

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

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 *xylXABCD* 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 *xylXABCD* - 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.

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 10⁷

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 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, Willems 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, Bücken 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, Maise 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_{mcl}) 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.