + h[e]	<=> ac[c] + h[c]
ADK1	amp[c] + atp[c]	<=> 2.000000 adp[c]
AKGDH	akg[c] + coa[c] + nad[c]	-> co2[c] + nadh[c] + succoa[c]
AKGt2r	akg[e] + h[e]	<=> akg[c] + h[c]
ATPM	atp[c] + h2o[c]	-> adp[c] + h[c] + pi[c]
ATPS4r	adp[c] + 4.000000 h[e] + pi[c]	<=> atp[c] + h2o[c] + 3.000000 h[c]
CO2t	co2[e]	<=> co2[c]
CS	accoa[c] + h2o[c] + oaa[c]	-> cit[c] + coa[c] + h[c]
CYTBD	2.000000 h[c] + 0.500000 o2[c] + q8h2[c]	-> h2o[c] + 2.000000 h[e] + q8[c]
D_LACt2	h[e] + lac_D[e]	<=> h[c] + lac_D[c]
ENO	2pg[c]	<=> h2o[c] + pep[c]
EX_ac(e)	ac[e]	<=>
EX_acald(e)	acald[e]	<=>
EX_akg(e)	akg[e]	<=>
EX_co2(e)	co2[e]	<=>
EX_etoh(e)	etoh[e]	<=>
EX_fru(e)	fru[e]	<=>
EX_fum(e)	fum[e]	<=>
EX_glc(e)	glc_D[e]	<=>
EX_gln_L(e)	gln_L[e]	<=>
EX_glu_L(e)	glu_L[e]	<=>
EX_h(e)	h[e]	<=>
EX_h2o(e)	h2o[e]	<=>
EX_lac_D(e)	lac_D[e]	<=>
EX_mal_L(e)	mal_L[e]	<=>
EX_nh4(e)	nh4[e]	<=>
EX_o2(e)	o2[e]	<=>
EX_pi(e)	pi[e]	<=>
EX_pyr(e)	pyr[e]	<=>
EX_succ(e)	succ[e]	<=>
FBA	fdp[c]	<=> dhap[c] + g3p[c]
FBP	fdp[c] + h2o[c]	-> f6p[c] + pi[c]
FRD7	fum[c] + q8h2[c]	-> q8[c] + succ[c]
FRUpts2	fru[e] + pep[c]	-> f6p[c] + pyr[c]
FUM	fum[c] + h2o[c]	<=> mal_L[c]
FUMt2_2	fum[e] + 2.000000 h[e]	-> fum[c] + 2.000000 h[c]
G6PDH2r	g6p[c] + nadp[c]	<=> 6pgl[c] + h[c] + nadph[c]
GAPD	g3p[c] + nad[c] + pi[c]	<=> 13dpg[c] + h[c] + nadh[c]
GLCpts	glc_D[e] + pep[c]	-> g6p[c] + pyr[c]
GLNS	atp[c] + glu_L[c] + nh4[c]	-> adp[c] + gln_L[c] + h[c] + pi[c]
GLNabc	atp[c] + gln_L[e] + h2o[c]	-> adp[c] + gln_L[c] + h[c] + pi[c]
GLUDy	glu_L[c] + h2o[c] + nadp[c]	<=> akg[c] + h[c] + nadph[c] + nh4[c]
GLUN	gln_L[c] + h2o[c]	-> glu_L[c] + nh4[c]
GLUSy	akg[c] + gln_L[c] + h[c] + nadph[c]	-> 2.000000 glu_L[c] + nadp[c]
GLUt2r	glu_L[e] + h[e]	<=> glu_L[c] + h[c]
GND	6pgc[c] + nadp[c]	-> co2[c] + nadph[c] + ru5p_D[c]
H2Ot	h2o[e]	<=> h2o[c]
ICDHyr	icit[c] + nadp[c]	<=> akg[c] + co2[c] + nadph[c]

D – Reações utilizadas no COBRA

(continuação)

Nome da Reação	Equação estequiométrica	
MALt2_2	2.000000 h[e] + mal_L[e]	-> 2.000000 h[c] + mal_L[c]
MDH	mal_L[c] + nad[c]	<=> h[c] + nadh[c] + oaa[c]
ME1	mal_L[c] + nad[c]	-> co2[c] + nadh[c] + pyr[c]
ME2	mal_L[c] + nadp[c]	-> co2[c] + nadph[c] + pyr[c]
NADH16	4.000000 h[c] + nadh[c] + q8[c]	-> 3.000000 h[e] + nad[c] + q8h2[c]
NADTRHD	nad[c] + nadph[c]	-> nadh[c] + nadp[c]
NH4t	nh4[e]	<=> nh4[c]
O2t	o2[e]	<=> o2[c]
PDH	coa[c] + nad[c] + pyr[c]	-> accoa[c] + co2[c] + nadh[c]
PGI	g6p[c]	<=> f6p[c]
PGK	3pg[c] + atp[c]	<=> 13dpg[c] + adp[c]
PGM	2pg[c]	<=> 3pg[c]
PIt2r	h[e] + pi[e]	<=> h[c] + pi[c]
PPC	co2[c] + h2o[c] + pep[c]	-> h[c] + oaa[c] + pi[c]
PPS	atp[c] + h2o[c] + pyr[c]	-> amp[c] + 2.000000 h[c] + pep[c] + pi[c]
PTAr	accoa[c] + pi[c]	<=> actp[c] + coa[c]
PYK	adp[c] + h[c] + pep[c]	-> atp[c] + pyr[c]
PYRt2r	h[e] + pyr[e]	<=> h[c] + pyr[c]
RPE	ru5p_D[c]	<=> xu5p_D[c]
RPI	r5p[c]	<=> ru5p_D[c]
SUCct2_2	2.000000 h[e] + succ[e]	-> 2.000000 h[c] + succ[c]
SUCct3	h[e] + succ[c]	-> h[c] + succ[e]
SUCDi	q8[c] + succ[c]	-> fum[c] + q8h2[c]
SUCOAS	atp[c] + coa[c] + succ[c]	<=> adp[c] + pi[c] + succoa[c]
TALA	g3p[c] + s7p[c]	<=> e4p[c] + f6p[c]
THD2	2.000000 h[e] + nadh[c] + nadp[c]	-> 2.000000 h[c] + nad[c] + nadph[c]
TKT1	r5p[c] + xu5p_D[c]	<=> g3p[c] + s7p[c]
TKT2	e4p[c] + xu5p_D[c]	<=> f6p[c] + g3p[c]
TPI	dhap[c]	<=> g3p[c]
PGL	6pgl[c] + h2o[c]	<=> 6pgc[c]
glucosaDH	glc_D[e] + q8[c]	<=> q8h2[c] + gluco15lactona[c]
gluconolactonasa	h2o[c] + gluco15lactona[c]	<=> gluconato[c]
gluconatoDH	nadp[c] + gluconato[c]	<=> h[c] + nadph[c] + akgluconato[c]
akgluconatoK	atp[c] + akgluconato[c]	<=> adp[c] + ak6Pgluconato
ak6PgluconatoDH	h[c] + nadph[c] + ak6Pgluconato	<=> 6pgc[c] + nadp[c]
gluconatoK	atp[c] + gluconato[c]	<=> 6pgc[c] + adp[c]
so4t	so4[e]	<=> so4[c]
sulfidrizacion	3.000000 h[c] + 3.000000 nadph[c] + so4[c]	<=> 3.000000 h2o[c] + 3.000000 nadp[c] + H2S[c]
biomass	1.338000 3pg[c] + 2.930000 accoa[c] + 1.078000 akg[c] + 17.821000 atp[c] + 0.361000 e4p[c] + 0.072000 f6p[c] + 0.129000 g3p[c] + 0.206000 g6p[c] + 17.821000 h2o[c] + 3.548000 nad[c] + 16.548000 nadph[c] + 6.965000 nh4[c] + 1.481000 oaa[c] + 0.720000 pep[c] + 2.861000 pyr[c] + 0.627000 r5p[c] + 0.233000 H2S[c]	-> 17.821000 adp[c] + 1.678000 co2[c] + 2.930000 coa[c] + 17.821000 h[c] + 3.548000 nadh[c] + 16.548000 nadp[c] + 17.821000 pi[c]

D – Reações utilizadas no COBRA

(conclusão)

Nome da Reação		Equação estequiométrica	
Ex_so4[e]	so4[e]	<=>	
ED1	6pgc[c]	<=>	h2o[c] + KDPG[c]
ED2	KDPG[c]	<=>	g3p[c] + pyr[c]
ICL	icit[c]	->	glx[c] + succ[c]
LDH_D	lac_D[c] + nad[c]	<=>	h[c] + nadh[c] + pyr[c]
MALS	accoa[c] + glx[c] + h2o[c]	->	coa[c] + h[c] + mal_L[c]
Ex_gluconato[c]	gluconato[c]	->	
Ex_akgluconato[c]	akgluconato[c]	->	
xil_DH	nad[c] + xil_D[e]	<=>	h[c] + nadh[c] + xilonolactona[c]
xilonolactonasa	h2o[c] + xilonolactona[c]	<=>	h[c] + xilonato[c]
xilonato_DH	xilonato[c]	<=>	h2o[c] + 2K3DoxiXilonato[c]
2keto3deoxi_xilonato_DH	2K3DoxiXilonato[c]	<=>	h2o[c] + alfaketoglutarico_semialdehido[c]
alfa_KGSA_DH	h2o[c] + nadp[c] + alfaketoglutarico_semialdehido[c]	<=>	akg[c] + 2.000000 h[c] + nadph[c]
SintPHB	2.000000 accoa[c] + h[c] + nadph[c]	<=>	2.000000 coa[c] + nadp[c] + HB[c]
SintPH_10	5.000000 accoa[c] + 4.000000 atp[c] + h[c] + 7.000000 nadph[c]	<=>	4.000000 adp[c] + 5.000000 coa[c] + 3.000000 h2o[c] + 7.000000 nadp[c] + 4.000000 pi[c] + PH_10[c]
Ex_xil_D[e]	xil_D[e]	<=>	
Ex_glicolaldehido[c]	glicolaldehido[c]	<=>	
Ex_HB[c]	HB[c]	<=>	
Ex_PH_10[c]	PH_10[c]	<=>	

E – Output de dados do loop aninhado

(continua)

Biomassa	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75
Xilose	0,25	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,75	0,0238	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,2	0,0738	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,25	0,25	0,1238	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,5	0,3	0,1738	0,0476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,75	0,35	0,2238	0,0976	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,4	0,2738	0,1476	0,0214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,25	0,45	0,3238	0,1976	0,0714	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,5	0,5	0,3738	0,2476	0,1214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,75	0,55	0,4238	0,2976	0,1714	0,0452	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,6	0,4738	0,3476	0,2214	0,0952	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,25	0,65	0,5238	0,3976	0,2714	0,1452	0,0190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,5	0,7	0,5738	0,4476	0,3214	0,1952	0,0690	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,75	0,75	0,6238	0,4976	0,3714	0,2452	0,1190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0,8	0,6738	0,5476	0,4214	0,2952	0,1690	0,0428	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4,25	0,85	0,7238	0,5976	0,4714	0,3452	0,2190	0,0928	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4,5	0,9	0,7738	0,6476	0,5214	0,3952	0,2690	0,1428	0,0166	0	0	0	0	0	0	0	0
4,75	0,95	0,8238	0,6976	0,5714	0,4452	0,3190	0,1928	0,0666	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	0,8738	0,7476	0,6214	0,4952	0,3690	0,2428	0,1166	0	0	0	0	0	0	0	0
5,25	1,05	0,9238	0,7976	0,6714	0,5452	0,4190	0,2928	0,1666	0,0405	0	0	0	0	0	0	0
5,5	1,1	0,9738	0,8476	0,7214	0,5952	0,4690	0,3428	0,2166	0,0905	0	0	0	0	0	0	0
5,75	1,15	1,0238	0,8976	0,7714	0,6452	0,5190	0,3928	0,2666	0,1405	0,0143	0	0	0	0	0	0
6	1,2	1,0738	0,9476	0,8214	0,6952	0,5690	0,4428	0,3166	0,1905	0,0643	0	0	0	0	0	0
6,25	1,25	1,1238	0,9976	0,8714	0,7452	0,6190	0,4928	0,3666	0,2405	0,1143	0	0	0	0	0	0
6,5	1,3	1,1738	1,0476	0,9214	0,7952	0,6690	0,5428	0,4166	0,2905	0,1643	0,0381	0	0	0	0	0
6,75	1,35	1,2238	1,0976	0,9714	0,8452	0,7190	0,5928	0,4666	0,3405	0,2143	0,0881	0	0	0	0	0
7	1,4	1,2738	1,1476	1,0214	0,8952	0,7690	0,6428	0,5166	0,3905	0,2643	0,1381	0,0119	0	0	0	0
7,25	1,45	1,3238	1,1976	1,0714	0,9452	0,8190	0,6928	0,5666	0,4405	0,3143	0,1881	0,0619	0	0	0	0

E – *Output* de dados do *loop* aninhado

(conclusão)

Biomassa	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75
Xilose																
7,5	1,5	1,3738	1,2476	1,1214	0,9952	0,8690	0,7428	0,6166	0,4905	0,3643	0,2381	0,1119	0	0	0	0
7,75	1,55	1,4238	1,2976	1,1714	1,0452	0,9190	0,7928	0,6666	0,5405	0,4143	0,2881	0,1619	0,0357	0	0	0
8	1,6	1,4738	1,3476	1,2214	1,0952	0,9690	0,8428	0,7166	0,5905	0,4643	0,3381	0,2119	0,0857	0	0	0
8,25	1,65	1,5238	1,3976	1,2714	1,1452	1,0190	0,8928	0,7666	0,6405	0,5143	0,3881	0,2619	0,1357	0,0095	0	0
8,5	1,7	1,5738	1,4476	1,3214	1,1952	1,0690	0,9428	0,8166	0,6905	0,5643	0,4381	0,3119	0,1857	0,0595	0	0
8,75	1,75	1,6238	1,4976	1,3714	1,2452	1,1190	0,9928	0,8666	0,7405	0,6143	0,4881	0,3619	0,2357	0,1095	0	0
9	1,8	1,6738	1,5476	1,4214	1,2952	1,1690	1,0428	0,9166	0,7905	0,6643	0,5381	0,4119	0,2857	0,1595	0,0333	0
9,25	1,85	1,7238	1,5976	1,4714	1,3452	1,2190	1,0928	0,9666	0,8405	0,7143	0,5881	0,4619	0,3357	0,2095	0,0833	0
9,5	1,9	1,7738	1,6476	1,5214	1,3952	1,2690	1,1428	1,0166	0,8905	0,7643	0,6381	0,5119	0,3857	0,2595	0,1333	0,0071
9,75	1,95	1,8238	1,6976	1,5714	1,4452	1,3190	1,1928	1,0666	0,9405	0,8143	0,6881	0,5619	0,4357	0,3095	0,1833	0,0571
10	2	1,8738	1,7476	1,6214	1,4952	1,3690	1,2428	1,1166	0,9905	0,8643	0,7381	0,6119	0,4857	0,3595	0,2333	0,1071

Entenda-se Xilose como o fluxo de consumo de xilose em $\text{mmol gDW}^{-1} \text{h}^{-1}$, e Biomassa como taxa de crescimento em h^{-1} .

F – Resultado do *Local BLAST* realizado para validar a clonagem do operon *xylXABCD*

```

Query=
(6250 letters)

Database: C:\BioEdit\database\pSEVA 241 - tac~RBS - ^Op + xylE.txt
1 sequences; 11,195 total letters

Sequences producing significant alignments:

Score      E
(bits) Value

1.239e+004  0.0

>
Length = 11195

Score = 1.239e+004 bits (6250), Expect = 0.0
Identities = 6250/6250 (100%)
Strand = Plus / Plus

```

G – Resultado do *Local BLAST* realizado para validar a clonagem do gene *xylE*

```

Query=
(7672 letters)

Database: C:\BioEdit\database\pSEVA 241 - tac~RBS - ^Op + xylE.txt
1 sequences; 11,195 total letters

Sequences producing significant alignments:

Score      E
(bits) Value

1.516e+004  0.0

>
Length = 11195

Score = 1.516e+004 bits (7646), Expect = 0.0
Identities = 7666/7672 (99%), Gaps = 3/7672 (0%)
Strand = Plus / Plus

```

H – Resultado do *Local BLAST* dos primeiros ~ 500 pb do operon

```

Query=
      (498 letters)

Database: C:\BioEdit\database\pSEVA 241 - tac~RBS - ^Op + xylE.txt
          1 sequences; 11,195 total letters

Sequences producing significant alignments:

                                         Score   E
                                         (bits) Value

                                         987    0.0

>
      Length = 11195

Score = 987 bits (498), Expect = 0.0
Identities = 498/498 (100%)
Strand = Plus / Plus

```

I – Resultado do *Local BLAST* dos últimos ~ 500 pb do operon

```

Query=
      (509 letters)

Database: C:\BioEdit\database\pSEVA 241 - tac~RBS - ^Op + xylE.txt
          1 sequences; 11,195 total letters

Sequences producing significant alignments:

                                         Score   E
                                         (bits) Value

                                         1009   0.0

>
      Length = 11195

Score = 1009 bits (509), Expect = 0.0
Identities = 509/509 (100%)
Strand = Plus / Plus

```

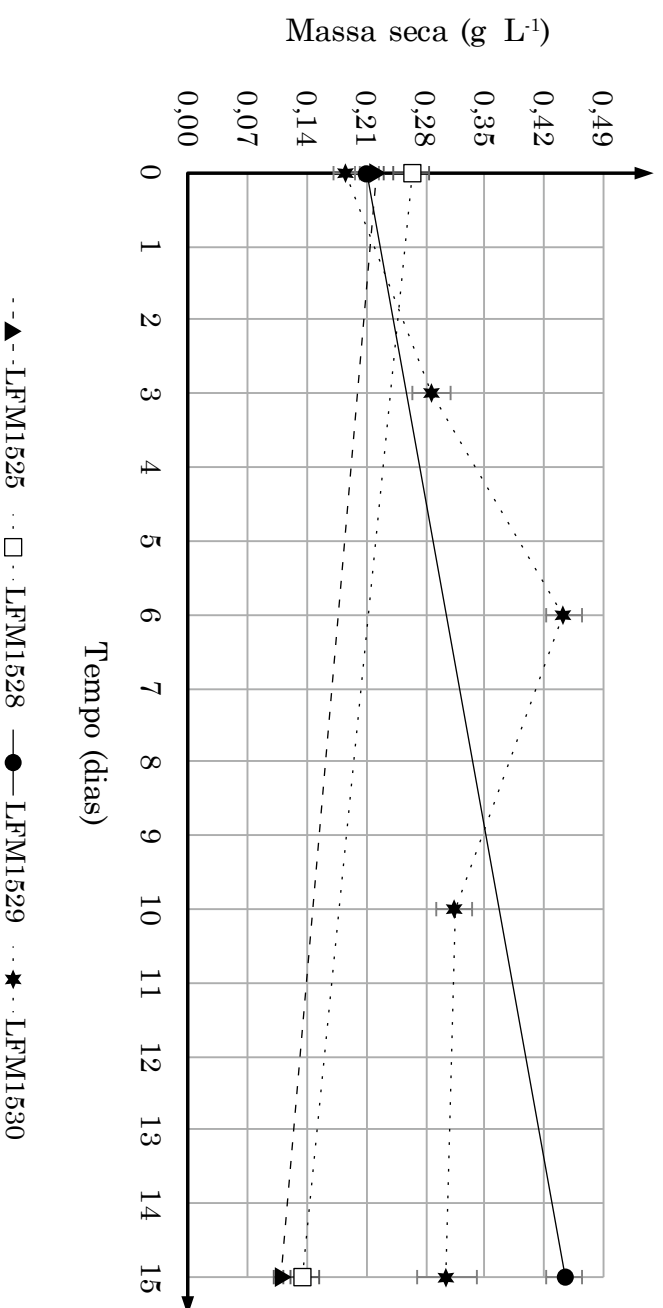
J – Dados de xilose residual e consumo de xilose do ensaio 1

Linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp.	Meio	Xilose (g L ⁻¹)										Δ	
		t ₀	t ₃	t ₆	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₅		
LFM046	MMX	11,50 ± 0,03	11,37 ± 0,08	11,56 ± 0,03	11,43 ± 0,15	11,13 ± 0,04	0,37 ± 0,04						
	MMXK	11,50 ± 0,03	11,41 ± 0,13	11,52 ± 0,08	11,43 ± 0,16	11,10 ± 0,04	0,40 ± 0,04						
	MMXKYe	11,12 ± 0,10	10,94 ± 0,11	10,99 ± 0,15	10,86 ± 0,16	10,72 ± 0,04	0,40 ± 0,06						
LFM1525	MMX	11,50 ± 0,03	11,55 ± 0,01	11,53 ± 0,05	11,51 ± 0,13	11,27 ± 0,03	0,23 ± 0,03						
	MMXK	11,50 ± 0,03	11,46 ± 0,02	11,37 ± 0,05	11,23 ± 0,09	11,10 ± 0,07	0,40 ± 0,06						
	MMXKYe	11,12 ± 0,10	11,07 ± 0,08	11,12 ± 0,02	10,67 ± 0,12	10,60 ± 0,12	0,52 ± 0,12						
LFM1526	MMX	11,50 ± 0,03	11,46 ± 0,43	11,37 ± 0,09	11,30 ± 0,06	11,37 ± 0,09	0,13 ± 0,08						
	MMXK	11,50 ± 0,03	11,44 ± 0,01	11,41 ± 0,03	11,34 ± 0,22	11,17 ± 0,03	0,32 ± 0,03						
	MMXKYe	11,12 ± 0,10	11,10 ± 0,05	11,05 ± 0,10	10,57 ± 0,02	10,47 ± 0,07	0,65 ± 0,08						
LFM1528	MMX	11,50 ± 0,03	11,42 ± 0,03	11,36 ± 0,01	11,22 ± 0,07	11,20 ± 0,05	0,30 ± 0,04						
	MMXK	11,50 ± 0,03	11,30 ± 0,09	11,23 ± 0,04	11,12 ± 0,31	10,85 ± 0,01	0,65 ± 0,02						
	MMXKYe	11,12 ± 0,10	11,10 ± 0,03	10,90 ± 0,03	10,81 ± 0,08	10,68 ± 0,12	0,44 ± 0,11						
LFM1527	MMX	11,50 ± 0,03	11,39 ± 0,21	10,75 ± 0,01	10,00 ± 0,13	8,76 ± 0,04	2,74 ± 0,04						
	MMXK	11,50 ± 0,03	11,43 ± 0,08	10,68 ± 0,11	9,82 ± 0,10	8,63 ± 0,01	2,87 ± 0,02						
	MMXKYe	11,12 ± 0,10	10,71 ± 0,23	10,14 ± 0,07	9,55 ± 0,12	7,76 ± 0,13	3,36 ± 0,12						
LFM1529	MMX	11,50 ± 0,03	11,29 ± 0,08	10,70 ± 0,15	10,09 ± 0,22	8,55 ± 0,59	2,95 ± 0,48						
	MMXK	11,50 ± 0,03	11,18 ± 0,07	10,70 ± 0,08	9,81 ± 0,29	8,87 ± 0,03	2,63 ± 0,03						
	MMXKYe	11,12 ± 0,10	10,57 ± 0,16	10,28 ± 0,14	9,50 ± 0,30	8,25 ± 0,01	2,87 ± 0,06						

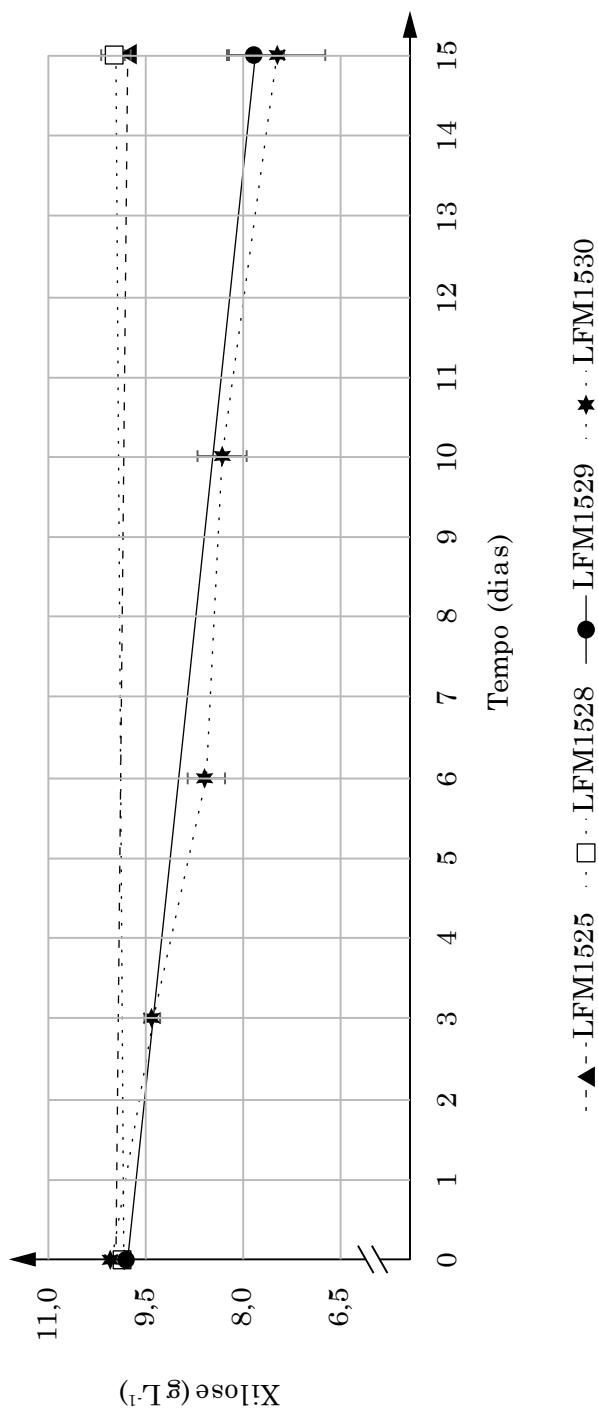
Dados de xilose residual medida no tempo zero, e nos dias 3, 6, 10 e 15. Δ: xilose consumida pela linhagem; MM: meio mineral; X: xilose; Ye: extrato de levedura; K: canamicina.

K – Dados e curvas de xilose residual, consumo de xilose e massa seca do ensaio 2

Linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp.	Massa seca (g L ⁻¹)						Δ
	t ₀	t ₃	t ₆	t ₁₀	t ₁₅		
LFM1530	0,187 ± 0,02	0,287 ± 0,02	0,443 ± 0,02	0,315 ± 0,02	0,305 ± 0,04	0,118 ± 0,03	
LFM1529	0,210 ± 0,01				0,445 ± 0,02	0,235 ± 0,02	
LFM1528	0,263 ± 0,02				0,133 ± 0,02	-0,130 ± 0,02	
LFM1525	0,223 ± 0,01				0,110 ± 0,01	-0,113 ± 0,01	

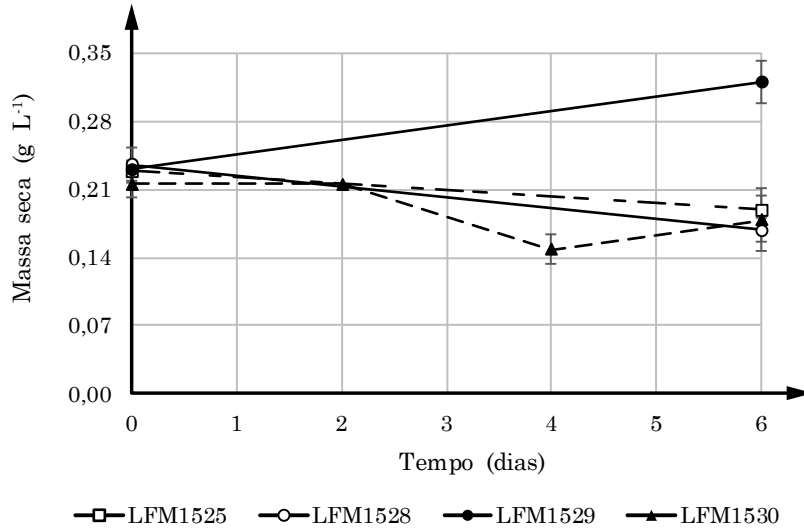


Linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp.	Xilose (g L ⁻¹)						Δ
	t ₀	t ₃	t ₆	t ₁₀	t ₁₅		
LFM1530	10,02 ± 0,09	9,38 ± 0,11	8,54 ± 0,30	8,29 ± 0,39	7,43 ± 0,76	2,60 ± 0,54	
LFM1529	9,78 ± 0,05				7,78 ± 0,45	2,00 ± 0,32	
LFM1528	9,84 ± 0,05				9,96 ± 0,23	-0,12 ± 0,17	
LFM1525	9,94 ± 0,12				9,76 ± 0,07	0,19 ± 0,10	

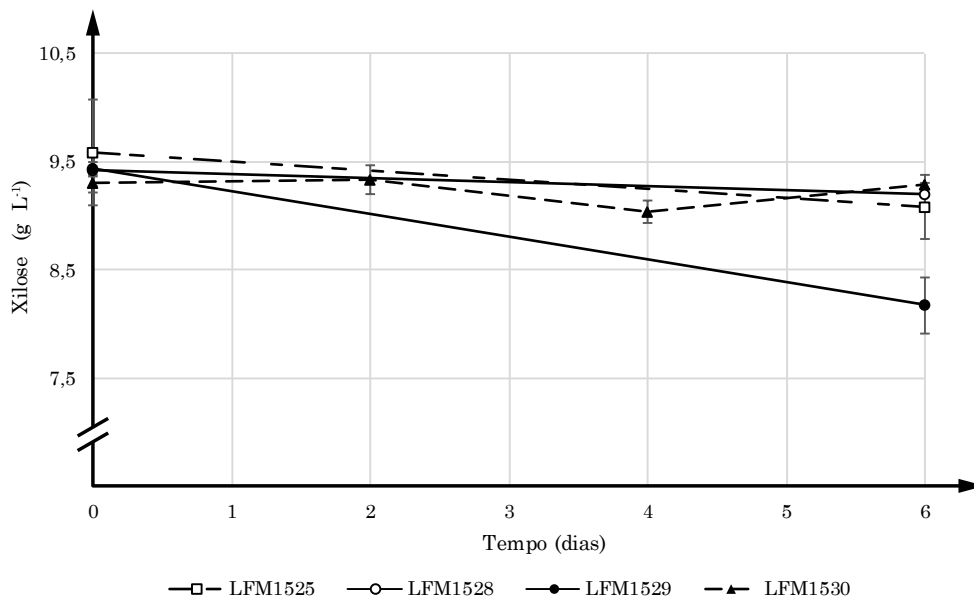


L – Dados e curvas de xilose residual, consumo de xilose e massa seca do ensaio 3

Linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp.	Massa seca (g L ⁻¹)				
	t ₀	t ₂	t ₄	t ₆	Δ
LFM1530	0,215 ± 0,01	0,215 ± 0,00	0,148 ± 0,02	0,178 ± 0,03	-0,037 ± 0,02
LFM1529	0,230 ± 0,01			0,320 ± 0,02	0,090 ± 0,02
LFM1528	0,235 ± 0,02			0,168 ± 0,01	-0,067 ± 0,01
LFM1525	0,228 ± 0,01			0,188 ± 0,02	-0,040 ± 0,01

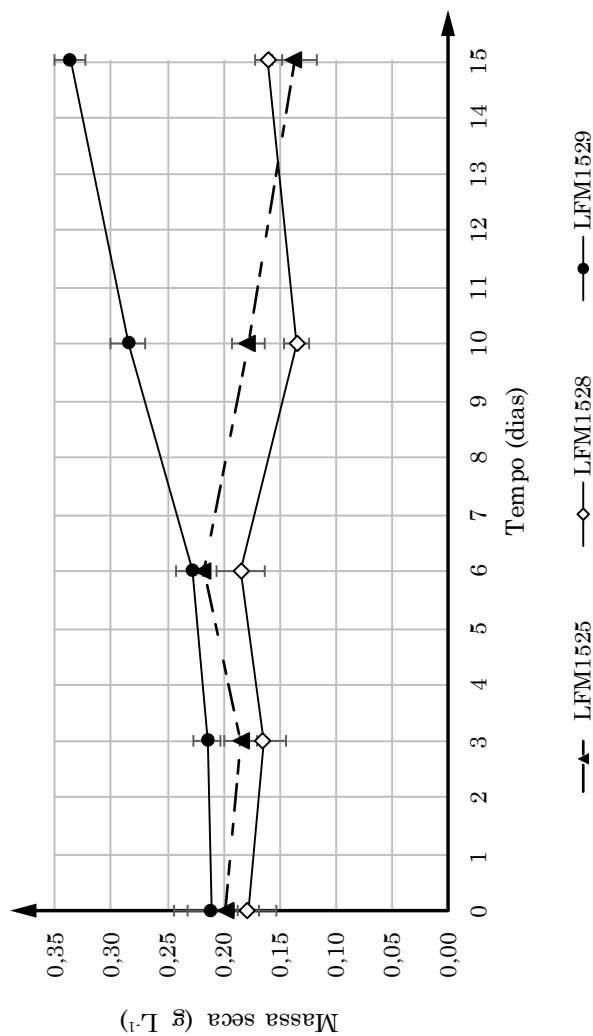


Linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp.	Xilose (g L ⁻¹)				
	t ₀	t ₂	t ₄	t ₆	Δ
LFM1530	9,30 ± 0,08	9,33 ± 0,14	9,04 ± 0,11	9,30 ± 0,55	0,00 ± 0,39
LFM1529	9,43 ± 0,16			8,17 ± 0,25	1,26 ± 0,21
LFM1528	9,43 ± 0,07			9,20 ± 0,11	0,23 ± 0,09
LFM1525	9,58 ± 0,48			9,08 ± 0,30	0,51 ± 0,40

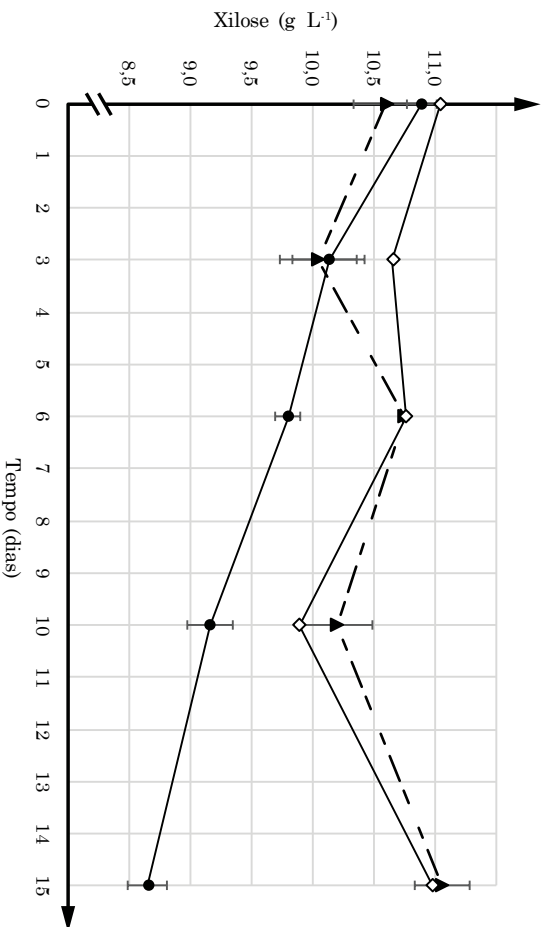


M – Dados experimentais, curvas de consumo de xilose e produção de biomassa, e cálculo de fatores de conversão do ensaio 4

Linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp.	Massa seca (g L ⁻¹)															Δ
	t ₀	t ₃	t ₆	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₀	t ₁₅	
LFM1529	0,211 ± 0,02	0,215 ± 0,01	0,228 ± 0,01	0,285 ± 0,02	0,337 ± 0,01	0,285 ± 0,02	0,337 ± 0,01	0,285 ± 0,02	0,337 ± 0,01	0,285 ± 0,02	0,337 ± 0,01	0,285 ± 0,02	0,337 ± 0,01	0,285 ± 0,02	0,337 ± 0,01	0,125 ± 0,02
LFM1528	0,178 ± 0,01	0,165 ± 0,02	0,185 ± 0,02	0,135 ± 0,01	0,160 ± 0,01	0,135 ± 0,01	0,160 ± 0,01	0,135 ± 0,01	0,160 ± 0,01	0,135 ± 0,01	0,160 ± 0,01	0,135 ± 0,01	0,160 ± 0,01	0,135 ± 0,01	0,160 ± 0,01	-0,018 ± 0,01
LFM1525	0,198 ± 0,05	0,185 ± 0,02	0,218 ± 0,00	0,178 ± 0,01	0,137 ± 0,02	0,178 ± 0,01	0,137 ± 0,02	0,178 ± 0,01	0,137 ± 0,02	0,178 ± 0,01	0,137 ± 0,02	0,178 ± 0,01	0,137 ± 0,02	0,178 ± 0,01	0,137 ± 0,02	-0,061 ± 0,04



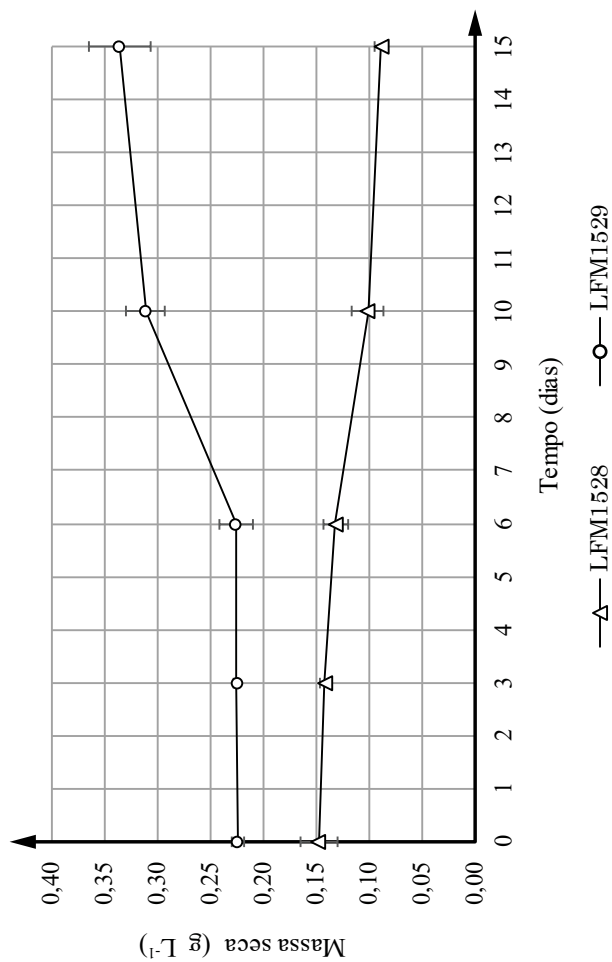
Linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp.		Xilose (g L ⁻¹)					
	t ₀	t ₃	t ₆	t ₁₀	t ₁₅	Δ	
LFM1529	10,89 ± 0,12	10,13 ± 0,29	9,80 ± 0,10	9,16 ± 0,19	8,65 ± 0,16	2,24 ± 0,14	
LFM1528	11,04 ± 0,19	10,65 ± 0,31	10,76 ± 0,08	9,89 ± 0,04	10,98 ± 0,08	0,06 ± 0,15	
LFM1525	10,60 ± 0,27	10,04 ± 0,32	10,74 ± 0,04	10,20 ± 0,29	11,05 ± 0,22	-0,45 ± 0,25	



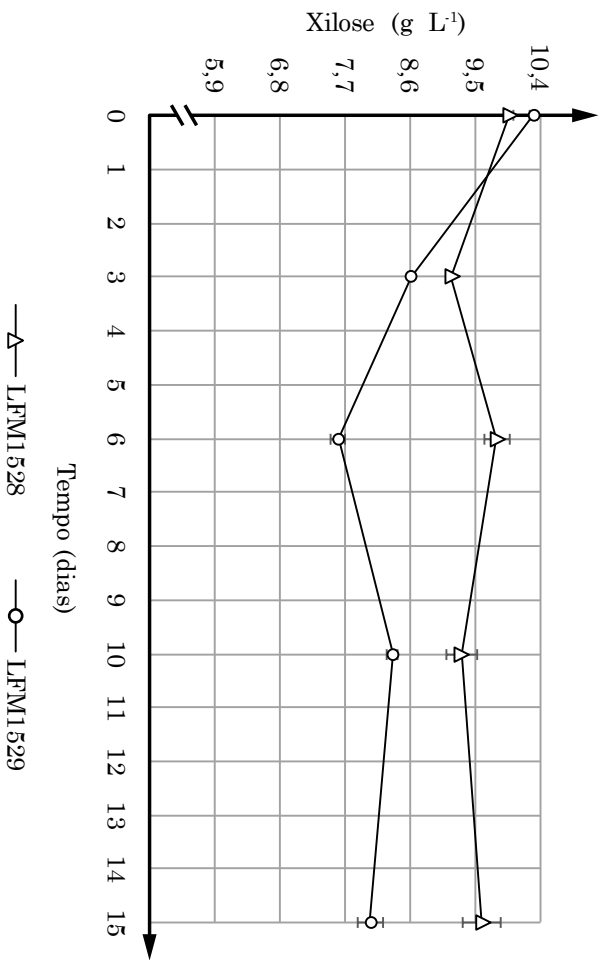
Linhagem	Variável	g L ⁻¹			Y(x/s) g g ⁻¹
		T ₀	T ₁₅	Δ	
LFM1525	Massa seca	0,198 ± 0,05	0,137 ± 0,02	-0,061 ± 0,04	0,14
	Xilose	10,602 ± 0,27	11,053 ± 0,22	-0,451 ± 0,25	
LFM1528	Massa seca	0,178 ± 0,01	0,160 ± 0,01	-0,018 ± 0,01	-0,30
	Xilose	11,040 ± 0,19	10,980 ± 0,08	0,060 ± 0,15	
LFM1529	Massa seca	0,211 ± 0,02	0,337 ± 0,01	0,125 ± 0,02	0,06
	Xilose	10,890 ± 0,12	8,653 ± 0,16	2,237 ± 0,14	

N – Dados experimentais, curvas de consumo de xilose e produção de biomassa, e cálculo de fatores de conversão do ensaio 5

Linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp.	Massa seca (g L ⁻¹)										Δ
	t ₀	t ₃	t ₆	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₁₅	
LFM1529	0,225 ± 0,01	0,226 ± 0,00	0,227 ± 0,02	0,312 ± 0,02	0,336 ± 0,03	0,312 ± 0,02	0,336 ± 0,03	0,312 ± 0,02	0,336 ± 0,03	0,336 ± 0,03	0,111 ± 0,02
LFM1528	0,148 ± 0,02	0,142 ± 0,00	0,133 ± 0,01	0,102 ± 0,02	0,089 ± 0,01	0,102 ± 0,02	0,089 ± 0,01	0,102 ± 0,02	0,089 ± 0,01	0,089 ± 0,01	-0,059 ± 0,01



Linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp.		Xilose (g L ⁻¹)					
	t_0	t_3	t_6	t_{10}	t_{15}	Δ	
LFM1529	10,300 ± 0,04	8,609 ± 0,01	7,607 ± 0,11	8,355 ± 0,08	8,046 ± 0,18	2,25 ± 0,13	
LFM1528	9,972 ± 0,05	9,172 ± 0,01	9,801 ± 0,19	9,303 ± 0,21	9,592 ± 0,27	0,38 ± 0,19	



Linhagem	Variável	g L ⁻¹		Δ	Y(x/s) g g ⁻¹
		T ₀	T ₁₅		
LFM1528	Massa seca	0,148 ± 0,02	0,089 ± 0,01	-0,059 ± 0,01	-0,15
	Xilose	9,97 ± 0,05	9,59 ± 0,27	0,38 ± 0,19	
LFM1529	Massa seca	0,225 ± 0,01	0,336 ± 0,03	0,111 ± 0,02	0,05
	Xilose	10,30 ± 0,04	8,05 ± 0,18	2,25 ± 0,13	

O – Resultados comparativos (BLASTP) de proteínas envolvidas em diferentes vias de catabolismo de xilose com proteínas presentes em *Pseudomonas* sp. LFM046 (continua)

Proteína / Origem	Score	Identidade	Positivos	Espaços	Proteína homóloga em LFM046
Xylulokinase <i>Burkholderia ambifaria</i> ATCC BAA-244	139 bits (350)	134/512 (26%)	219/512 (42%)	32/512 (6%)	Glycerol kinase
Xylulose kinase <i>Burkholderia cenocepacia</i>	90.1 bits (222)	111/465 (23%)	183/465 (39%)	34/465 (7%)	Glycerol kinase
Xylulokinase <i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	140 bits (352)	134/511 (26%)	218/511 (42%)	30/511 (5%)	Glycerol kinase
Xylulokinase <i>E. coli</i> O139:H28	124 bits (311)	134/526 (25%)	222/526 (42%)	72/526 (13%)	Glycerol kinase
Xylulose kinase <i>E. coli</i> K12	124 bits (312)	135/526 (25%)	222/526 (42%)	72/526 (13%)	Glycerol kinase
xylulokinase <i>Bacillus velezensis</i> DSM 23117	156 bits (394)	133/518 (25%)	223/518 (43%)	37/518 (7%)	Glycerol kinase
Xylulose kinase <i>Bacillus subtilis</i> 168	156 bits (395)	128/515 (24%)	225/515 (43%)	31/515 (6%)	Glycerol kinase
Xylulose kinase <i>Streptomyces coelicolor</i> ATCC BAA-471	82.0 bits (201)	129/523 (24%)	196/523 (37%)	64/523 (12%)	Glycerol kinase
NAD(P)H- dependent D- xylose reductase <i>Candida tenuis</i>	134 bits (338)	96/307 (31%)	149/307 (48%)	51/307 (16%)	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase B
NADPH- dependent D- xylose reductase II,III <i>Candida tropicalis</i>	148 bits (373)	96/305 (31%)	143/305 (46%)	47/305 (15%)	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase B
D-xylulose reductase <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 204508	143 bits (360)	110/357 (30%)	173/357 (48%)	15/357 (4%)	2,3-butanediol dehydrogenase

O – Resultados comparativos (BLASTP) de proteínas envolvidas em diferentes vias de catabolismo de xilose com proteínas presentes em *Pseudomonas* sp. LFM046 (conclusão)

Proteína / Origem	Score	Identidade	Positivos	Espaços	Proteína homóloga em LFM046
Xyhitol dehidrogenase	144 bits (362)	110/356 (30%)	174/356 (48%)	15/356 (4%)	2,3-butanediol dehidrogenase
Putative D-xylose reductase	133 bits (335)	106/360 (29%)	166/360 (46%)	20/360 (5%)	2,3-butanediol dehidrogenase
Xyhitol dehidrogenase	144 bits (362)	113/358 (31%)	172/358 (48%)	17/358 (4%)	2,3-butanediol dehidrogenase
Xyhitol dehidrogenase 2	125 bits (313)	106/366 (28%)	166/366 (45%)	24/366 (6%)	2,3-butanediol dehidrogenase
2-dehidro-3-deoxy-phosphogluconate	72.8 bits (177)	76/299 (25%)	130/299 (43%)	29/299 (9%)	4-hidroxy-tetrahidropicolinate synthase

ANEXOS

A - Protocolo de extração de DNA genômico

1. Precipitar as células por centrifuga a 16.000 g por 2 min. (1 mL de meio de cultura) (Max. Vel. em microcentrifuga).
2. Adicionar 600 µL da solução de lise de núcleos. Pipetar com gentileza para misturar.
3. Incubar por 5 min. a 80 °C, depois esfriar em temperatura ambiente.
4. Adicionar 3 µL de solução de RNase; misturar e incubar a 37 °C por 15 – 60 min. Esfriar em temperatura ambiente.
5. Adicionar 200 µL de solução de precipitação de proteínas; *vortex*.
6. Incubar por 5 min. a temperatura ambiente.
7. Centrifugar durante 3 min. a 16.000 g (Max. Vel. em microcentrifuga).
8. Transfira cuidadosamente o sobrenadante a um tubo limpo com 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Misturar.
9. Centrifugar a 16.000 g por 2 min. (Max. Vel. em microcentrifuga).
10. Adicione 600 µL de etanol 70% a temperatura ambiente. Misturar.
11. Centrifugar a 16.000 g por 2 min. (Max. Vel. em microcentrifuga).
12. Reidratar o DNA em 100 µL de solução de reidratação por 1 h a 65 °C ou overnight a 4 °C.

B - Protocolo de extração de DNA plasmidial

1. Precipitar as células por centrifuga a 10.000 g por 5 min (2 mL de meio de cultura) (Max. Vel. Em microcentrifuga).
2. Suspender o precipitado em 250 µL de solução de resuspensão.
3. Adicionar 250 µL de solução de lise e inverter 4 vezes para misturar.
4. Adicionar 10 µL de solução de Protease Alcalina; inverter 4 vezes para misturar.
5. Incubar por 5 min. a temperatura ambiente.
6. Adicionar 350 µL de solução de neutralização e inverter 4 vezes para misturar.
7. Centrifugar durante 10 min. a 10.000 g (Max. Vel. Em microcentrifuga).
8. Insira a minicoluna no tubo de coleta.
9. Transfira cuidadosamente o produto da lise à minicoluna.
10. Centrifugar a Max. Vel. Por 1 min. na microcentrifuga. Descartar o filtrado e reinserir a minicoluna no tubo de coleta.
11. Adicione 750 µL de solução de lavagem contendo etanol. Centrifugar a Max. Vel. por 1 min. Descartar o filtrado e reinserir a coluna para o tubo de coleta.
12. Repita o passo anterior com 250 µL de solução de lavagem. Centrifugado a Max. Vel. durante 2 min.
13. Nota: repousar 10 min. para remover o excesso de etanol.
14. Transferir a minicoluna para um novo tubo de microcentrifugação de 1,5 mL (ter cuidado em não transferir solução de lavado junto com minicoluna. Se a minicoluna tem solução de lavado ainda, centrifugar novamente por 1 min. a Max. Vel. e depois transferir a minicoluna ao novo tubo de microcentrifuga).
15. Adicione 100 µL de água livre de nucleasse na minicoluna.
16. Centrifugar a Max. Vel. por 1 min. a temperatura ambiente.
17. Remova e descarte a minicoluna. Guardar o DNA a 4 °C ou -20 °C.

C - Protocolo de purificação de bandas de DNA

1. Colocar num tubo de microcentrifuga de 1,5 mL a banda recortada.
2. Adicionar 10 μ L de solução de união à membrana por cada 10 mg de gel.
3. Aplicar *vortex* e incubar-se em 50 – 65 °C até que o gel esteja completamente dissolvido.
4. Insira a minicoluna no tubo de coleta.
5. Transfira cuidadosamente na minicoluna o gel dissolvido.
6. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
7. Centrifugar a 16.000 *g* por 1 min. Descartar o filtrado e reinserir a coluna no tubo de coleta.
8. Adicione 700 μ L de solução de lavagem de membrana contendo etanol. Centrifugar a 16.0000 *g* por 1 min. Descartar o filtrado e reinserir a coluna no tubo de coleta.
9. Repita o passo anterior com 500 μ L de solução de lavagem de membrana. Centrifugado a 16000 *g* durante 5 min.
10. Esvaziar o tubo de coleta e centrifugar durante 1 min. com a tampa da microcentrífuga aberta (ou sem tampa) para remover o excesso de etanol.
11. Transferir a minicoluna para um novo tubo de microcentrifugação de 1,5 mL.
12. Adicione 50 μ L de água livre de nucleasse na minicoluna.
13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
14. Centrifugar a 16.000 *g* por 1 min.
15. Remova e descarte a minicoluna. Guardar o DNA a 4 °C ou -20 °C.