ROMINNE KARLA BARROS FREIRE

**Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e
biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço
de cana-de-açúcar**

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

2012

ROMINNE KARLA BARROS FREIRE

**Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e
biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de
cana-de-açúcar**

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

2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Freire, Rominne Karla Barros.

Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar / Rominne Karla Barros Freire. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Produção de bioprodutos

Versão do título para o inglês: Engineering bacterias to produce ethanol and biopolymers using sugar derived from sugarcane bagasse hydrolysate.

1. Etanol 2. Plásticos biodegradáveis 3. Xilose 4. Bagaço de cana-de-açúcar 5. Repressão catabólica 6. Resíduos lignocelulósicos I. Silva, Profa. Dra. Luiziana Ferreira da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB043/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rominne Karla Barros Freire.

Título da Dissertação: Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

Orientador(a): Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

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

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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 337/09, referente ao projeto intitulado: “*Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar*” sob a responsabilidade de **Rominne Karla Barros Freire**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPsh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 25 de agosto de 2009.

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

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

**Aos meus pais, que sempre
me proporcionaram a longa
caminhada pelo saber.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sustentar-me em minha caminhada.

Agradeço a meus pais que sempre colocaram meus estudos em primeiro lugar e permitiram minha vinda para São Paulo. Obrigada pelo carinho e incentivo! Aos meus irmãos Radha Krishna e Endrigo Stêfanes pelo apoio e incentivo.

Agradeço à FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro que auxiliou na minha pesquisa.

Agradeço à orientação da Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva e à co-orientação do Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez a quem devo boa parte do aprendizado adquirido ao longo do meu trabalho. Agradeço também à Marilda Keiko Taciro pela orientação nas questões de engenharia bioquímica.

Agradeço a meu companheiro André Luis Lopes Neves pelo apoio, paciência e carinho que me ajudaram na conclusão deste trabalho. Obrigada por compartilhar comigo noites a fio de experimentos infundáveis no laboratório.

Agradeço aos que me ajudaram ao longo da caminhada: à equipe do laboratório, especialmente Daniela, pelas análises no HPLC e CG; Karen, Kelli, Karinna, Thatiane, Débora, Amanda e Rogério, que me auxiliaram nos experimentos e colaboraram com meu aprendizado. Obrigada pela disposição, paciência e amizade.

Agradeço à equipe da Profa. Dra. Heloiza Ramos Barbosa, do Prof. Dr. Gabriel Padilla, do Prof. Dr. Beny Spira, do Prof. Dr. René Schneider e à equipe da Profa. Dra. Marilis do Valle Marques pela colaboração.

Agradeço aos amigos que deixei em Natal, mas que até hoje guardo no coração: Larissa Klemig, Elizângela, Keith e Aleida. Agradeço também a Leonardo Nobre a quem devo em parte minha vinda a São Paulo e início do mestrado. Obrigada pelo apoio e incentivo!

Diante do desafio de apreender uma pequena parte da realidade longínqua aqui investigada, mergulhei na tentativa de condensar a vida em placas de Petri e me vi presa em minha própria rede de (im)prováveis hipóteses a cerca da vida e de seus mistérios.

Peixe preso dentro do vento
Tu me perguntas
O que uma lagosta tece lá embaixo com seus pés dourados?
Respondo que o oceano sabe.
E por quem a medusa espera em sua veste transparente?
Está esperando pelo tempo, como tu.
'Quem as algas apertam em seu abraço...'perguntas
'mais firme que uma hora e um mar certos?' Eusei.
Perguntas sobre a presa branca do narval
E eu respondo contando como o unicórnio do mar, arpadado, morre.
Perguntas sobre as plumas do rei-pescador
Que vibram nas puras primaveras dos mares do sul.
Quero te contar que o oceano sabe isto:
que a vida, em seus estojos de jóias,
é infinita como a areia incontável, pura;
e o tempo, entre uvas cor de sangue
tornou a pedra dura e lisa encheu a água-viva de luz,
desfez o seu nó, soltou seus fios musicais
de uma cornicópia feita de infinita madrepérola.
Sou só a rede vazia diante dos olhos humanos na escuridão
e de dedos habituados à longitude do tímido globo de uma laranja.
Caminho como tu, investigando a estrela sem fim
E em minha rede, durante a noite, acordo nu.
A única coisa capturada é um peixe preso dentro do vento.

Pablo Neruda.

RESUMO

FREIRE, R. K. B. **Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 132f. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Resíduos lignocelulósicos são substratos proeminentes para a produção sustentável de biocombustíveis, como o etanol, e de biopolímeros, como os polihidroxialcanoatos (PHAs). No Brasil o bagaço de cana-de-açúcar tem se mostrado a matéria-prima mais promissora em razão da crescente produção de cana-de-açúcar nesse país. A xilose é um dos principais componentes da lignocelulose, mas o aproveitamento eficiente desse açúcar ainda representa uma barreira técnica. Assim, o objetivo desse trabalho foi obter linhagens bacterianas mais eficientes no consumo desse açúcar. Para isso, foi inserido maior número de cópias dos genes responsáveis pelo metabolismo (*xylAB*) e transporte (*xylFGH*) de xilose em *Escherichia coli* KO11, produtora de etanol, e em *Burkholderia sacchari* LFM 101, produtora de poli-3-hidroxibutirato (PHB). As linhagens recombinantes foram analisadas quanto à capacidade de consumo de xilose e de produção em cultivos contendo esse açúcar na ausência e presença de glicose. Em *E. coli* KO11, a inserção de maior número de cópias de *xylAB* reduziu o tempo de consumo de xilose e aumentou até 30% na produção final de etanol, mas esse efeito foi reduzido na presença de glicose em consequência da repressão catabólica. Assim, em *E. coli* KO11, além da repressão catabólica, o baixo nível de expressão dos genes *xylAB* também contribui para a utilização ineficiente de xilose. Por outro lado, *xylFGH* teve um efeito deletério ao reduzir para quase zero o crescimento e produção de etanol por essa linhagem, mesmo na presença de glicose. Em *B. sacchari* LFM 101 a inserção de maior número de cópias desses genes não resultou em qualquer efeito positivo ou negativo. O plasmídeo pBBR1MCS-5, no entanto, prejudicou o crescimento e a metabolização de xilose por essa linhagem. Um fenômeno interessante observado foi o consumo de xilose com maior velocidade na presença de glicose quando comparado a cultivos em que esse carboidrato estava ausente, sugerindo que a glicose exerce um efeito contrário à repressão catabólica em *B. sacchari*. A capacidade de *xylAB* e *xylFGH* complementarem um mutante *xyl⁻* de *B. sacchari* LFM 101 também foi avaliada. O operon *xylFGH* foi capaz de restituir completamente à capacidade desse mutante de crescer em xilose, enquanto *xylAB* não foi capaz de fazê-lo. Concentrações de IPTG até 6,0 mM foram testadas para avaliar se a quantidade de indutor era o fator que limitava a expressão dos genes alvo, mas não foi observada melhora no consumo de xilose e produção pelas linhagens alvo.

Palavras-chave: Xilose. Bactérias. Resíduos lignocelulósicos. Bagaço de cana-de-açúcar. Etanol. Polihidroxialcanoatos. Repressão catabólica.

ABSTRACT

FREIRE, R. K. B. **Engineering recombinant bacteria to produce ethanol and biopolymers using sugars derived from sugarcane bagasse hydrolysate.** 2012. 132f. [Masters thesis (Microbiology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Lignocellulosic residues are remarkable substrates for biofuels production such as ethanol and for biopolymers such as polyhydroxyalkanoates (PHAs). The sugarcane bagasse has been indicated as the most promising raw material in Brazil due to increasing sugarcane production in this country. Xylose is one of the most important lignocellulose component, but its efficient utilization still represents a technical barrier. The aim of this work was to obtain bacterial strains more efficient in the xylose consumption. Multiple copies of the catabolism (*xylAB*) and transport (*xylFGH*) genes of xylose were introduced in the ethanol producer *Escherichia coli* KO11 strain and the poly-3-hydroxybutyrate (PHB) producer *Burkholderia sacchari* LFM 101. The recombinant strains were analysed for ability of xylose consumption and production in cultures containing xylose in the absence and presence of glucose. The inclusion of multiple copies of *xylAB* in *E. coli* KO11 reduced the rate of xylose consumption and increased the final ethanol production by 30% although this effect was decreased in the glucose presence as a result of catabolite repression. This indicates that the low level of *xylAB* expression in *E. coli* KO11 also contribute to the inefficient xylose consumption for this strain, in addition to catabolite repression. Moreover *xylFGH* induce a deleterious effect to decrease to nearly zero the growth and ethanol production by this strain, even in glucose presence. The multiple copies inclusion of these genes in *B. sacchari* LFM 101 didn't result in any positive or negative effect. However pBBR1MCS-5 plasmid affected the growth and metabolism of xylose by this strain, probably because of inhibition by gentamycin. An interesting phenomenon was the faster rate of xylose consumption in the presence of glucose when compared to cultures in which this carbohydrate was missing, suggesting that glucose has an opposite effect to catabolite repression in *B. sacchari*. The ability of *xylAB* and *xylFGH* in complement a *xyI* mutant from *B. sacchari* 101 was also evaluated. The *xylFGH* operon was able to completely restore growth and PHB production in xylose, whereas *xylAB* was unable to do it. Concentrations of IPTG until 6,0 mM were tested to assess if this inducer was the limiting factor in expression of target genes but improvement in xylose consumption and production were not noticed.

Key words: Xylose. Bacteria. Lignocellulosic residues. Sugarcane bagasse. Ethanol. Polyhydroxyalkanoates. Catabolite repression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Transporte de xilose em <i>Escherichia coli</i>	26
Figura 2 - Organização dos genes <i>xyl</i> descrita para algumas bactérias.....	28
Figura 3 - Metabolismo de xilose em fungos e bactérias.....	29
Figura 4 - Sistema PTS e mecanismo de repressão catabólica em <i>Escherichia coli</i>	31
Figura 5 - Conversão de hexoses e pentoses por <i>E. coli</i> KO11 em conjunção com a via de produção de etanol por <i>Z. mobilis</i>	37
Figura 6 - Fotomicrografia eletrônica de células bacterianas contendo grânulos de polímeros biodegradáveis da família dos polihidroxialcanoatos no seu interior e estrutura química geral dos PHAs.....	38
Figura 7 - Organização dos genes <i>xyl</i> , região promotora e sítios de restrição em <i>Escherichia coli</i> KO11.....	51
Figura 8 - Sequência de nucleotídeos referente à região promotora dos genes <i>xyl</i>	54
Figura 9 - Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8% m/v) mostrando os amplicons <i>xylAB</i> e <i>xylFGH</i>	54
Figura 10 - A) Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8% m/v) da amostra pGEM:: <i>xylFGH</i> extraída de <i>E. coli</i> XL1-Blue e digerida com <i>BamHI/SalI</i> ; B) Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8% m/v) das amostras pGEM:: <i>xylAB</i> e pGEM:: <i>xylFGH</i> extraídas de <i>E. coli</i> XL1-Blue e digeridas com a enzima <i>AatII</i>	56
Figura 11 - Organização dos genes <i>xylAB</i> e <i>xylFGH</i> inseridos no vetor pGEM T-Easy.....	56
Figura 12 - A) Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% (m/v) de pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-2:: <i>xylAB</i> extraídos de <i>E. coli</i> XL1 Blue e digeridas com <i>KpnI/SacI</i> ; B) Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% (m/v) de pBBR1MCS-5 e pBBR1MCS-5:: <i>xylFGH</i>	

extraídos de *E. coli* XL1 Blue e digeridos com *Sall/BamHI*.....57

Figura 13 - Organização dos genes *xylAB* e *xylFGH* inseridos, respectivamente, nos vetores pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5.....58

Figura 14 - Placas resultantes da transformação de *Escherichia coli* KO11 com A) pBBR1MCS-5::*xylFGH* e com B) pBBR1MCS-5 em meio LB sólido com gentamicina (30 µg/ml).....59

Figura 15 - Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *E. coli* KO11 abrigando a construção pBBR1MCS-2::*xylAB* ou o plasmídeo pBBR1MCS-2 e cultivadas em meio M9 com xilose na presença e ausência de glicose.....64

Figura 16 - Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *E. coli* KO11 abrigando a construção pBBR1MCS-5::*xylFGH* ou o plasmídeo pBBR1MCS-5 e cultivadas em meio M9 com xilose na presença e ausência de glicose.....66

Figura 17 - Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM101 abrigando a construção pBBR1MCS-2::*xylAB* ou o plasmídeo pBBR1MCS-2 e cultivadas em meio mineral com xilose na presença e ausência de glicose.....68

Figura 18 - Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM 101 abrigando a construção pBBR1MCS-5::*xylFGH* ou o plasmídeo pBBR1MCS-5 e cultivadas em meio mineral com xilose na presença e ausência de glicose.....71

Figura 19 - Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM101 abrigando as construções pBBR1MCS-2::*xylAB* e pBBR1MCS-5::*xylFGH* ou os plasmídeos pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5, cultivadas em meio mineral com xilose na presença e ausência de glicose.....74

Figura 20 - Produção de etanol pelas linhagens recombinantes de *E. coli* KO11, seus controles e pela linhagem não etanologênica *E. coli* W3110 em meio NBS com xilose na presença e ausência de glicose.....77

Figura 21 - Produção de poli-3-hidroxibutirato pelas linhagens recombinantes de <i>B. sacchari</i> LFM 101 e seus controles em meio mineral com xilose na presença e ausência de glicose.....	82
Figura 22 - Perfil de crescimento e consumo de linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM536 portando as construções pBBR1MCS-2:: <i>xyLAB</i> e seu controle portando o plasmídeo pBBR1MCS-2 vazio cultivadas em meio mineral com glicose e xilose e em meio mineral com xilose.....	85
Figura 23 - Perfil de crescimento e consumo de linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM536 portando as construções pBBR1MCS-2:: <i>xyFGH</i> , seu controle portando o plasmídeo pBBR1MCS-5 vazio e <i>B. sacchari</i> LFM101 pBBR1MCS-5 cultivadas em a) meio mineral com glicose e xilose e b) em meio mineral com xilose.....	87
Figura 24 - Produção de poli-3-hidroxibutirato pelas linhagens de <i>B. sacchari</i> provenientes da mutante <i>xyI</i> carregando pBBR1MCS-5 ou pBBR1MCS-5:: <i>xyFGH</i> e pela selvagem <i>B. sacchari</i> LFM 101 carregando pBBR1MCS-5 em meio mineral com xilose.....	88
Figura 25 - Comparação do perfil de crescimento e consumo de xilose pelas linhagens recombinantes provenientes de <i>Escherichia coli</i> KO11 em concentrações diferentes de IPTG (3,0; 4,5; 6,0 mM).....	90
Figura 26 - Comparação do perfil de crescimento e consumo de xilose pelas linhagens recombinantes provenientes de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 em concentrações diferentes de IPTG (3,0; 4,5; 6,0 mM).....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.....	40
Tabela 2 - Vetores de clonagem utilizados neste trabalho.....	41
Tabela 3 - Composição dos meios de cultura.....	42
Tabela 4 - Iniciadores construídos para a amplificação de genes <i>xyl</i> . Os sítios de restrição estão sublinhados e especificados na tabela.....	44
Tabela 5 - Características das sequências de <i>xylA-H</i> de <i>Escherichia coli</i> KO11 quanto a posição destas no genoma, tamanho do gene, descrição e tamanho da proteína.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 Organização e regulação dos genes <i>xyl</i>	25
3.2 Metabolismo de xilose.....	28
3.3 Estratégias visando aperfeiçoar o consumo de xilose.....	30
3.4 Linhagens alvo.....	35
3.4.1 <i>Escherichia coli</i> KO11.....	35
3.4.2 <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Micro-organismos e vetores de clonagem.....	40
4.2 Meios de cultura e condições de cultivo.....	41
4.3 Métodos de manipulação de DNA.....	43
4.3.1 Extração de DNA genômico e plasmidial.....	43
4.3.2 Construção dos iniciadores.....	43
4.3.3 Amplificação dos genes <i>xylAB</i> e <i>xylFGH</i>	44
4.3.4 Clonagem.....	45
4.3.5 Eletroforese em gel de agarose.....	46
4.4 Análise de crescimento em xilose e em mistura de glicose e xilose.....	46
4.5 Análise de produção de etanol e poli-3-hidroxibutirato a partir de xilose e de glicose e xilose.....	47
4.6 Clonagem e análise das construções em mutante <i>xyl</i> de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101.....	48
4.7 Análise de crescimento em xilose com diferentes concentrações de IPTG.....	48
4.8 Metodologias analíticas.....	49
4.8.1 Determinação do pH.....	49
4.8.2 Concentração de Biomassa (Massa Seca Celular)	49
4.8.3 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos.....	49
4.8.4 Determinação de etanol.....	49
4.8.5 Determinação de PHB.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Construção dos iniciadores e amplificação dos genes <i>xylAB</i> e <i>xylFGH</i>	51

5.2 Clonagem.....	54
5.3 Obtenção de linhagens recombinantes de <i>Escherichia coli</i> KO11.....	58
5.4 Obtenção de linhagens recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101.....	60
5.5 Ensaios de crescimento em xilose e em mistura de glicose e xilose.....	61
5.5.1 Ensaios de crescimento com linhagens recombinantes de <i>Escherichia coli</i> KO11.....	62
5.5.2 Ensaios de crescimento com linhagens recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101.....	67
5.6 Ensaios de produção de etanol ou poli-3-hidroxibutirato a partir de xilose e de mistura de glicose e xilose.....	75
5.6.1 Ensaios de produção de etanol pelas linhagens recombinantes de <i>Escherichia coli</i> KO11.....	75
5.6.2 Ensaios de produção de poli-3-hidroxibutirato pelas linhagens recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101.....	80
5.7 Clonagem e análise das construções em mutante <i>xyl⁻</i> de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101.....	84
5.8 Ensaios de crescimento em xilose com diferentes concentrações de IPTG.....	90
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXOS.....	104
Anexo A. Vetores utilizados para a expressão dos genes <i>xylAB</i> e <i>xylFGH</i>	104
Anexo B. Esquematização da amplificação dos genes <i>xylAB</i> e <i>xylFGH</i> , clonagem e construção das linhagens recombinantes.....	105
Anexo C. Esquematização dos ensaios de crescimento em xilose e em glicose e xilose pelas linhagens provenientes de <i>B. sacchari</i> LFM 101 e <i>E. coli</i> KO11.....	106
Anexo D. Organização do operon <i>xyl</i> em <i>Escherichia coli</i> e em algumas espécies de <i>Burkholderia spp</i>	108
Anexo E. Alinhamento entre as sequências de <i>xylA</i> , <i>xylB</i> , <i>xylF</i> , <i>xylG</i> e <i>xylH</i> de <i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 e <i>Escherichia coli</i> KO11.....	111
Anexo F. Sequência de nucleotídeos dos plasmídeos pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5 com os genes <i>xylAB</i> e <i>xylFGH</i> , respectivamente.....	118
Anexo G. Alinhamento das sequências obtidas do sequenciamento de <i>xylAB</i> e <i>xylFG</i>	126
Anexo H. Apresentação dos resultados obtidos nos experimentos de crescimento e produção pelas linhagens recombinantes e seus controles.....	127

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A crescente preocupação acerca da depleção das reservas e oscilação dos preços do barril de petróleo, bem como as mudanças climáticas resultantes da geração de resíduos provenientes dessa matéria-prima, tem resultado em várias pesquisas que buscam por fontes energéticas seguras, de natureza renovável, com a finalidade de reduzir a dependência sobre os combustíveis fósseis (JOJIMA et al., 2010). A biomassa lignocelulósica, derivada de resíduos agroindustriais e florestais, tem sido apontada como uma fonte bastante atrativa de matéria-prima para a produção de biocombustíveis e outros químicos, em razão de ser abundante, renovável e vastamente distribuída no mundo todo (BOTHAST; NICHOLS; DIEN, 1999; TAKAHASHI et al., 2000; NONATO; MANTELATO; ROSSEL, 2001; SILVA et al., 2004; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; SASAKI; JOJIMA; MASAYUKI, 2008; JOJIMA et al., 2010).

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar tem se mostrado o resíduo lignocelulósico mais promissor em razão da crescente produção de cana-de-açúcar nesse país. Segundo dados da UNICA, hoje o Brasil possui mais de 400 usinas concentradas principalmente no Estado de São Paulo, que processam cerca de 600 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano. Desse montante, 28% correspondem ao bagaço que, embora seja queimado para suprir as necessidades energéticas da usina, ainda resultam em milhões de toneladas de resíduos, causando sérios problemas de estocagem e poluição ambiental (MICHELIN RAMOS, 2003). O excedente de bagaço poderia, portanto, ser melhor aproveitado ao ser utilizado como matéria-prima para a geração de biocombustíveis como o etanol e de outros produtos como os polihidroxialcanoatos (NONATO; MANTELATO; ROSSEL, 2001).

Resíduos lignocelulósicos correspondem a uma mistura de lignina e polímeros de carboidratos (celulose, hemicelulose e pectina), sendo a glicose e a xilose seus principais açúcares constituintes (DORAN-PETERSON; COOK; BRANDON, 2008). A produção de etanol e polihidroxialcanoatos a partir dessa matéria-prima requer, portanto, a despolimerização das porções celulósicas e hemicelulósicas e a subsequente conversão dos açúcares resultantes nos produtos desejados, utilizando-se para isso micro-organismos (SASAKI; JOJIMA; MASAYUKI, 2008). Dessa forma, uma rápida e eficiente conversão de todos os açúcares presentes nessa matéria-prima é muito importante para tornar o processo de conversão de lignocelulose em biomassa economicamente viável.

Embora a celulose seja a porção mais abundante encontrada em materiais lignocelulósicos, a fração hemicelulósica detém mais que 35% do total de carboidratos presentes no bagaço de cana-de-açúcar que podem ser liberados por hidrólise ácida, sendo que desse total aproximadamente 50-70% pode corresponder à xilose (CHENG et al., 2008). Dessa forma, ainda que a composição dos açúcares possa variar consideravelmente dependendo do tipo de matéria-prima, a xilose é o açúcar mais prevalente em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (UNDERWOOD, 2003). Além disso, a recuperação desse açúcar a partir de hemicelulose é mais simples e mais eficiente que a recuperação de glicose a partir de celulose (XU et al., 2006). A bioconversão de xilose, portanto, tem sido apontada como uma etapa importante no processo (MATSUSHIKA et al., 2009; JOJIMA et al., 2010).

A metabolização de xilose representa um desafio. Enquanto muitos micro-organismos não são capazes de metabolizar pentoses (HAHN HÄGERDAL et al., 2007) outros metabolizam esses açúcares, mas apresentam dificuldades quando estes estão em mistura com outros açúcares, principalmente na presença de glicose (DEUTCHER, 2008; KIM; BLOCK; MILLS, 2010; CLOMBURG; GONZALEZ, 2010). Como a utilização de resíduos lignocelulósicos requer um micro-organismo que seja capaz de metabolizar com eficiência todos os açúcares presentes no hidrolisado, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar o consumo de xilose e, consequentemente, a produtividade do processo (JOJIMA et al., 2010).

Dentre essas estratégias destacam-se: (I) a redução da repressão da glicose sobre a xilose, fenômeno denominado de repressão catabólica carbônica, através da inativação de componentes específicos do sistema fosfotransferase fosfoenolpiruvato-dependente (PTS, do inglês *phosphotransferase system*) (LINDSAY; BOTHAST; INGRAM, 1995; NICHOLS; DIEN; BOTHAST, 2001; GOSSET, 2005; LOPES et al., 2011); (II) a redução da repressão catabólica através da substituição da proteína receptora de cAMP (CRP) por uma proteína mutada, não-dependente de cAMP (CRP*) (CIRINO; CHIN; INGRAM, 2006; KHANKAL et al., 2009); (III) a superexpressão de genes relacionados com o metabolismo e transporte de xilose (JOHANSSON et al., 2001; KAWAGUSHI et al., 2006; KHANKAL; CHIN; CIRINO, 2008; MEIJNEN; WINDE; RUIJSSENAARS, 2008; EITEMAN; LEE; ALTMAN, 2008; LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009); e a superexpressão de genes-chaves da via das pentoses (ALTINTAS et al., 2005; GU et al., 2009).

Diante do exposto, este trabalho foi proposto a partir de experiência prévia do nosso laboratório com o uso de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de polihidroxialcanoatos (SILVA et al., 2004; LOPES, 2010). Nesses e em outros trabalhos do nosso grupo (LOPES, et al., 2009; LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009; LOPES, et al., 2011) foi possível observar que a utilização de pentoses, principalmente xilose, é um passo importante para o desenvolvimento de processos biotecnológicos economicamente viáveis a partir de biomassa. No presente trabalho, decidiu-se expandir essa ideia também para a produção de etanol a partir de linhagem anteriormente estudada (OHTA et al., 1991).

Esse trabalho propôs, portanto, a construção de linhagens recombinantes pela inserção de maior número de cópias de *xylAB* e *xylFGH*, genes do catabolismo e transporte de xilose, respectivamente. Com essa estratégia esperava-se aumentar o consumo de xilose, bem como melhorar a produção de etanol ou de polihidroxialcanoato pelas linhagens alvo em cultivos suplementados com xilose ou com glicose e xilose, açúcares que representam quase 80% da composição total do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Dessa forma, foi possível avaliar se a superexpressão dos genes *xylAB* ou *xylFGH* ou até mesmo dos dois seria relevante para aumentar o consumo de xilose e quanto o fenômeno de repressão catabólica poderia interferir nesse resultado.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo principal a inserção de maior número de cópias de *xylAB* e *xylFGH* nas linhagens *Escherichia coli* KO11 e *Burkholderia sacchari* LFM 101 para avaliar a contribuição de cada um dos fenômenos – expressão dos genes *xyl* e repressão catabólica – para o consumo de xilose e, em consequente, avaliar a eficiência dessa estratégia para a produção de etanol e polihidroxialcanoatos, respectivamente, a partir do cultivo dessas linhagens em açúcares presentes no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

Os seguintes objetivos específicos foram definidos para atingir o objetivo geral acima:

- Amplificação dos genes *xylAB* e *xylFGH* a partir de *E. coli* KO11, clonagem nos vetores pBBR1MCS-2 (Cam^r) e pBBR1MCS-5 (Gm^r), respectivamente, e inserção de maior número de cópias dessas construções nas linhagens *E. coli* KO11 e *B. sacchari* LFM101;
- Análise do crescimento e consumo de xilose pelas linhagens recombinantes através de experimentos de crescimento em xilose e em mistura desse açúcar com glicose;
- Análise da capacidade de produção das linhagens recombinantes a partir de xilose e da mistura desse açúcar com glicose;
- Avaliação da capacidade desses genes complementarem um mutante *xyl⁻* de *B. sacchari* LFM101 (LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Um dos grandes desafios da sociedade para o século 21 é satisfazer a demanda crescente de energia para transporte, aquecimento e processos industriais, e garantir matéria-prima para a indústria de maneira sustentável (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). O petróleo, embora seja a fonte de energia mais vastamente utilizada no mundo, contribui para o aquecimento global e poderá ter suas fontes esgotadas, em razão de sua natureza não renovável (SILVA et al., 2005). Essa matéria-prima é responsável pela geração de grande quantidade de combustíveis e materiais plásticos que resultam em impactos cada vez mais prejudiciais ao meio-ambiente. Esses fatores associados à crescente preocupação acerca do custo oscilante do petróleo têm estimulado o desenvolvimento de tecnologias para a produção de combustíveis alternativos, como o etanol, e diversos produtos ambientalmente corretos, como os plásticos biodegradáveis, que podem ser gerados a partir de fontes renováveis (NONATO; MANTELATO; ROSSEL, 2001; SILVA et al., 2004; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; CLOMBURG; GONZALEZ, 2010).

No Brasil, Índia e América do Sul, a cana-de-açúcar é a matéria-prima mais utilizada para a produção de etanol, enquanto nos Estados Unidos e na França as mais utilizadas para esse fim são o milho e o açúcar da beterraba, respectivamente (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). No entanto, é previsto que essas matérias-primas de base, as quais também são utilizadas para a alimentação de animais e necessidades humanas, não sejam suficientes para suportar a crescente demanda desse combustível (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Diante disso, a utilização de materiais lignocelulósicos, como resíduos industriais e agrícolas, vem sendo apontada como uma possível solução para esses problemas (NONATO; MANTELATO; ROSSEL, 2001; SILVA et al., 2004; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; SASAKI; JOJIMA; MASAYUKI, 2008; JOJIMA et al., 2010).

A lignocelulose corresponde a uma mistura de lignina e polímeros de carboidratos (celulose, hemicelulose e pectina), sendo a glicose e a xilose seus principais açúcares constituintes, além de menores quantidades de arabinose, manose, galactose, ramnose e outros (DORAN-PETERSON; COOK; BRANDON, 2008). Sua composição química apresenta basicamente 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-15% de lignina em forma de peso de massa seca, dependendo da

espécie de planta e das condições de cultivo (BOTHAST; NICHOLS; DIEN, 1999).

A celulose é o polímero mais abundante da natureza e sua composição consiste em unidades de anidroglicose interligadas por ligação β -1,4-glicosídica (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). As microfibrilas de estrutura cristalina da celulose são circundadas por hemicelulose amorfa, que é totalmente embebida pela matriz de lignina (PÉREZ et al., 2002). A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante depois da celulose e, ao contrário desta que é constituída apenas por glicose, é um heteropolímero cuja composição consiste em resíduos de hexoses (galactose, manose, ramnose e fucose), pentoses (arabinose e xilose) e ácido *D*-glucurônico (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). A lignina, o mais abundante polímero aromático da natureza, é formada por unidades de fenil-propano interligadas por diferentes tipos de ligações (PÉREZ et al., 2002).

Os materiais lignocelulósicos são vantajosos por consistirem em matérias-primas renováveis, de baixo custo e que estão disponíveis em grandes quantidades (BOTHAST; NICHOLS; DIEN, 1999). Dentre esses materiais, a madeira e subprodutos agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar, a casca de arroz, a palha de milho e a serragem têm sido utilizados para a produção de etanol (DORAN; ALDRICH; INGRAM, 1994; TAKAHASHI et al., 2000; LIMA; TAKAHASHI; ALTERTHUM, 2002; JARBOE et al., 2007; DORAN-PETERSON; COOK; BRANDON, 2008; MARGEOT et al., 2009) e de outros produtos, como os polihidroxialcanoatos (PHAs) (SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2007; LOPES et al., 2009; LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009; LOPES et al., 2011).

Atualmente o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e açúcar do mundo e o segundo maior produtor mundial de etanol, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, segundo dados estatísticos da FAO (do inglês *Food and Agriculture Organization of The United Nations*) de 2011. O desenvolvimento da indústria canavieira voltada não só para a produção de açúcar, mas também associada à produção de etanol, ganhou forças em 1975 quando o Brasil implantou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) com o objetivo de enfrentar a crise do petróleo e reduzir a dependência sobre os seus produtos derivados (NONATO; MANTELATO; ROSSEL, 2001).

De acordo com Zanin e colaboradores (2000), três principais fatores levaram a implantação desse programa. Primeiro, o aumento de preço do barril de petróleo que passou de U\$2,50 em 1973 para mais de U\$20,00 em 1979, atingindo U\$34,40 em

1981. O aumento dos preços fez com que o país gastasse, em 1981, U\$10,6 bilhões com a importação de petróleo; em segundo lugar, 98% da energia importada no Brasil era proveniente do petróleo; por fim, o terceiro e principal fator da implementação do Proálcool foi a queda dos preços do açúcar no mercado mundial. O programa permitiria maior flexibilidade do setor, evitando a formação de grandes estoques de açúcar através do redirecionamento da cana-de-açúcar para a produção de etanol. Como resultado desse programa, em 1986, 96% da indústria automotiva no Brasil consistia de carros movidos a álcool (ZANIN et al., 2000).

No entanto, no período de 1986 a 1995 veio a fase de estagnação quando o preço do barril de petróleo caiu de U\$30,00 para cerca de U\$12,00, resultando num sensível decréscimo no volume de investimentos nos projetos de produção interna de energia e, conseqüentemente, em redução da demanda e venda de veículos movidos a álcool no Brasil (ZANIN et al., 2000). Atualmente, observa-se uma corrida mundial para ampliar a produção de álcool que no Brasil passou a ser movida mais pela iniciativa privada, convicta de que o álcool terá, a partir de agora, um papel cada vez mais importante como combustível, no Brasil e no mundo.

Em razão da necessidade crescente em ampliar a produção de combustíveis como o etanol e de viabilizar a produção de químicos como os polihidroxialcanoatos, o bagaço de cana-de-açúcar é no Brasil a matéria-prima mais indicada para este fim em razão de sua abundância, baixo custo e por encontrar-se disponível na unidade de produção de etanol, evitando dessa forma custos adicionais com o deslocamento dessa matéria-prima (ZANIN et al., 2000). A intenção é complementar o álcool de primeira geração, proveniente da fermentação do caldo de cana-de-açúcar (sacarose) por *Saccharomyces cerevisiae*, com o álcool de segunda geração, resultante do aproveitamento dos açúcares presentes no bagaço da cana (MARQUES, 2009).

Atualmente, o Brasil possui mais de 400 usinas concentradas principalmente no Estado de São Paulo, que processam cerca de 600 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano, de acordo com o levantamento anual realizado pela União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA, <<http://www.unica.com.br/>>, acesso em 12/01/2012). Na safra de 2010/2011, a produção de cana-de-açúcar no Brasil atingiu quase 624 milhões de toneladas e foi estimado para a safra de 2011/2012, em um levantamento realizado pelo CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) em Dezembro de 2011, que 50% da produção de cana-de-açúcar seria destinada à produção de etanol (CONAB,

2011). Do total de cana-de-açúcar produzido, aproximadamente 28% corresponde ao bagaço, o qual é capaz de gerar, através de sua queima, toda a energia térmica, mecânica e elétrica necessária para a manutenção da indústria de açúcar e etanol (NONATO; MANTELATO; ROSSEL, 2001). Cerca de 54 milhões de toneladas de bagaço (peso seco) é produzido anualmente no mundo todo (SUN et al., 2004).

Apesar de parte do bagaço ser queimado para a geração de energia, ainda restam milhões de toneladas de resíduos, causando sérios problemas de estocagem e poluição ambiental (MICHELIN RAMOS, 2003). Além disso, essa matéria-prima possui grandes quantidades de carboidratos, pouca quantidade de lignina e é gerado em quantidades enormes, caracterizando-o como um ótimo substrato para bioconversões (MARTIN et al., 2002). O excedente de bagaço poderia, portanto, ser utilizado como matéria-prima para a geração de etanol e polihidroxialcanoatos, além de outros produtos de interesse, como xilitol e 2,3-butanodiol (BERTRAND et al., 1990; SAHA, 2003).

Neste cenário destaca-se a produção de PHA a partir deste resíduo, pois poderá contribuir para a redução dos custos de produção desses polímeros, em especial se levarmos em conta o modelo de produção integrado à usina de açúcar e álcool no Brasil, tornando-o mais competitivo frente aos plásticos derivados do petróleo. Esse modelo proposto por NONATO e colaboradores (2001) é interessante devido à capacidade do sistema em suprir a energia necessária para o processo, disponibilidade de substratos para a produção e produtos para a etapa de purificação, e também pela habilidade do sistema de processar e utilizar os seus efluentes. Além disso, como todo o carbono envolvido (tanto combustível quanto de matéria-prima) é originado da cana-de-açúcar, as emissões de CO₂ pela planta de produção também retornam para os campos de cultivo através da fotossíntese e o balanço de emissão de carbono é próximo a zero (NONATO; MANTELATO; ROSSEL, 2001).

A fim de que sejam utilizados por micro-organismos produzindo etanol ou outros materiais, os resíduos lignocelulósicos precisam primeiramente ser submetidos a um pré-tratamento no qual há a liberação dos polímeros de celulose e hemicelulose do complexo formado com a lignina. A hidrólise desses resíduos pode ser catalisada por ácidos ou enzimas celulolíticas (MARTIN et al., 2002). Estima-se que uma destilaria que produza hoje 1 milhão de litros de etanol por dia do caldo de cana-de-açúcar poderia inicialmente, com a tecnologia de hidrólise, gerar um adicional de 150 mil

litros de etanol do bagaço (MARQUES, 2009). Em 2025, com a técnica aperfeiçoada, a mesma produção poderia ter um acréscimo de 400 mil litros provenientes do bagaço recuperado (MARQUES, 2009).

Como resultado da hidrólise, a celulose e hemicelulose são liberadas do complexo formado com a lignina, com posterior quebra dos polímeros de açúcares e liberação de uma mistura de hexoses e pentoses, principalmente glicose e xilose (KHANKAL; CHIN; CIRINO, 2008). Assim, qualquer produto microbiano que se pretenda obter de modo eficiente a partir desta matéria-prima necessariamente deverá buscar linhagens capazes de usar todos esses açúcares. Enquanto a produção do álcool de primeira geração requer apenas um micro-organismo que fermenta sacarose com altos rendimentos a etanol, trabalho que já é feito com eficiência pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o álcool de segunda geração necessita, portanto, de um micro-organismo capaz de fermentar uma mistura de hexoses (açúcares de 6 carbonos) e pentoses (açúcares de 5 carbonos), resultantes da hidrólise de tais resíduos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; JARBOE et al., 2007).

Entre os açúcares liberados pela hidrólise de materiais lignocelulósicos está a xilose, o segundo açúcar mais abundante na natureza depois da glicose, encontrado mais frequentemente sob a forma de xilano (JEFFRIES, 1983). O xilano é o principal polímero de carboidrato constituinte da hemicelulose, podendo corresponder a mais de 30% do peso seco desses materiais (SUN et al., 2004). A fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar é importante, pois contém mais de 35% do total de carboidratos presente nessa matéria-prima, sendo que aproximadamente 50-70% desse total pode corresponder a xilose (CHENG et al., 2008). Outra vantagem no aproveitamento dessa pentose é que a sua liberação a partir de hemicelulose através de hidrólise ácida é mais simples e eficiente que a recuperação de glicose a partir de celulose (XU et al., 2006). O aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para a geração de produtos de interesse industrial requer, portanto, a bioconversão eficiente desse açúcar (UNDERWOOD, 2003; CHENG et al., 2008; MATSUSHIKA et al., 2009; JOJIMA et al., 2010; KIM; BLOCK; MILLS, 2010).

3.1 Organização e regulação dos genes *xyl*

A organização e regulação dos genes responsáveis pelo metabolismo e transporte de xilose está descrita na literatura (SONG; PARK, 1997). Segundo esses

autores, em *Escherichia coli*, assim como na maioria dos micro-organismos, a xilose é metabolizada pela via das pentoses. Em bactérias, primeiramente esse açúcar é isomerizado a D-xilulose por ação da enzima xilose isomerase e, posteriormente, fosforilado por ação da enzima xiluloquinase, produzindo D-xilulose-5-fosfato (DAVID; WIESMEYER, 1970; SHAMANNA; SANDERSON, 1979). As duas enzimas responsáveis por catalisar essas reações são codificadas pelos genes *xylA* e *xylB*, respectivamente, que formam o operon *xylAB* em *E. coli* (SONG; PARK, 1997). Em leveduras e fungos filamentosos, no entanto, por haver uma etapa a mais para a formação de D-xilulose, são três genes que participam da metabolização de xilose a xilulose-5-fosfato: *XYL1*, *XYL2* e *XKS1*, respectivamente (JEFFRIES; JIN, 2004).

O transporte de xilose para o interior da célula pode ser feito através de dois sistemas de transporte: um sistema quimiosmótico do tipo simporte de prótons, de baixa afinidade (63-169 μM), codificado pelo gene *xylE* ou através de um transportador do tipo ABC (do inglês, *ATP Binding Cassete*) de alta afinidade ($K_m = 0,2-4,0 \mu\text{M}$) codificado pelo operon *xylFGH* (SOFIA et al., 1994). Esses dois sistemas de transporte estão esquematizados na figura 1. De acordo com a análise das sequências referentes ao operon *xylFGH*, XylF é uma proteína periplasmática de ligação a D-xilose; XylG é uma proteína de ligação a ATP; e XylH é uma proteína de membrana componente de um sistema de transporte do tipo ABC (SOFIA et al., 1994). Enquanto o sistema de transporte XylE é energizado pela força próton motriz, o sistema de transporte XylFGH requer a hidrólise de um ATP (GONZALEZ et al., 2002; UNDERWOOD, 2003).

Figura 1. Transporte de xilose em *Escherichia coli*.

Fonte: UNDERWOOD, 2003 (modificado).

De acordo com a literatura (TAKEDA et al., 1998), algumas linhagens bacterianas apresentam apenas o sistema de transporte do tipo simporte XylE (figura 2). Em leveduras (*Pichia stipitis* e *Candida intermedia*), o transporte de xilose também é realizado por dois sistemas, de alta afinidade e baixa afinidade (DMYTRUK et al., 2008). O primeiro trata-se de um transporte do tipo simporte de prótons, enquanto o segundo é do tipo difusão facilitada que, por depender do gradiente de concentração, funciona quando a concentração de xilose no meio está elevada. Esse sistema também é responsável pelo transporte de glicose (DMYTRUK et al., 2008).

Em *Escherichia coli*, as unidades transcricionais *xylAB* e *xylFGH* estão organizadas uma ao lado da outra, embora orientadas em sentidos opostos, e estão sob o controle dos promotores P_A e P_F, respectivamente (SONG; PARK, 1997). Organização similar já havia sido sugerida também para *Salmonella thyphimurium* (SHAMANNA; SANDERSON, 1979). A regulação dos genes *xyl* ocorre a nível transcricional e, nessas duas linhagens, é mediada pelo controle positivo do produto de *xylR*. Este gene, que se localiza a montante de *xylFGH*, caracteriza-se por apresentar um promotor fraco (P_R) e reconhece sequências consenso localizadas nas regiões promotoras de *xylAB* e *xylFGH* (I_A e I_F, respectivamente), ativando a transcrição por associar-se diretamente a componentes do aparato transcricional (SONG; PARK, 1997). Segundo Song e Park (1997), a regulação transcricional dos genes *xyl* envolve a interação de cada promotor com XylR, RNA polimerase e CRP (regulador global de transcrição envolvido com a repressão catabólica).

Em outras espécies bacterianas como espécies do gênero *Bacillus spp.* (GARTNER et al., 1988), *Staphylococcus xylosus* (SIZEMORE et al., 1991), *Lactobacillus pentosus* (LOKMAN et al., 1997) e *Streptomyces lividans* (GUN-YOUNG et al., 2008), XylR atua como repressor. Nesses casos, os genes *xyl* são regulados negativamente pela ligação de XylR ao operador *xylO* na ausência de xilose (DAHL; SCHIMIEDEL; HILLEN, 1995).

Foram observadas também variações na organização desses genes entre espécies bacterianas distintas (figura 2). Espécies de *Bacillus spp.*, por exemplo, apresentam os genes *xylAB* e *xylR* adjacentes e orientados em sentido contrário como em *E. coli*, enquanto *S. xylosus* e *L. pentosus* apresentam esse operon e *xylR* orientados no mesmo sentido (DAHL; SCHIMIEDEL; HILLEN, 1995). No entanto, as maiores variações referem-se aos genes envolvidos na captação de xilose (SCHIMIEDEL et al., 1997). Em

Bacillus megaterium, por exemplo, foi identificado um sistema de transporte que envolve simporte de prótons, codificado pelo gene *xylT* e cuja sequência de nucleotídeos mostrou maior identidade com o gene *xylE* de uma linhagem de *E. coli* (SCHMIEDEL et al., 1997). Para outras linhagens, como *Lactobacillus pentosus* e *Streptococcus lividans*, esses sistemas de transporte de xilose ainda não foram descritos (LOKMAN et al., 1997; GUN-YOUNG et al., 2008), enquanto para *Tetragenococcus halophila* apenas foi descrito *xylE* (TAKEDA et al., 1998).

Figura 2. Organização dos genes *xyl* descrita para algumas bactérias. As letras fazem referência aos genes *xyl* descritos para as espécies citadas. A-*xylA*; B-*xylB*; F-*xylF*; G-*xylG*; H-*xylH*; R-*xylR*; E-*xylE*; T-*xylT*.

Fonte: TAKEDA et al., 1998 (modificado).

3.2 Metabolismo de xilose

Como mostrado, em bactérias a metabolização de xilose consiste em duas reações iniciais, de isomerização e fosforilação, que culminam na formação de D-xilulose-5-fosfato. Em leveduras e fungos filamentosos (como *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* e *Candida shehatae*), o catabolismo de xilose possui uma etapa adicional que não está presente em bactérias e culmina na formação de xilitol (JEFFRIES; JIN, 2004). Nesse caso, a formação de D-xilulose requer duas reações de oxidorredução, como mostra a figura 3. A primeira reação envolve a enzima xilose redutase (codificada pelo gene *XYL1*) e consiste na redução de D-xilose a xilitol. O xilitol pode ser excretado ou oxidado pela enzima xilitol desidrogenase (codificada pelo gene *XYL2*) para formar D-xilulose (JEFFRIES; JIN, 2004). A última reação consiste na fosforilação desse composto para a formação de D-xilulose-5-fosfato pela enzima

xiluloquinase (*XKS1*) (JOHANSSON et al., 2001).

De acordo com a literatura (ERLANDSON et al., 2000), tanto em fungos como em bactérias, D-xilulose-5-fosfato é metabolizado pela via das pentoses e convertido a intermediários da via glicolítica (frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato). A via das pentoses também fornece D-ribose para a biossíntese de ácidos nucleicos, D-eritrose-4-fosfato para a síntese de aminoácidos aromáticos e poder redutor (NADPH) necessário para as reações anabólicas (JEFFRIES, 2006).

Figura 3. Metabolismo de xilose em fungos e bactérias. Em A- reações do metabolismo de xilose em fungos filamentosos e leveduras; em B- reações do metabolismo de xilose em bactérias. As siglas representam as enzimas que catalisam cada uma dessas reações. XR- xilose redutase; XDH- xilose desidrogenase; XI- xilose isomerase; XK- xiluloquinase.

Fonte: JOJIMA et al., 2010 (modificado).

No catabolismo de xilose, o gasto energético requerido para o transporte desse açúcar não está vinculado a sua ativação (formação de D-xilulose-5-fosfato), como mostra a figura 1. A glicose, por sua vez, requer um único ATP para seu transporte e fosforilação, que é mediado pelo sistema fosfotransferase (PTS) e proveniente de um fosfoenolpiruvato (UNDERWOOD, 2003). Em razão disso, o crescimento em xilose resulta em rendimento relativamente baixo de ATP (0,67 ATPs/mol de xilose) quando comparado ao catabolismo de glicose pela via glicolítica (2 ATPs/mol de glicose), o que explicaria em parte o consumo preferencial deste açúcar (GONZALEZ et al., 2002;

UNDERWOOD et al., 2002; UNDERWOOD, 2003).

Enquanto a glicose é o substrato preferencial da maioria dos micro-organismos, incluindo *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae* (JOJIMA et al., 2010) e *Burkholderia sacchari* (SILVA et al., 2004), poucos micro-organismos possuem a habilidade natural de utilizar pentoses, como a xilose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Por outro lado, aqueles que possuem a habilidade natural de utilizar esses açúcares ainda podem apresentar baixo rendimento e produtividade em razão de uma variedade de fenômenos, entre os quais repressão catabólica carbônica (DEUTCHER, 2008; KIM; BLOCK; MILLS, 2010; CLOMBURG; GONZALEZ, 2010) e baixa eficiência na captação de xilose (JEFFRIES; JIN, 2004; HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; MATSUSHIKA et al., 2009). Consequentemente, tem sido observado grande esforço por parte da comunidade científica para o desenvolvimento de micro-organismos eficientes no aproveitamento de xilose (ZHANG et al., 1995; JOHANSSON et al., 2001; JEFFRIES; JIN, 2004; MEIJNEN; WINDE; RUIJSSENAARS, 2008; LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009; MATSUSHIKA et al., 2009; GU et al., 2009) e no desenvolvimento de micro-organismos capazes de utilizar simultaneamente os principais açúcares encontrados em materiais lignocelulósicos (NICHOLS; DIEN; BOTHAST, 2001; CIRINO; CHIN; INGRAM, 2006; SASAKI; JOJIMA; MASAYUKI, 2008; LOPES et al., 2009; KHANKAL et al., 2009; YOMANO et al., 2009; JI et al., 2011; KIM; BLOCK; MILLS, 2010; LOPES, 2010).

3.3 Estratégias visando aperfeiçoar o consumo de xilose

Uma das preocupações apontadas pela comunidade científica para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos por micro-organismos é a obtenção de linhagens eficientes na co-utilização de glicose e xilose. O consumo simultâneo desses açúcares, no entanto, é prejudicado pelo fenômeno de repressão catabólica. Esse fenômeno caracteriza-se pela incapacidade que algumas bactérias possuem de consumir mais de uma fonte de carbono simultaneamente, uma vez que uma delas (geralmente a glicose) é metabolizada preferencialmente (DEUTCHER, 2008).

Este perfil de consumo seqüencial de açúcares também é caracterizado por um crescimento diáuxico e está bem descrito em *Escherichia coli* (MEGASANIK, 1961; BRÜKNER; TITGEMEYER, 2002; DEUTCHER, 2008; KREMLING, 2009; KIM;

BLOCK; MILLS, 2010). Um regulador global de transcrição denominado CRP é o personagem principal, por agir como ativador de genes envolvidos com o metabolismo de outros açúcares que não a glicose. No entanto, na presença de glicose, este regulador não fica em sua forma ativa, ou seja, ligado a cAMP (adenosina monofosfato cíclica) e portanto não consegue ativar esses genes (figura 4).

Com o objetivo de reduzir a repressão catabólica da glicose sobre os outros açúcares presentes em materiais lignocelulósicos, foram desenvolvidas linhagens com mutação no sistema de transporte fosfotransferase fosfoenolpiruvato-dependente (PTS, do inglês *phosphotransferase system*) para a produção de etanol (LINDSAY; BOTHAST; INGRAM, 1995; NICHOLS; DIEN; BOTHAST, 2001) e polihidroxicanoatos (LOPES et al., 2011). O sistema PTS consiste em um sistema de transporte do tipo translocação de grupo, no qual o doador de grupos fosforil é o fosfoenolpiruvato (figura 4). Na ausência de glicose, uma das proteínas de transporte (IIA) permanece em sua forma fosforilada (IIA-P) permitindo que se ligue a enzima adenilato ciclase e ative essa enzima para produzir cAMP (adenosina monofosfato cíclica). O aumento de cAMP na célula, por sua vez, ativa o regulador global de transcrição CRP (do inglês *Catabolite Repressor Protein*) que é responsável pela ativação de genes do catabolismo de açúcares não transportados pelo sistema PTS, como xilose, lactose e arabinose (GOSSET, 2005).

Figura 4. Sistema PTS e mecanismo de repressão catabólica em *Escherichia coli*. Proteínas constituintes do sistema PTS: Complexo enzimático II- enzimas IIA (codificada pelo gene *crr*), IIB e IIC (codificada pelo gene *ptsG*); proteína citoplasmática HPr (codificada pelo gene *ptsH*); Enzima I (codificada pelo gene *ptsI*). PEP- fosfoenolpiruvato; CRP- *catabolite repressor protein* (encontrada em bactérias Gram negativas); IIA-P, HPr-P e I-P – forma fosforilada das proteínas IIA, HPr e I, respectivamente.

Fonte: UNDERWOOD, 2003 (modificado).

LINDSAY e colaboradores (1995) isolaram mutantes de *E. coli* KO11, afetados no transporte de glicose e outros açúcares transportados pelo sistema PTS, em placas de fosfomicina e observaram que a linhagem em que foi restabelecida a capacidade de crescimento em glicose (mutante SL40) não foi capaz de consumir simultaneamente glicose e xilose como o esperado. Quando cultivada em uma mistura de glicose e xilose na proporção 2:1 desses açúcares, o mutante SL40 consumiu 60 g/l de glicose completamente em 24 horas de cultivo e levou 72 horas para fazer o mesmo com 30 g/l de xilose (LINDSAY; BOTHAST; INGRAM, 1995).

Por outro lado, NICHOLS e colaboradores (2001) observaram para outra linhagem de *E. coli* que uma mutação no gene *ptsG* (ver figura 4) foi capaz de melhorar o consumo de xilose. Embora a xilose tenha sido consumida junto com a glicose, foi observado atraso no consumo daquele açúcar, que levou aproximadamente 72 horas para ser consumido completamente, enquanto a mesma quantidade de glicose foi consumida com quase 40 horas de cultivo (NICHOLS; DIEN; BOTHAST, 2001).

LOPES e colaboradores (2011) obtiveram linhagem de *Burkholderia sacchari* com mutação no gene *ptsI* (ver figura 4) e com a capacidade de crescimento em glicose restabelecida em razão da superexpressão de um sistema de transporte alternativo para o transporte de glicose (*galP*). Esses autores observaram que, embora o mutante *pts⁻gli⁺* tenha apresentado melhor desempenho no consumo de glicose e xilose, como observado nos outros trabalhos, o atraso no consumo de xilose permaneceu.

Outra estratégia que tem sido utilizada para inibir os efeitos da repressão catabólica é a substituição do gene *crp* original de *E. coli* por um gene *crp* portando alteração em 3 aminoácidos específicos (I112L, T127I e A144T), cujo produto corresponde a uma proteína CRP que, aparentemente, não depende de cAMP para estar ativa (CIRINO; CHIN; INGRAM, 2006). De acordo com HARMAN e colaboradores (1986), CRP torna-se ativo quando forma um dímero, requerendo para isso cAMP. Ji e colaboradores (2011) mostraram que as referidas alterações no gene *crp* estão envolvidas com a dimerização funcional de CRP com cAMP, o que explicaria o funcionamento desse regulador independente da presença dessa molécula.

Dessa forma, esse novo fenótipo possibilitaria a captação e metabolização de xilose mesmo na presença de glicose em razão da expressão constitutiva dos genes *xyl* (CIRINO; CHIN; INGRAM, 2006). Cirino e colaboradores (2006) verificaram a ausência de crescimento diáuxico, ou seja, o consumo simultâneo de glicose e xilose,

em linhagens *crp** de *E. coli* produtoras de xilitol (linhagem mutante PC05). Resultado similar foi obtido por Ji e colaboradores (2011) para a produção de 2,3-butanodiol por uma linhagem de *Klebsiella oxytoca* abrigando *crp**, embora ainda tenha sido verificado atraso no consumo de xilose, que foi consumida completamente 14 horas após o término de glicose.

Em outro trabalho, foi feita a análise da expressão de mais de 600 genes na linhagem parental *E. coli* W3110 e na linhagem mutante carregando *crp** (PC05, mesma linhagem do trabalho de CIRINO et al., 2006) na presença e ausência de glicose. Esses resultados mostraram modificação no nível transcricional de aproximadamente 481 genes durante o cultivo de W3110 na ausência de glicose e da linhagem CRP* na presença de glicose, constatando-se que o fenótipo CRP* ainda sofre influência desse açúcar (KHANKAL et al., 2009). Relataram ainda a superexpressão de vários genes pela linhagem CRP* (na presença de glicose), entre os quais genes envolvidos com a regulação da quimiotaxia (*che*), genes que codificam proteínas do sistema PTS (*ptsG*), envolvidos no metabolismo de glutamato (*glt*) e em vias metabólicas, como a Entner-Doudoroff (*edd*); e a redução da expressão de genes envolvidos com a biossíntese de lisina e arginina (*argD*), envolvidos com metabolismo e transporte de glicerol (*glp*), na biossíntese de tiamina (*thiCE*), entre outros (KHANKAL et al., 2009). O fenótipo CRP* como estratégia para melhorar o consumo de açúcares presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar tem sido avaliado no nosso laboratório em linhagem de *E. coli* geneticamente modificada para a produção de polihidroxicanoatos ¹(CHOUMAN, [s.d], em elaboração).

A superexpressão de genes responsáveis pelo catabolismo e transporte de xilose e a superexpressão de genes da via das pentoses são estratégias que também têm sido utilizadas. Os principais trabalhos nesse sentido estão relacionados com a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, micro-organismos bons produtores de etanol que não conseguem aproveitar as pentoses presentes no hidrolisado lignocelulósico (DIEN; COTTA; JEFFRIES, 2003).

Zhang e colaboradores (1995) mostraram que a inserção dos genes *xylAB*, *tktA* e *talA* (os dois últimos são genes que codificam as enzimas transcetolase e transaldolase da via das pentoses) tornou uma linhagem de *Zymomonas mobilis* capaz de metabolizar xilose, aumentando a eficiência da mesma na produção de etanol a partir de mistura de

¹ CHOUMAN, K. São Paulo. [s.d.].

açúcares. De acordo com esse trabalho, a linhagem selvagem foi capaz de produzir aproximadamente 12 g/l de etanol em meio contendo glicose (25 g/l) e xilose (25 g/l), enquanto a linhagem recombinante foi capaz de produzir o dobro dessa quantidade nas mesmas condições de cultivo (ZHANG et al., 1995).

Em um trabalho de revisão, a superexpressão de genes do catabolismo e transporte de xilose foi apontada como uma possível estratégia para melhorar a atividade fermentativa para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, levedura que não metaboliza xilose, e por *Pichia stipitis*, que possui a capacidade natural em utilizar esse açúcar (JEFFRIES, 2006). Em linhagens de *S. cerevisiae* foi mostrado que a inserção isolada de *xylA* (xilose isomerase) de *E. coli* não foi capaz de incrementar o consumo de xilose por essa levedura (JIN et al., 2003). Outros autores, no entanto, mostraram que linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, portando os genes *xylA* e *XKSI* (xiluloquinase de *P. stipitis*) em vetor com alto número de cópias, foi capaz de produzir etanol a partir de xilose (LÖNN et al., 2003). Segundo JEFFRIES e colaboradores (2003) a atividade de xiluloquinase parece limitar o metabolismo de xilose em *S. cerevisiae*. No entanto, o consumo desse açúcar pode ser até 35 vezes maior quando o gene da xiluloquinase é superexpresso nessa levedura associado a outros do catabolismo de xilose (*XYL1* e *XYL2*) (ELIASSON et al., 2000).

A bactéria gram-positiva *Corynebacterium glutamicum* também foi geneticamente modificada pela inserção de *xylA* de *E. coli* (sozinho ou associado com *xylB*) através de vetor com alto número de cópias (KAWAGUCHI et al., 2006). Foi observado nesse trabalho que a construção abrigando *xylAB* teve melhor desempenho no consumo de xilose que a linhagem com apenas *xylA*. Além disso, a linhagem abrigando os dois genes foi capaz de consumir simultaneamente uma mistura de glicose (5,0%) e xilose (2,5%), demonstrando ausência de crescimento diáuxico, embora ainda tenha sido observada alguma influência da glicose na taxa de consumo de xilose (KAWAGUCHI et al., 2006).

Os genes *xylA* e *xylB* também foram inseridos em linhagem de *Pseudomonas putida*, resultando em linhagem recombinante mais eficiente no consumo de xilose (MEIJINEN; WINDE; RUIJSSENAARS, 2008). De acordo com esse trabalho, a inserção de *xylAB* nessa linhagem tornou-a capaz de metabolizar arabinose e cofermentar uma mistura (1:1:1) desse açúcar com glicose e xilose.

LOPES, GOMEZ E SILVA (2009) também clonaram o gene *xylA* em

Burkholderia sacchari para avaliar se haveria incremento no consumo de xilose e na produção de poli-3-hidroxibutirato por essa linhagem. Embora esse gene tenha sido capaz de restituir a capacidade de crescimento em xilose a mutantes *xyl* desta mesma bactéria, quando transferido para a linhagem selvagem, ele não foi capaz de incrementar a capacidade de crescimento em xilose, indicando que a atividade de XylA não é o fator limitante para a utilização deste açúcar por *B. sacchari*.

De acordo com a literatura (JIN et al., 2003; KAWAGUCHI et al., 2006; LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009), a inserção de apenas *xylA* aparentemente não resultou em maiores incrementos no consumo desse açúcar, mas a inserção desse gene associado a *xylB* foi capaz de fazê-lo (KAWAGUCHI et al., 2006; MEIJINEN; WINDE; RUIJSSENAARS, 2008), sugerindo que a inserção de genes responsáveis pelo metabolismo de xilose (*xylAB*) pode ser uma estratégia eficiente para melhorar o consumo desse açúcar até mesmo na presença de glicose e arabinose. É possível também que a superexpressão de genes de transporte de carboidratos, associados ou não a genes do catabolismo de xilose, determine o fluxo desse açúcar (ELIASSON et al., 2000).

Diante do exposto, essa estratégia foi proposta no presente trabalho para a obtenção de linhagens mais eficientes quanto à capacidade de crescimento em xilose e consumo desse açúcar. As linhagens alvo, *Escherichia coli* KO11 e *Burkholderia sacchari* LFM 101, foram avaliadas quanto à produção de etanol e poli-3-hidroxibutirato, respectivamente, a partir de xilose e da mistura desse açúcar com glicose, já que esses dois açúcares representam quase 80% da composição total do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (AZIZIN, 2010). Embora essas linhagens sejam capazes de assimilar xilose para a produção dos produtos citados, a eficiência das mesmas na utilização desse açúcar ainda é significativamente mais baixa quando comparada a eficiência em glicose (GONZALEZ et al., 2002; SILVA et al., 2004; LOPES, 2010), sugerindo que ainda há considerável espaço para o melhoramento dessas linhagens nesse sentido.

3.4 Linhagens alvo

3.4.1 *Escherichia coli* KO11

Diversos trabalhos têm se dedicado à construção de novas linhagens bacterianas capazes de produzir etanol (OHTA et al., 1991; WOOD; INGRAM, 1992; YOMANO;

YORK; INGRAM, 1998; DIEN et al., 2000; KIM; INGRAM; SHANMUGAM, 2007; YOMANO et al., 2008). Uma das mais importantes construções consistiu na inserção cromossômica dos genes *pdc* e *adh* que codificam, respectivamente, as enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, as quais constituem na bactéria *Zymomonas mobilis* uma via capaz de produzir etanol e CO₂ como os únicos produtos de fermentação (OHTA et al., 1991; INGRAM et al., 1999; PETERSON; INGRAM, 2008).

Os genes de *Z. mobilis* foram combinados e colocados sob o controle de um único promotor para a construção de um operon artificial, denominado *pet* (INGRAM et al., 1987). Tal construção, realizada pelo grupo do professor Lonnie Ingram, da Universidade da Flórida, foi inicialmente introduzida em *E. coli* utilizando plasmídeos (INGRAM; CONWAY; ALTERTHUM, 1991) e posteriormente integrada ao cromossomo no *locus* do gene piruvato formato liase (*pfl*), associada ao marcador *cat*, de resistência ao cloranfenicol (JARBOE et al., 2007; PETERSON; INGRAM, 2008).

O K_m da enzima piruvato descarboxilase de *Z. mobilis* é bastante baixo quando comparado com outras enzimas que participam da redução do piruvato (figura 5), desviando efetivamente o fluxo metabólico para a via de produção de etanol (PETERSON e INGRAM, 2008). Além disso, por essa via requerer a oxidação de apenas um NADH, é possível fechar o balanço desse componente com o fluxo correndo apenas por esse caminho. Já a via usual de *E. coli* requer a oxidação de dois NADH e, portanto, é necessário também haver fluxo na via de produção de formiato e acetato para que haja NADH suficiente para fechar o balanço (STEPHANOPOULOS et al., 1998).

Essas características associadas à mutação no gene fumarato redutase (*frd*), resultou na linhagem KO11 (OHTA et al., 1991). Esse mutante, capaz de produzir etanol com rendimento acima de 100% do teórico a partir de glicose, foi selecionado em meios de cultura com concentração elevada de cloranfenicol (600 mg/L) para assegurar níveis desejáveis de expressão de *pdc* e *adh* (OHTA et al., 1991).

Yomano e colaboradores (1998) mostraram que a produtividade a partir de glicose é maior do que a partir de xilose para a produção de etanol por *E. coli* KO11. Isso ocorre possivelmente porque essa linhagem cresce aproximadamente 50 % mais rápido e produz até três vezes mais ATP de glicose do que de xilose (GONZALEZ et al., 2002).

Em outro trabalho, no qual o desempenho dessa linhagem foi comparado com outras duas (*Z. mobilis* AX101 e *S. cerevisiae* 424A), *E. coli* KO11 foi cultivada em água de maceração de milho contendo glicose (100 g/l), xilose (100 g/l) ou uma mistura 7:3 dos dois açúcares (LAU et al., 2010). Quando cultivada em glicose, essa linhagem produziu 44 g/l de etanol em 72 horas de cultivo, enquanto em xilose foi produzido concentrações similares após 160 horas de cultivo. Em hidrolisado lignocelulósico, enquanto a glicose foi consumida completamente em 72 horas, no final do cultivo ainda restava quase 85% da quantidade inicial de xilose, afetando o rendimento e a produtividade do processo de produção de etanol (LAU et al., 2010). Esses autores sugerem que o consumo de xilose presente no hidrolisado lignocelulósico por *E. coli* KO11 representa o maior gargalo, afetando a produção de etanol.

Figura 5. Conversão de hexoses e pentoses por *E. coli* KO11 em conjunção com a via de produção de etanol por *Z. mobilis*. A seta tracejada indica a via homoetanólica de *Z. mobilis*.

Fonte: PETERSON; INGRAM, 2008.

3.4.2 *Burkholderia sacchari* LFM 101

A linhagem *Burkholderia sacchari* LFM 101 (também previamente denominada IPT 101, LMG 19450 e CCT 6771) é uma bactéria Gram negativa isolada no Brasil, de solo de canavial (*Saccharum officinarum*), capaz de acumular mais de 68 % de sua massa seca celular na forma de grânulos de poli-3-hidroxibutirato (PHB) a partir de sacarose (BRÄMER et al., 2001). O poli-3-hidroxibutirato é o principal representante dos polihidroxialcanoatos (PHAs), que compõem um grupo bastante diversificado de

polímeros acumulados por grande número de bactérias (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). Segundo Brandl e colaboradores (1990), o acúmulo de grânulos de PHA ocorre de forma mais expressiva sob condições desbalanceadas de crescimento, quando há excesso de fonte de carbono e escassez de alguma fonte essencial à multiplicação da célula, como nitrogênio, fósforo, magnésio e enxofre. Na figura 6, esses grânulos intracelulares podem ser observados.

A descoberta desse grupo de polímeros é atribuída ao microbiologista Maurice Lemoigne do Instituto Pasteur de Paris que, no ano de 1923, observou a presença de poli-3-hidroxibutirato em uma bactéria do gênero *Bacillus* (LEMOIGNE, 1926). Esses polímeros apresentam propriedades termoplásticas, biodegradáveis e biocompatíveis, cuja produção e aplicabilidade vêm sendo estudadas em todo o mundo. No Brasil, o impulso para esse estudo teve início no começo da década de 90 com o projeto “Produção de plásticos biodegradáveis a partir de cana-de-açúcar, por via biotecnológica” que foi desenvolvido em cooperação pelo Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), o Centro de Tecnologia da Copersucar e o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (este associado à Universidade Federal da Paraíba) (SILVA et al., 2007).

Figura 6. Fotomicrografia eletrônica de células bacterianas contendo grânulos de polímeros biodegradáveis da família dos polihidroxialcanoatos no seu interior e estrutura química geral dos PHAs. Na estrutura química geral dos PHAs, n pode variar de 1-4. Quando R (radical) é igual a CH₃, tem-se o homopolímero PHB.

Fonte: SILVA et al., 2007.

Em razão de suas características, podem ser atribuídas a esses materiais diversas aplicações, tornando-os uma alternativa ambientalmente correta aos plásticos convencionais, de origem petroquímica, considerando-se os impactos sobre o meio-ambiente (BYROM, 1990; SUDESH et al., 2000; NONATO et al., 2001). No entanto, os custos atribuídos à produção desses biopolímeros (na ordem de US\$ 4,00/kg) ainda representa uma barreira para torná-los competitivos frente aos plásticos petroquímicos (comercializado a cerca de US\$ 1,5/kg) (PRADELLA, 2006). Nesse sentido, o desafio atual para a produção de PHA é a redução dos custos ao mesmo nível dos congêneres produzidos a partir de petróleo e, uma das estratégias para isso, é a utilização de matérias-primas de baixo custo uma vez que esta representa a maior parcela (29%) dos gastos totais (NONATO et al., 2001).

A produção de PHB integrada a usinas de cana-de-açúcar e etanol, com o emprego do bagaço como fonte de matéria-prima, tem sido apontado na literatura como uma possibilidade para a redução dos custos de produção desse biopolímero (NONATO et al., 2001). Silva e colaboradores (2004), ao realizarem experimentos de produção de PHB com a linhagem *B. sacchari* LFM 101 utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e mistura de glicose e xilose, observaram deficiência no consumo de xilose. Nesses experimentos, após 30 horas de cultivo, nem metade da quantidade inicial de xilose (10 g/l) havia sido consumida completamente, enquanto a glicose (5 g/l) foi completamente consumida com 10 horas de cultivo (SILVA et al. 2004). Em outro trabalho (LOPES et al., 2009), *B. sacchari* LFM 101 foi cultivada em glicose (15 g/l), xilose (15 g/l) e na mistura dos dois açúcares (7,5 g/l cada), constatando-se melhor desempenho em cultivo com glicose do que em xilose e na mistura dos dois açúcares.

A literatura sugere, portanto, a necessidade de melhorar o consumo de xilose por essa linhagem a fim de aumentar o rendimento e produtividade na produção de PHB por *B. sacchari* LFM 101 a partir desse açúcar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos e vetores de clonagem

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens bacterianas *Escherichia coli* KO11 (OHTA et al., 1991), *Burkholderia sacchari* LFM 101 (BRÄMER et al., 2001) e a mutante *xyl⁻ Burkholderia sacchari* LFM 536 (LOPES; GOMES; SILVA, 2009), além dos micro-organismos recombinantes derivados dessas três. O DNA genômico de *Escherichia coli* KO11 ($\Delta frd pfl::pdc_{Zm} adhB_{Zm} cat$) foi utilizado como molde para a amplificação dos genes *xylAB* e *xylFGH*. A linhagem *E. coli* XL1 Blue foi utilizada como hospedeira para o plasmídeo pGEM®-T Easy Vector System portando o fragmento *xylAB* ou *xylFGH* amplificado, enquanto *E. coli* S17-1 foi utilizada na transferência desses fragmentos por conjugação com *B. sacchari* LFM 101 e *B. sacchari* LFM 536. Essas linhagens bem como os vetores de clonagem utilizados estão listados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

Linhagens	Características	Origem/Referência
* <i>Escherichia coli</i> KO11	$\Delta frd pfl::pdc_{Zm} adhB_{Zm} cat$, Xil ⁺ , Can ^S , Amp ^S , ** Gm ^S , Cm ^R	OHTA et al., 1991
<i>Escherichia coli</i> K-12 W3110	Linhagem selvagem	Banco LFM
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101	PHA ⁺ , Xil ⁺ , Can ^S , Amp ^S , Gm ^S	Banco LFM/ BRÄMER et al., 2001
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 536	PHA ⁺ , Xil ⁻ , Can ^S , Amp ^S , Gm ^S	LOPES, GOMES e SILVA, 2009
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>lacZ</i> AM15, Tc ^R , Amp ^S	Banco LFM/BULLOCK, FERNANDEZ e SHORT, 1987
<i>Escherichia coli</i> S17-1	Linhagem com plasmídeo conjugativo RP4 integrado ao seu cromossomo, Amp ^S , Can ^S , Gm ^S	Banco LFM/SIMON et al., 1983
<i>E. coli</i> XL1 Blue pGEM::xylAB	Linhagem abrigando o vetor pGEM::xylAB	Neste trabalho
<i>E. coli</i> XL1 Blue pGEM::xylFGH	Linhagem abrigando o vetor pGEM::xylFGH	Neste trabalho
<i>E. coli</i> LFM 307	Linhagem de <i>E. coli</i> KO11 abrigando o vetor pBBR1MCS-2	Neste trabalho
<i>E. coli</i> LFM 168	Linhagem de <i>E. coli</i> KO11 abrigando o vetor pBBR1MCS-2::xylAB	Neste trabalho
<i>E. coli</i> LFM 995	Linhagem de <i>E. coli</i> KO11 abrigando o vetor pBBR1MCS-5	Neste trabalho
<i>E. coli</i> LFM 319	Linhagem de <i>E. coli</i> KO11 abrigando o vetor pBBR1MCS-5::xylFGH	Neste trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 308	Linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM 101 abrigando o vetor pBBR1MCS-2	Neste trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 147	Linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM 101 abrigando o vetor pBBR1MCS-2::xylAB	Neste trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 317	Linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM 101 abrigando o vetor pBBR1MCS-5	Neste trabalho

(continua).

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

Linhagens	Características	Origem/Referência
<i>B. sacchari</i> LFM 318	Linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM 101 abrigando o vetor pBBR1MCS-5::xylFGH	Neste trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 996	Linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM 101 abrigando os vetores vazios pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5	Neste trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 997	Linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM 101 abrigando os vetores pBBR1MCS-2::xylAB e pBBR1MCS-5::xylFGH	Neste trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 313	Linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM 536 abrigando o vetor pBBR1MCS-2	Neste trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 314	Linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM 536 abrigando o vetor pBBR1MCS-2::xylAB	Neste trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 315	Linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM 536 abrigando o vetor pBBR1MCS-5	Neste trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 316	Linhagem de <i>B. sacchari</i> LFM 536 abrigando o vetor pBBR1MCS-5::xylFGH	Neste trabalho

Siglas: *frd* – gene que codifica a enzima fumarato redutase; *pfl* – gene que codifica a enzima piruvato formato liase; *pd_{zm}* – gene que codifica a enzima piruvato descarboxilase da linhagem bacteriana *Zymomonas mobilis*; *adhB_{zm}* – gene que codifica a enzima álcool desidrogenase de *Z. mobilis*; *cat* – gene de resistência ao cloranfenicol; Xil – xilose; Amp – ampicilina; Cm – cloranfenicol; Can – canamicina; Gm – gentamicina; Tc – tetraciclina; r – resistente; s – sensível; PHA – polihidroxialcanoato; *lacZΔM15* – deleção parcial de *lacZ*, gene da enzima β-galactosidase; LFM - Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos.

* Linhagem gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Flávio Althertum

** Linhagem sensível a gentamicina apenas em concentrações ≥ 28μg/ml

(concluída).

Tabela 2. Vetores de clonagem utilizados neste trabalho.

Vetores	Características	Origem/Referência
pGEM®-T Easy Vector System	<i>Amp^R</i>	Promega Corp., Madison, USA
pBBR1MCS-2	<i>Can^R</i>	Banco LFM/ KOVACH et al., 1995
pBBR1MCS-5	<i>Gm^R</i>	Banco LFM/ KOVACH et al., 1995

Siglas: Amp – ampicilina; Can – canamicina; Gm – gentamicina; r – resistente.

Todas as linhagens foram mantidas em glicerol 20% e congeladas em freezer - 80°C, além de submetidas ao processo de liofilização e armazenadas no banco de linhagens LFM (Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos).

4.2 Meios de cultura e condições de cultivo

As linhagens de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK et al., 1989; tabela 3) e incubadas em estufa a 37 °C ou em agitador rotativo a 150 rpm e 37 °C, por 18-24h. As linhagens de *Burkholderia sacchari* também foram cultivadas em LB sob as mesmas condições, mas sob temperatura de 30 °C. Para os experimentos de crescimento e produção, as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio M9 (SAMBROOK et al., 1989; tabela 3) e NBS (MARTINEZ et al., 2007; tabela

3), respectivamente, enquanto as linhagens de *B. sacchari* foram cultivadas em meio mineral. Aos meios NBS e M9 foi adicionado extrato de levedura (0,1 g/l). O pH inicial desses meios foi ajustado para 7,0.

Tabela 3. Composição dos meios de cultura.

Componentes	Meio LB (SAMBROOK et al., 1989)	Meio mineral (RAMSAY et al., 2001)	*Meio M9 (SAMBROOK et al., 1989)	*Meio NBS (MARTINEZ et al., 2007)
Complexos (g/L)				
Tripton	10 g/L	-----	-----	-----
Extrato de levedura	5 g/L	-----	0,1 g/L	0,1 g/L
NaCl	5 g/L	-----	-----	-----
Definidos quimicamente (mmol/L)				
Na ₂ HPO ₄	-----	24,65 mmol/L	42,2 mmol/L	28,71 mmol/L
KH ₂ PO ₄	-----	11 mmol/L	22,0 mmol/L	25,72 mmol/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	-----	7,56 mmol/L	-----	-----
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-----	-----	-----	26,5 mmol/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	-----	10 mmol/L	0,001mmol/L	0,1 mmol/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	-----	20 mmol/L	0,001mmol/L	1,0 mmol/L
NH ₄ Cl	-----	-----	18,69 mmol/L	18,69 mmol/L
Definidos quimicamente (μmol/L)				
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-----	0,35 x 10 ³ μmol/L	-----	1,47 μmol/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	-----	0,24 x 10 ³ μmol/L	-----	-----
NaMoO ₄ .2H ₂ O	-----	0,14 x 10 ³ μmol/L	-----	0,83 μmol/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	-----	0,13 x 10 ³ μmol/L	-----	-----
CuSO ₄ .5H ₂ O	-----	0,04 x 10 ³ μmol/L	-----	0,59 μmol/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	-----	0,84 x 10 ³ μmol/L	-----	0,84 μmol/L
H ₃ BO ₃	-----	4,85 x 10 ³ μmol/L	-----	0,81 μmol/L
Citrato férrico amoniacal 6%	-----	4,7 x 10 ⁵ μmol/L	-----	4,7 x 10 ⁵ μmol/L

* meios de cultura com algumas modificações em sua composição com relação a composição original.

Antibióticos foram utilizados quando necessário para a seleção de linhagens portando a construção de interesse. O antibiótico ampicilina (concentração no meio igual a 100 μg/mL) foi utilizado para selecionar *E. coli* XL1 Blue contendo o plasmídeo pGEMxylAB ou pGEMxylFGH. Os antibióticos canamicina e gentamicina também foram utilizados, nas concentrações de 50 μg/mL e 15 μg/mL (FIEDLER; STEINBÜCHEL; REHM, 2002), respectivamente, para a seleção de linhagens de *E. coli* e *B. sacchari* contendo os plasmídeos pBBR1MCS-2 (*Can^R*) e pBBR1MCS-5 (*Gm^R*). Para as linhagens de *E. coli* abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-5, no entanto, foi necessário dobrar a concentração de gentamicina no meio de cultura para 30 μg/ml, uma vez que a linhagem parental mostrou-se resistente a esse antibiótico em concentrações < 28 μg/ml.

Os meios de cultura sólidos foram obtidos pela adição de 15-20g/L de agar às composições citadas. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C. O mesmo foi feito com as soluções de açúcar, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio e extrato de levedura, as quais foram esterilizadas a parte. Os antibióticos foram esterilizados por filtração (filtro Millipore, 0,22 µm).

4.3 Métodos de manipulação de DNA

4.3.1 Extração de DNA genômico e plasmidial

Para a amplificação dos genes *xylAB* e *xylFGH*, foi necessária a extração de DNA genômico a partir de um cultivo de *Escherichia coli* KO11, a qual foi feita utilizando-se o kit Dneasy Blood & Tissue da Quiagen (número do catálogo: 69504), conforme instruções do fabricante. Para a utilização dos vetores de clonagem pBBR1MCS-2 (anexo A-I) e pBBR1MCS-5 (anexo A-II), estes foram extraídos de um cultivo de *E. coli* XL1 Blue em LB com canamicina (LBK) e em LB com gentamicina (LBG), respectivamente, utilizando-se para isso o kit de extração de DNA plasmidial QIAprep® Spin Miniprep da Qiagen (número do catálogo: 27104) ou o método de BIRNBOIM e DOLY (1979) modificado. Esses vetores, após a extração, foram submetidos ao processo de desfosforilação, utilizando-se para este fim uma fosfatase alcalina (Promega Corporation, Madison, EUA).

4.3.2 Construção dos iniciadores

O desenho dos iniciadores foi feito a partir de sequências descritas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Do genoma da linhagem *Escherichia coli* K12 MG1655 foram obtidas as sequências referentes aos genes *xylAB* (2.851 pb) e *xylFGH* (3.772 pb), bem como regiões a jusante (*downstream*) e a montante (*upstream*) destas. Sequências homólogas foram encontradas no genoma de *E. coli* KO11 (número de acesso: CP002516). Essas sequências foram alinhadas no *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do NCBI e analisadas *in silico*, utilizando-se para isso o programa FastPCR®. Com esse programa foi possível saber quais sítios de restrição estavam presentes e obter sequências de iniciadores possíveis. Escolhidos os iniciadores *forward* e *reverse* a serem trabalhados, sítios de restrição foram inseridos em suas extremidades (tabela 4).

Tabela 4. Iniciadores construídos para a amplificação de genes *xyl*. Os sítios de restrição estão sublinhados e especificados na tabela.

Iniciadores construídos	Sítio de restrição	Denominação
1 – [5'- <u>GAGCTCT</u> TATCCCCACCCGGTCAGGCAG-3']	<i>SacI</i>	<i>xylAB forward</i>
2 – [5'- <u>GGTACCA</u> TCCATCACCCGCGGCATTAC-3']	<i>KpnI</i>	<i>xylAB reverse</i>
3 – [5'- <u>GTCGACT</u> TACAGAAGGCCCTACACC-3']	<i>Sall</i>	<i>xylFGH forward</i>
4 – [5'- <u>GGATCCG</u> GTAATACGTAACCGGCTTTGAG-3']	<i>BamHI</i>	<i>xylFGH reverse</i>

4.3.3 Amplificação dos genes *xylAB* e *xylFGH*

Os genes *xylAB* e *xylFGH* foram obtidos através de amplificação utilizando a técnica de PCR com os iniciadores específicos construídos como demonstrado no item anterior. Essa amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®), utilizando-se a enzima Platinum® *Taq* DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen). Esta enzima, além da atividade de polimerização de DNA, possui a habilidade de revisar as sequências de bases recém-preenchidas na fita de DNA, através de sua atividade de exonuclease (Manual Platinum® *Taq* DNA Polimerase High Fidelity, Invitrogen). A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições, para um volume final de 50µl:

<i>Taq</i> DNA Polimerase High Fidelity	0,2 µL
Tampão <i>Taq</i> DNA Polimerase High Fidelity (10x)	5,0 µL
Sulfato de magnésio (50mM)	2,0 µL
dNTP (10mM)	1,0 µL
Primer <i>Forward</i>	1,0 µL
Primer <i>Reverse</i>	1,0 µL
DNA genômico (<i>E. coli</i> KO11)	1,0 µL
Água livre de nuclease	38,8 µL

As reações de amplificação foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 2 minutos, seguidas de subseqüentes ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 58 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 3 minutos. Esse ciclo foi repetido 35 vezes. Os amplicons foram purificados utilizando-se para isso o kit PCR Purification da Qiagen, conforme as instruções descritas pelo fabricante (número do catálogo: 28104).

4.3.4 Clonagem

Os amplicons *xylAB* e *xylFGH* foram primeiramente ligados ao vetor *pGEM* (pGEM[®]-T Easy Vector, Promega Corporation) por uma T4 DNA ligase, incubados 18-24 horas em banho-maria a 14 °C e inseridos em *E. coli* XL1-Blue por transformação (SAMBROOK et al., 1989). A seleção dos clones foi feita pela adição de IPTG (isopropil-tio- β -D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) em meio LB sólido com ampicilina (LBA). Os plasmídeos foram então extraídos dos transformantes, digeridos com o par de enzimas de restrição (*SacI/KpnI* e *Sall/BamHI*) já mencionados (tabela 4) e as amostras foram analisadas em gel de agarose (0,8% m/v). O kit Qiaquick Gel Extraction da marca Qiagen (número do catálogo: 28704) foi utilizado quando a extração de DNA a partir do gel de agarose foi necessária.

Confirmada a inserção de *xylAB* ou *xylFGH* no pGEM T-Easy, esses amplicons foram ligados nos plasmídeos pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5, respectivamente (anexo B). A ligação foi feita utilizando a enzima T4 DNA Ligase, de acordo com o protocolo do fabricante (T4 DNA Ligase Blue/White cloning qualified, Promega, Madison, EUA). A concentração de DNA das amostras foi analisada com o aparelho NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare). As construções e os plasmídeos sem inserto foram primeiramente transferidos por transformação para *E. coli* XL1 Blue, extraídos e digeridos com o par de enzimas de restrição e analisados em gel de agarose (0,8% m/v). Posteriormente, cada plasmídeo (com e sem inserto) foi transferido por transformação para *E. coli* KO11 e *E. coli* S17-1 e os clones transformantes foram selecionados em meio LB contendo o antibiótico apropriado.

Esses mesmos plasmídeos também foram transferidos para *B. sacchari* LFM101, por conjugação. Para isso, essa linhagem foi inoculada em meio LB e cultivada por 24h a 30 °C e 150 rpm, enquanto as linhagens de *E. coli* S17-1 (abrigando os vetores com e sem inserto) foram cultivadas em LB sólido e incubadas em estufa 37 °C. No dia seguinte, as células de *B. sacchari* foram lavadas duas vezes com solução NaCl (0,85% m/v) e 200 μ L do inóculo resultante foi espalhado com alça de drigalski em meio sólido contendo meio mineral com glicose (MMG) e o antibiótico de interesse. Colônias isoladas das linhagens de *E. coli* S17-1 foram semeadas em MMG sem antibiótico para confirmar ausência de crescimento nesse meio e foram semeadas sobre as culturas de *B. sacchari* LFM 101 em placas de MMG com antibiótico. As culturas foram incubadas

em estufa 30 °C por 48h e, após esse período, foi pesquisado o aparecimento de clones de *B. sacchari* LFM 101 em MMG com antibiótico.

Os produtos *xylAB* e *xylFGH* foram amplificados dos plasmídeos pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5, respectivamente, utilizando-se para isso os iniciadores desses genes. As amostras purificadas foram encaminhadas para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, conforme o protocolo descrito no site da instituição (<http://genoma.ib.usp.br/>).

4.3.5 Eletroforese em gel de agarose

Todas as clonagens foram confirmadas através da análise do perfil eletroforético das amostras de DNA por eletroforese em gel de agarose, utilizando-se agarose na concentração 0,8% (m/v) e solução TAE 0,5% (m/v) como tampão de corrida (SAMBROOK et al., 1989). A eletroforese foi realizada nas seguintes condições: 90 V (voltagem), 110 mA (amperagem) e 90 W (potência) por 60 minutos. Os fragmentos de DNA foram corados em brometo de etídeo (0,1mg/ 100mL de TAE) por 20 minutos e visualizados sob luz UV ($\lambda=254$ nm) em transiluminador MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP).

4.4 Análise de crescimento em xilose e em mistura de glicose e xilose

Linhagens recombinantes de *E. coli* KO11 e *B. sacchari* LFM 101 foram pré cultivadas em LB, lavadas com solução NaCl (0,85% m/v) e cultivadas em meio M9 (SAMBROOK et al., 1989; tabela 3) com extrato de levedura (0,1 g/l) e em meio mineral (RAMSAY et al., 1990; tabela 3), respectivamente. A esses meios de cultura foram adicionados glicose (2 g/L) e xilose (2 g/L) ou apenas xilose (2 g/L), além de IPTG (1,5 mM) e antibiótico canamicina (50 µg/ml) ou gentamicina (30 µg/ml para as linhagens de *E. coli* e 15 µg/ml para as linhagens de *B. sacchari*). O volume de inóculo foi calculado de forma que todos os cultivos iniciassem o crescimento com DO₆₁₀ (densidade óptica com $\lambda = 610$ nm) igual a 0,1.

Dessa forma, foi construída uma curva de crescimento em meio com glicose e xilose e outra em meio com apenas xilose para cada uma dessas linhagens. Para isso, das linhagens provenientes de *E. coli* KO11 foram retirados 2 mL de cada amostra a cada hora nas primeiras 6 horas e a cada duas horas após esse período até completar 12 horas de amostragem. Enquanto isso, das linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM

101, foram coletados 2 ml de amostra a cada 2 horas desde o tempo inicial (0) até completar 20 horas de cultivo (anexo C). Para cada amostra foi medido a densidade celular por espectrofotômetro (Varian Cary 50 UV-visible spectrophotometer, Agilent Technology) e, após centrifugação (4°C, 11.000 rpm, 8 min) e obtenção do sobrenadante, este foi congelado para a dosagem de açúcares.

Todos esses experimentos foram feitos em duplicata e os açúcares foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os valores de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram calculados a partir dos valores de Ln da absorbância medidos ao longo do cultivo (DO_{610}), de acordo com Pirt (1975).

4.5 Análise de produção de etanol e poli-3-hidroxibutirato a partir de xilose e de glicose e xilose

Nesses experimentos foi adicionado xilose (15 g/l) ou glicose e xilose (15 g/l, cada). Para a produção de etanol, as linhagens de *E. coli* foram pré-cultivadas em LB, lavadas mais uma vez em solução NaCl (0,85% m/v) e inoculadas em meio NBS modificado (Martinez et al., 2007; tabela 3), contendo o antibiótico canamicina ou gentamicina nas concentrações adequadas (50 $\mu\text{g/ml}$ e 30 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente), extrato de levedura (0,1 g/l) e IPTG (1,5 mM), com DO_{610} inicial igual a 0,1. O cultivo foi feito sob limitação de oxigênio: menor agitação (100 rpm) e utilização de frascos de 500 mL contendo 350 mL (70% do volume do frasco) preenchido com meio (BEALL; OHTA; INGRAM, 1991); cada frasco foi vedado com rolha de borracha contendo uma agulha para a saída de CO_2 e outra agulha, conectada a uma mangueira de silicone, para a retirada das amostras (TAKAHASHI et al., 2000). Para evitar contaminação, as mangueiras de silicone foram conectadas a filtros de ar.

Para análise de produção foram retiradas duas amostras de cada frasco no início do experimento (20 mL cada) e o mesmo foi feito após 12h, 24h, 48h e 72h de cultivo. Essas amostras foram centrifugadas (8.000 rpm, 4 °C, 10 min) e foi dosado o pH do meio. O precipitado foi congelado e liofilizado para medição de massa seca celular (g/l), enquanto o sobrenadante foi congelado em freezer – 20 °C para dosagem de açúcares, ácidos (ácido acético, ácido lático, ácido succínico, ácido fórmico e ácido pirúvico) e etanol.

Para analisar a produção de poli-3-hidroxibutirato (PHB), o mesmo foi feito para as linhagens de *B. sacchari*, que foram cultivadas em meio mineral com adição de 1,5 g/l de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, antibiótico (canamicina ou gentamicina, este último com concentração final de 15 µg/ml) e IPTG (1,5 mM). Foram retiradas duas amostras de 10 mL de cada frasco no início do cultivo e após 24, 48 e 72 horas. Estas foram centrifugadas (8.000 rpm, 4 °C, 10 min), com parte do sobrenadante foi dosado o pH e o restante foi congelado (-20 °C) para posterior dosagem de açúcares (HPLC). O precipitado foi congelado, liofilizado e pesado em balança analítica para obtenção da massa seca celular (g/L). Com a massa seca celular foi realizado um procedimento necessário para a dosagem de propil-ésteres em cromatógrafo gasoso (RIIS; MAI, 1988). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.6 Clonagem e análise das construções em mutante *xyl* de *Burkholderia sacchari* LFM 101

As construções pBBR1MCS-2::*xylAB* e pBBR1MCS-5::*xylFGH*, assim como os respectivos plasmídeos sem inserto, também foram inseridos no mutante *B. sacchari* LFM 536 (LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009), proveniente da linhagem LFM 101 e deficiente no crescimento em xilose. As novas linhagens foram obtidas pela conjugação de *B. sacchari* LFM 536 com as linhagens provenientes de *E. coli* S17-1 abrigando esses plasmídeos. Essas linhagens foram avaliadas quanto ao consumo de xilose e produção de poli-3-hidroxibutirato, conforme descrito nos itens 5.4 e 5.5, respectivamente.

4.7 Análise de crescimento em xilose com diferentes concentrações de IPTG

Nesse experimento, as linhagens de *Escherichia coli* (LFM 307, 168, 995 e 319) e *Burkholderia sacchari* (LFM 308, 147, 317 e 318; ver tabela 1) foram cultivadas, conforme já descrito, em meio M9 ou meio mineral, respectivamente, com adição de xilose (2 g/l) e IPTG nas seguintes concentrações: 3,0 mM, 4,5 mM e 6,0 mM.

Foi construída uma curva de crescimento em xilose para cada linhagem nas diferentes concentrações de IPTG (anexo C). Para isso, foram coletados 2 mL de cada amostra a cada hora nas primeiras 6 horas e a cada duas horas após esse período até completar 10 horas de amostragem (linhagens de *E. coli*) ou 2 mL de cada amostra a cada 2 horas durante 18 horas (linhagens de *B. sacchari*).

Para cada amostra foi medida a densidade celular por espectrofotometria (DO_{610}). Em seguida, estas foram centrifugadas (4 °C, 11.000 rpm, 8 min) e seus sobrenadantes foram congelados em freezer -20°C para a determinação de xilose por HPLC.

4.8 Metodologias analíticas

4.8.1 Determinação do pH

O sobrenadante resultante do cultivo de cada isolado foi separado das células por centrifugação e posteriormente determinado o pH em um potenciômetro (Tecnal – TEC-2), previamente calibrado utilizando soluções padrões de pH 4,1 e 7,0.

4.8.2 Concentração de Biomassa (Massa Seca Celular)

Amostras das culturas foram centrifugadas (8.000 rpm, 4 °C, 10 minutos), lavadas duas vezes com uma solução de NaCl (0,85% m/v) e submetidas a liofilização. Após secagem a massa das amostras foi medida e a concentração da massa seca celular (g/L) foi determinada.

4.8.3 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos

A concentração de açúcares e ácidos orgânicos (ácido acético, ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico e ácido pirúvico) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*). Previamente, cada amostra foi diluída para uma concentração entre 0,5 e 2 g/L, filtrada através de membrana de poro 0,45 µm (Millipore) e injetada em cromatógrafo líquido Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com detector por Índice de Refração (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 35 °C, coluna HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 45 °C, fase móvel de H₂SO₄ (5 mM) com fluxo de 0,6 mL/min. e volume de injeção de 20 µL. Soluções de glicose, xilose e ácidos orgânicos (10 g/l cada) foram preparadas nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 e 2,0 g/l e utilizadas como padrão para elaboração da curva de calibração.

4.8.4 Determinação de etanol

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa (CG) em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com uma coluna HP-FFAP (30 m, 0,53 mm,

1,33 μm), com fracionamento da amostra 5:1 e volume de injeção de 0,2 μL . O etanol foi detectado por meio de ionização de chama. As temperaturas do injetor e detector (FID) foram 250 °C e 300 °C, respectivamente. Foi empregado um programa de temperatura da coluna que consistiu em 60 °C por 5 minutos, aumentando até 85 °C, com uma vazão de 10 °C/ min. O gás de arraste empregado foi hélio a uma vazão de 3,0 mL/ min. Solução de η -propanol (4 g/l) foi utilizada como padrão interno, sendo misturada com cada amostra na proporção 5:1 (v/v). Soluções de etanol e η -propanol (10 g/l cada) foram preparadas nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 e 2,0 g/l e utilizadas como padrão para elaboração da curva de calibração.

4.8.5 Determinação de PHB

A quantidade de poli-3-hidroxibutirato (PHB) foi determinada por cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RIIS; MAI, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 μL de uma solução de ácido benzóico em propanol (40 mg/ mL), a qual foi utilizada como padrão interno. Os tubos foram agitados e mantidos em banho com água a 100 °C por 3 horas. Ao final do tempo de incubação as fases aquosa e orgânica foram separadas utilizando-se água destilada (4 mL). Esta foi retirada e, na mistura restante, foi adicionado sulfato de sódio anidro para absorção de água remanescente na fase contendo os propil-ésteres. A fase orgânica foi transferida para frascos adequados para cromatógrafo e o volume de 1 μL foi analisado após fracionamento da amostra (*split* 1:20) em cromatógrafo gasoso Agilent 7890A equipado com uma coluna HP-5 (5% difenil-95% dimetil-polisiloxane, comprimento 30 m, diâmetro 320 mm, espessura do filme 0,25 μm). Os propil-ésteres foram detectados por meio de ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor e detector foram 250 °C e 300 °C, respectivamente. Empregou-se um programa de temperatura da coluna para separar os propil-ésteres, que consistiu em 100 °C por 1 minuto, aumentando até 180 °C a uma razão de 8 °C/ min e 180 °C por 15 minutos. O gás de arraste empregado foi hélio a uma vazão de 0,8 mL/ min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção dos iniciadores e amplificação dos genes *xylAB* e *xylFGH*

Para a obtenção de linhagens de *Escherichia coli* KO11, produtora de etanol, e de *Burkholderia sacchari*, produtora de PHB (poli-3-hidroxibutirato), capazes de metabolizar com mais eficiência a xilose, foi necessário obter conhecimento sobre a estrutura e organização dos genes *xyl*, responsáveis pelo metabolismo (*xylA* e *xylB*) e transporte (*xylF*, *xylG* e *xylH*) dessa pentose.

Em *E. coli* esses genes estão organizados em dois operons, *xylAB* e *xylFGH*, que estão próximos no genoma e orientados em direção oposta. Essa organização foi primeiramente descrita por Song e Park (1997) para a linhagem *Escherichia coli* K12 W3110, mas também é observada em outras linhagens dessa espécie, que estão registradas na página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, acesso em 10/01/2012), como mostra a figura 7.

Figura 7. Organização dos genes *xyl*, região promotora e sítios de restrição em *Escherichia coli* KO11. Os genes *xylAB* estão coloridos de azul e com listras transversais. Os genes *xylFGH* apresentam-se com coloração verde e listras horizontais. O gene *xylR* está envolvido na regulação transcricional dos genes *xyl*. As setas abaixo do diagrama indicam o sentido de transcrição desses genes. P_A = promotor de *xylAB*, P_F = promotor de *xylFGH* e P_R = promotor de *xylR*. Em destaque, alguns sítios de restrição apontados na análise das sequências no programa FastPCR®.

Espécies do gênero *Burkholderia* apresentam uma organização de genes *xyl* diferente daquela encontrada em *E. coli*. Em *B. cenocepacia* J2315 os genes *xylA* e *xylFGH* estão adjacentes e orientados na mesma direção, enquanto o gene *xylB* está localizado em outra região do cromossomo. Em *B. multivorans* ATCC 17616 a organização é muito semelhante, mas são encontradas duas cópias do gene *xylB*. Um deles é adjacente a *xylA*, formando um provável operon *xylABFGH*, o outro encontra-se em outra região do genoma. Nessas bactérias, o gene *xylR* encontra-se adjacente a *xylA*, mas em direção oposta a este (anexo D). Um estudo recentemente realizado em nosso laboratório (PEREIRA et al., [s.d.], em elaboração) demonstrou que genes de PHA sintase de *Burkholderia* spp., enzima-chave para a biossíntese de PHA, podem ser classificados em grupos. *B. sacchari* mostrou maior similaridade com genes

encontrados em *B. phymatum*, *B. xenovorans* e *B. phytofirmans*. Dessa forma, as sequências dos genes *xyl* em *B. cenocepacia* J2315 foram utilizadas para detecção de genes ortólogos em genomas das linhagens *B. phymatum* STM815, *B. phytofirmans* PsJN e *B. xenovorans* LB400. Genes *xyl* nessas três linhagens de *Burkholderia* apresentaram sequência de nucleotídeos com 80-90% de identidade quando comparados aos ortólogos em *B. cenocepacia* J2315 e em outras linhagens de *Burkholderia spp.* Nessas três linhagens, os genes *xyl* encontram-se organizados da mesma forma que em *B. cenocepacia* J2315 (Anexo D). A sequência de *xylA* de *B. sacchari* LFM 101, disponível no banco de dados do NCBI número de acesso FJ374785 (LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009), apresentou 85% de identidade com o ortólogo em *B. cenocepacia* J2315. Como a sequência do genoma de *B. sacchari* ainda não está disponível, supõe-se que os genes *xyl* devem estar organizados como em *B. cenocepacia* J2315.

Neste trabalho, os genes *xylAB* e *xylFGH* seriam amplificados a partir do genoma de *E. coli* KO11, linhagem cedida pelo Prof. Dr. Flávio Alterthum (Universidade de São Paulo, Brasil). Entretanto, no momento em que o trabalho estava sendo realizado, embora toda sequência do genoma estivesse disponível, os genes ainda não haviam sido anotados. Dessa forma, utilizando a sequência dos genes *xyl* de *E. coli* K12 MG1655 foram localizados os genes ortólogos em *E. coli* KO11. A comparação da sequência de nucleotídeos destes genes com seus ortólogos em *E. coli* KO11 demonstrou 99-100% de identidade (anexo E). A posição dos genes no genoma demonstrou a mesma organização constituindo dois operons: *xylAB* e *xylFGH*. A Tabela 5 apresenta a localização de cada um dos genes *xyl* no genoma de *E. coli* KO11, bem como o tamanho dos genes e seus respectivos produtos.

Tabela 5. Características das sequências de *xylA-H* de *Escherichia coli* KO11 quanto a posição destas no genoma, tamanho do gene, descrição e tamanho da proteína.

Genes	Posição no genoma	Tamanho do gene (pb)	Descrição	Tamanho da proteína (aa)
<i>xylA</i>	172771..174093	1323	Xilose isomerase – reação de isomerização: D-xilose → D-xilulose	440
<i>xylB</i>	174165..175619	1455	Xiluloquinase – fosforilação de D-xilulose: D-xilulose → Xilulose-5 fosfato	484
<i>xylF</i>	171413..172405	993	Componente periplasmático de alta afinidade com D-xilose	330
<i>xylG</i>	169794..171335	1542	Proteína de ligação ao ATP	513
<i>xylH</i>	168635..169816	1182	Componente de membrana do sistema de transporte ABC*	393

*Sistema de transporte ATP-binding cassette. Siglas: pb – pares de bases; aa – aminoácidos.

Sequências das regiões do genoma contendo os genes *xylAB* e *xylFGH* de *E. coli* KO11 foram então analisadas no programa FastPCR[®]. Essa análise gerou uma lista de pequenas sequências, que poderiam ser utilizadas como iniciadores para a amplificação de *xylAB* ou *xylFGH*. Foram escolhidas aquelas que se encontravam mais próximas do gene de interesse. Na extremidade de cada uma das sequências foram inseridos os sítios de restrição das enzimas *KpnI* e *SacI* (iniciadores para *xylAB*) e das enzimas *Sall* e *BamHI* (iniciadores para *xylFGH*). Esses sítios de restrição foram escolhidos por não estarem presentes dentro da sequência de *xylAB* e *xylFGH* (figura 7) e por serem encontrados no sítio de múltipla clonagem dos vetores pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5, que seriam utilizados para a expressão dos respectivos genes.

A escolha dos sítios de restrição também foi importante para determinar em qual orientação esses genes seriam inseridos nos vetores pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5, pois era de interesse cloná-los sem as suas respectivas regiões promotoras originais, P_A e P_F (figura 8). Duas razões nortearam essa escolha: (1) a ativação desses promotores depende do produto de *xylR* (SONG; PARK, 1997), gene responsável pela regulação de *xylAB* e *xylFGH* e que não seria inserido nas linhagens alvo. (2) O papel de ativador conferido a *xylR* restringe-se a espécies de *Escherichia coli* (SONG; PARK, 1997) e a *Salmonella typhimurium* (SHAMANNA; SANDERSON, 1979), de forma que não foi encontrado na literatura que papel (ativador ou repressor) é conferido a esse gene em linhagens de *Burkholderia spp.* Não seria interessante, portanto, clonar um repressor junto com os genes *xyl* nas linhagens de *B. sacchari*, já que o objetivo principal deste trabalho é aumentar a metabolização de xilose. Assim, a clonagem dos genes-alvo nos vetores pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5, respectivamente, ocorreu de forma que *xylAB* e *xylFGH* ficassem sob o controle do promotor *lac* (anexo F), que está presente nesses plasmídeos.

A partir do genoma de *Escherichia coli* KO11 e utilizando os iniciadores obtidos neste trabalho, fragmentos de DNA de 2,9 kb e 3,8 kb foram amplificados. A análise do perfil eletroforético em gel de agarose (0,8% m/v) das amostras amplificadas por PCR mostrou bandas de tamanho esperado (figura 9).

Figura 8. Sequência de nucleotídeos referente à região promotora dos genes *xyl*. Os iniciadores *forward* para *xylAB* e *xylFGH* e sítios de restrição *KpnI* e *Sall* estão em destaque. As regiões consenso dos promotores P_A e P_F estão sublinhadas. As setas indicam o sentido de transcrição.

Figura 9. Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8% m/v) mostrando os amplicons *xylAB* e *xylFGH*. M= marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com *HindIII*; 1= amplicon *xylAB* (2,9 kb); 2= amplicon *xylFGH* (3,8 kb).

5.2. Clonagem

Para a construção das linhagens recombinantes, cada amplicon foi ligado ao vetor pGEM T-Easy (amp^R) empregando-se a enzima T4 DNA ligase e a construção foi inserida em *E. coli* XL1-Blue por transformação. O pGEM é um vetor que possui o seu sítio de múltipla clonagem inserido no meio do gene *LacZ*, dentro da região codificadora do α -peptídeo da enzima β -galactosidase (pGEM® T-Easy Vector System, Promega). Através da capacidade de α -complementação, essa linhagem de *E. coli*

consegue complementar o gene da β -galactosidase, que é expresso nos clones sem o inserto (SAMBROOK, et al., 1989). A presença do inserto, entretanto, interrompe o gene tornando-o inativo. Essas características são evidenciadas em LB sólido após adição de IPTG e X-Gal. O IPTG induz a expressão do gene da β -galactosidase, enquanto X-Gal é o substrato para essa enzima (SAMBROOK, et al., 1989). A ocorrência de reação resulta em colônias de coloração azul, o que significa ausência do inserto. A presença deste, no entanto, impede a expressão do gene da β -galactosidase de forma que a reação não ocorre, resultando em colônias brancas (SAMBROOK, et al., 1989). Dessa forma, foi possível selecionar linhagens portando os genes *xyAB* e *xyFGH*.

A inserção de cada amplicon no vetor pGEM T-Easy (amp^R) deu origem as linhagens *E. coli* XL1-Blue pGEM::*xyAB* e *E. coli* XL1-Blue pGEM::*xyFGH* (anexo B). A digestão desses plasmídeos com os respectivos pares de enzimas de restrição (*KpnI/SacI* e *Sall/BamHI*) gerou fragmentos de DNA que puderam ser observados em gel de agarose (0,8% m/v). A análise do perfil eletroforético da amostra com *xyFGH* mostrou bandas de 3,0 kb e 3,8 kb, indicando a presença desse fragmento no vetor pGEM T-Easy (figura 10 A). No entanto, para *xyAB* não foi possível a princípio obter um perfil eletroforético com bandas separadas, em razão desse fragmento e o vetor em questão terem tamanho praticamente iguais (2,9 e 3,0 kb, respectivamente). Por isso, para confirmar a inserção de *xyAB* no pGEM, foi utilizado outro sítio de restrição (*AatII*), que está presente no sítio de múltipla clonagem desse vetor, no gene *xyIB* e no gene *xyIH*. Dessa vez, o perfil eletroforético para *xyAB* mostrou bandas separadas, em um padrão esperado (figura 10 B), indicando a inserção desse gene em orientação contrária ao promotor *lac* e de *xyFGH* no mesmo sentido deste (figura 11).

A amostra pGEM::*xyAB* digerida com o par de enzimas *SacI/KpnI* foi utilizada na reação de ligação com o vetor pBBR1MCS-2. O mesmo foi feito com a amostra pGEM::*xyFGH*, que foi digerida com o par de enzimas *Sall/BamHI*, para ligação de *xyFGH* no vetor pBBR1MCS-5. A inserção de cada amplicon nos vetores pBBR1MCS deu origem as linhagens *E. coli* XL1-Blue pBBR1MCS-2::*xyAB* e *E. coli* XL1-Blue pBBR1MCS-5::*xyFGH* (anexo B). Os plasmídeos sem inserto também foram inseridos por transformação nessa linhagem de *E. coli*, resultando nas linhagens *E. coli* XL1-Blue pBBR1MCS-2 e *E. coli* XL1-Blue pBBR1MCS-5.

Figura 10. A) Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8% m/v) da amostra pGEM::*xylFGH* extraída de *E. coli* XL1-Blue e digerida com *BamHI/SalI*. 1- produto de PCR de *xylFGH* com 3,8 kb (controle); 2- pGEM::*xylFGH* digerido e 3- duplicata da reação 2. M= marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com *HindIII*. B) Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8% m/v) das amostras pGEM::*xylAB* e pGEM::*xylFGH* extraídas de *E. coli* XL1-Blue e digeridas com a enzima *AatII*. 1-pGEM::*xylAB*; 2- duplicata da reação 1; 3- pGEM::*xylFGH*; 4-duplicata da reação 3. M= marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com *HindIII*.

Figura 11. Organização dos genes *xylAB* e *xylFGH* inseridos no vetor pGEM T-Easy. As setas apontam os sítios de restrição para a enzima *AatII*. As letras A-E representam o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão com essa enzima. A = 206 pb; B = 2.035 pb; C = 3.709 pb; D = 959 pb; E = 5.897 pb.

A quantificação das amostras pGEM::*xylAB* (digerido) e pBBR1MCS-2 (digerido e desfosforilado) resultou em 2.239,9 ng/μL e 783,6 ng/μL de DNA, respectivamente. Com essas amostras foram feitas ligações com proporções inserto:plasmídeo (mol/mol) iguais a 3:1, 5:1 e 10:1, as quais foram utilizadas para a transformação de *E. coli* XL1 Blue. As duas últimas resultaram em colônias brancas em meio LB com canamicina, onde foram selecionados 5 possíveis portadores do inserto.

O padrão de bandas em gel de agarose (0,8% m/v) mostrou a presença do fragmento *xylAB* em 4 amostras do total analisado, dentre as quais a amostra 3 (figura 12A) apresentou maior concentração de DNA (4.985,8 ng/μL). Essa amostra teve o fragmento *xylAB* amplificado e enviado para sequenciamento. O resultado mostrou 98-100% de identidade da sequência alvo com os genes *xylA* e *xylB* de linhagens de *E. coli* (anexo G).

Quanto a amostra pGEM::*xylFGH*, o fragmento *xylFGH* foi extraído do gel resultando em uma amostra com 54,0 ng/μL de DNA. Esta foi colocada em reação com 180 ng/μL de pBBR1MCS-5 numa proporção inserto:plasmídeo de 3:1 (mol/mol). O resultado da inserção de *xylFGH* em pBBR1MCS-5 foi observado em gel de agarose 0,8% (m/v) após extração plasmidial e digestão com o par de enzimas *Sall/BamHI* (figura 12 B). O inserto foi então amplificado e o resultado obtido com um dos iniciadores (*forward*) mostrou identidade de aproximadamente 70% com o gene *xylF* de outras linhagens de *E. coli* (anexo G). As construções pBBR1MCS-2::*xylAB* e pBBR1MCS-5::*xylFGH* estão esquematizadas na figura 13.

Figura 12. A) Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% (m/v) de pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-2::*xylAB* extraídos de *E. coli* XL1 Blue e digeridos com *KpnI/SacI*. 1 e 4-pBBR1MCS-2 digerido (5.228 pb); 2- produto de PCR *xylAB* (2.933 pb); 3 - pBBR1MCS2::*xylAB* digerido; M= marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com *HindIII*. B) Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% (m/v) de pBBR1MCS-5 e pBBR1MCS-5::*xylFGH* extraídos de *E. coli* XL1 Blue e digeridos com *Sall/BamHI*. 1- pBBR1MCS-5::*xylFGH* não digerido (8.568 pb); 2- pBBR1MCS-5 digerido (4.768 pb); 3- pBBR1MCS-5::*xylFGH* digerido (*xylFGH*: 3.834 pb). M = marcador de peso molecular *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas).

Figura 13. Organização dos genes *xylAB* e *xylFGH* inseridos, respectivamente, nos vetores pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5. As setas indicam os sítios de restrição. As letras A-B representam o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão de pBBR1MCS-2::*xylAB* com *SacI/KpnI*; as letras C-D representam o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão de pBBR1MCS-5::*xylFGH* com *Sall/BamHI*. A = inserto *xylAB* (2.933 pb); B = pBBR1MCS-2 (5.228 pb); C = inserto *xylFGH* (3.834 pb); D = pBBR1MCS-5 (4.768 pb).

5.3 Obtenção de linhagens recombinantes a partir de *Escherichia coli* KO11

A transferência por transformação do vetor pBBR1MCS-2 e da construção pBBR1MCS-2::*xylAB*, extraídos de *E. coli* XL1Blue, para a linhagem *E. coli* KO11 deu origem as linhagens *E. coli* KO11 pBBR1MCS-2 e *E. coli* KO11 pBBR1MCS-2::*xylAB*, as quais foram liofilizadas e registradas no banco de cepas do laboratório como LFM 307 e LFM 168, respectivamente. Não houve dificuldade na obtenção dessas linhagens, nem mesmo a inserção desse plasmídeo com ou sem inserto gerou qualquer modificação morfológica nas colônias de *E. coli* KO11.

Por outro lado, houve dificuldade na obtenção de recombinantes dessa *E. coli* abrigo pBBR1MCS-5::*xylFGH* embora o mesmo não tenha sido observado com relação ao vetor pBBR1MCS-5 vazio. Na primeira tentativa de transformação foram obtidas várias colônias de *E. coli* KO11 portando esse vetor em placas de LB com gentamicina (LBG, 30 µg/ml). No entanto, para a inserção de *xylFGH* nessa linhagem foram feitas diversas tentativas de transformação nas quais foram testadas concentrações distintas da amostra pBBR1MCS-5::*xylFGH* extraída de *E. coli* XL1 Blue (400 ng/µl; 600 ng/µl; 800 ng/µl; 1000 ng/µl e 1500 ng/µl). Entre essas tentativas, as concentrações mais elevadas de DNA proporcionaram a obtenção de uma única colônia em meio LBG.

As colônias de *E. coli* KO11 abrigo o plasmídeo pBBR1MCS-5 tinham tamanho e aspecto bastante similares a morfologia de sua linhagem parental. Segundo Ohta e colaboradores (1991), *E. coli* KO11 caracteriza-se por apresentar colônias grandes, espessas, com bordas irregulares e coloração amarelada quando cultivadas em meios de cultivo como o LB. Essas características são devidas em parte ao fato dessa

linhagem ter sofrido algumas modificações genéticas que permitiram o desvio do fluxo metabólico para a produção de etanol, reduzindo a produção de ácidos (OHTA et al., 1991). Estes reduzem o pH do meio, tornando as condições desfavoráveis para o crescimento de espécies como *E. coli*, que cresce melhor em pH neutro (BEALL; OHTA; INGRAM, 1991).

Embora a introdução de pBBR1MCS-5 nessa linhagem tenha resultado em colônias com morfologia bastante similar àquela descrita por Ohta e colaboradores (1991), a inserção de *xylFGH* resultou em colônias com aspecto morfológico bem distinto daquele observado para aquelas linhagens: tamanho bem menor (~1 mm de diâmetro), coloração mais clara e com bordas regulares. A morfologia das colônias desses dois transformantes pode ser comparada na figura 14.

Figura 14. Cultivos resultantes da transformação de *Escherichia coli* KO11 com A) pBBR1MCS-5::*xylFGH* e B) pBBR1MCS-5 em meio LB sólido com gentamicina (30 µg/ml).

Foi feita a análise microscópica comparando essas linhagens, na qual se constatou a presença exclusiva de bacilos Gram negativos morfologicamente iguais, indicando ausência de contaminação. Além disso, foram feitas novas tentativas de transformação utilizando amostras de *E. coli* KO11 do estoque (liofilizadas e congeladas a -80 °C), cuja cultura em placa de LB obedecia a morfologia descrita por OHTA e colaboradores (1991). No entanto, o resultado foi igual ao já apresentado anteriormente: uma ou duas colônias de diâmetro pequeno, coloração clara e borda regular.

A transferência do vetor pBBR1MCS-5 e da construção pBBR1MCS-5::*xylFGH*, extraídos de *E. coli* XL1 Blue, para a linhagem *E. coli* KO11 deu origem as linhagens *E. coli* KO11 pBBR1MCS-5 e *E. coli* KO11 pBBR1MCS-5::*xylFGH*, as quais foram liofilizadas e registradas no banco de cepas do laboratório como LFM 995 e LFM 319, respectivamente.

Com a finalidade de analisar o efeito que teria a inserção de ambos os genes *xylAB* e *xylFGH* nas linhagens alvo, foram feitas algumas tentativas para transferir, por transformação, os plasmídeos pBBR1MCS-5 e pBBR1MCS-5::*xylFGH* para as linhagens *E. coli* KO11 pBBR1MCS-2 e *E. coli* KO11 pBBR1MCS-2::*xylAB*, respectivamente. No entanto, nenhuma delas resultou no aparecimento de colônias em placas de LB com gentamicina e canamicina (LBKG).

5.4 Obtenção de linhagens recombinantes a partir de *Burkholderia sacchari* LFM 101

A transferência dos vetores pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5 com ou sem inserto para *B. sacchari* LFM 101 foi feita por conjugação com as linhagens de *E. coli* S17-1, portadoras desses plasmídeos, obtidas no presente trabalho. *E. coli* S17-1 é a linhagem bacteriana mais utilizada para mobilização de DNA por conjugação. Ela carrega o plasmídeo conjugativo RP4 integrado no seu cromossomo que apresenta em sua estrutura genes *tra*, responsáveis pela formação das estruturas necessárias para a conjugação (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983). A seleção dos transconjugantes foi feita em meio mineral com canamicina (MMGK) e isso só foi possível porque *E. coli* S17-1 não é capaz de crescer em meio mineral, ao contrário de *B. sacchari* que, ao receber o plasmídeo, é capaz de crescer nesse meio com antibiótico. Dessa forma, foram obtidas linhagens de *B. sacchari* LFM 101 portadoras dos vetores de interesse, as quais foram liofilizadas e registradas no banco de cepas do laboratório com as seguintes numerações: LFM 308 (linhagem carregando pBBR1MCS-2), LFM 147 (linhagem carregando pBBR1MCS-2::*xylAB*), LFM 317 (linhagem carregando pBBR1MCS-5) e LFM 318 (linhagem carregando pBBR1MCS-5::*xylFGH*).

Ao contrário do que ocorreu com *E. coli* KO11, não houve dificuldade na obtenção desses recombinantes. Além disso, foi possível obter linhagens de *B. sacchari* LFM 101 abrigando os dois plasmídeos (pBBR1MCS-2 e 5) e os dois insertos (*xylAB* e *xylFGH*), as quais foram registradas no banco de cepas do laboratório com as seguintes

numerações: *B. sacchari* LFM 996 (linhagem controle carregando os plasmídeos pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5) e *B. sacchari* LFM 997 (linhagem carregando as construções pBBR1MCS-2::*xylAB* e pBBR1MCS-5::*xylFGH*).

5.5 Ensaios de crescimento em xilose e em mistura de glicose e xilose

Para avaliar se a inserção de maior número de cópias dos genes responsáveis pelo metabolismo (*xylAB*) e pelo transporte de xilose (*xylFGH*) teriam um papel importante para melhorar a capacidade de consumo desse açúcar pelas linhagens alvo, foram realizados dois grupos de experimentos: um no qual a xilose foi utilizada como única fonte de carbono e outro no qual glicose e xilose foram supridas em conjunto. A ideia com isso era avaliar se haveria deficiência na expressão dos genes *xyl* e avaliar a presença de repressão catabólica.

Molecularmente, o fenômeno de repressão catabólica caracteriza-se pela baixa expressão de genes envolvidos com o catabolismo e transporte de açúcares que não são transportados pelo sistema PTS, principal sistema de transporte de glicose. Isso ocorre porque na presença de glicose, os níveis de CRP-cAMP são baixos, reduzindo a expressão desses genes (GOSSET, 2005). A transcrição dos genes *xyl*, alvos do presente trabalho dependeria, portanto, da indução do promotor *lac* e da presença do ativador CRP-cAMP para que o nível de expressão desses genes atingisse seu máximo. Para a indução desse promotor e expressão dos genes *xyl* clonados nos plasmídeos pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5 foi utilizado isopropil-tio- β -D-galactosídeo (IPTG), que é um análogo sintético de lactose bastante utilizado em biologia molecular.

Deve-se levar em conta que a expressão através do promotor *lac* também está sujeita à repressão catabólica. Fenotipicamente, muitas vezes se correlaciona um perfil de crescimento diáuxico ao fenômeno genético de repressão catabólica, como ocorre em *Escherichia coli* (MEGASANIK, 2009; BRÜKNER; TITGEMEYER, 2002, DEUTCHER, 2008, KREMLING, 2009, KIM; BLOCK; MILLS, 2010). Entretanto, mesmo sem esse fenômeno, baixo nível de expressão dos genes responsáveis pelo metabolismo do outro açúcar que não a glicose, pode resultar em consumo lento daquele açúcar e por isso levar a um perfil de crescimento diáuxico se quantidades iguais desses açúcares são supridas. Isto ocorre porque inicialmente as células crescem utilizando a glicose e parte do outro açúcar. Como a glicose é consumida mais rapidamente, proporciona uma maior velocidade de crescimento. No segundo momento, quando

apenas o segundo açúcar é consumido, temos uma redução drástica na velocidade específica de crescimento devido a metabolização mais lenta deste. Considerando ainda que mesmo sob condições de repressão catabólica uma pequena expressão dos genes ocorre, os cultivos realizados neste trabalho permitiriam avaliar a contribuição de cada um dos fenômenos (superexpressão dos genes *xyl* e repressão catabólica) para o consumo de xilose.

Nestes experimentos, as linhagens provenientes de *Escherichia coli* KO11 e aquelas provenientes de *Burkholderia sacchari* LFM101 obtidas no presente trabalho (cada uma portando *xylAB* e/ou *xylFGH* e seus controles portando apenas os plasmídeos vazios) foram cultivadas, respectivamente, em meio M9 (SAMBROOK et al., 1989) e em meio mineral (RAMSAY et al., 1990) com xilose (2 g/L) ou com uma mistura 1:1 de glicose e xilose (2 g/L cada). Foram ainda adicionados nesses meios o antibiótico de acordo com o tipo de resistência de cada plasmídeo (gentamicina ou canamicina) e IPTG na concentração de 1,5 mM.

5.5.1 Ensaios de crescimento com as linhagens recombinantes de *Escherichia coli* KO11

Em razão de *E. coli* KO11 não crescer bem em meio mínimo sem suplementação (UNDERWOOD et al., 2002; YOMANO et al., 2008), além das fontes de carbono também foi adicionado extrato de levedura (0,1 g/L). A adição de nutrientes complexos é necessária porque, apesar dessa linhagem ser prototrófica, a inserção de uma nova via metabólica (composta pelas enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase) não só reduziu o fluxo de carbono através das vias fermentativas naturais dessa espécie, como também reduziu o fluxo através da via dos ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs), comprometendo a biossíntese de aminoácidos (UNDERWOOD et al., 2002; UNDERWOOD, 2003). Dessa forma, a adição de extrato de levedura foi necessária para auxiliar no processo de crescimento dessas linhagens.

Para as linhagens de *E. coli* KO11 abrigando o plasmídeo vazio pBBR1MCS-2 (LFM 307) e aquela portando a construção pBBR1MCS-2::*xylAB* (LFM 168), observou-se um perfil de crescimento bastante similar entre elas, sendo a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) igual para ambas quando cultivadas em mistura de glicose e xilose ($\mu_{\text{máx}}$ aproximadamente igual a $0,47 \text{ h}^{-1}$) ou em apenas xilose ($\mu_{\text{máx}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$) (figura 15). A comparação dos perfis de consumo de xilose

entre a linhagem recombinante abrigando *xyLAB* e o controle contendo apenas o vetor mostrou-se diferente, diferença acentuada na ausência de glicose. Nessa condição (figura 15 B), a linhagem LFM 168 consumiu completamente a xilose em 8 horas de cultivo, duas horas a menos que a linhagem controle. Na mistura de açúcares, (figura 15 A), no entanto, não houve diferença no perfil de consumo de xilose entre essas duas linhagens.

Os resultados apresentados na figura 15 C demonstram que a repressão catabólica ocorre em *E. coli* KO11, pois as velocidades de consumo de xilose foram maiores na ausência de glicose. Entretanto, mesmo na presença de glicose, a xilose é consumida (ainda que lentamente), demonstrando que a repressão catabólica não elimina completamente a capacidade de utilização desse açúcar. Assim, mesmo nessas condições há alguma expressão dos genes relacionados ao consumo de xilose. Possivelmente, a diferença nas velocidades de consumo desse açúcar entre a linhagem superexpressando *xyLAB* em relação à linhagem controle (abrigando apenas o vetor) foi mais sutil na presença de glicose devido a expressão desses genes depender também de CRP-cAMP para sua ativação transcricional plena. Dessa forma, nessa condição (presença de glicose), o efeito da superexpressão é atenuado devido a repressão catabólica.

Esses resultados sugerem que ainda há espaço para o melhoramento do metabolismo de xilose em *E. coli* KO11, uma vez que foi possível incrementar o consumo desse açúcar através da introdução de maior número de cópias de *xyLAB* nessa linhagem. No entanto, essa estratégia é prejudicada na presença de glicose em razão da repressão catabólica, confirmando relatos descritos na literatura que mostram que esse fenômeno limita a velocidade de consumo de xilose em *E. coli* (LINDSAY; BOTHAST; INGRAM, 1995; NICHOLS; DIEN; BOTHAST, 2001; GOSSET, 2005; DEUTCHER, 2008; KREMLING, 2009, KIM; BLOCK; MILLS, 2010). Uma estratégia que poderia ser utilizada para melhorar ainda mais o consumo de xilose seria a expressão desses genes sob o controle de um promotor que não fosse regulado pelo sistema cAMP-CRP.

Figura 15. Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *E. coli* KO11 abrigo a construção pBBR1MCS-2::xylAB ou o plasmídeo pBBR1MCS-2 e cultivadas em meio M9 com xilose na presença e ausência de glicose. A- Cultivo em glicose e xilose da linhagem portando pBBR1MCS-2 (LFM 307) e daquela portando pBBR1MCS-2::xylAB (LFM 168), com $\mu_{\max} = 0,47 \text{ h}^{-1}$; B- Cultivo em xilose pelas mesmas linhagens, com $\mu_{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$; C- Comparação do perfil de consumo de xilose por essas linhagens quando na presença de glicose (GX) ou na ausência desse açúcar (X). Esses dados representam a média de pelo menos dois experimentos, cada um com duplicata analítica, e desvio padrão representado pela barra de erros. Valores de $\mu_{\max}$ foram calculados pelo ln da absorbância ($\lambda = 610 \text{ nm}$).

Para as linhagens de *E. coli* KO11 portando o plasmídeo vazio pBBR1MCS-5 (LFM 995) e a construção pBBR1MCS-5::xylFGH (LFM 319) o perfil de consumo e crescimento entre as duas foi bem diferente (figura 16). Enquanto a linhagem controle cresceu bem na mistura de glicose e xilose ($\mu_{\max}=0,66 \text{ h}^{-1}$) e em meio só com xilose ($\mu_{\max}=0,50 \text{ h}^{-1}$), a linhagem portando o inserto mostrou grande dificuldade em crescer

nessas duas condições, demonstrando que a superexpressão de *xylFGH* resultou em efeitos prejudiciais em *E. coli* KO11, como já havia sido verificado na seleção dos clones recombinantes.

Com a superexpressão dos genes *xylFGH* também foi observado baixo consumo dos carboidratos (glicose e xilose) nas duas condições avaliadas. Na presença de glicose (figura 16 A), a linhagem controle consumiu completamente a glicose em 5 horas de cultivo, enquanto a xilose foi consumida mais lentamente, chegando a zero após 8 horas de cultivo. A linhagem com *xylFGH*, nessa condição, consumiu esses açúcares muito lentamente, restando no final do cultivo entre 65-75% da quantidade inicial de glicose e xilose, respectivamente. Na ausência de glicose (figura 16 B), a linhagem LFM 995 consumiu completamente a xilose em 5 horas, enquanto a linhagem com *xylFGH* novamente mostrou-se deficiente no consumo desse açúcar (mais de 85% da quantidade inicial de xilose não foi consumida ao longo do cultivo). O fenômeno de repressão catabólica foi observado na linhagem controle, uma vez que esta levou três horas a menos para consumir completamente a xilose na ausência de glicose (figura 16 C), indicando mais uma vez que esse fenômeno prejudica a velocidade de consumo de xilose nessa linhagem.

Aparentemente, a introdução de maior número de cópias de *xylFGH* em *E. coli* KO11 provocou um efeito deletério sobre esta linhagem evidenciado pela modificação na morfologia das colônias, as quais tornaram-se bem menores e com coloração mais clara quando comparada a morfologia da linhagem parental (figura 14), e corroborado pela modificação em sua fisiologia, ao reduzir para quase zero a capacidade de crescimento dessa linhagem em xilose ainda que na presença de glicose (figura 16). Como o transporte de xilose requer a hidrólise de um ATP (adenosina trifosfato), uma possível explicação para tal efeito seria que a superexpressão de *xylFGH* em *E. coli* KO11 teria sido elevada a ponto de provocar a redução de ATP na célula, prejudicando seu crescimento e metabolismo por escassez de energia.

Segundo Tao e colaboradores (2001), a substituição da via fermentativa nativa na linhagem parental de *E. coli* KO11 pela via metabólica de produção de etanol da linhagem *Zymomonas mobilis*, resultou em um aumento de 30 a 50% na taxa de crescimento e fluxo glicolítico durante a metabolização de xilose, resultante da superexpressão de alguns genes, entre eles *xylFGH*, cuja expressão foi de 50 a 100 vezes maior em *E. coli* KO11 que em sua parental. Além disso, Johansson e

colaboradores (2001) mostraram um efeito deletério similar com a superexpressão do gene da xiluloquinase (XK) em *Saccharomyces cerevisiae*, o qual foi confirmado por outros autores (JIN et al., 2003), segundo os quais afirmaram que elevadas quantidades dessa enzima poderia resultar em desequilíbrio entre a hidrólise de ATP e sua formação nas vias geradoras de ATP.

Figura 16. Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *E. coli* KO11 abrigo a construção pBBR1MCS-5::*xylFGH* ou o plasmídeo pBBR1MCS-5 e cultivadas em meio M9 com xilose na presença e ausência de glicose. A- Cultivo em glicose e xilose da linhagem portando pBBR1MCS-5 (LFM 995) e daquela portando pBBR1MCS-5::*xylFGH* (LFM 319), com $\mu_{\text{máx}} = 0,66 \text{ h}^{-1}$ e $0,12 \text{ h}^{-1}$, respectivamente; B- Cultivo em xilose pelas mesmas linhagens, com $\mu_{\text{máx}} = 0,50 \text{ h}^{-1}$ e $0,01 \text{ h}^{-1}$, respectivamente; C- Comparação do perfil de consumo de xilose por essas linhagens quando na presença de glicose (GX) ou na ausência desse açúcar (X). Esses dados representam a média de pelo menos dois experimentos, cada um com duplicata analítica, e desvio padrão representado pela barra de erros. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram calculados pelo ln da absorbância ($\lambda = 610 \text{ nm}$).

De forma semelhante, a superexpressão dos genes de transporte de xilose poderia resultar em mais xilose no meio intracelular, mas não necessariamente em maior metabolização da mesma, uma vez que *xyLAB* e os genes responsáveis pela via das pentoses estariam no seu nível normal de expressão. Neste caso, assim como citado por Jin e colaboradores (2003), o efeito deletério observado na linhagem LFM 319 poderia ser resultado do desequilíbrio entre a hidrólise de ATP necessária para o transporte de xilose e sua formação nas vias geradoras de ATP, o que levaria a uma deficiência de energia e ao comprometimento do metabolismo celular. É a primeira vez que se aponta uma hipótese como essa para transportadores do tipo ABC, de forma que os efeitos aqui apresentados podem ser decorrentes de algum problema relacionado a esses transportadores, embora nenhuma informação nesse sentido tenha sido encontrada na literatura.

5.5.2 Ensaios de crescimento com as linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari* LFM 101

Ao comparar as linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM 101 portando a construção pBBR1MCS-2::*xyLAB* (LFM 147) e seu controle portando apenas este plasmídeo vazio (LFM 308), observou-se que a inserção desses genes não resultou em qualquer mudança no perfil de crescimento seja em xilose ($\mu_{\text{máx}}=0,14 \text{ h}^{-1}$) ou na mistura deste açúcar com glicose ($\mu_{\text{máx}}=0,35 \text{ h}^{-1}$; figura 17).

Embora LFM 308 e 147 tenham apresentado o mesmo perfil de consumo dos carboidratos, o consumo de xilose foi mais rápido quando em presença de glicose quando comparado ao cultivo no qual foi suprida apenas a xilose (Figura 17 C). Nessa condição, LFM 308 e LFM 147 consumiram completamente a glicose após 12 horas de cultivo, enquanto a xilose foi consumida mais lentamente, chegando a zero 6 horas depois do término da glicose. No entanto, quando apenas xilose estava presente no meio (figura 17 B), ambas as linhagens apresentaram menor crescimento e consumo, com densidade celular cinco vezes menor e presença de xilose correspondendo a cerca de 1 g/L (55% da quantidade inicial) mesmo após 20 horas de cultivo.

O perfil de consumo desse açúcar na presença e ausência de glicose pode ser melhor avaliado na figura 17 C. Comparando essa figura com a figura 15 C observa-se que, diferentemente do que ocorreu em *E. coli* KO11, a inserção de maior número de cópias de *xyLAB* em *B. sacchari* LFM 101 não foi capaz de incrementar o consumo de

xilose por esta linhagem mesmo na ausência de glicose. Esse resultado pode indicar que a conversão de xilose a xilulose-5-fosfato por *B. sacchari* LFM 101 não é o passo que limita o consumo de xilose por essa linhagem. Além disso, os resultados demonstram que a repressão catabólica não é relevante em *B. sacchari*, ao contrário a presença de glicose de alguma forma estimula a capacidade de metabolização da xilose nessa bactéria. Considerando que a superexpressão de *xylAB* não proporcionou qualquer incremento na metabolização de xilose, o aumento observado na presença de glicose deve ser associado a um aumento das atividades que antecedem ou procedem as reações catalisadas pelos produtos desses genes, ou seja, pode estar ocorrendo um aumento na velocidade de transporte da xilose ou um aumento na metabolização de xilulose-5-fosfato na via das pentoses fosfato.

Figura 17. Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM101 abrigo a construção pBBR1MCS-2::*xylAB* ou o plasmídeo pBBR1MCS-2 e cultivadas em meio mineral com xilose na presença e ausência de glicose. A- Cultivo em glicose e xilose da linhagem portando pBBR1MCS-2 (LFM 308) e daquela portando pBBR1MCS-2::*xylAB* (LFM 147), com $\mu_{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$; B- Cultivo em xilose pelas mesmas linhagens com $\mu_{\max} = 0,14 \text{ h}^{-1}$; C- Comparação do perfil de consumo de xilose por essas linhagens quando na presença de glicose (GX) ou na ausência desse açúcar (X). Esses dados representam a média de pelo menos dois experimentos, cada um com duplicata analítica, e desvio padrão representado pela barra de erros. Valores de $\mu_{\max}$ foram calculados pelo ln da absorbância ($\lambda = 610 \text{ nm}$).

(Continua).

Figura 17. Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM101 abrigo a construção pBBR1MCS-2::xylAB ou o plasmídeo pBBR1MCS-2 e cultivadas em meio mineral com xilose na presença e ausência de glicose. A- Cultivo em glicose e xilose da linhagem portando pBBR1MCS-2 (LFM 308) e daquela portando pBBR1MCS-2::xylAB (LFM 147), com $\mu_{\text{máx}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$; B- Cultivo em xilose pelas mesmas linhagens com $\mu_{\text{máx}} = 0,14 \text{ h}^{-1}$; C- Comparação do perfil de consumo de xilose por essas linhagens quando na presença de glicose (GX) ou na ausência desse açúcar (X). Esses dados representam a média de pelo menos dois experimentos, cada um com duplicata analítica, e desvio padrão representado pela barra de erros. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram calculados pelo ln da absorbância ($\lambda = 610 \text{ nm}$).

(Concluída).

Resultado semelhante foi obtido por Lopes e colaboradores (2009), que mostraram que a superexpressão de *xylA* de *B. sacchari* LFM 101 sob o controle do promotor nativo desse gene (P_A), não foi capaz de incrementar a capacidade de crescimento nesse açúcar. Portanto, assim como a superexpressão do gene *xylA* de *B. sacchari* LFM101 não teve qualquer efeito sobre essa bactéria, o mesmo foi observado quando o ortólogo desse gene em *E. coli* KO11 foi superexpresso associado a *xylB*, contrariando os resultados obtidos por outros autores (KAWAGUCHI *et al.*, 2006; MEIJINEN, WINDE e RUIJSSENAARS, 2008), os quais mostraram que a superexpressão de *xylA* associado a *xylB* em linhagens bacterianas deficientes no consumo de xilose foi capaz não somente de torná-las hábeis no consumo desse açúcar, como também de consumí-lo concomitantemente com a glicose.

Além disso, é possível inferir a partir da comparação entre as figuras 15 C e 17 C que, enquanto em *E. coli* KO11 o fenômeno de repressão catabólica ficou bem evidente, em *B. sacchari* LFM 101 este fenômeno não foi observado. Ao contrário, observou-se um comportamento inverso, na medida que a xilose foi consumida mais rapidamente na presença de glicose (figura 17 C). De acordo com a literatura, em cultivos contendo glicose e xilose, existe a possibilidade da xilose ser transportada por transportadores secundários (GONZALEZ *et al.*, 2002; HERNÁNDEZ-MONTALVO *et*

al., 2006; KHANKAL; CHIN; CIRINO, 2008). Segundo Gonzalez e colaboradores (2002), muitos genes que codificam transportadores, entre os quais GalP (transportador para galactose), LacY (transportador para lactose) e AraE (transportador para arabinose), encontram-se superexpressos em micro-organismos cultivados em glicose e xilose. Khankal e colaboradores (2008) corroboram essa ideia e sugerem que, na presença de indutores como o IPTG, possivelmente o transportador LacY estaria ativo e serviria como transportador secundário de xilose. Por outro lado, esses mesmos autores (KHANKAL; CHIN; CIRINO, 2008) sugerem que o transporte de xilose via transportadores secundários nem sempre é uma regra e que esse assunto precisa ser investigado melhor.

Hernández-montalvo e colaboradores (2006) também propuseram ideia semelhante, ao mostrarem que uma linhagem de *E. coli* com mutação no sistema PTS foi capaz de transportar glicose através do transportador de galactose GalP. Esses mesmos autores mostraram que o gene *galP* encontrava-se superexpresso nessa linhagem, dando respaldo a essa proposição. Resultado semelhante foi obtido por LOPES e colaboradores (2011) em linhagem de *B. sacchari* com mutação no gene *ptsI* a qual, por processo de engenharia evolutiva, recuperou a capacidade de crescimento em glicose. O mutante *ptsI*, além de ter sua capacidade de crescimento em glicose reduzida, também apresentava a mesma deficiência para crescer em xilose. Ao ser submetida à engenharia evolutiva, foi restabelecida não apenas a capacidade dessa linhagem crescer eficientemente em glicose, mas também em xilose. A análise da expressão de genes, revelou que o gene *galP* estava sendo superexpresso nessa linhagem. Dessa forma, o produto desse gene, o qual é induzido na presença de glicose, pode ser o fator que permita maior eficiência na metabolização de xilose quando na presença de glicose, o que justificaria o perfil de consumo de xilose observado nos cultivos de *B. sacchari*.

As linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM 101 portando a construção pBBR1MCS-5::*xylFGH* (LFM 318) e seu controle abrigando apenas o plasmídeo vazio (LFM 317) também foram avaliadas. Dessa vez, o inserto *xylFGH* não causou nenhum efeito negativo sobre a capacidade dessa linhagem crescer em xilose, uma vez que os perfis de crescimento e consumo apresentados pelas linhagens LFM 317 e LFM 318 mostraram-se iguais nos dois grupos de experimentos (figura 18).

Em mistura de açúcares (figura 18 A), a velocidade específica máxima de crescimento foi igual a, aproximadamente, $0,32 \text{ h}^{-1}$ para as duas linhagens. O consumo

de xilose foi muito lento e pouco eficaz, restando ainda 75% da quantidade inicial desse açúcar no final do cultivo, enquanto a glicose foi consumida completamente em 12 horas de cultivo. Em meio contendo apenas xilose (figura 18 B), a taxa de crescimento foi de $0,12 \text{ h}^{-1}$ e o consumo desse açúcar foi sutilmente maior que na presença de glicose, restando 65% da quantidade inicial de xilose no final do cultivo.

Figura 18. Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM 101 abrigando a construção pBBR1MCS-5::xylFGH ou o plasmídeo pBBR1MCS-5 e cultivadas em meio mineral com xilose na presença e ausência de glicose. A- Cultivo em glicose e xilose da linhagem portando pBBR1MCS-5 (LFM 317) e daquela portando pBBR1MCS-5::xylFGH (LFM 318) com $\mu_{\text{máx}} = 0,32 \text{ h}^{-1}$; B- Cultivo em xilose pelas linhagens portando pBBR1MCS-5 (LFM 317) e daquela portando pBBR1MCS-5::xylFGH (LFM 318), com $\mu_{\text{máx}} = 0,13 \text{ h}^{-1}$; C- Comparação do perfil de consumo de xilose por essas linhagens quando na presença de glicose (GX) ou na ausência desse açúcar (X). Esses dados representam a média de pelo menos dois experimentos, cada um com duplicata analítica, e desvio padrão representado pela barra de erros. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram calculados pelo ln da absorbância ($\lambda = 610 \text{ nm}$).

(Continua).

Figura 18. Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM 101 abrigando a construção pBBR1MCS-5::*xylFGH* ou o plasmídeo pBBR1MCS-5 e cultivadas em meio mineral com xilose na presença e ausência de glicose. A- Cultivo em glicose e xilose da linhagem portando pBBR1MCS-5 (LFM 317) e daquela portando pBBR1MCS-5::*xylFGH* (LFM 318) com $\mu_{\text{máx}} = 0,32 \text{ h}^{-1}$; B- Cultivo em xilose pelas linhagens portando pBBR1MCS-5 (LFM 317) e daquela portando pBBR1MCS-5::*xylFGH* (LFM 318), com $\mu_{\text{máx}} = 0,13 \text{ h}^{-1}$; C- Comparação do perfil de consumo de xilose por essas linhagens quando na presença de glicose (GX) ou na ausência desse açúcar (X). Esses dados representam a média de pelo menos dois experimentos, cada um com duplicata analítica, e desvio padrão representado pela barra de erros. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram calculados pelo ln da absorbância ($\lambda = 610 \text{ nm}$).

(Concluída).

Comparando-se o perfil de consumo de xilose na presença e ausência de glicose (figura 18 C), observa-se que, embora a diferença no perfil de consumo desse açúcar nessas duas condições tenha sido pequena, a xilose foi consumida mais rapidamente na ausência de glicose (50% do açúcar foi consumido nessa condição, contra 25% na ausência de glicose). No entanto, esse resultado indicaria a presença de repressão catabólica nessa linhagem, contrariando os resultados obtidos anteriormente com as linhagens de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2 com ou sem *xylAB*. Deficiência no consumo de xilose também foi observada para as linhagens portando os dois plasmídeos, com ou sem inserto (figura 19). No entanto, nessa condição a xilose foi consumida mais rapidamente quando na presença de glicose.

Como apenas nessas duas situações *B. sacchari* apresentou deficiência no consumo de xilose, independentemente da presença ou ausência de *xylFGH*, é possível que esse perfil de consumo seja um efeito provocado pela inserção de pBBR1MCS-5 nessa linhagem. Além disso, as diferenças observadas entre os resultados obtidos com a expressão dos plasmídeos pBBR1MCS-2 (figura 17) e pBBR1MCS-5 (figura 18) em *B. sacchari* LFM 101 permite chegar a mesma conclusão. De alguma forma algum

componente presente nesse vetor é prejudicial ao consumo de xilose por essa linhagem. Considerando que a única diferença entre os plasmídeos pBBR1MCS é o gene que confere resistência ao antibiótico (KOVACH et al., 1995), a expressão do gene que confere resistência a gentamicina deve exercer um efeito prejudicial em *B. sacchari* LFM101.

A avaliação das linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM 101 abrigando os dois plasmídeos vazios (LFM 996) e as duas construções (LFM 997) mostrou que elas também apresentaram o mesmo perfil de crescimento e consumo tanto em mistura de glicose e xilose como em cultivo contendo apenas xilose (figura 19). Em mistura, enquanto a glicose foi consumida completamente em 16 horas de cultivo (figura 19 A), nem metade da quantidade inicial de xilose foi consumida até o final do cultivo. Na ausência de glicose, o crescimento foi ligeiramente menor e pouca xilose foi consumida ao longo do cultivo, restando ainda 75% da quantidade inicial deste açúcar no final (figura 19 B). As duas linhagens atingiram valores de $\mu_{\text{máx}}$ aproximadamente iguais a $0,31 \text{ h}^{-1}$ e $0,10 \text{ h}^{-1}$ quando cultivadas em mistura e em xilose, respectivamente.

Esses resultados indicam que a inserção de *xylAB* e *xylFGH* ou a inserção de cada um isoladamente em *B. sacchari* LFM 101 não resultou em nenhuma melhora no crescimento e consumo de xilose por essa linhagem. Além disso, também não foi observado nenhum efeito deletério resultante da superexpressão de *xylFGH* em *B. sacchari* LFM 101. Esses resultados são compatíveis com relatos na literatura que sugerem que o transporte de xilose por XylFGH não é o fator limitante para o consumo desse açúcar (HAMACHER et al., 2002; MEIJNEN; WINDE; RUIJSSENAARS, 2008). Segundo Meijnen e colaboradores (2008), o cultivo de linhagem de *Pseudomonas putida*, co-expressando os genes *xylAB* e *xylFGH*, em meio mineral com aproximadamente 2 g/l de xilose, resultou em baixa taxa de crescimento (igual a $0,01 \text{ h}^{-1}$) e o fator de conversão de xilose em biomassa foi menor para a linhagem abrigando os dois genes do que para aquelas abrigando cada um deles isoladamente.

Efeito similar foi obtido no presente trabalho, no qual nota-se que a velocidade específica máxima de crescimento foi menor na presença das duas construções ($\mu_{\text{máx}} = 0,10 \text{ h}^{-1}$), do que na presença de cada uma isoladamente ($0,13 \text{ h}^{-1}$ para linhagem com *xylAB* e $0,14 \text{ h}^{-1}$ para linhagem com *xylFGH*). Embora outros autores sugiram que a superexpressão dos genes de transporte de xilose seja importante para leveduras como *S. cerevisiae* (ELIASSON et al., 2000; JOJIMA et al., 2008), aparentemente o mesmo

não pode ser dito para linhagens como *E. coli* e *B. sacchari* com relação aos genes *xylFGH*. Entretanto, como foi observado neste trabalho, o transporte através de um transportador alternativo (como o GalP) pode ter sido responsável pelo aumento da velocidade de consumo de xilose na presença de glicose por *B. sacchari* LFM101.

Figura 19. Perfil de crescimento e consumo de linhagens provenientes de *B. sacchari* LFM101 abrigo as construções pBBR1MCS-2::xylAB e pBBR1MCS-5::xylFGH ou os plasmídeos pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5, cultivadas em meio mineral com xilose na presença e ausência de glicose. A- Cultivo em glicose e xilose da linhagem portando pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5 (LFM 996) e daquela portando pBBR1MCS-2::xylAB e pBBR1MCS-5::xylFGH (LFM 997), com $\mu_{\max} = 0,31 \text{ h}^{-1}$; B- Cultivo em xilose pelas mesmas linhagens, com $\mu_{\max} = 0,10 \text{ h}^{-1}$; C- Comparação do perfil de consumo de xilose por essas linhagens quando na presença de glicose (GX) ou na ausência desse açúcar (X). Esses dados representam a média de pelo menos dois experimentos, cada um com duplicata analítica, e desvio padrão representado pela barra de erros. Valores de $\mu_{\max}$ foram calculados pelo ln da absorbância ($\lambda = 610 \text{ nm}$).

Por outro lado, a inserção de pBBR1MCS-5 em *B. sacchari* LFM 101 parece ter prejudicado o crescimento dessa linhagem, bem como o consumo de xilose, visto que esse açúcar só foi consumido completamente pelas linhagens sem esse vetor (LFM 308 e 147). Dessa forma, é possível que esse efeito sobre o consumo de xilose seja resultado da adição do antibiótico gentamicina no meio e que, portanto, a inserção de pBBR1MCS-5 em *B. sacchari* LFM 101 tenha camuflado o efeito inverso ao da repressão catabólica claramente observado nas linhagens abrigando apenas pBBR1MCS-2. Em *E. coli* KO11 esse problema decorrente da inserção de pBBR1MCS-5 não foi observado.

5.6 Ensaios de produção de etanol ou poli-3-hidroxibutirato a partir de xilose e de mistura de glicose e xilose

Após os experimentos de crescimento e consumo, as linhagens portando os genes *xyl* foram avaliadas quanto a sua capacidade de produção. *Escherichia coli* KO11 é uma linhagem proveniente de *E. coli* W (ATCC 9637) que foi geneticamente modificada para a produção de etanol (OHTA et al., 1991), enquanto *Burkholderia sacchari* LFM 101 foi isolada de solo de canavial, sendo capaz de acumular intracelularmente grânulos de PHB (BRAMER et al., 2001). As linhagens provenientes dessas duas foram então avaliadas quanto à geração desses produtos a partir de xilose (15 g/l) e a partir da mistura desse açúcar com glicose (15 g/l cada).

5.6.1 Ensaios de produção de etanol pelas linhagens recombinantes de *Escherichia coli* KO11

O cultivo das linhagens recombinantes e controles provenientes de *E. coli* KO11 foi bem diferente dos cultivos anteriormente realizados, pois foi preciso criar um sistema de coleta de amostras que dificultasse a oxigenação do meio, para que este permanecesse com baixa concentração de oxigênio ao longo do cultivo, condição esta favorável à produção de etanol. A vantagem da microaeração para a produção de etanol foi a princípio demonstrada por Lawford e Rousseau (1994), que testou o efeito de diferentes taxas de oxigenação em misturas de glicose e xilose sobre a produção desse álcool por uma *E. coli* recombinante etanologênica. Eles observaram que todos os níveis de oxigenação testados (8, 24 e 100 mmol/l.h) provocavam a redução da produtividade por desviar o fluxo de carbono para a geração de células e de outros produtos que não o

etanol. Resultados semelhantes foram demonstrados por outros autores (OKUDA et al., 2007).

Essas linhagens foram então cultivadas em meio quimicamente definido NBS modificado (MARTINEZ et al., 2007) com limitação de oxigênio, conforme descrito em materiais e métodos, e nesse meio foi adicionado IPTG (1,5 mM), extrato de levedura (0,1 g/l) e o antibiótico adequado, além das fontes de carbono. Segundo Peterson e Ingram (2008), “o meio mineral NBS sustenta o crescimento celular e produção de etanol a níveis relativamente elevados”. Dessa forma, esse meio foi escolhido por possuir maiores quantidades de fosfato (na forma de Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), que auxilia na manutenção do pH, e de micronutrientes quando comparado ao meio M9 (tabela 3, materiais e métodos), favorecendo o crescimento e produção de etanol. As amostras foram analisadas a cada 12 horas durante 72 horas. Dessas análises foram obtidos dados de consumo de açúcar, produção de etanol e ácidos (pirúvico, láctico, acético, fórmico e succínico), além de valores de massa seca celular e pH (anexo H). A linhagem *E. coli* W3110, disponível no banco de linhagens do laboratório, foi utilizada como controle por não ser etanologênica.

Primeiramente, as linhagens recombinantes foram comparadas entre si. Em meio NBS com glicose e xilose (anexo H-I), *E. coli* KO11 abrigando pBBR1MCS-2 (LFM 307) consumiu ao longo do cultivo aproximadamente 10 g/l de glicose e 5,7 g/l de xilose, produzindo 6,52 g/l de etanol ($Y_{\text{Et/Subst}} = 0,41$ g/g) além dos ácidos pirúvico (0,09 g/l), láctico (1,21 g/l), fórmico (1,36 g/l) e acético (1,39 g/l). Os dados de produção obtidos para a linhagem superexpressando *xyLAB* (LFM 168), em meio com glicose e xilose, foram bem semelhantes. Com 72 horas de cultivo, tendo consumido 9,57 g/l de glicose e 4,64 g/l de xilose, *E. coli* LFM 168 produziu 6,58 g/l de etanol ($Y_{\text{Et/Subst}} = 0,46$ g/g) e os ácidos pirúvico (0,086 g/l), láctico (1,24 g/l), fórmico (1,42 g/l) e acético (1,49 g/l). A produção de etanol a partir de glicose e xilose por essas duas linhagens pode ser comparada na figura 20 A, na qual se constata que praticamente não houve diferença entre elas.

Em meio NBS com xilose (anexo H-II), *E. coli* LFM 307 consumiu até o final do cultivo 11,71 g/l de xilose, produzindo 3,95 g/l de etanol ($Y_{\text{Et/Xil}} = 0,34$ g/g) e os ácidos láctico (0,99 g/l), fórmico (1,00 g/l) e acético (1,16 g/l). Nessa condição, a quantidade de xilose consumida pela linhagem com *xyLAB* foi sutilmente maior (13,13 g/l), assim como a produção de etanol (5,58 g/l). Essa diferença é demonstrada no

gráfico de produção de etanol a partir de xilose (figura 20 B). Diante disso, é possível fazer uma analogia entre estes resultados e aqueles obtidos no experimento de crescimento (figura 15), uma vez que em ambos foi observado um consumo sutilmente maior de xilose pela linhagem superexpressando os genes *xylAB*, que ficou em maior evidência na ausência de glicose. Assim, a inserção desses genes em *E. coli* KO11 não só foi capaz de incrementar o consumo de xilose, como também de melhorar a produção de etanol por essa linhagem, embora a repressão catabólica tenha prejudicado o efeito provocado pela superexpressão. O aumento da concentração de IPTG foi visto nessa etapa como uma possibilidade para observar se esse efeito ficaria mais evidente em concentrações maiores desse indutor.

Figura 20. Produção de etanol pelas linhagens recombinantes de *E. coli* KO11, seus controles e pela linhagem não etanologênica *E. coli* W3110 em meio NBS com xilose na presença e ausência de glicose. A- Cultivo em meio NBS com glicose (15 g/l) e xilose (15 g/l); B- cultivo em NBS com apenas xilose (15 g/l). LFM 307 - *E. coli* KO11 carregando o vetor pBBR1MCS-2; LFM 168 - *E. coli* KO11 com pBBR1MCS-2::*xylAB*; LFM 995 - *E. coli* KO11 carregando o vetor pBBR1MCS-5; LFM 319 - *E. coli* KO11 com pBBR1MCS-5::*xylFGH*. Esses dados representam a média de dois experimentos e o desvio padrão está representado pela barra de erros.

As linhagens abrigo pBBR1MCS-5 (LFM 995) e pBBR1MCS-5::*xylFGH* (LFM 319) também foram comparadas quanto a produção de etanol e ácidos. Foram

observados que os parâmetros de consumo de açúcares e produção de etanol foram mais baixos quando comparados àqueles obtidos para LFM 307 e LFM 168. Em meio NBS com glicose e xilose (anexo H-I), no final do cultivo, a linhagem LFM 995 havia consumido 8,33 g/l de glicose e 5,39 g/l de xilose, produzindo etanol (4,39 g/l, com $Y_{Et/Subst} = 0,32$ g/g) e ácidos pirúvico (0,11 g/l), láctico (1,38 g/l), fórmico (1,41 g/l) e acético (1,42 g/l). Em meio NBS com xilose (anexo H-II), LFM 995 consumiu 8,97 g/l de xilose, produzindo etanol (2,76 g/l, com $Y_{Et/Subst} = 0,31$ g/g) e ácidos láctico (0,99 g/l), fórmico (1,00 g/l) e acético (1,00 g/l). Por sua vez, a linhagem portando *xylFGH* praticamente não consumiu os açúcares disponíveis no meio, e consequentemente apresentou níveis baixíssimos de produção de etanol, bem menores que aqueles apresentados pela linhagem não etanologênica *E. coli* W3110 (figura 20). *E. coli* LFM 319, em glicose e xilose, consumiu apenas 2,0 g/l de cada açúcar, produzindo apenas 0,77 g/l de etanol ($Y_{Et/Subst} = 0,08$ g/g). Em meio com apenas xilose, o desempenho foi ainda pior: 0,10 g/l de etanol ($Y_{Et/Xil} = 0,13$ g/g). Esses dados corroboram a hipótese do efeito deletério de *xylFGH* sobre *E. coli* KO11, o qual afetou não só o crescimento como também a produção de etanol por essa linhagem.

Os dados obtidos pelas linhagens provenientes de *E. coli* KO11 também foram comparados com os parâmetros de produção obtidos para *E. coli* W3110. Em meio NBS com glicose e xilose (anexo H-I), observou-se que, em 72 horas, *E. coli* W3110 produziu 1,87 g/l de etanol, sendo o fator de conversão do substrato a etanol ($Y_{Et/Subst}$) igual a 0,12 g/g, além de grande quantidade de ácido láctico (3,88 g/l), fórmico (1,82 g/l), acético (3,33 g/l) e pouco ácido pirúvico (0,09 g/l). Essa linhagem também foi a única, entre as analisadas, a produzir ácido succínico (2,85 g/l). A elevada produção de ácidos resultou em pH mais baixo (igual a 4,1 no final do cultivo). As linhagens provenientes de *E. coli* KO11, com exceção da linhagem abrigando o inserto *xylFGH* (LFM 319), produziram até 3,5 vezes mais etanol e menores quantidades de ácidos, além de não terem produzido ácido succínico. Resultado similar foi observado em meio contendo apenas xilose (anexo H-II), sendo que nesse meio *E. coli* W3110 produziu ainda menos etanol (0,52 g/l), com $Y_{et/xil} = 0,05$ g/g.

Esses resultados são compatíveis com a literatura (JARBOE et al., 2007; PETERSON; INGRAM, 2008), uma vez que *Escherichia coli* é uma espécie bacteriana que realiza fermentação do tipo ácida mista sendo, portanto, os ácidos os principais produtos resultantes da fermentação. A introdução da via homoetanólica de *Z. mobilis*,

que deu origem a *E. coli* KO11, modificou o metabolismo dessa bactéria ao fazer com que esta tivesse seu fluxo metabólico desviado para a produção de etanol, reduzindo a produção de ácidos (OHTA et al., 1991; JARBOE et al., 2007). Além disso, a ausência de ácido succínico entre os produtos de fermentação das linhagens provenientes de *E. coli* KO11 corrobora com o fato dessa linhagem possuir uma deleção no gene *frd*, que codifica a enzima fumarato redutase, responsável pela formação desse ácido em condição anaeróbia (OHTA et al., 1991).

A produção de etanol por *E. coli* KO11 foi avaliada em muitos trabalhos descritos na literatura, mas apenas um aborda a superexpressão de genes *xyl* nessa linhagem (TAO et al., 2001). Essa superexpressão, entretanto, não foi devida a inserção desses genes e sim um efeito indireto da introdução da via homoetanólica de *Z. mobilis* nessa *E. coli*. Segundo Tao e colaboradores (2001), a expressão em *E. coli* dos genes de *Z. mobilis*, que codificam as enzimas piruvato descarboxilase (*pdc_{Zm}*) e álcool desidrogenase (*adhB_{Zm}*), teria resultado em uma resposta celular programada a mudanças na concentração de cofatores e intermediários metabólicos, cujo efeito foi o aumento na expressão de genes envolvidos no metabolismo e transporte de xilose. Ao comparar o desempenho de *E. coli* KO11 com outra linhagem dessa espécie (*E. coli* B), em meio LB contendo xilose (100 g/l), esses autores observaram que a linhagem etanologênica produziu 45 g/l de etanol ($Y_{Et/Xil} = 0,45$ g/g) e quase 10 g/l de ácidos orgânicos (acético, láctico e succínico), enquanto a outra linhagem produziu apenas 10 g/l de etanol ($Y_{Et/Xil} = 0,16$ g/g) e até 3 vezes mais ácidos orgânicos que *E. coli* KO11. A primeira publicação que trata da construção dessa linhagem (OHTA et al., 1991), mostrou que ela foi capaz de produzir 30 g/l de etanol em meio LB a partir de xilose (80 g/l), com $Y_{Et/Xil} = 0,53$ g/g (acima do valor máximo teórico, que é de 0,51 g/g), e apresentou uma redução de até 20 vezes na produção de ácidos orgânicos quando comparada a linhagem parental. Takahashi e colaboradores (2000) também avaliaram o desempenho de *E. coli* KO11 em xilose (50 g/l) após 72 horas de cultivo em meio LB, verificando a produção de aproximadamente 20 g/l de etanol.

Em grande parte dos trabalhos descritos na literatura, LB foi o meio utilizado. Além disso, nesses trabalhos foi feito o controle do pH ao longo do cultivo por adição de KOH (2 N). A utilização de um meio complexo e o controle do pH são condições favoráveis para o crescimento dessa linhagem (BEALL; OHTA; INGRAM, 1991; UNDERWOOD, 2003), o que poderia explicar a quantidade relativamente baixa de

etanol produzida pelas linhagens provenientes de *E. coli* KO11 analisadas no presente trabalho (com exceção da linhagem com *xylFGH*, que não se aplica ao caso em razão do efeito negativo que esse gene teve sobre a produção de etanol). A utilização de meio mineral resultou em menor consumo do substrato e fatores de conversão de xilose a etanol quase 50% mais baixos do que aqueles obtidos quando o LB foi o meio utilizado (YOMANO et al., 2008). Como já explicado anteriormente, isso ocorre porque a introdução da via homoetanólica de *Z. mobilis* na linhagem parental de *E. coli* KO11 reduziu o fluxo de carbono para o Ciclo de Krebs, prejudicando a síntese de aminoácidos (UNDERWOOD, 2003). Segundo Yomano e colaboradores (2007), o cultivo dessa linhagem em meio NBS com adição de betaína (1 mM) e tiamina (0,015 mM) resultou em 26,9 g/l de etanol produzido a partir de 90 g/l de xilose. Nessas mesmas condições em meio complexo LB, essa linhagem produziu 43,2 g/l de etanol, com $Y_{Et/Xil} = 0,48$ g/g. Esses autores (YOMANO et al., 2007), demonstraram portanto que quando *E. coli* KO11 é cultivada em meio mineral, o fator de conversão ($Y_{Et/Xil}$) é aproximadamente igual a 0,3 g/g, enquanto em meio complexo esse valor pode atingir o máximo teórico que é igual a 0,51 g/g ou mesmo ultrapassá-lo (OHTA et al., 1991).

Valores de $Y_{Et/Xil}$ similares e até maiores foram obtidos no presente trabalho, tanto em meio NBS com xilose como nesse meio com glicose e xilose (anexos H-I e II). No entanto, ajustes na composição do meio de cultura, como a adição de tiamina, e a manutenção do pH em 6,0-7,6 parecem ser importantes para aumentar a produção de etanol por *E. coli* KO11. Segundo Lengeler e colaboradores (1999), a enzima piruvato descarboxilase, que participa da primeira reação da via homoetanólica de *Z. mobilis*, requer tiamina fosfato (vitamina B1) para a sua atividade. A adição de tiamina em meio mineral NBS foi observada em alguns trabalhos (YOMANO et al., 2007; MARTINEZ et al., 2007; YOMANO et al., 2008). Quanto ao pH, este foi avaliado por Beall e colaboradores (1991), que constataram maior crescimento e produção de etanol quando o pH foi mantido em 6,0-7,6. Abaixo de 6,0 esses autores observaram redução de até 30% na produção de etanol por linhagem etanologênica antecessora a *E. coli* KO11.

5.6.2 Ensaio de produção de poli-3-hidroxibutirato pelas linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari* LFM 101

Para os experimentos de produção de poli-3-hidroxibutirato, as linhagens de *B. sacchari* obtidas neste trabalho foram cultivadas durante 72 horas, sob agitação, em

meio mineral com xilose (15 g/L) ou com adição de glicose e xilose (15 g/L cada), o antibiótico adequado, IPTG (1,5 mM) e uma fonte de nitrogênio (1,5 g/l de sulfato de amônio). A baixa concentração de fonte de nitrogênio associada às elevadas concentrações de fonte de carbono é necessária para promover o acúmulo do polímero. O nitrogênio é um elemento essencial para a célula e, portanto, ao não ser repostado ao longo do cultivo, torna-se escasso fazendo com que esta acumule o carbono disponibilizado no meio em forma de grânulos de PHB (BRANDL et al., 1990). As amostras foram coletadas a cada 24 horas e a partir delas obtiveram-se dados de massa seca celular, pH, consumo de açúcares e análise dos monômeros constituintes do polímero acumulado ao longo do cultivo.

As análises por cromatografia gasosa apontaram a presença apenas de monômeros de quatro átomos de carbono, caracterizando o homopolímero poli-3-hidroxiбутирато. Esse resultado está de acordo com a literatura, que mostra produção por *Burkholderia sacchari* apenas do monômero HB (hidroxibutirato) quando a fonte de carbono fornecida é um açúcar como a glicose ou a xilose (SILVA et al., 2004; MENDONÇA, 2009). Para todas as linhagens analisadas, nas duas condições de cultivo (xilose e mistura deste com glicose), observou-se um acúmulo de PHB correspondente a 50-60% da massa seca celular, sendo o acúmulo maior nas primeiras 24 horas, período em que também se observa maior consumo do substrato (anexos H-III e IV).

Os parâmetros observados para a linhagem *B. sacchari* LFM 101 carregando pBBR1MCS-2 (LFM 308) em cultivos com glicose e xilose (anexo H-III), mostram que essa linhagem apresentou acúmulo de PHB correspondendo a 62,45% de sua massa seca celular (MSC = 4,74 g/l) e fator de conversão de substrato a PHB ($Y_{\text{PHB/açúcar}}$) igual a 0,10 g/g. Em xilose (anexo H-IV), os resultados foram similares (59,72% de PHB em 5,03 g/l de massa seca celular). Para a linhagem com pBBR1MCS-2::xy/AB (LFM 147), os parâmetros obtidos foram praticamente iguais aos da linhagem controle LFM 308, tanto em mistura (59,09% de PHB em 2,59 g/l de MSC e $Y_{\text{PHB/açúcar}} = 0,09$ g/g) como em meio contendo apenas xilose (53,05% de PHB em 4,43 g/l de MSC, com $Y_{\text{PHB/Xil}} = 0,18$ g/g). Na presença de glicose, para ambas a linhagens, as fontes de carbono fornecidas foram consumidas completamente.

Esses resultados foram comparados com outros presentes na literatura (SILVA et al., 2004; LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009). Silva e colaboradores mostraram que *B. sacchari* LFM 101, quando cultivada em meio mineral com 10 g/l de xilose, foi capaz

de acumular PHB correspondente a 35% da massa seca celular (2,93 g/l) após 72 horas de cultivo, com o fator de conversão de xilose a PHB ($Y_{\text{PHB/xil}}$) igual a 0,11 g/g. No entanto, os resultados apresentados (anexos H-III e IV) aproximam-se mais daqueles apontados por LOPES e colaboradores (2009), que obteve 57,35% de PHB em um total de 4,05 g/l de massa seca celular, com $Y_{\text{PHB/xil}}$ igual a 0,18 g/g, a partir do cultivo de *B. sacchari* LFM 101 carregando o vetor pBBR1MCS-2 em meio mineral com 15 g/l de xilose. Esses mesmos autores também avaliaram a produção de PHB por *B. sacchari* LFM 101 carregando a construção pBBR1MCS-2::*xylA*, apontando resultados similares aos obtidos com a linhagem sem inserto: 57,89 % de PHB em 3,97 g/l de massa seca celular e $Y_{\text{PHB/xil}}$ igual a 0,18 g/g. Portanto, assim como a superexpressão homóloga de *xylA* não foi capaz de incrementar a produção de PHB por *B. sacchari* LFM 101 (LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009), o mesmo foi observado com a superexpressão de *xylAB* de *E. coli* KO11, de acordo com os resultados apresentados no presente trabalho.

Figura 21. Produção de poli-3-hidroxibutirato pelas linhagens recombinantes de *B. sacchari* LFM 101 e seus controles em meio mineral com xilose na presença e ausência de glicose. Em A – cultivo em meio mineral com glicose e xilose; em B – cultivo em meio mineral com xilose. LFM 308 – *B. sacchari* LFM 101 com o vetor pBBR1MCS-2; LFM 147 - linhagem carregando pBBR1MCS-2::*xylAB*; LFM 317 - linhagem carregando o vetor pBBR1MCS-5; LFM 318 - linhagem carregando pBBR1MCS-5::*xylFGH*. Esses dados representam a média de dois experimentos e o desvio padrão está representado pela barra de erros.

Os parâmetros obtidos para as outras linhagens recombinantes e seus respectivos controles sem inserto também foram comparados e mostraram-se bastante similares aos apresentados pelas linhagens LFM 308 e LFM 147, tanto em xilose como em mistura de carboidratos. A linhagem com o plasmídeo pBBR1MCS-5 (LFM 317), em cultivo com glicose e xilose (anexo H-III), apresentou acúmulo de 54,92 % de PHB em 4,44 g/l de massa seca celular e $Y_{\text{PHB/açúcar}}$ igual a 0,13 g/g. Dados semelhantes foram obtidos para a linhagem com o inserto *xylFGH* (LFM 318): 58,47 % de PHB em 4,35 g/l de MSC e $Y_{\text{PHB/açúcar}}$ igual a 0,12 g/g. Em xilose, LFM 317 acumulou 58,66 % da massa seca celular (5,57 g/l) em forma de PHB, com $Y_{\text{PHB/Xil}} = 0,29$ g/g. Para a linhagem recombinante LFM 318, os dados obtidos foram novamente bem similares: acumulou 58,35 % da MSC (4,84 g/l) em forma de PHB resultando em valor de $Y_{\text{PHB/Xil}}$ um pouco menor, igual a 0,24 g/g. Embora na presença de glicose a produção de PHB pela linhagem com o inserto tenha sido um pouco maior, essa diferença foi muito pequena (aproximadamente 0,1 g/l), como mostra a figura 21 A. Além disso, esse comportamento não se repete na ausência de glicose quando, muito pelo contrário, a produção de PHB é maior pela linhagem sem inserto (figura 21 B).

Não há relatos na literatura que mostrem a superexpressão de genes de transporte para melhorar o consumo de xilose e a produção de PHB pela linhagem *Burkholderia sacchari*, sendo o presente trabalho pioneiro nesse aspecto. Embora nada nesse sentido tenha sido encontrado na literatura, há estudos sugerindo que a superexpressão de genes envolvidos com a captação de xilose não determinou o fluxo desse açúcar na levedura *saccharomyces cerevisiae*, nem resultou em aumento na taxa de produção de etanol (HAMACHER et al., 2002). Aparentemente, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, a inserção de *xylFGH* também não foi relevante em *B. sacchari* LFM 101, uma vez que esses genes não foram capazes de incrementar a capacidade de consumo de xilose e produção de PHB por essa linhagem.

Os dados de produção de PHB obtidos para a linhagem carregando os dois plasmídeos vazios pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5 (LFM 996) e a recombinante carregando as duas construções pBBR1MCS-2::*xylAB* e pBBR1MCS-5::*xylFGH* (LFM 997) mostram que essas duas linhagens foram as que menos produziram PHB (figura 21), possivelmente porque a introdução de dois antibióticos no meio de cultura inibiu o crescimento celular, resultando em menos polímero no meio. Em meio com glicose e xilose (anexo H-III), a linhagem LFM 996 acumulou 57,28 % de sua massa seca celular

(4,53 g/l) na forma de PHB e obteve $Y_{\text{PHB/açúcar}}$ igual a 0,13 g/g. A linhagem LFM 997 obteve dados bastante similares: 55,87 % de PHB em 3,53 g/l (MSC), com $Y_{\text{PHB/açúcar}}$ igual a 0,11 g/g. Em xilose, a produção de PHB foi menor para ambas as linhagens (anexo H-IV). Nessa condição, LFM 996 e LFM 997 acumularam 50,75 e 51,66% desse homopolímero em 5,02 e 3,76 g/l de MSC com $Y_{\text{PHB/Xil}}$ correspondendo a 0,19 e 0,17 g/g, respectivamente. Portanto, assim como a inserção de *xylAB* ou *xylFGH* individualmente não foi capaz de aumentar a produção de PHB pela linhagem LFM 101, a inserção simultânea desses dois grupos de genes também não foi capaz de fazê-lo. Ao contrário, LFM 997 produziu menos polímero que a linhagem controle LFM 996 (figura 21).

5.7 Clonagem e análise das construções em mutante *xyl* de *Burkholderia sacchari* LFM 101

Com a finalidade de avaliar se as construções portando os genes *xylAB* ou *xylFGH* seriam capazes de restabelecer a capacidade de um mutante *xyl* em crescer em xilose, estas foram inseridas nesse mutante por conjugação com as linhagens *E. coli* S17-1 pBBR1MCS-2::*xylAB*, *E. coli* S17-1 pBBR1MCS-5::*xylFGH* e os controles sem inserto. Esse mutante, que faz parte do banco de linhagens do laboratório, é denominado LFM 536 e foi obtido por Lopes e colaboradores (2009) por mutação com luz ultravioleta (UV).

As seguintes linhagens foram obtidas: *B. sacchari* LFM 536 pBBR1MCS-2, *B. sacchari* LFM 536 pBBR1MCS-2::*xylAB*, *B. sacchari* LFM 536 pBBR1MCS-5 e *B. sacchari* LFM 536 pBBR1MCS-5::*xylFGH*. Estas foram liofilizadas e denominadas LFM 313, LFM 314, LFM 315 e LFM 316, respectivamente. Para avaliar a capacidade de consumo de xilose por essas linhagens, estas foram cultivadas em meio mineral contendo esse açúcar (2 g/l), IPTG (1,5 mM) e o antibiótico adequado. Também foi avaliado o consumo de xilose quando em presença de glicose, em uma mistura 1:1 desses açúcares (2 g/l cada). Dessa forma, foi possível obter as curvas de crescimento e consumo dessas linhagens nessas duas condições durante aproximadamente 20 horas de cultivo (figuras 22 e 23).

De acordo com os gráficos A e B na figura 22, a linhagem controle abrigando apenas o plasmídeo pBBR1MCS-2 foi capaz de consumir glicose, mas apresentou deficiência no consumo de xilose. O mesmo foi observado para a linhagem

superexpressando *xylAB*. Essas duas linhagens apresentaram a mesma velocidade específica máxima de crescimento tanto na condição na qual xilose foi suprida juntamente com glicose ($\mu_{\text{máx}} = 0,22 \text{ h}^{-1}$), quanto naquela na qual xilose foi suprida sozinha ($\mu_{\text{máx}} = 0,06 \text{ h}^{-1}$). A deficiência no consumo desse açúcar refletiu, portanto, no perfil de crescimento dessas linhagens, uma vez que o valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi aproximadamente três vezes maior na presença dos dois açúcares.

Figura 22. Perfil de crescimento e consumo de linhagem de *B. sacchari* LFM536 portando as construções pBBR1MCS-2::*xylAB* e seu controle portando o plasmídeo pBBR1MCS-2 vazio cultivadas em meio mineral com glicose e xilose e em meio mineral com xilose. A- Cultivo em glicose e xilose da linhagem portando pBBR1MCS-2 (LFM 313) e daquela portando pBBR1MCS-2::*xylAB* (LFM 314), com $\mu_{\text{máx}} = 0,22 \text{ h}^{-1}$; B- Cultivo em xilose pelas mesmas linhagens, com $\mu_{\text{máx}} = 0,06 \text{ h}^{-1}$. Esses dados representam a média de pelo menos dois experimentos, cada um com duplicata analítica, e desvio padrão representado pela barra de erros. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram calculados pelo ln da absorbância ($\lambda = 610 \text{ nm}$).

Esses resultados demonstram que a inserção de *xylAB* no mutante *B. sacchari* LFM 536 não foi capaz de restabelecer nem parcialmente a capacidade deste em consumir xilose. Além disso, observa-se que esse mutante apresenta alguma capacidade de crescer em xilose, mesmo sem a superexpressão de genes *xyl*, ainda que esse crescimento seja muito deficiente e próximo a zero. Esse resultado contradiz os obtidos

por Lopes, Gomez e Silva (2009), segundo os quais a inserção de *xyIA* foi capaz de restabelecer parcialmente a capacidade de *B. sacchari* LFM 536 em crescer nesse açúcar. Por outro lado, no atual trabalho, a inserção de *xylFGH* conseguiu complementar totalmente o mutante *xyI*⁻, que retomou sua capacidade original em consumir xilose como mostram os gráficos A e B (figura 23).

A capacidade de crescimento e consumo de xilose pela linhagem LFM 315 (com o inserto *xylFGH*) na ausência e presença de glicose foi comparada com a da linhagem mutante *xyI*⁻ abrigando pBBR1MCS-5 (LFM 316) e com a da linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 abrigando pBBR1MCS-5 (LFM 317). Enquanto a linhagem *B. sacchari* LFM 536 pBBR1MCS-5 consumiu apenas cerca de 0,5 g/l de xilose em 20 horas de cultivo, a linhagem recombinante consumiu quase completamente este açúcar nesse intervalo de tempo de modo semelhante a linhagem sem mutação LFM 317 (figura 23 B). Na presença de glicose (figura 23 A), o resultado foi similar: em 16 horas de cultivo toda xilose havia sido consumida pelo recombinante carregando pBBR1MCS-5::*xylFGH* e pela linhagem LFM 101 pBBR1MCS-5, enquanto a linhagem *xyI*⁻ LFM 536 pBBR1MCS-5 consumira apenas metade da quantidade inicial de xilose (1 g/l).

O perfil de consumo refletiu no perfil de crescimento dessas linhagens em xilose e em glicose e xilose. Na ausência de glicose, *B. sacchari* LFM 536 pBBR1MCS-5 manteve o perfil de crescimento do mutante *xyI*⁻ contendo o plasmídeo pBBR1MCS-2 ($\mu_{\text{máx}}=0,07 \text{ h}^{-1}$). A inserção de *xylFGH* nesse mutante, no entanto, dobrou a velocidade específica máxima de crescimento do mesmo ($\mu_{\text{máx}}=0,15 \text{ h}^{-1}$) quando cultivado nesse açúcar. Na presença de glicose essa diferença foi mais sutil ($\mu_{\text{máx}}=0,35 \text{ h}^{-1}$ e $0,33 \text{ h}^{-1}$ para as linhagens com e sem inserto, respectivamente). Nota-se ainda, ao comparar o consumo de xilose na presença e ausência de glicose (figura 23), o mesmo efeito observado nas outras linhagens de *B. sacchari* LFM 101, ao mostrar que o consumo de xilose é mais rápido quando suprido com glicose. Enquanto na presença de glicose, o açúcar xilose é completamente consumido em 16 horas de cultivo, na ausência de glicose, a quantidade de xilose apenas chega a zero após 20 horas de cultivo. Esses resultados corroboram com os obtidos anteriormente no presente trabalho e com dados na literatura que sugerem o transporte de xilose por transportadores secundários (HERNANDEZ-MONTALVO et al., 2001; GONZALEZ et al., 2002; KHANKAL; CHIN; CIRINO, 2008; LOPES et al., 2011).

Figura 23. Perfil de crescimento e consumo de linhagem de *B. sacchari* LFM536 portando as construções pBBR1MCS-2::*xyI**FGH*, seu controle portando o plasmídeo pBBR1MCS-5 vazio e *B. sacchari* LFM101 pBBR1MCS-5 cultivadas em a) meio mineral com glicose e xilose e b) em meio mineral com xilose. A- Cultivo em glicose e xilose da linhagem portando pBBR1MCS-5 (LFM 315), daquela portando pBBR1MCS-5::*xyI**FGH* (LFM 316) e de *B. sacchari* LFM 101 pBBR1MCS-5 (LFM 317), com $\mu_{\max} = 0,33 \text{ h}^{-1}$ (LFM 313) e $0,35 \text{ h}^{-1}$ (LFM 316 e 317); B- Cultivo em xilose pelas mesmas linhagens, com $\mu_{\max} = 0,07 \text{ h}^{-1}$ (LFM 315) e $0,15 \text{ h}^{-1}$ (LFM 316 e 317). Esses dados representam a média de pelo menos dois experimentos, cada um com duplicata analítica, e desvio padrão representado pela barra de erros. Valores de $\mu_{\max}$ foram calculados pelo ln da absorbância ($\lambda = 610 \text{ nm}$).

A capacidade da linhagem recombinante carregando pBBR1MCS-5::*xyI**FGH* em produzir poli-3-hidroxitirato a partir de xilose também foi avaliada e comparada com as outras duas linhagens, mutante *xyI* carregando pBBR1MCS-5 e selvagem LFM 101 carregando pBBR1MCS-5, em um experimento na qual estas foram cultivadas por 72 horas em meio mineral com adição de IPTG (1,5 mM), xilose (15 g/l) e gentamicina. Segundo os resultados, apresentados na figura 24 e no anexo H-V, enquanto o mutante *xyI* carregando o vetor pBBR1MCS-5 mostrou-se deficiente no consumo de xilose e na produção de PHB ao longo do cultivo, a linhagem LFM 316 (com o inserto *xyI**FGH*) foi capaz de obter 57,99 % de sua massa seca celular (4,41 g/l) acumulada na forma de PHB, sendo $Y_{\text{PHB/Xil}} = 0,26 \text{ g/g}$. A linhagem controle sem mutação (LFM 101

pBBR1MCS-5) apresentou dados aproximados de acúmulo (58,66% em 5,57 g/l de MSC) e $Y_{\text{PHB/Xil}}$ (igual a 0,29 g/g).

Lopes e colaboradores (2009) observaram em experimento similar a esse que a superexpressão de *xyIA*, ao restabelecer parcialmente a capacidade desse mutante em crescer em xilose, resultou em um acúmulo de PHB referente a 18,62 % de sua massa seca celular, com $Y_{\text{PHB/Xil}} = 0,05$ g/g (enquanto a linhagem selvagem LFM 101 carregando o plasmídeo vazio acumulou 58,07 %, com $Y_{\text{PHB/Xil}} = 0,26$ g/g). No presente trabalho, os experimentos de crescimento em xilose (figura 24 B) mostraram que a linhagem *B. sacchari* LFM 536 superexpressando *xyIFGH* e o controle sem mutação *B. sacchari* LFM 101 abrigando apenas o plasmídeo pBBR1MCS-5 (LFM 317) apresentaram perfil de crescimento e consumo de xilose bastante similares, tanto quando esse açúcar foi suprido sozinho como quando foi suprido associado a glicose (figura 24). Além disso, essas linhagens também apresentaram resultados bastante similares de acúmulo de PHB (ANEXO VIII, figura 24). Portanto, de acordo com os dados propostos na literatura (LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009) e tomando como base os experimentos de crescimento e produção de PHB a partir de xilose obtidos neste trabalho, a superexpressão de *xyIFGH* no mutante *xyI* de *B. sacchari* foi capaz de restabelecer completamente a capacidade dessa linhagem em crescer nesse açúcar.

Figura 24. Produção de poli-3-hidroxibutirato pelas linhagens de *B. sacchari* provenientes da mutante *xyI* carregando pBBR1MCS-5 ou pBBR1MCS-5::*xyIFGH* e pela selvagem *B. sacchari* LFM 101 carregando pBBR1MCS-5 em meio mineral com xilose. LFM 317 – *B. sacchari* LFM 101 com o vetor pBBR1MCS-5; LFM 315 – *B. sacchari* LFM 536 (mutante *xyI*) abrigando o vetor pBBR1MCS-5; LFM 316 – *B. sacchari* LFM 536 carregando a construção pBBR1MCS-5::*xyIFGH*. Esses dados representam a média de dois experimentos e o desvio padrão está representado pela barra de erros.

O fato de *xylA* ter sido capaz de complementar o mutante *xyl⁻* apenas parcialmente poderia indicar que a mutação não estivesse apenas nesse gene. Levando em consideração a organização dos genes *xyl* em linhagens de *Burkholderia* spp. (Anexo D), observa-se que *xylA* encontra-se adjacente e orientado no mesmo sentido de *xylFGH*, indicando a disposição desses genes em um único operon *xylAFGH*. Dessa forma, em razão da proximidade de *xylA* e *xylFGH*, seria possível que o mutante *xyl⁻* também apresentasse mutação em algum desses genes de transporte. Além disso, o transporte de xilose por transportadores secundários como o GalP poderia justificar a complementação parcial do mutante *xyl⁻* por *xylA*, já que o transporte de xilose não dependeria exclusivamente de *xylFGH*.

Song e Park (1997) mostraram esse efeito em linhagem de *E. coli*, ao induzir mutação nesse gene de transporte. Esses autores observaram que mutação em *xylFGH* reduziu a captação de xilose, mas não foi capaz de eliminá-la, uma vez que a linhagem mutante continuou crescendo nesse açúcar. Por outro lado, segundo esses autores, linhagens com mutação em *xylA* e *xylB* não conseguem crescer em xilose em razão desses genes codificarem enzimas essenciais às duas primeiras reações de metabolização desse açúcar. Dessa forma, não seria possível que a linhagem mutante crescesse em xilose apenas com a superexpressão de *xylFGH*, sendo necessário também a superexpressão de *xylA*. Como a superexpressão de *xylFGH* foi suficiente para restabelecer completamente a capacidade desse mutante em crescer em xilose, é possível deduzir que a linhagem mutante LFM 536 não apresentava mutação em *xylA* e sim em algum dos genes de transporte de xilose *xylFGH*.

Levando em consideração a existência de transportadores secundários em *B. sacchari* capazes de transportar xilose, é possível que a superexpressão de *xylA* de *B. sacchari* em linhagem *xyl⁻* dessa mesma espécie, tenha explorado ao máximo a capacidade desse transportador alternativo, aumentando um pouco o crescimento e produção de PHB a partir de xilose por essa linhagem, conforme verificado na literatura (LOPES, GOMEZ e SILVA, 2009). Esse efeito não foi obtido com os genes *xylAB* de *E. coli* possivelmente em razão da diferença na estrutura e organização desses genes nessas duas linhagens. Por outro lado, a superexpressão de *xylFGH* de fato complementou esse mutante, que retomou o crescimento em xilose e produção de PHB como mostra a figura 23, que compara essa linhagem com a selvagem LFM 101.

5.8 Ensaios de crescimento em xilose com diferentes concentrações de IPTG

Esse experimento foi feito para avaliar se concentrações de IPTG maiores que 1,5 mM poderiam incrementar o consumo de xilose pelas linhagens recombinantes portando *xylAB* ou *xylFGH*. Para isso, as linhagens *E. coli* KO11 e *B. sacchari* abrigoando pBBR1MCS-2::*xylAB* ou pBBR1MCS-5::*xylFGH* foram cultivadas em meio com xilose (2 g/l) e concentrações de IPTG 2, 3 e 4 vezes maiores que a inicial (3,0, 4,5 e 6,0 mM, respectivamente), como mostrado no anexo C-II e nas figuras 25 e 26. A quantidade de IPTG foi escolhida baseada no trabalho de Cirino e colaboradores (2006) que, ao avaliarem a superexpressão de genes responsáveis pelo catabolismo de xilose em linhagem de *E. coli*, verificou indução desses genes com apenas 100 μ M de IPTG.

Figura 25. Comparação do perfil de crescimento e consumo de xilose pelas linhagens recombinantes provenientes de *Escherichia coli* KO11 em concentrações diferentes de IPTG (3,0; 4,5; 6,0 mM). A – Linhagem LFM 168 (*E. coli* KO11 pBBR1MCS-2::*xylAB*), $\mu_{\text{máx}} = 0,47 \text{ h}^{-1}$; B – Linhagem LFM 319 (*E. coli* KO11 pBBR1MCS-5::*xylFGH*), $\mu_{\text{máx}} = 0,01 \text{ h}^{-1}$. Concentrações de IPTG testadas: 3,0 mM (triângulo), 4,5 mM (quadrado) e 6,0 mM (círculo). Experimentos realizados em duplicata e desvio padrão representado pela barra de erros.

Ao comparar as curvas de crescimento e consumo das linhagens *E. coli* LFM 168 e 319 e das linhagens *B. sacchari* LFM 147 e 318 nas três concentrações diferentes de IPTG, observou-se que não houve mudança nem no perfil de crescimento nem no

perfil de consumo de xilose em nenhuma das concentrações de IPTG avaliadas (figuras 25 e 26). É possível inferir com esses resultados que mesmo com o aumento da concentração de IPTG até 6,0 mM não houve incremento no consumo de xilose tanto por parte de *E. coli* etanologênica, como por parte de *B. sacchari*.

É possível que a utilização de um promotor forte e constitutivo no lugar do promotor *lac* e que, portanto, não dependesse da ativação pelo complexo CRP-cAMP, fosse mais eficiente na superexpressão desses genes pelo menos em *E. coli* KO11, já que nessa linhagem a repressão catabólica mostrou ser um problema.

Figura 26. Comparação do perfil de crescimento e consumo de xilose pelas linhagens recombinantes provenientes de *Burkholderia sacchari* LFM 101 em concentrações diferentes de IPTG (3,0; 4,5; 6,0 mM). A – Linhagem LFM 147: *B. sacchari* LFM 101 pBBR1MCS-2::xylAB, $\mu_{\text{máx}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$; B – Linhagem LFM 318: *B. sacchari* LFM 101 pBBR1MCS-5::xylFGH, $\mu_{\text{máx}} = 0,11 \text{ h}^{-1}$. Concentrações de IPTG testadas: 3,0 mM (triângulo), 4,5 mM (quadrado) e 6,0 mM (círculo). Experimentos realizados em duplicata e desvio padrão representado pela barra de erros.

6 CONCLUSÕES

É possível inferir a partir dos resultados apresentados neste trabalho que:

- A inserção de maior número de cópias de *xylAB* em *E. coli* KO11 foi capaz de melhorar a capacidade de consumo de xilose por essa linhagem, mas esse efeito foi atenuado na presença de glicose em razão do fenômeno de repressão catabólica;
- A superexpressão dos genes *xylAB* em *E. coli* KO11 levou a um aumento na produção de etanol, pelo menos quando apenas xilose foi suprida como fonte de carbono;
- Os dados deste trabalho demonstram que a repressão catabólica não é o único fator importante para explicar a baixa eficiência na utilização de xilose por *E. coli* KO11, uma vez que o baixo nível de expressão dos genes do metabolismo desse açúcar contribui para esse fenótipo;
- Em consequência do efeito deletério de *xylFGH* sobre *E. coli* KO11, essa linhagem perdeu o potencial de produção de etanol, tornando-se ainda menos eficiente que a linhagem não etanologênica *E. coli* W3110;
- Em *B. sacchari* LFM 101 nenhum efeito (positivo ou negativo) sobre o consumo de xilose e produção de poli-3-hidroxibutirato foi obtido com a inserção de maior número de cópias dos genes *xylAB* e/ou *xylFGH* nessa linhagem;
- Em *B. sacchari* LFM 101 no lugar de repressão catabólica foi observado um efeito inverso, uma vez que a xilose foi consumida mais rapidamente na presença de glicose;
- O efeito observado em *B. sacchari* LFM 101, no entanto, foi prejudicado com a inserção do vetor pBBR1MCS-5, indicando que esse plasmídeo teve um efeito negativo sobre o crescimento dessa linhagem e consumo de xilose pela mesma, possivelmente em razão da adição de gentamicina no meio de cultivo;
- A avaliação da capacidade desses genes em complementar um mutante *xyl⁻* de *B. sacchari* LFM 101 mostrou que *xylFGH* foi capaz de fazê-lo, restituindo completamente a capacidade do mesmo em crescer em xilose;
- A adição de IPTG até concentração igual a 6,0 mM não foi capaz de incrementar o consumo de xilose por essas linhagens, sugerindo que a expressão desses genes não é o fator que limita o consumo desse açúcar;

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Propor novas estratégias para melhorar a velocidade de consumo de xilose por essas linhagens.
 - ➔ Uma proposta seria utilizar outro promotor que não o *lac*, que fosse forte e constitutivo e que, portanto, não dependesse de cAMP-CRP para estar ativo.

²REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTINTAS, M. M.; EDDY, C. K.; ZHANG, M. et al. Kinetic modeling to optimize pentose fermentation in *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 2, p. 273-295, 2005.

AZIZIN, S. M. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse by alkaline extraction. 2010. 60f. [Bacharelado (Ciências Químicas)] – Faculdade de Ciências Aplicadas, Universiti Teknologi MARA, Shah Alam, Selangor, 2010.

BEALL, D.S.; OHTA, K.; INGRAM, L.O. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 296-303, 1991.

BERTRAND, J.; RAMSAY, J.; RAMSAY, B. A. et al. Biosynthesis of poly- β -hydroxyalkanoates from pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3133-3138, 1990.

BIRNBOIM, H. C.; DOLLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

BOTHAST, R. J.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S. Fermentations with new recombinant organisms. **Biotechnology Program**, v. 15, p. 867-875, 1999.

BRÄMER, C. O.; VANDAMME, P.; SILVA, L. F. et al. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugarcane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1709-1713, 2001.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegradable polyesters. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v. 41, p. 77-93. 1990.

BRÜCKNER, R.; TITGEMEYER, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 2, p. 141-148, 2002.

BULLOCK, W. O.; FERNANDEZ, J. M.; SHORT, J. M. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. **BioTechniques**, vol. 5, n. 4, p. 376-378, 1987.

² De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BYROM, D. Industrial production of copolymers from *Alcaligenes eutrophus*. In: Dawes, E.A. (Ed.) **Novel biodegradable microbial polymers**. Dodrecht: Kluwer academic Publishers, p. 113-117, 1990.

CHENG, K.; CAI, B.; ZHANG, J.; et al. Sugarcane bagasse hemicelulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 105-109, 2008.

CIRINO, P. C.; CHIN, J. W.; INGRAM, L. O. Engineering *Escherichia coli* for xylitol production from glucose-xylose mixtures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n.6, p. 1167-1176, 2006.

CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 419-434, 2010.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, Dezembro/2011**. Brasília: CONAB, 2011. 20p.

DAVID, J. D.; WIESMEYER, H. Control of xylose metabolism in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 201, p.497-499, 1970.

DAHL M. K.; SCHIMIEDEL, D.; HILLEN, W. Glucose and glucose-6-phosphate interaction with xyl repressor proteins from *Bacillus* spp. may contribute to regulation of xylose utilization. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 19, p.5467-5472, 1995.

DEUTSCHER, J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 87-93, 2008.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 258-266, 2003.

DIEN, B. S.; NICHOLS, N. N.; O'BRYAN, P. J. et al. Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 181-196, 2000.

DMYTRUK, O. V.; DMYTRUK, K. V.; VORONOVSKY, Y. et al. Metabolic engineering of the initial stages of xylose catabolism in yeast for the purpose of constructing efficient producers of ethanol from lignocellulosics. **Cytology and Genetics**, v. 42, n. 2, p. 70-83, 2008.

DORAN, J. B.; ALDRICH, H. C.; INGRAM, L. O. Saccharification and fermentation of sugar cane bagasse by *Klebsiella oxytoca* P2 containing chrmosomally integrated genes encoding the *Zymomonas mobilis* ethanol pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 240-247, 1994.

DORAN-PETERSON, J.; COOK, D. M.; BRANDON, S. K. Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. **The Plant Journal**, v. 54, p. 582–592, 2008.

EITEMAN, M. A.; LEE, S. A.; ALTMAN, E. A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively. **Journal of Biological Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2008.

ELIASSEN, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, C. F.; HÄHN-HAGERDAL, B. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3381-3386, 2000.

ERLANDSON, K. A.; PARK, J. H.; KHAL, W. E. et al. Dissolution of xylose metabolism in *Lactococcus latis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3974-3980, 2000.

FAO, *Food and Agriculture Organization of The United Nations*. **Biofuels – OECD-FAO: Agricultural outlook 2011-2020**, cap. 3, p. 77-93, 2011.

FIEDLER, S.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. The role of the fatty acid beta-oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the fadBA operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes phaJ from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*. **Archives of Microbiology**, v. 178, n. 2, p. 149-160, 2002.

GARTNER, D.; GEISSENDORFER, M.; HILLEN, W. Expression of the *Bacillus subtilis* xyl operon is repressed at the level of transcription and is induced by xilose. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 7, p. 3102-3109, 1988.

GONZALEZ, R.; TAO, H.; SHANMUGAM, K. T. et al. Global gene expression differences associated with changes in glycolytic flux and growth rate in *Escherichia coli* during the fermentation of glucose and xylose. **Biotechnology Program**, v. 18, n. 1, p. 6-20, 2002.

GOSSET, G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. **Microbiology Cell Factory**, v. 4, p. 14-39, 2005.

GU, Y.; LI, J.; ZHANG, L. et al. Improvement of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* via expression of the *talA* gene encoding transaldolase from *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 143, p. 284-287, 2009.

GUN-YOUNG, H.; KIM, W.; JOO, G.; et al. Deletion of *xylR* gene enhances expression of xylose isomerase in *Streptomyces lividans* TK24. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 837-844, 2008.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. et al. Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 157-169, 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; JEPPSSON, M. et al. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p.147–177, 2007.

HAMACHER, T.; BECKER, J.; GÁRDÓNYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BOLES, E. Characterization of xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, p. 2783-2788, 2002.

HARMAN, J. G.; MCKENNEY, K.; PETEROFISKY, A. Structure-function analysis of three cAMP-independent forms of the cAMP receptor protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 16332-16339, 1986.

HERNANDEZ-MONTALVO, V.; VALLE, F.; BOLIVAR, F.; GOSSET, G. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 186-191, 2001.

INGRAM, L. O.; CONWAY, T.; CLARK, D. P. et al. Genetic Engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 2420-2425, 1987.

INGRAM, L. O.; CONWAY, T.; ALTERTHUM, F. **Ethanol production by *Escherichia coli* strains co-expressing *Zymomonas pdc* and *adh* genes**. Patent n° 5.000.000, United States Patent, 1991.

INGRAM, L. O.; ALDRICH, H. C.; BORGES, C. C. et al. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. **Biotechnology Program**, v. 15, p. 855-866, 1999.

JARBOE, L. R.; GRABAR, T. B.; YOMANO, L. P. et al. Development of ethanologenic bacteria. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 237-261, 2007.

JEFFRIES, T. W. Utilization of xilose by bacteria, yeasts, and fungi. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 27, p. 1-32, 1983.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 495-509, 2004.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 320-326, 2006.

JI, X.; NIE, Z.; HUANG, H.; et al. Elimination of carbon catabolite repression in *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production from glucose-xylose mixtures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 1119-1125, 2011.

JIN, Y.; NI, H.; LAPLAZA, J. M.; JEFFRIES, T. Xylulokinase overexpression in two strains of *saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 495-503, 2003.

JOHANSSON, B.; CHRISTENSSON, C.; HOBLEY, T.; HANH-HÄGERDAL, B. Xylulokinase overexpression in two strains of *saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4249-4255, 2001.

JOJIMA, T.; OMUMASABA, A. C.; INUI, M.; YUKAWA, H. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 471-480, 2010.

KAWAGUCHI, H.; VERTÈS, A. A.; OKINO, S. et al. Engineering of a xilose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3418-3428, 2006.

KHANKAL, R.; CHIN, J. W.; CIRINO, P. Role of xylose transporters in xylitol production from engineered *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 246-252, 2008.

KHANKAL, R.; CHIN, J. W.; GHOSH, D.; CIRINO, P. Transcriptional effects of CRP* expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Engineering**, v. 3, n. 13, 2009.

KIM, Y.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. Construction of an *Escherichia coli* K-12 Mutant for Homoethanologenic Fermentation of Glucose or Xylose without Foreign Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1766-1771, 2007.

KIM, Y.; BLOCK, D. E.; MILLS, D. A. Simultaneous consumption of pentoses and hexoses sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, p. 1077-1085, 2010.

KOVACH, M. E.; ELZER, P. H.; HILL, D. S. et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, v. 166, p. 175-176, 1995.

KREMLING, A.; KREMLING, S.; BETTENBROCK, K. Catabolic repression in *Escherichia coli*: a comparison of modeling approaches. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 2, p. 594-602, 2008.

LAU, M. W.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; et al. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, p. 1-11, 2010.

LAWFORD, H. G; ROUSSEAU, J. D. Relative rates of sugar utilization by an ethanologenic recombinant *Escherichia coli* using mixtures of glucose, mannose, and xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45-46, p. 367-381, 1994.

LEMOIGNE, M. Products of dehydration and of polymerization of γ -hydroxybutyric acid. **Bulletin de la Société de Chimie Biologique**, v.8, p. 770-782, 1926.

LENGELER, J. W. et al. **Biology of the prokaryotes**. Malden, MA: Blackwell Science, 1999, 955p.

LIMA, K. G. C.; TAKAHASHI, C. M.; ALTERTHUM, F. Ethanol production from corn cob hydrolysates by *Escherichia coli* KO11. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 29, p. 124-128, 2002.

LINDSAY, S. E.; BOTHAST, R. J.; INGRAM, L. O. Improved strains of recombinant *Escherichia coli* for ethanol production from sugar mixtures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, p. 70- 75, 1995.

LOKMAN, B. C.; HEERIKHUISEN, M.; LEER, R. J. et al. Regulation of expression of the *Lactobacillus pentosus* *xylAB* operon. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 17, p. 5391-5397, 1997.

LÖNN, A.; TRÄFF-BJERRE, K. L.; CORDERO-OTELLO, R. R.; VAN ZYL, W. H.; HAHN-HÄGERDAL, W. H. Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated *xylA* from *Thermus thermophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.567-573, 2003.

LOPES, M. S. G.; GOMEZ, J. G. C.; SILVA, L. F. Cloning and over-expression of xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and the polyhydroxybutyrate production from xylose. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 1012-1015, 2009.

LOPES, M. S. G.; ROCHA, R. C. S.; ZANOTTO, S. P. et al. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p. 1751-1756, 2009.

LOPES, M. S. G. **Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010, 131f. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)] – Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LOPES, M. S. G.; GOSSET, G.; ROCHA, R. C. S. et al. PHB biosynthesis in catabolite repression mutant of *Burkholderia sacchari*. **Current Microbiology**, v. 63, p. 319-326, 2011.

MARGEOT, A.; HAHN-HÄGERDAL, B.; EDLUND, M. et al. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p.1-9, 2009.

MARQUES, F. **O alvo é o bagaço**: subproduto abundante da indústria da cana dá vantagem competitiva ao Brasil na busca do etanol de segunda geração. *Ciência e Tecnologia no Brasil Pesquisa FAPESP*, São Paulo: FAPESP, 163, p. Set, 2009.

MARTIN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C. F. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 274-282, 2002.

MARTINEZ, A.; GRABAR, T. B.; SHANMUGAM, K. T. et al. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 397-404, 2007.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T. et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 37-53, 2009.

MEIJNEN, J. P.; WINDE, J. H.; RUIJSSENAARS, H. J. Engineering *Pseudomonas putida* S12 for efficient utilization of D-xylose and L-arabinose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 16, p. 5031-5037, 2008.

MENDONÇA, T. T. **Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) [P(3HB-co-3HHx)]** 2009. 130 f. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MICHELIN RAMOS, M. E. **Caracterização de linhagens bacterianas para a produção de poli-3-hidroxi butirato (P3HB) a partir de hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar**. 2003, 93f. Tese – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S.; BOTHAST, R. J. Use of catabolite repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 120-125, 2001.

NONATO, R. V.; MANTELATO, P. E.; ROSSEL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Biotechnology**, v. 57, p.1-5, 2001.

OHTA, K.; BEALL, D. S.; MEJIA, J. P. et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 893-900, 1991.

OKUDA, N.; NINOMYJA, K.; MASATO, T. et al. Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 350-357, 2007.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DOURADO, J.; RUBIA, T. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53-63, 2002.

PETERSON, J. D.; INGRAM, L. O. Anaerobic Respiration in Engineered *Escherichia coli* with an internal electron acceptor to produce fuel ethanol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 363-372, 2008.

PIRT, S. J. **Principles of microbe and cell cultivation**. London, UK: Blackwell Cientific, 1975. 274p.

PRADELLA, J. G. C.; TACIRO, M. K.; PICCOLI, R. A. M.; SILVA, L. R.; AVÓ, M. R.; YU, A. S. O. **Biopolímeros e intermediários químicos**, p. 118 (Relatório Técnico nº 84 396-205). Disponível em: <www.anbio.org.br/pdf/2/tr6/_biopolimeros.pdf>. Acesso em: 10 set. 2006.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C. et al. Production of poly- β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric acids. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093–2098, 1990.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- α -hydroxybutyric acid in microbial biomass-ester hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography A**, v. 445, p. 285-289, 1988.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989. 3v.

SASAKI, M.; JOJIMA, T.; MASAYUKI, I. Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, p.691–699, 2008.

SCHMIEDEL, D.; KINTRUP, M.; KÜSTER, E.; HILLEN, W. Regulation of expression, genetic organization and substrate specificity of xilose uptake in *Bacillus megaterium*. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 1053-1062, 1997.

SHAMANNA, D. K.; SANDERSON, K. E. Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology*, v. 139, n. 1, p. 64-70, 1979.

SILVA, G. P.; ARAÚJO, E. F.; SILVA, D. O. et al. Ethanol fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *Klebsiella oxytoca* strain P2. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 395-404, 2005.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S. et al. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n.7, p. 1732-1743, 2007.

SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; MICHELIN, M. E. R. et al. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xilose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysis. **Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 245-254, 2004.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

SIZEMORE, C.; BUCHNER, E.; RYGUS, T.; et al. Organization, structure, promoter analysis and transcriptional regulation of the xylose utilization operon from *Staphylococcus xylosus*. **Molecular and General Genetics**, v. 227, p.377-384, 1991.

SOFIA, H. J.; BURLAND, V.; DANIELS, D. L. et al. .Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes. **Nucleic Acids Research**. v. 22, p. 2576–2584, 1994.

SONG, S.; PARK, C. Organization and Regulation of the D-Xylose Operons in *Escherichia coli* K-12: XylR Acts as a Transcriptional Activator. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 22, p. 7025-7032, 1997.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219-228, 1995.

STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. **Metabolic Engineering: principles and methodologies**, Elsevier science: Estados Unidos, 1998.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195–204, 2004.

TAKAHASHI, C. M.; CARVALHO, K. G. L.; TAKAHASHI, D. F.; ALTERTHUM, F. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 829-834, 2000.

TAKEDA, Y.; TAKASE, K.; YAMATO, I. et al. Sequence and characterization of the xyl operon of a Gram-positive bacterium, *Tetragenococcus halophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2513-2519, 1998.

TAO, H.; GONZALEZ, R.; MARTINEZ, A. et al. Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 10, p. 2979-2988, 2001.

UNDERWOOD, S. A.; BUSZKO, M. L.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Flux through citrate synthase limits the growth of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1071-1081, 2002.

UNDERWOOD, S. A. **Improving the performance of *Escherichia coli* KO11 during the fermentation of xylose to ethanol**. 2003. 119f. Tese – Universidade da Flórida, Flórida, Gainesville, Estados Unidos. 2003.

UNICA, União da Indústria de Cana-de-açúcar. Coletiva de imprensa estimativa safra 2011/2012. Disponível em <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em 12/01/2012.

WOOD, B. E; INGRAM, L. O. Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2103-2110, 1992.

YOMANO, L. P.; YORK, S. W.; INGRAM, L. O. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 132-138, 1998.

YOMANO, L. P.; YORK, S. W.; ZHOU, S. et al. Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 2097-2103, 2008.

YOMANO, L. P.; YORK, S. W.; SHANMUGAM, K. T., INGRAM, L. O. Deletion of methylglyoxal synthase gene (mgsA) increased sugar co-metabolism in ethanol-producing *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1389-1398, 2009.

XU, F.; LIU, C. F.; GENG, G. C.; et al. Characterization of degraded organosolv hemicelluloses from wheat straw. **Polymer Degradation and Stability**. v. 91, p. 1880–1886, 2006.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 17-34, 2001.

ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BON, E. P. S. et al. Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.

ZHANG, M.; EDDY, C.; DEANDA, K. et al. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. **Science**, v. 267, n. 5195, p. 240-243, 1995.

Anexo A

Vetores utilizados para a expressão dos genes *xylAB* e *xylFGH*.

Anexo A – I) Vetor pBBR1MCS-2

Fonte: KOVACH *et al.*, 1995

Os sítios de restrição utilizados estão em destaque. A seta indica o sentido de clonagem dos genes *xylAB*.

Anexo A – II) Vetor pBBR1MCS-5

Fonte: KOVACH *et al.*, 1995

Os sítios de restrição utilizados estão em destaque. A seta indica o sentido de clonagem dos genes *xylFGH*.

Anexo B

Esquema mostrando desde a amplificação dos genes *xylAB* e *xylFGH*, até a clonagem e inserção nas bactérias-alvo, resultando na construção de novas linhagens de *E. coli* e *B. sacchari*.

Anexo C

Experimento de crescimento em xilose e em mistura de glicose e xilose pelas linhagens de *E. coli* e *B. sacchari* portadoras dos vetores pBBR1MCS-2 ou pBBR1MCS-5 com ou sem inserto.

Anexo C – D) Experimento utilizando IPTG na concentração de 1,5 mM

LBG – meio sólido LB com gentamicina; LBK – meio sólido LB com canamicina; MMXG – meio mineral com xilose e gentamicina; MMXK – meio mineral com xilose e canamicina; M9XG – meio M9 com xilose e gentamicina; M9XK – meio M9 com xilose e canamicina.

Anexo C – II) Experimento utilizando concentrações diferentes de IPTG (3,0; 4,5; 6,0 mM)

LBG – meio sólido LB com gentamicina; LBK – meio sólido LB com canamicina; MMXG – meio mineral com xilose e gentamicina; MMXK – meio mineral com xilose e canamicina; M9XG – meio M9 com xilose e gentamicina; M9XK – meio M9 com xilose e canamicina.

Anexo D

Organização do operon *xyl* em *Escherichia coli* e em algumas espécies de *Burkholderia spp.*

Anexo D – I) Organização do operon *xyl* na linhagem *Escherichia coli* K12, também observada em outras linhagens de *Escherichia coli*. Esta estrutura foi descrita por Song e Park (1997).

Anexo D – II) Organização dos genes *xyl* na linhagem *Burkholderia cenocepacia* J2315. BCAM0 095 (cromossomo 2) e BCAS0 354 (cromossomo 3) apresentaram 91% de identidade com *xylR* de *Burkholderia thailandensis* E264.

Anexo D – III) Organização dos genes *xyl* na linhagem *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. BMUL J_02550 e BMUL J_04299 são proteínas regulatórias com 89% e 90% de identidade com *xylR* de *Burkholderia thailandensis* E264, respectivamente. BMUL J_04296, BMUL J_04295 e BMUL J_04294 apresentaram 94%, 91% e 92% de identidade com *xylF*, *xylG* e *xylH* de *B. cenocepacia* J2315, respectivamente.

Anexo D – IV) Organização dos genes *xyl* na linhagem *Burholderia thailandensis* E264. Cromossomo I- BTH_I2339, BTH_I2340 e BTH_I2341 apresentaram 90% de identidade com os genes *xylF*, *xylG* e *xylH* de *B. cenocepacia* J2315, respectivamente. Cromossomo II- BTH_III1174 apresenta 86% de identidade com *xylB* de *B. cenocepacia* J2315.

Anexo D –V) Organização dos genes *xyl* na linhagem *Burholderia xenovorans* LB400. No cromossomo 1, Bxe_A0233: proteína regulatória da família *AraC*; Bxe_A0232 é o gene da xiluloquinase (*xylB*); no cromossomo 2: Bxe_B2623: proteína regulatória da família *AraC*; Bxe_B2622: xilose isomerase (*xylA*); Bxe_I2621: proteína periplasmática de ligação a D-xilose (*xylF*); Bxe_2620: Proteína de ligação ao ATP (*xylG*); Bxe_B2619: Componente de membrana do sistema de transporte ABC (*xylH*). Esses 3 últimos genes apresentaram identidade de 85%, 81% e 83% com *xylF*, *xylG* e *xylH* de *B. cenocepacia* J2315, respectivamente.

Anexo D-VI) Organização dos genes *xyl* na linhagem *Burkholderia phymatum* Cromossomo 1- STM815. Bphy_2342: xilose isomerase (*xylA*); Bphy_2341: proteína periplasmática de ligação a D-xilose (*xylF*); Bphy_2340: Proteína de ligação ao ATP (*xylG*); Bphy_2339: Componente de membrana do sistema de transporte ABC (*xylH*); Bphy_2343: proteína regulatória da família *AraC* (91% de identidade com sequência ortóloga em *B. cenocepacia* J2315). Cromossomo 2- Bphy_0497: proteína xiluloquinase (identidade de 95% com ortólogo de *xylB* em *B. cenocepacia* J2315); Bphy_0499: proteína regulatória da família *AraC*.

Anexo D –VII) Organização dos genes *xyl* na linhagem *Burkholderia phytofirmans* PsJN. Cromossomo 1- Bphyt_0961: Regulador transcricional da família *LacI*; Bphyt_0962: Componente de membrana do sistema de transporte ABC; Bphyt_0963: Proteína de ligação ao ATP; Bphyt_0964: proteína periplasmática de transporte ABC; Bphyt_0965: xilose isomerase; Bphyt_3239: xiluloquinase (*xylB*); Bphyt_3237: Regulador transcricional da família *AraC*. Bphyt_3239 apresentou 81% de identidade com gene *xylB* de *B. thailandensis* E264 e 93% de identidade com ortólogo em *B. xenovorans* LB400.

Anexo E

Alinhamento entre as sequências de *xylA*, *xylB*, *xylF*, *xylG* e *xylH* de *Escherichia coli* K12 MG1655 e *Escherichia coli* KO11

Anexo E- I) *xylA*

Blast 2 sequences			
gb CP002516.1 (4920168 letters)			
Query ID	gi 323376397 gb CP002516.1	Subject ID	31769
Description	Escherichia coli KO11, complete genome	Description	gi 49175990:c3728788-3727466 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome
Molecule type	nucleic acid	Molecule type	nucleic acid
Query Length	4920168	Subject Length	1323
		Program	BLASTN 2.2.26+ > Citation

>lc1|31769 gi|49175990:c3728788-3727466 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome
Length=1323

Score = 2377 bits (1287), Expect = 0.0
Identities = 1311/1323 (99%), Gaps = 0/1323 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query	172771	ATGCAAGCCTATTTTGACCAGCTCGATCGCGTTCGTTATGAAGGCTCAAAATCCTCAAAC	172830
Sbjct	1323	ATGCAAGCCTATTTTGACCAGCTCGATCGCGTTCGTTATGAAGGCTCAAAATCCTCAAAC	1264
Query	172831	CCGTTAGCATTCGCTCACTACAATCCCGACGAACTGGTGTGGGCAAGCGTATGGAAGAG	172890
Sbjct	1263	CCGTTAGCATTCGCTCACTACAATCCCGACGAACTGGTGTGGGTAAGCGTATGGAAGAG	1204
Query	172891	CACCTGCGTTTTGCGCGCTGCTACTGGCACACATTCTGCTGGAACGGGCGGACATGTTT	172950
Sbjct	1203	CACCTGCGTTTTGCGCGCTGCTACTGGCACACCTTCTGCTGGAACGGGCGGATATGTTT	1144
Query	172951	GGTGTGGGGCGTTTAAATCGTCCGTGGCAGCAGCCTGGTGAGGCACTGGCGTTGGCGAAG	173010
Sbjct	1143	GGTGTGGGGCGTTTAAATCGTCCGTGGCAGCAGCCTGGTGAGGCACTGGCGTTGGCGAAG	1084
Query	173011	CGTAAAGCAGATGTCGCATTTGAGTTTTTCCACAAGTTACATGTGCCATTTTATTGCTTC	173070
Sbjct	1083	CGTAAAGCAGATGTCGCATTTGAGTTTTTCCACAAGTTACATGTGCCATTTTATTGCTTC	1024
Query	173071	CACGATGTGGATGTTTCCCTGAGGGCGCGTCGTTAAAAGAGTACATCAATAATTTTGCG	173130
Sbjct	1023	CACGATGTGGATGTTTCCCTGAGGGCGCGTCGTTAAAAGAGTACATCAATAATTTTGCG	964
Query	173131	CAAAATGGTTGATGTCTTGGCAGGCAAGCAAGAAGAGAGCGGCGTGAAGCTGCTGTGGGA	173190
Sbjct	963	CAAAATGGTTGATGTCTTGGCAGGCAAGCAAGAAGAGAGCGGCGTGAAGCTGCTGTGGGA	904
Query	173191	ACCGCTAACTGCTTTACAAACCTCGCTATGGCGCGGGTGC GGCGACGAACCCAGATCCT	173250
Sbjct	903	ACGGCCAACTGCTTTACAAACCTCGCTACGGCGCGGGTGC GGCGACGAACCCAGATCCT	844
Query	173251	GAAGTCTTCAGTTGGGCGGCAACGCAAGTTGTTACAGCGATGGAAGCAACCCATAAATTG	173310
Sbjct	843	GAAGTCTTCAGTTGGGCGGCAACGCAAGTTGTTACAGCGATGGAAGCAACCCATAAATTG	784
Query	173311	GGCGGTGAAAACATATGTCCTGTGGGGCGGTCGTGAAGGTTACGAAACGCTGTTAAATACC	173370
Sbjct	783	GGCGGTGAAAACATATGTCCTGTGGGGCGGTCGTGAAGGTTACGAAACGCTGTTAAATACC	724
Query	173371	GACTTGCGTCAGGAGCGTGAAACAGCTGGGCGCTTTATGCAGATGGTGGTTGAGCATAAA	173430
Sbjct	723	GACTTGCGTCAGGAGCGTGAAACAGCTGGGCGCTTTATGCAGATGGTGGTTGAGCATAAA	664
Query	173431	CATAAAATCGGTTTCCAGGGCACGTTGCTTATCGAACCAGAAACGCAAGAACCACCAAAA	173490
Sbjct	663	CATAAAATCGGTTTCCAGGGCACGTTGCTTATCGAACCAGAAACGCAAGAACCACCAAAA	604
Query	173491	CATCAATATGATTACGATGCCGCGACGGTCTATGGCTTCCTGAAACAGTTGGTCTGGAA	173550
Sbjct	603	CATCAATATGATTACGATGCCGCGACGGTCTATGGCTTCCTGAAACAGTTGGTCTGGAA	544
Query	173551	AAAGAGATTAACTGAACATTGAAGCTAACCACGCGACGCTGGCAGGTCACCTTTCCAT	173610
Sbjct	543	AAAGAGATTAACTGAACATTGAAGCTAACCACGCGACGCTGGCAGGTCACCTTTCCAT	484

Query	173611	CATGAAATTGCCACCGCCATTGCGCTTGGCCTGTTTCGGTTCTGTGACGCCAACCGTGGC	173670
Sbjct	483	CATGAAATAGCCACCGCCATTGCGCTTGGCCTGTTTCGGTTCTGTGACGCCAACCGTGGC	424
Query	173671	GATGCGCAACTGGGCTGGGACACCGACAGTTCCTGGAACAGTGTGGAAGAGAATGCGCTG	173730
Sbjct	423	GATGCGCAACTGGGCTGGGACACCGACAGTTCCTGGAACAGTGTGGAAGAGAATGCGCTG	364
Query	173731	GTGATGTATGAAATTCTCAAAGCAGGCGGTTTCACCACCGGTGGTCTGAACTTCGATGCC	173790
Sbjct	363	GTGATGTATGAAATTCTCAAAGCAGGCGGTTTCACCACCGGTGGTCTGAACTTCGATGCC	304
Query	173791	AAAGTACGTCGTCAAAGTACTGATAAATATGATCTGTTTACGGTCATATCGGCGCGATG	173850
Sbjct	303	AAAGTACGTCGTCAAAGTACTGATAAATATGATCTGTTTACGGTCATATCGGCGCGATG	244
Query	173851	GATACGATGGCACTGGCGCTGAAAATTGCAGCGCGCATGATTGAAGATGGCGAGCTGGAT	173910
Sbjct	243	GATACGATGGCACTGGCGCTGAAAATTGCAGCGCGCATGATTGAAGATGGCGAGCTGGAT	184
Query	173911	AAACGCATCGCGCAGCGTTATTCCGGCTGGAATAGCGAATTGGGCCAGCAAATCCTGAAA	173970
Sbjct	183	AAACGCATCGCGCAGCGTTATTCCGGCTGGAATAGCGAATTGGGCCAGCAAATCCTGAAA	124
Query	173971	GGCCAAATGTCACTGGCAGATTAGCCAAATATGCTCAGGAACATAATTTGTCTCCGGTG	174030
Sbjct	123	GGCCAAATGTCACTGGCAGATTAGCCAAATATGCTCAGGAACATCATTTGTCTCCGGTG	64
Query	174031	CATCAGAGTGGTCGCGCAGGAGCAACTGGAAAATCTGGTAAATCATTATCTGTTGACAAA	174090
Sbjct	63	CATCAGAGTGGTCGCGCAGGAGCAACTGGAAAATCTGGTAAACATTATCTGTTGACAAA	4
Query	174091	TAA 174093	
Sbjct	3	TAA 1	

Anexo E- II) *xylB*

Blast 2 sequences			
gb CP002516.1 (4920168 letters)			
Query ID	gi 323376397 gb CP002516.1	Subject ID	64899
Description	Escherichia coli KO11, complete genome	Description	gi 49175990:c3727394-3725940 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome
Molecule type	nucleic acid	Molecule type	nucleic acid
Query Length	4920168	Subject Length	1455
		Program	BLASTN 2.2.26+ > Citation

>lcl|64899 gi|49175990:c3727394-3725940 Escherichia coli str. K-12 substr.
 MG1655 chromosome, complete genome
Length=1455

Score = 2555 bits (1383), Expect = 0.0
Identities = 1431/1455 (98%), Gaps = 0/1455 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query	174165	ATGTATATCGGGATAGATCTTGGCACCTCGGGCGTAAAAGTTATTTTGCTCAACGAGCAG	174224
Sbjct	1455	ATGTATATCGGGATAGATCTTGGCACCTCGGGCGTAAAAGTTATTTTGCTCAACGAGCAG	1396
Query	174225	GGTGAGGTGGTTGCTTCGCAACGGAAAGCTGACCGTTTCGCGCCCGCATCCACTCTGG	174284
Sbjct	1395	GGTGAGGTGGTTGCTTCGCAACGGAAAGCTGACCGTTTCGCGCCCGCATCCACTCTGG	1336
Query	174285	TCGGAACAAGACCCGGAACAGTGGTGGCAGGCAACTGATCGCGCAATGAAAGCTCTGGGC	174344
Sbjct	1335	TCGGAACAAGACCCGGAACAGTGGTGGCAGGCAACTGATCGCGCAATGAAAGCTCTGGGC	1276
Query	174345	GATCAGCATTCTCTGCAGGACGTTAAAGCATTGGGTATTGCCGGCCAGATGCATGGAGCA	174404
Sbjct	1275	GATCAGCATTCTCTGCAGGACGTTAAAGCATTGGGTATTGCCGGCCAGATGCACGGAGCA	1216
Query	174405	ACCTTACTGGATGCTCAACAACGGGTATTGCGCCCTGCCATTTTGTGGAACGACGGGCGC	174464
Sbjct	1215	ACCTTGTCTGGATGCTCAGCAACGGGTGTTACGCCCTGCCATTTTGTGGAACGACGGGCGC	1156
Query	174465	TGTGCGCAAGAGTGCACTTTGCTGGAAGCGAGAGTCCGCAATCACGAGTGATTACCGGC	174524
Sbjct	1155	TGTGCGCAAGAGTGCACTTTGCTGGAAGCGAGAGTCCGCAATCGCGGTGATTACCGGC	1096
Query	174525	AACCTGATGATGCCCGGATTTACTGCGCCTAAATTGCTATGGGTTTCAGCGGCATGAGCCG	174584
Sbjct	1095	AACCTGATGATGCCCGGATTTACTGCGCCTAAATTGCTATGGGTTTCAGCGGCATGAGCCG	1036
Query	174585	GAGATATTCCGTCAAATCGACAAAGATTATTACCGAAAGATTACTTGCGTCTGCGTATG	174644

Sbjct	1035	GAGATATTCCGTCAAATCGACAAAGTATTATTACCGAAAGATTACTTGCGTCTGCGTATG	976
Query	174645	ACGGGGGAGTTTGGCAGCGATATGTCTGACGCAGCTGGCACCATGTGGCTGGATGTCGCA	174704
Sbjct	975	ACGGGGGAGTTTGGCAGCGATATGTCTGACGCAGCTGGCACCATGTGGCTGGATGTCGCA	916
Query	174705	AAGCGTGACTGGAGTGACGTCATGCTGCAGGCTTGCGACTTATCTCGTGACCAGATGCCC	174764
Sbjct	915	AAGCGTGACTGGAGTGACGTCATGCTGCAGGCTTGCGACTTATCTCGTGACCAGATGCCC	856
Query	174765	GCATTATATGAAGGCAGCGAAATTACTGGTGCTTTGTTACCTGAAGTTGCGAAAGCGTGG	174824
Sbjct	855	GCATTATACGAAGGCAGCGAAATTACTGGTGCTTTGTTACCTGAAGTTGCGAAAGCGTGG	796
Query	174825	GGTATGGCGACGGTGCCAGTTGTGCGAGGCGGTGGCGACAATGCAGCTGGTGCAGTTGGT	174884
Sbjct	795	GGTATGGCGACGGTGCCAGTTGTGCGAGGCGGTGGCGACAATGCAGCTGGTGCAGTTGGT	736
Query	174885	GTGGGAATGGTTGATGCTAATCAGGCAATGTTATCGCTGGGGACGTCGGGGGTCTATTTT	174944
Sbjct	735	GTGGGAATGGTTGATGCTAATCAGGCAATGTTATCGCTGGGGACGTCGGGGGTCTATTTT	676
Query	174945	GCTGTCAGCGAAGGGTTCTTAAGCAAGCCAGAAAGCGCTGTACACAGCTTTTGCCATGCG	175004
Sbjct	675	GCTGTCAGCGAAGGGTTCTTAAGCAAGCCAGAAAGCGCGTACATAGCTTTTGCCATGCG	616
Query	175005	CTACCGCAGCGTTGGCATTAAATGTCTGTAATGCTGAGTGCAGCATCGTGTCTGGATTGG	175064
Sbjct	615	CTACCGCAACGTTGGCATTAAATGTCTGTGATGCTGAGTGCAGCGTCGTGTCTGGATTGG	556
Query	175065	GTCGCGAAATTAACCGGCCTGTGCAATGTCCAGCTTTAATCGCTGCAGCTCAACAGGCT	175124
Sbjct	555	GCCGCGAAATTAACCGGCCTGAGCAATGTCCAGCTTTAATCGCTGCAGCTCAACAGGCT	496
Query	175125	GATGAAAGTGCCGAGCCAGTTTGGTTTCTGCCTTATCTTTCCGGCGAGCGTACACCACAC	175184
Sbjct	495	GATGAAAGTGCCGAGCCAGTTTGGTTTCTGCCTTATCTTTCCGGCGAGCGTACGCCACAC	436
Query	175185	AATAATCCCCAGGCGAAGGGGTTTCTTTGGTTTGACTCATCAACATGGCCCCAATGAA	175244
Sbjct	435	AATAATCCCCAGGCGAAGGGGTTTCTTTGGTTTGACTCATCAACATGGCCCCAATGAA	376
Query	175245	CTGGCGCAGCAGTGTGGAAGGCGTGGGTTATGCGCTGGCAGATGGCATGGATGTCGTG	175304
Sbjct	375	CTGGCGCAGCAGTGTGGAAGGCGTGGGTTATGCGCTGGCAGATGGCATGGATGTCGTG	316
Query	175305	CATGCCTGCGGCATTAAACCGCAAAGTGTTACGTTGATTGGTGGCGGGGCGCGTAGTGAG	175364
Sbjct	315	CATGCCTGCGGTATTAAACCGCAAAGTGTTACGTTGATTGGGGGCGGGGCGCGTAGTGAG	256
Query	175365	TACTGGCGTCAGATGCTGGCGGATATCAGCGGTCAGCAGCTCGATTACCGTACggggggg	175424
Sbjct	255	TACTGGCGTCAGATGCTGGCGGATATCAGCGGTCAGCAGCTCGATTACCGTACGGGGGGG	196
Query	175425	gATGTGGGGCCAGCACTGGGCGCAGCAAGGCTGGCGCAGATTGCGGCGAATCCAGAGAAA	175484
Sbjct	195	GATGTGGGGCCAGCACTGGGCGCAGCAAGGCTGGCGCAGATCGCGGCGAATCCAGAGAAA	136
Query	175485	TCGCTCATTGAGTTGTTGCCGAGCTACCGTTAGAACAGTCGCATCTACCAGATGCGCAG	175544
Sbjct	135	TCGCTCATTGAATTGTTGCCGCACTACCGTTAGAACAGTCGCATCTACCAGATGCGCAG	76
Query	175545	CGTTATGCCGCTTATCAGCCACGACGTGAAACGTTCCGTCGCCTCTATCAGCAACTTCTG	175604
Sbjct	75	CGTTATGCCGCTTATCAGCCACGACGAGAAACGTTCCGTCGCCTCTATCAGCAACTTCTG	16
Query	175605	CCATTAATGGCGTAA	175619
Sbjct	15	CCATTAATGGCGTAA	1

Anexo E- III) *xytF*

Blast 2 sequences			
gb CP002516.1 (4920168 letters)			
Query ID	gi 323376397 gb CP002516.1	Subject ID	21169
Description	Escherichia coli KO11, complete genome	Description	gi 49175990:3729154-3730146 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome
Molecule type	nucleic acid	Molecule type	nucleic acid
Query Length	4920168	Subject Length	993
		Program	BLASTN 2.2.26+ > Citation

>lcl|30519 gi|49175990:3729154-3730146 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome
Length=993

Score = 1784 bits (966), Expect = 0.0
Identities = 984/993 (99%), Gaps = 0/993 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query	171413	TTACAGCTCGCTCTCTTTGTGGAATCCGTCCTTAACTACCGTGTCTTTGATGTTGTTTTT	171472
Sbjct	993	TTACAGCTCGCTCTCTTTGTGGAATCCGTCCTTAACTACCGTATCTTTGATGTTGTTTTT	934
Query	171473	ATTACATCGATCGGTGTCAGGAGGCGGGAGGGCACATCTTTCAGGCCATTATTCAGTGT	171532
Sbjct	933	ATTACATCGATCGGTGTCAGGAGGCGGGAGGGGACATCTTTCAGGCCATTATTCAGTGT	874
Query	171533	GGTATCTGCTTTTGGTTCCTGACCATTGCCCAACTCAACGGCAATTTCTGCGGCAGTATT	171592
Sbjct	873	GGTATCTGCTTTTGGTTCCTGACCATTGCCCAACTCAACGGCAATTTCTGCGGCAGTATT	814
Query	171593	TGCCAACAACTAATAGGTTTATACACCGTCATAGTTTGCCTACCGGCAGCAATACGTTT	171652
Sbjct	813	TGCCAACAACTAATAGGTTTATACACCGTCATAGTTTGCCTACCGGCAGCAATACGTTT	754
Query	171653	AATACCTGCGAGATCCGCATCCTGGCCGGAATTGCTACTTTCCCTGATAAACCTTGCGC	171712
Sbjct	753	AATACCTGCGAGATCCGCATCCTGGCCGGAATTGCTACTTTCCCTGATAAACCTTGCGC	694
Query	171713	GCTTAATGCCTGAATTGCCCCACCTGCGGTGGCATCGTTTGAGGCAACTACAGCATCAAT	171772
Sbjct	693	GCTTAATGCCTGAATTGCCCCACCTGCGGTGGCATCGTTTGAGGCAACTACAGCATCAAT	634
Query	171773	TTTGTATTATTGGCGGTTAGCGCGTTTTCATAATTTTCAATGCGTTTCCGGTAACCA	171832
Sbjct	633	TTTGTATTATTGGCGGTTAGCGCGTTTTCATAATTTTCAATGCGTTTCCGGTAACCA	574
Query	171833	GCCATCAACCCATTGGTCACCAACGACTTTAATTTTCCGGAATCAACGTAAGGTTTAA	171892
Sbjct	573	GCCATCAACCCATTGGTCACCAACGACTTTAATTTTCCGGAATCAACGTAAGGTTTAA	514
Query	171893	CACTTTCATTGTTCGGCGCGGAACAGCTTGGCGTTGTTATCTACCGGCGAGCCGCCAT	171952
Sbjct	513	CACTTTCATTGTTCGGCGCGGAACAGCTTGGCGTTGTTATCTACCGGCGAGCCGCCAT	454
Query	171953	CAGGAAGTAATTACCTTGCAGAACATATCGACCAGGGCTTTGCCTGCAGTTCACCGAC	172012
Sbjct	453	CAGGAAGTAATTACCTTGCAGAACATATCGACCAGGGCTTTGCCTGCAGTTCACCGAC	394
Query	172013	TTTTTCGTTATCGAAAGAAATATAAAAATCGATATCCGCATCGTTAATCATACGATCGTA	172072
Sbjct	393	TTTTTCGTTATCGAAAGAAATATAAAAATCGATATCCGCATCGTTAATCATACGATCGTA	334
Query	172073	AGCTAATACTTTAATACCTTCTGTTTGGCTTCTTTTACAACGTTACTTAATACCTGACC	172132
Sbjct	333	AGCTAATACTTTAATGCCTTCTGTTTGGCTTCTTTTACAACGTTACTTAATACCTGACC	274
Query	172133	GTTATACGGAATAATGACAAGAACATCGACACCCCGGTTTATCATGTTTCAATCTGCGA	172192
Sbjct	273	GTTATACGGAATAATGACAAGAACATCGACACCCCGGTTTATCATGTTTCAATCTGCGA	214
Query	172193	CATTGTGTGTTCTTTCATTGCCATTTGCAGACTGTACAAATACTTTTCGCGCCGAGAGATTC	172252
Sbjct	213	CATTGTGTGTTCTTTCATTGCCATTTGCAGACTGTACAAATACTTTTCGCGCCGAGAGATTC	154
Query	172253	TGCCTTTTTCACAAAAATATCTCGATCTTTTGGCAGCGTTCAAGACGGAGATCATCAAT	172312
Sbjct	153	TGCCTTTTTCACAAAGATATCTCGATCTTTTGGCAGCGTTCAAGACGGAGATCATCAAT	94
Query	172313	CGCCATACCTATTTTGACTTCTTTGGCGTGTGCCGCAACGTTGGTAAGCAGAAGTGAGGT	172372
Sbjct	93	CGCCATACCTATTTTGACTTCTTTGGCGTGTGCCGCAACGTTGGTAAGCAGGAGTGAGGT	34
Query	172373	GCAAAGGGTGAGTAGAATGTTCTTTATTTTCAT	172405
Sbjct	33	GCAAAGGGTGAGTAGAATGTTCTTTATTTTCAT	

Anexo E- IV) *xylG*

Blast 2 sequences			
gb CP002516.1 (4920168 letters)			
Query ID	gi 323376397 gb CP002516.1	Subject ID	19281
Description	Escherichia coli K011, complete genome	Description	gi 49175990:3730224-3731765 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome
Molecule type	nucleic acid	Molecule type	nucleic acid
Query Length	4920168	Subject Length	1542
		Program	BLASTN 2.2.26+ Citation

>lcl|26405 gi|49175990:3730224-3731765 Escherichia coli str. K-12 substr.
 MG1655 chromosome, complete genome
Length=1542

Score = 2782 bits (1506), Expect = 0.0
Identities = 1530/1542 (99%), Gaps = 0/1542 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query	169794	TCAGACGGATTGCTTTTCGACATGATGTTTCGCTCCTCAATGCGGCTTCCATCACCTGCTC	169853
Sbjct	1542	TCAGACGGATTGCTTTTCGACATGATGTTTCGCTCCTCAATGCGGCTTCCATCACCTGCTC	1483
Query	169854	CTGAGTCAGGTTATGATTATCAGGTTGGCTTTTAGTTTCCCTTCATGCATCACCAGTAC	169913
Sbjct	1482	CTGAGTCAGGTTATGATTATCAGGTTGGCTTTTAGTTTCCCTTCATGCATCACCAGTAC	1423
Query	169914	CCGATCGCTAAGGCCGAGCACCTTCAGGTAATTCGGAAGAGATGACAATAACGGCAATACC	169973
Sbjct	1422	ACGATCGCTAAGGCCGAGCACCTTCAGGTAATTCGGAAGAGATGACAATAACGGCAATACC	1363
Query	169974	CTGCTGGACGAGTTGGTTAATTAATTTGTAGATCTCGTATTTTCGCGCCAATATCGATACC	170033
Sbjct	1362	CTGCTGGACGAGTTGGTTAATTAATTTGTAGATCTCGTATTTTCGCGCCAATATCGATACC	1303
Query	170034	CCTGGTAGGTTTCATCAAGAATGAGGATGCGCGGGTTAAGTAACAGACGCGAGCGAGGAT	170093
Sbjct	1302	CCTGGTAGGTTTCATCAAGAATGAGAATGCGCGGGTTAAGTAACAGACGCGAGCGAGGAT	1243
Query	170094	CGCTTTTGTCTGATTGCCGCCGCTCAAACGTCCAATAGCAAGGTCGGGGGACGACGTTTT	170153
Sbjct	1242	CGCTTTTGTCTGATTGCCGCCGCTCAAACGTCCAATAGCAAGGTCGGGGGACGACGTTTT	1183
Query	170154	AACTTTGAGTTGCTGAATTGATTCCAGAATACATTTTGTCTCTGCCCGTCATCAAGCTG	170213
Sbjct	1182	AACTTTGAGTTGCTGGATTGATTCCAGAATACATTTTGTCTCTGCCCGTCATCAAGCTG	1123
Query	170214	GCTAATGCCACCGGTAAATTTATTGAGTGCGGCGAGGGTAATATTTTACCAACCGCCAT	170273
Sbjct	1122	GCTAATGCCACCGGTAAATTTATTGAGTGCGGCGAGGGTAATATTTTACCAACCGCCAT	1063
Query	170274	TACCGGAACGATGCCGTCGCGCTTCTGTCTTCGGGTACCATCGCAATCCCCTGGGCGAT	170333
Sbjct	1062	TACCGGAACGATGCCGTCGCGCTTCTGTCTTCGGGGACCATCGCAATCCCCTGGGCGAT	1003
Query	170334	GGCTTGCTGACAGTTACGAATATCTACCTGTTTGCCATCAATATAAAATTTTCCTTCCCA	170393
Sbjct	1002	GGCTTGCTGACAGTTACGAATATCTACCTGTTTGCCATCAATATAAAATTTTCCTTCCCA	943
Query	170394	TTGTCCGGGCCACACGCCAAACAGGCACTGAATGGTCTCGGTACGTCCGGCACCACGAG	170453
Sbjct	942	TTGTCCGGGCCACACGCCAAACAGGCACTGAATGGTCTCGGTACGTCCGGCACCACGAG	883
Query	170454	TCCGGAATACCCAGTATTTTCGCCACGTTTCAGGGAACAGAGACATCATTAACTCGTTT	170513
Sbjct	882	TCCGGAATACCCCAATATTTTCGCCACGTTTCAGGGAACAGAGACATCATTAACTCGTTT	823
Query	170514	AATATGACGATTGACCGATGCCATGCCGTCAGATGTTCAATACGTAATATTTTCATCTCC	170573
Sbjct	822	AATATGACGATTAAACCGATGCCATGCCGTCAGATGTTCAATACGTAATATTTTCATCTCC	763
Query	170574	GGTGGTATGTGGTTCATTAGGGTAAAGCGCGGTTAACTCTCGCCCGACCATCATGGTGAT	170633
Sbjct	762	GGTGGTATGTGGTTCATTAGGGTAAAGCGCGGTTAACTCTCGCCCGACCATCATGGTGAT	703
Query	170634	AATATCGTCTTCACCTATTCCGGCAGCATCACGCGTACCAATGTGCTGTCCGTCGCGAAT	170693
Sbjct	702	AATATCGTCTTCACCTATTCCGGCAGCATCACGCGTACCAATGTGCTGTCCGTCGCGAAT	643
Query	170694	AACGCAATCGTATCGGAAATCGCTTTGACTTCGTTGAGTTTGTGCGAAATATAAATACA	170753
Sbjct	642	AACGCAATCGTATCGGAAATCGCTTTGACTTCGTTGAGTTTGTGCGAAATATAAATACA	583
Query	170754	GGCGATACCGTGCTGTTGTAGATCGCGAATAATATCCAGTAAAACCGACGTTTCTGCTC	170813

Sbjct	582	GGCGATACCGTGCTGTTGTAGATCGCGAATAATATCCAGTAAAAATCGACGTTTCCTGCTC	523
Query	170814	AGTTAATGAGGCTGTCGGTTCATCGAGAATTAACAAGCGCACCTGTTTATTAAGTGCCTT	170873
Sbjct	522	AGTTAATGAGGCTGTCGGTTCATCGAGAATTAACAAGCGCACCTGTTTATTAAGTGCCTT	463
Query	170874	GGCAATTTCAACCAAGTTGTTGTTGCCCAAGCCCTAAATCGCCAACGCGGGTATCAGGTGA	170933
Sbjct	462	GGCAATTTCAACCAAGTTGTTGTTGCCCAAGCCCTAAATCGCCAACGCGGGTATCAGGTGA	403
Query	170934	AATGGATAAACTGACCTGTGCGAGCAGCTTCTGACAGCGTAGCGTCATCAGGTCATAATC	170993
Sbjct	402	AATGGATAAACTGACCTGTGCGAGCAGCTTCTGACAGCGTAGCGTCATCAGGTCATAATC	343
Query	170994	CATAATGCCATTGTGGGTATTTTCGTTACCCAGGAAGATATTTCCAGCACGGTCAATTC	171053
Sbjct	342	CATAATGCCATTGTGGGTATTTTCGTTACCCAGGAAGATATTTCCAGCACGGTCAATTC	283
Query	171054	TTTCACCAAGGCCAATTCCTGGTGAATGATGGCGATACCTTTGCGTTTCGGTATCGCGGAT	171113
Sbjct	282	TTTCACCAAGGCCAATTCCTGATGAATGATGGCGATACCTTTGCGTTTCGGTATCGCGGAT	223
Query	171114	GTGACTCGCCTGAATCTCTTCTCCCGCAAAAAATAATTCGCCTTCGTAGGAGCCATGGGG	171173
Sbjct	222	GTGACTCGCCTGAATCTCTTCTCCCGCAAAAAATAATTCGCCTTCGTAGGAGCCATGGGG	163
Query	171174	ATAAATACCACACAGCACTTTTCATCAGTGTGATTACAGACCCATTTTCCCAAAAAG	171233
Sbjct	162	ATAAATACCACACAGCACTTTTCATCAGCGTTGATTACAGACCCATTTTCCCAAAAAG	103
Query	171234	TGAGACGATTTTCGCCAGCATTCAACCGCAAGCAGACGTTATCAATCGCCTTCACACTGCC	171293
Sbjct	102	TGAGACGATTTTCGCCAGCATTCAACCGCAAGCAGACGTTATCAATCGCCTTCACACTGCC	43
Query	171294	GAAGGTTTTGGTAATATCTTCATTTCAAGTAGATAAGGCAT	171335
Sbjct	42	GAAGGTTTTGGTAATGTTCTTCATTTCAAGTAGATAAGGCAT	1

Anexo E- V) *xyIH*

Blast 2 sequences			
gb CP002516.1 (4920168 letters)			
Query ID	gi 323376397 gb CP002516.1	Subject ID	37487
Description	Escherichia coli K011, complete genome	Description	gi 49175990:3731743-3732924 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome
Molecule type	nucleic acid	Molecule type	nucleic acid
Query Length	4920168	Subject Length	1182
		Program	BLASTN 2.2.26+ > Citation
>lcl 37487 gi 49175990:3731743-3732924 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome			
Length=1182			
Score = 2122 bits (1149), Expect = 0.0			
Identities = 1171/1182 (99%), Gaps = 0/1182 (0%)			
Strand=Plus/Minus			
Query	168635	TCAAGAACGGCGTTTGGTTGCGGAGTCCATCCATACTGCCAGCAACAGAATCGCACCTTT	168694
Sbjct	1182	TCAAGAACGGCGTTTGGTTGCGGAGTCCATCCATACTGCCAGCAACAGAATCGCACCTTT	1123
Query	168695	AACGATATACTGCCAGAAGGTCGGTACATCCATCATACTCATGCCGTTATCCAGTGAAGC	168754
Sbjct	1122	AACGATATACTGCCAGAAGGTCGGTACATCCATCATACTCATGCCGTTATCCAGTGAAGC	1063
Query	168755	CATGATAAAATGCCCCATTACTGCTCCGGCAACGCTTCCCACTCCGCCAGCCAGGCTGGT	168814
Sbjct	1062	CATGATAAAATGCCCCATTACTGCTCCGGCAACGCTTCCCACTCCGCCAGCCAGGCTGGT	1003
Query	168815	GCCGCCAATCACGCATGCTGCAATTGCGTCCAGTTCGGCGATATTTCCCGCAGAAGGTGA	168874
Sbjct	1002	GCCGCCAATCACGCATGCTGCAATTGCGTCCAGTTCGGCGATATTTCCCGCAGAAGGTGA	943
Query	168875	ACCAGCGCCAAGTCGAGAATAAGGATTAATCCGGCGATGGCTACCATTAAATCCGTTAAT	168934
Sbjct	942	ACCAGCGCCAAGTCGAGAATAAGGATTAATCCGGCGATGGCTACCATTAAATCCGTTAAT	883
Query	168935	CGCGAACACGGCAAGTTTGGTGCCTTCAACGTTAATCCCGGAGAGACGTGCTGCTTCCAG	168994
Sbjct	882	CGCGAACACGGCAAGTTTGGTGCCTTCAACGTTAATCCCGGAGAGACGTGCTGCTTCCAG	823
Query	168995	ATTGCCGCCGATGGCATAAATGCGTCGTCCAAATGCCGTCCGCGTTGCCATAAACATTCC	169054
Sbjct	822	ATTGCCGCCGATGGCATAAATGCGTCGTCCAAATGCCGTCCGCGTTGCCATAAACATTCC	763
Query	169055	GCCGAGTAACAGCAACGTCAGCAGCAGAACAGGAGTGGGAACGCCACGGTAATCATTTCAA	169114

Sbjct	762	 GCCGAGTAACAGCAACGTCAGCAGCAGAACAGGAGTGGGAACGCCACGGTAATCATTCAA	703
Query	169115	CAGCCAGATTGCGCCTAATACGATGATAGCGGTTAAAGCCTGGCGACCGACTACTGCGGT	169174
Sbjct	702	 CAGCCAGATTGCGCCTAATACGATGATAGCGGTTAAAGCCTGGCGACCGACTACTGCGGT	643
Query	169175	AGAGGCCGGAGACTGCAAACCCAAAGCCTGACGGCGCATTCTTCCGCGCCATTGCCAACC	169234
Sbjct	642	 AGAGGCCGGAGACTGTAAACCCAAAGCCTGACGGCGCATTCTTCCGCGCCATTGCCAACC	583
Query	169235	AACAAAAGCCATTAAAGCCAAGCGCGCCAATGATGAAGCCAGTGCTGGCAGGTAGATAGCT	169294
Sbjct	582	 AACAAAAGCCATTAAAGCCAAGCGCGCCAATGATGAAGCCAGTACTGGCGGGGAGATAGCT	523
Query	169295	TTGCCCAATTTGTGACATCGCGGCGCTGGTGGGGGAAACAGTCGTGCCGTTGGTGATGCC	169354
Sbjct	522	 TTGCCCAATTTGTGACATCGCGGCGCTGGTGGGGGATACAGTCGTGCCGTTGGTGATGCC	463
Query	169355	AATGAGTATGCCGCGAAATGCCAACATGCCCGCGAGGGTGACAATAAATGAAGGGACTTT	169414
Sbjct	462	 AATGAGTATGCCGCGAAATGCCAACATGCCCGCGAGGGTGACAATAAATGAAGGGACTTT	403
Query	169415	GCGGTACGCGACCCACCATCCGTTCCAGGCACCGAGAAGCAGTCCCAGAACCAACGTCAC	169474
Sbjct	402	 ACGGTACGCGACCCACCATCCGTTCCAGGCACCGAGAAGCAGTCCCAGAACCAACGTCAC	343
Query	169475	AATGATGGTAAGTGGCAAAGGCCAGCCTAACCCAGACGTCACAAATCGCCGCGACGCCACC	169534
Sbjct	342	 AATGATGGTAAGTGGCAAAGGCCAGCCTAACCCAGACGTCACAAATCGCCGCGACGCCACC	283
Query	169535	TAATAGCCCCATCATTGAGCCGACGGAAGGTCGATTTTCAGCAGAAATATGACGAACAC	169594
Sbjct	282	 TAACAGCCCCATCATTGAGCCGACGGAAGGTCGATTTTCAGCAGAAATATGACGAACAC	223
Query	169595	CATTCTACCGCGAGGATGCCGGTAATCGCGGTCTGGCGTAACAGGTTGGAGACGTTACG	169654
Sbjct	222	 CATTCTACCGCGAGGATGCCGGTAATCGCGGTCTGGCGTAACAGGTTGGAGACGTTACG	163
Query	169655	GGCGCTTAAGTAGGCACCATCCGTTGGTCCAGGTAAGAACAGCATGATTGCGATGATAGC	169714
Sbjct	162	 GGCGCTTAAGTAGGCACCATCCGTTGGTCCAGGTAAGAACAGCATGATTGCGATGATAGC	103
Query	169715	TGCAATCATCACGAAGACCTGCAAATTCAGTGATTTTCAGCCCGGAAAAGCCACCGGATGT	169774
Sbjct	102	 TGCAATCATCACGAAGACCTGCAAATTCAGTGATTTTCAGCCCGGAGAAGCCACCGGATGT	43
Query	169775	CGGTACGGCCAATTTCACTTCAGACGGATTGCTTTTCGACAT	169816
Sbjct	42	 CGGTACGGCCAATTTCACTTCAGACGGATTGCTTTTCGACAT	1

Anexo F

Sequência de nucleotídeos dos plasmídeos pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5 após a inserção dos genes *xyiAB* e *xyiFGH*, respectivamente.

Anexo F – D) Sequência do plasmídeo pBBR1MCS-2 com *xyiAB*

ORIGIN

```
CTCGGGCCGCTCTCTTGGGCTTGATCGGCCTTCTTGCGCATCTCACGCGCTCCTGCGGCGGCCTGTAGGGC
AGGCTCATACCCCTGCCGAACCGCTTTTGTACGCCGCTCGGCCACGGCTTCCGGCGTCTCAACGCGCTT
GAGATTCCCAGCTTTTCGGCCAATCCCTGCGGTGCATAGGCGCGTGGCTCGACCGCTTTCGGGCTGATGG
TGACGTGGCCCACTGGTGGCCGCTCCAGGGCTCGTAGAACGCTGAATGCGCGTGTGACGTGCCCTTGCT
GCCCTCGATGCCCCGTTGACAGCCCTAGATCGGCCACAGCGGCCGCAAACGTGGTCTGGTTCGCGGGTCA
TGCGCTTTGTTGCCGATGAACTCCTTGCCGACAGCCTGCCGTCTGCGTCAGCGGCACCACGAACGCGG
TCATGTGCGGGCTGGTTTCTGTCACGGTGGATGCTGGCCGTCACGATGCGATCCGCCCCGCTACTTGTCCG
CAGCCACTTGTGCGCTTCTCGAAGAAGCGCCGCTGCTGTTCTTGGCTGGCCGACTTCCACCATTCCGGG
CTGGCCGTCATGACGTACTCGACGCCAACACAGCGTCTTGCGCCGCTTCTCTGGCAGCAACTCGCGCA
GTCGGCCCATCGCTTCATCGGTGCTGCTGGCCGCCAGTGTCTGTTCTCTGGCGTCTCTGCTGGCGTCAGC
GTTGGGCGTCTCGCGCTCGCGGTAGGCGTGTCTGAGACTGGCCGCCACGTTGCCCATTTTCGCCAGCTTC
TTGCATCGCATGATCGCGTATGCCGCCATGCTGCCCCCTCCCTTTTGGTGTCCAACCGGCTCGACGGGG
CAGCGCAAGGCGGTGCCTCCGGCGGGCCACTCAATGCTTGAGTATACTCACTAGACTTTGCTTCGCAAG
TCGTGACCGCCTACGGCGGCTGCGGCGCCCTACGGGCTTGCTCTCCGGGCTTCGCCCTGCGCGGTGCTG
CGCTCCCTTGCCAGCCCGTGATATGTGGACGATGGCCGCGAGCGGCCACCGGCTGGCTCGCTTCGCTCG
GCCCCGTGGACAACCTGCTGGACAAGCTGATGGACAGGCTGCGCCTGCCCACGAGCTTGACCACAGGGAT
TGCCACCGGCTACCCAGCCTTCGACCACATACCCACCGGCTCCAACGCGCGGCTGCGGCTTGCCCC
ATCAATTTTTTAATTTTCTCTGGGGAAGGCTCCGGCTGCGGCTGCGCGCTTCGCTTGCCGGTTGG
ACACCAAGTGGAAGGCGGCTCAAGGCTCGCGCAGCGACCGCGCAGCGGCTTGGCTTTCGCGGCTGGA
CGACCAAGCTATGCGAGTGGGGGCGAGTCAAGGCGAAGCCCGCCGCTGCCCCCGGCTGCGCGCTCACGG
GGCGAGTGGGGGTTTCCAAGGGGCGAGCGCCACCTTGGGCAAGGCCGAAGGCCGCGCAGTCGATCAACA
AGCCCCGAGGGGCCACTTTTTGCGGAGGGGGAGCCGCGCCGAAGGCGTGGGGGAACCCCGCAGGGGTG
CCCTTCTTTGGGCACCAAGAACTAGATATAGGGCGAAATGCGAAAGACTTAAAAATCAACAACCTAAAA
AAGGGGGGTACGCAACAGCTCATTCGCGCACCCCCCGCAATAGCTCATTCGCTAGGTAAAGAAAATCTG
TAATTGACTGCCACTTTTACGCAACGCATAATTGTTGTCGCGCTGCCGAAAAGTTGCAGCTGATTGCGCA
TGGTGCCGCAACCGTGCGGCACCTACCGCATGGAGATAAGCATGGCCACGCAGTCCAGAGAAATCGGCA
TTCAAGCCAAGAACAAGCCCGTCACTGGGTGCAAACGGAACGAAAGCGCATGAGGCGTGGGCCGGGCT
TATTGCGAGGAAACCCACGGCGGCAATGCTGCTGCATCACCCTGTTGGCGCAGATGGGCCACCAGAACGCC
GTGGTGGTCAGCCAGAAGACACTTTCCAAGCTCATCGGACGTTCTTTGCGGACGGTCCAATACGCAGTCA
AGGACTTGGTGGCCGAGCGCTGGATCTCCGTGCTGAAGCTCAACGGCCCCGGCACCGTGTGCGCCTACGT
GGTCAATGACCGGTGGCGTGGGGCCAGCCCCCGGACAGTTCGCGCTGTGCGTGTTCAGTGCCGCGCTG
GTGGTTGATCACGACGACGAGGACGAATCGCTGTTGGGGCATGGCGACCTGCGCCGCATCCCGACCTGT
ATCCGGGCGAGCAGCAACTACCGACCGGCCCGGCGAGGAGCCGCCAGCCAGCCCGGCTATCCGGGCAT
GGAACAGACCTGCCAGCCTTGACCGAAACGGAGGAATGGGAACGGCGCGGGCAGCAGCGCTGCCGATG
CCCGATGAGCCGTGTTTTCTGGACGATGGCGAGCCGTTGGAGCCGCCGACACGGGTACGCTGCGCGCC
GGTAGCACTTGGGTTGCGCAGCAACCCGTAAGTGCCTGTTCCAGACTATCGGCTGTAGCCGCTCGCCG
CCCTATACCTTGTCTGCTTCCCGGCTTGGCTGCGGCTGATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGA
AGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTACCGCTTTTATCAGGCTCTGGGAGGCAGAATAAATGATCATAT
CGTCAATTATTACCTCCACGGGGAGAGCCTGAGCAAACTGGCCTCAGGCATTTGAGAAGCACACGGTCA
ACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAACAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCTGCCCT
GAACCGACGACCGGGTCAATTTGCTTTTCGAATTTCTGCCATTTCATCCGCTTATTATCACTTATTCAGG
GTAGCACAGGCGTTTAAAGGACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGC
AGTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAAC
GCTTACAATTTCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGC
TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAAGCCAGGGTTTTCCCA
GTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTC
TTATCCCCCACCCTGGTCAGGCAGGGGATAACGTTTTACGCCATTAAATGGCAGAAGTTGCTGATAGAGGCGA
CGGAACGTTTCTCGTCGTGGCTGATAAGCGGCATAACGCTGCGCATCTGGTAGATGCGACTGTTCTAACG
GTAGTTGCGGCAACAATTCAATGAGCGATTCTCTGGATTTCGCCGATCTGCGCCAGCCTTGCTGCGCC
```

→ *xyiB*

CAGTGTGCGCCCCACATCCCCCCCCGTACGGTAATCGAGCTGCTGACCGCTGATATCCGCCAGCATCTGA
 CGCCAGTACTCACTACGCGCCCCGCCCAATCAACGTAACACTTTTGCAGTTTAAATACCGCAGGCATGCA
 CGACATCCATGCCATCTGCCAGCGCATAACCCACGCCTTCCAGCACTGCTCGCGCCAGTTTATTGGGGCC
 ATGTTGATGAGTCAAACCAAAGAAAAACCCCTTCGCCTGGGGATTATTGTGTGGCGTACGCTCGCCGGAA
 AGATAAGGCAGAAAACAACTGGCTCGGCACTTTCATCAGCCTGTTGAGCTGCAGCGATTAAAGCTGGGA
 CATTGCTCAGGCCGGTTAATTTTCGCGGCCCAATCCAGACACGACGCTGCACCTCAGCATCACAGACATTAA
 ATGCCAACGTTGCGGTAGCGCATGGCAAAAGCTATGTACGGCGCTTTCTGGCTTGCTTAAGAACCCTTCG
 CTGACAGCAAAATAGACCCCCGACGTCCCAGCGATAACATTGCCTGATTAGCATCAACCATTTCCACAC
 CAACTGCACCAGCTGCATTGTGCGCACCGCCTGCGACAACCTGGCACCGTCGCCATACCCACGCTTTTCG
 AACTTCAGGTAACAAAGCACCAGTAATTTTCGCTGCCTTCGTATAATGCGGGCATCTGGTCACGAGATAAG
 TCGCAAGCCTGCAGCATGACGTCACTCCAGTCACGCTTTGCGACATCCAGCCACATGGTGCCAGCTGCGT
 CAGACATATCGCTGGCAAACTCCCCCGTCATACGCAGACGCAAGTAATCTTTTCGGTAATAATACCTTTGTC
 GATTTGACGGAATATCTCCGGCTCATGCCGCTGAACCCATAGCAATTTAGGCGCAGTAAATCCGGGCATC
 ATCAGGTTGCCGGTAATCACCCGCGATTGCGGAACTCGCGCTTCCAGCAAAGTGCACTCTTGCGCACAGC
 GCCGCTCGTTCCACAAAATGGCAGGGCGTAACACCCGTTGCTGAGCATCCAGCAAGTTGCTCCGTGCAT
 CTGGCCGGCAATACCCAATGCTTTAACGTCCTGCAGAGAATGCTGATCGCCAGAGCTTTTATTGCGCGA
 TCAGTTGCCTGCCACCACTGTTCCGGGTCTTGTTCGACAGAGTGGATGCGGGCGGAAACGGTCAGCT
 TTTCCGTTTTCGCGAGCAACCACTCACCTGCTCGTTGAGCAAAAATAACTTTTACGCCCGAGGTGCCAAG
 ATCTATCCCGATATACATATCGATCGTTCCCTTAAAAAAATGCCCGGTATCGCTACCGATAACCGGGCCAA
 CGGACTGCACAGTTAGCCGTTATTTGTGCGAACAGATAATGGTTTACCAGATTTTCCAGTTGTTCTGGCG
 ACCACTCTGATGCACCGGAGACAAATGATGTTCTGAGCATATTTGGCTAAATCTGCCAGTGACATTTGG
 CCTTTAGGATTTGCTGGCCCAATTCGCTATTCCAGCCGGAATAACGTCGCGCATGCGTTTATCCAGCT
 CGCCATCTTCAATCATGCGCGCTGCAATTTTCAGCGCCAGTGCCATCGTATCCATCGCGCCGATATGACC
 GTAAACAGATCATATTTATCAGTACTTTGACGACGTACTTTGGCATCGAAGTTCAGACCACCGGTGGTG
 AAACCGCTGCTTTGAGAATTTATACATCACCAGCGCATTTCTTCCACACTGTTTCGGGAACCTGGTCGG
 TGTCCAGCCAGTTGCGCATCGCCACGGTTGGCGTCGACAGAACCGAACAGGCCAAGCGCAATGGCGGT
 GGCTATTTTCATGATGGAAGAGTGACCTGCCAGCGTCGCGTGGTTAGCTTCAATGTTTCAATTTAATCTCT
 TTTTCCAGACCAAACTGTTTTCAGGAAGCCATAGACCGTCGCGGCATCGTAATCATATTGATGTTTGGTTCG
 GTTCTTGCGGTTTCGGTTCGATAAGCAACGTGCCCTGGAAACCGATTTTATGTTTATGCTCAACCACCAT
 CTGCATAAAGCGGCCAGTTGTTTACGCTCCTGACGCAAGTCGGTATTTAACAGCGTTTCGTAACCTTCA
 CGACCGCCCCACAGGACATAGTTTTCACCGCCCAATTTATGGGTTGCTTCCATCGCTGTAACAACTTGCG
 TTGCCGCCAGCTGAAGACTTCAGGATCTGGGTTTCGTCGCCGACCCGCGCCGTAGCGAGGGTTTGTA
 GCAGTTGGCGGTTCCCCACAGCAGCTTACGCGCTCTCTTCTTGCCTGCCAGGACATCAACCAT
 TGCGCAAAATTTATGATGTACTCTTTAACGACGCGCCCTCAGGGGAAACATCCACATCGTGGAAGCAAT
 AAAATGGCACATGTAACCTGTGGAAGAACTCAAATGCGACATCTGCTTTACGCTTCGCCACGCCAGTGC
 CTCACCGGCTGCTGCCACGGACGATTAAACGCCCCACACCAACATATCCGCCCGCTTCCAGCAAG
 GTGTGCCAGTAGCAGGCGGCAAAACGCAAGTGCTCTTCCATACGCTTACCCAACACCACTTCGTGCGGGAT
 TGTAAGTACGGAATGCTAACGGGTTTGGAGGATTTTGGAGCTTTCATAACGAACGCGATCGAGCTGGTCAA
 ATAGGCTTGCATATTGAACTCCATAATCAGGTAATGCCGCGGGTGATGGATGGTACCACCGCGGTGGCG
 GCCGCTCTAGAACTAGTGATCCCCGGGTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAACCGTCGACCT
 CGAGGGGGGGCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATG
 GTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACAAACATACGAGCCGGAAGCATA
 AAGTGTAAGCGCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTT
 TCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCG
 TATTGGGCGCATGCATAAAAACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCGCGGACATGGAAGCCATCACAAACG
 GCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCTTGCCTATAATATTTGCCCATGGGGG
 TGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAAACGATTC
 CGAAGCCCAACCTTTTCATAGAAGGCGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGGGCGTCGCTTG
 GTCGGTCATTTCAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCT
 GCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCATTCGCCGCCAAGCTCTTACAG
 AATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAAT
 CCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACAGACGAGATCCT
 CGCGCTCGGGCATGCGCGCTTGAGCTTGCGGAACAGTTTCGGCTGGCGCGAGCCCTGATGCTCTTCGTC
 CAGATCATCTGATCGACAAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTTCGCTTGG
 TGGTCAATGGGCGAGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCGCATTTGCATCAGCCATGATGGATACTT
 TCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCT
 TCCGCTTCAGTGACAACGTGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGC
 GCTGCTCGTCTGCGATTTCATTAGGGCACCGGACAGGTGCGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCCCT
 GCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAG
 CCTCTCACCCAAGCGGCCGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCTCAT
 CCTGTCTCTTGATCAGATCTTGATCCCTGCGCCATCAGATCCTTGGCGGCAAGAAAGCCATCCAGTTTA

→ *xylA*

CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATTCCGGTTCGCTTGCTGTCCATAA
 AACCGCCCAGTCTAGCTATCGCCATGTAAGCCCACTGCAAGCTACCTGCTTCTCTTTGCGCTTGCGTTT
 TCCCTTGTCCAGATAGCCAGTAGCTGACATTCATCCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGCCC
 GCGTTCTGCTGGCGCTGGGCCTGTTTCTGGCGCTGGACTTCCCGCTGTTCCGTGAGCAGCTTTTCGCCC
 ACGGCCTTGATGATCGCGGCGGCTTGGCTGCATATCCCGATTCAACGGCCCCAGGGCGTCCAGAACGG
 GCTTCAGGCGCTCCCGAAGGT

azul: genes; amarelo: promotor *lacZ*; verde: iniciadores; vermelho: sítios de restrição

Anexo F – II) Sequência do plasmídeo pBBR1MCS-5 com *xyFGH*

ORIGIN

ACCTTCGGGAGCGCCTGAAGCCCGTTCTGGACGCCCTGGGGCCGTTGAATCGGGATATGCAGGCCAAGGC
 CGCCGCGATCATCAAGGCCGTGGGCGAAAAGCTGCTGACGGAACAGCGGGAAGTCCAGCGCCAGAAACAG
 GCCCAGCGCCAGCAGGAACGCGGGCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGGCGGCGTTGTGACAAT
 TTACCGAACAACCTCCGCGGCCGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGT
 CGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACC
 GTAATCTGCTTGACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGC
 GCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCG
 GCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCTGAAGGCAGCAAG
 CGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTG
 GCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTGTGACTTGGTCAGGGCCGA
 GCCTACATGTGCGAATGATGCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGT
 AACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGC
 TTGCTGCTTGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACT
 GCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATT
 ACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCTGTCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCC
 ATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTTT
 GTGATGGCTTCCATGTGCGCAGAAATGCTTAATGAATTACAACAGTTTTTATGCATGCGCCCAATACGCAA
 ACCGCCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCG
 GGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGC TTTACACTTTATGC
 TTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGA
 TTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTC
 GACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTTGCAGCCCGGG GTCGACTACAGAAGGCCCTACACCATGA
 AAATAAAGAACATTCTACTCACCCCTTGCACCTCACTCCTGCTTACCAACGTTGCTGCACACGCCAAAGA
 AGTCAAAATAGGTATGGCGATTGATGATCTCCGTCTTGAACGCTGGCAAAAAGATCGAGATATCTTTGTG
 AAAAAGGCAGAAATCTCTCGGCGCGAAAGTATTTGTACAGTCTGCAAAATGGCAATGAAGAAACACAAATGT
 CGCAGATTGAAAACATGATAAACCGGGGTGTCGATGTTCTTGTCAATTATTCCGTATAACGGTCAGGTATT
 AAGTAACGTTGTAAAAGAAGCCAAACAAGAAGGCATTAAAGTATTAGCTTACGACCGTATGATTAAC GAT
 GCGGATATCGATTTTTATATTTCTTTTCGATAACGAAAAAGTCGGTGAAGTGCAGGCAAAAGCCCTGGTTCG
 ATATTGTTCCGCAAGGTAATTACTTCCTGATGGGCGGCTCGCCGGTAGATAACAACGCCAAGCTGTTCCG

→ *xyIF*

CGCCGGACAAATGAAAGTGTTAAAACCTTACGTTGATTCCGGAAAAATTAAAGTCGTTGGTGACCAATGG
 GTTGATGGCTGGTTACCGGAAAACGCATTGAAAATTATGGAAAACGCGCTAACCGCCAATAATAACAAAA
 TTGATGCTGTAGTTGCCTCAAACGATGCCACCGCAGGTGGGGCAATTTCAGGCATTAAAGCGCGCAAGGTTT
 ATCAGGGAAAAGTAGCAATCTCCGGCCAGGATGCGGATCTCGCAGGTATTAAACGTATTGCTGCCGGTACG
 CAAACTATGACGGTGTATAAACCTATTACGTTGTTGGCAAATACTGCCGCAGAAATTGCCGTTGAGTTGG
 GCAATGGTCAGGAACCAAAAAGCAGATACCACACTGAATAATGGCCTGAAAGATGTCCCTCCCGCCTCCT
 GACACCGATCGATGTGAATAAAAAACAACATCAAAGATACGGTAATTAAAGACGGATTCCACAAAGAGAGC
 GAGCTGTAA GCGTTACGCCCCAGCGCGGAGCGGGGGCGTGATTTCTCTCCATGCCGCGTGAATGAATTGG
 CTTAGGTGGAGTCGTT

ATGCCTTATCTACTTGAAATGAAGAACATTACCAAAACCTTCGGCAGTGTGAAG
 GCGATTGATAACGTCTGCTTGGGTTGAATGCTGGCGAAATCGTCTCACTTTGTGGGGAAAATGGGTCTG
 GTAAATCAACGCTGATGAAAGTGCTGTGTGGTATTTATCCCCATGGCTCCTACGAAGGCGAAATTATTTT
 TCGCGGAGAAGAGATTTCAGGCGAGTCACATCCGCGATACCGAACGAAAGGTATCGCCATCA TTCATCAG
 GAATTGGCCCTGGTGAAAGAATTGACCGTGCTGGAAAATATCTTCCTGGGTAACGAAATAACCCACAATG
 GCATTATGGATTATGACCTGATGACGCTACGCTGTGAGAAGCTGCTCGCACAGGTGAGTTTATCCATTTT
 ACCTGATACCCGCGTTGGCGATTTAGGGCTTGGGCAACAACAACCTGGTTGAAATTGCCAAGGCACTTAAT
 AAACAGGTGCGCTTGTTAATTCTCGATGAACCGACAGCCTCATTAACGAGCAGGAAACGTCGATTTTAC
 TGGATATTATTTCGCGATCTACAACAGCACGGTATCGCCTGTATTTATATTTCGCACAAACTCAACGAAGT
 CAAAGCGATTTCCGATACGATTTGCGTTATTCGCGACGGACAGCACATTGGTACGCGTGATGCTGCCGGA
 ATGAGTGAAGACGATATTATCACCATGATGGTCGGGCGAGAGTTAACCGCGCTTTACCCTAATGAACCAC
 ATACCACCGGAGATGAAATATTACGTATTGAACATCTGACGGCATGGCATCCGGTTAATCGTCATATTAA
 ACGAGTTAATGATGTCTCGTTTTCCCTGAAACGTGGCGAAATATTGGGTATTGCCGGACTCGTTGGTGCC
 GGACGTACCGAGACCATTCAGTGCCTGTTTGGTGTGTGGCCCGACAATGGGAAGGAAAAATTTATATTG
 ATGGCAAACAGGTAGATATTCTGTAACGTGTCAGCAAGCCATCGCCAGGGGATTGCGATGG TCCCCGAAGA
 CAGAAAGCGCGACGGCATCGTTCCGTAATGGCGGTTGGTAAAAATATTACCCTCGCCGCACTCAATAAA
 TTTACCGGTGGCATTAGCCAGCTTGATGACGCGGCAGAGCAAAAATGTATTCTGGAATCAATCCAGCAAC
 TCAAAGTTAAAACGTGCTCCCCGACCTTGCTATTGGACGTTTGAGCGGCGGCAATCAGCAAAAAGCGAT
 CCTCGCTCGCTGTCTGTTACTTAACCCGCGCATTTCTCATTCTTGATGAACCCACCAGGGGTATCGATATT
 GCGCGGAAATACGAGATCTACAAATTAATTAACCAACTCGTCCAGCAGGGTATTGCCGTTATTGTCATCT
 CTTCCGAATTACCTGAAGTGCTCGGCCTTAGCGATCGTGACTGGTGATGCATGAAGGGAACTAAAAGC
 CAACCTGATAAATCATAACCTGACTCAGGAGCAGGTGATGGAAGCCGCATTGAGGAGCGAACATCATGTC
 GAAAAGCAATCCGCTCTGA

→ *xyIG*

AGTGAAATTGGCCGTACCGACATCCGGTGGCTTCTCCGGGCTGAAATCACTG
 AATTTCAGGTCTTCGTGATGATTGCAGCTATCATCGCAATCATGCTGTTCTTTACCTGGACCACCGATG
 GTGCCTACTTAAGCGCCCGTAACGTCTCCAACCTGTTACGCCAGACCGCGATTACCGGCATCCTCGCGGT
 AGGAATGGTGTTCGTCATAATTTCTGCTGAAATCGACCTTTCCGTCGGCTCAATGATGGGGCTGTTAGGT
 GGCGTCGCGGCGATTTGTGACGTCTGGTTAGGCTGGCCTTTGCCACTTACCATCATTTGTGACGCTGGTTC
 TGGGACTGCTTCTCGGTGCCGTGAACGGATGGTGGGTGCGGTACCGTAAAGTCCCTTCATTTATTGTCAC
 CCTCGCGGGCATGTTGGCATTTCGCGGCATACTCATTTGGCATCACCAACGGCACGACTGTATCCCCACC
 AGCGCCGCGATGTCACAAATTGGGCAAAGCTATCTCCCCGCCAGTACCGGCTTCATCATTTGGCGCGCTTG
 GCTTAATGGCTTTTGTGGTTGGCAATGGCGCGGAAGAATGCGCCGTGAGGCTTTGGGTTTACAGTCTCC
 GGCTCTACCGCAGTAGTCGGTCGCCAGGCTTTAACCGCTATCATCGTATTAGGCGCAATCTGGCTGTTG
 AATGATTACCGTGGCGTTCCCACTCCTGTTCTGCTGCTGACGTTGCTGTTACTCGGCGGAATGTTTATGG

→ *xyIH*

CAACGCGGACGGCATTGACGACGCATTTATGCCATCGGCGGCAATCTGGAAGCAGCACGTCTCTCCGG
 GATTAACGTTGAACGCACCAAACCTGCCGTGTTGCGGATTAACGGATTAATGGTAGCCATCGCCGGATTA
 ATCCTTAGTTCTCGACTTGGCGCTGGTTACCTTCTGCGGGAAATATCGCCGAACCTGGACGCAATTGCAG
 CATGCGTGATTGGCGGCACCAGCCTGGCTGGCGGTGTGGGAAGCGTTGCCGGAGCAGTAATGGGGGCATT
 TATCATGGCTTCACTGGATAACGGCATGAGTATGATGGATGTACCGACCTTCTGGCAGTATATCGTTAAA
 GGTGCGATTCTGTTGCTGGCAGTATGGATGGACTCCGCAACCAAACGCCGTTCTTGAATTTTGATAAAAAT
 TTTCTCAAAGCCGGTTACGTATTACCGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCA
 ATTGCCCCATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAA
 CCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
 GCGCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATAT
 TTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGACTGCGATGAG
 TGGCAGGGCGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTGCTACGCCTGAAT
 AAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGAAAGCAAATTCGACCCGGTCGTGGTTTCAGGGCAGG
 GTCGTTAAATAGCCGCTTATGTCTATTGCTGGTTTACCGGTTTATTGACTACCGGAAGCAGTGACCGT
 GTGCTTCTCAAATGCCTGAGGCCAGTTTGCTCAGGCTCTCCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATATGATC
 ATTTATTCTGCCTCCAGAGCCTGATAAAAACGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCATTCA
 GGTGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAGGTATAGGGCGGCGAGG
 CGGCTACAGCCGATAGTCTGGAACAGCGCACTTACGGGTTGCTGCGCAACCCAAGTGCTACCGGCGCGGC
 AGCGTGACCCGTGTGCGCGGCTCCAACGGCTCGCCATCGTCCAGAAAACACGGCTCATCGGGCATCGGCA
 GCGCTGCTGCCCGCGCCGTTCCCATTCCTCCGTTTCGGTCAAGGCTGGCAGGTCTGGTTCCATGCCCGG
 AATGCCGGGCTGGCTGGGCGGCTCCTCGCCGGGGCCGGTCGGTAGTTGCTGCTCGCCCGGATACAGGGTC
 GGGATGCGGCGCAGGTGCCATGCCCCAACAGCGATTTCGTCTGGTCTGCTGATCAACCACCACGGCGG
 CACTGAACACCGACAGGCGCAACTGGTCGCGGGGCTGGCCCCACGCCACGCGGTCAATTGACCACGTAGGC
 CGACACGGTGCCGGGGCCGTTGAGCTTCACGACGGAGATCCAGCGCTCGGCCACCAAGTCCTTGACTGCG
 TATTGGACCGTCCGCAAAGAACGTCCGATGAGCTTGGAAGTGTCTTCTGGCTGACCACCACGGCGTTCT
 GGTGGCCCATCTGCGCCACGAGGTGATGCAGCAGCATTGCCGCCGTGGGTTTCTCTCGCAATAAGCCCGGC
 CCACGCCTCATGCGCTTTGCGTTCCGTTTGACCCAGTGACCGGGCTTGTCTTGGCTTGAATGCCGATT
 TCTCTGGAAGTGGTGGCCATGCTTATCTCCATGCGGTAGGGTGCCGCACGGTTGCGGCACCATGCGCAAT
 CAGCTGCAACTTTTCGGCAGCGCGACAACAATTATGCGTTGCGTAAAAGTGGCAGTCAATTACAGATTTT
 CTTTAACCTACGCAATGAGCTATTGCGGGGGGTGCCGCAATGAGCTGTTGCGTACCCCCCTTTTTTAAGT
 TGTTGATTTTTTAAGTCTTTTCGCATTTTCGCCCTATATCTAGTTCTTTGGTGCCCAAAGAAGGGCACCCCTG
 CGGGGTTCCCCCACGCCTTCGGCGCGGCTCCCCCTCCGGCAAAAAGTGGCCCTCCGGGGCTTGTGATC
 GACTGCGCGGCTTCGGCCTTGCCCAAGGTGGCGCTGCCCCCTTGGAACCCCCGCACTCGCCGCCGTGAG
 GCTCGGGGGGCGAGCGGGCGGGCTTCGCCTTCGACTGCCCCACTCGCATAGGCTTGGGTGCTTCCAGGC
 GCGTCAAGGCCAAGCCGCTGCGCGGTGCTGCGCGAGCCTTGACCCGCCTTCCACTTGGTGTTCAACCGG
 CAAGCGAAGCGCGCAGGCCGAGGCCGAGGCTTTTCCCCAGAGAAAATTAAAAAAATTGATGGGGCAAG
 GCCGAGGCCGCGCAGTTGGAGCCGGTGGGTATGTGGTGAAGGCTGGGTAGCCGGTGGGCAATCCCTGT
 GGTCAAGCTCGTGGGCAGGCGCAGCCTGTCCATCAGCTTGTCCAGCAGGGTGTCCACGGGCGAGCGAA
 GCGAGCCAGCCGGTGGCCGCTCGCGGCCATCGTCCACATATCCACGGGCTGGCAAGGGAGCGCAGCGACC
 GCGCAGGGCGAAGCCCGGAGAGCAAGCCCGTAGGGCGCCGAGCCGCCGTAGGCGGTACGACTTTGCGA
 AGCAAAGTCTAGTGAGTATACTCAAGCATTGAGTGCCCGCCGAGGCACCGCCTTGCGCTGCCCCCGTC

GAGCCGGTTGGACACCAAAAGGGAGGGGCAGGCATGGCGGCATACGCGATCATGCGATGCAAGAAGCTGG
 CGAAAATGGGCAACGTGGCGGCCAGTCTCAAGCACGCCCTACCGCGAGCGCGAGACGCCCAACGCTGACGC
 CAGCAGGACGCCAGAGAACGAGCACTGGGCGGCCAGCAGCACCGATGAAGCGATGGGCCGACTGCGCGAG
 TTGCTGCCAGAGAAGCGGCGCAAGGACGCTGTGTTGGCGGTCGAGTACGTCATGACGGCCAGCCCGGAAT
 GGTGGAAGTCGGCCAGCCAAGAACAGCAGGCGGCGTTCTTCGAGAAGGCGCACAAAGTGGCTGGCGGACAA
 GTACGGGGCGGATCGCATCGTGACGGCCAGCATCCACCGTGACGAAACCAGCCCGCACATGACCGCGTTC
 GTGGTGCCGCTGACGCAGGACGGCAGGCTGTCGGCCAAGGAGTTCATCGGCAACAAAGCGCAGATGACCC
 GCGACCAGACCACGTTTTCGGGCCGCTGTGGCCGATCTAGGGCTGCAACGGGGCATCGAGGGCAGCAAGGC
 ACGTCACACGCGCATTCAGGCGTTCTACGAGGCCCTGGAGCGGCCACCAGTGGGCCACGTCACCATCAGC
 CCGCAAGCGGTTCGAGCCACGCGCCTATGCACCGCAGGGATTGGCCGAAAAGCTGGGAATCTCAAAGCGCG
 TTGAGACGCCGGAAGCCGTGGCCGACCGGCTGACAAAAGCGGTTTCGGCAGGGGTATGAGCCTGCCCTACA
 GGCCGCCGCAGGAGCGCGTGAGATGCGCAAGAAGGCCGATCAAGCCCAAGAGACGGCCCGAG

Azul: genes; amarelo: promotor *lacZ*; verde: iniciadores; vermelho: sítios de restrição

Anexo G

Alinhamento das sequências obtidas do sequenciamento de *xylAB* e *xylFGH* com sequências homólogas presentes no banco de dados do NCBI.

Anexo G – I) Sequência obtida do sequenciamento de *xylAB* com iniciador *reverse* para esse operon.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
ZP_06934532.1	xylose isomerase [Escherichia coli OP50]	361	361	100%	9e-126	98%
EGC10472.1	xylose isomerase [Escherichia coli E1167]	361	361	100%	1e-123	98%
YP_859171.2	xylA gene product [Escherichia coli APEC O1]	361	361	100%	1e-123	98%
YP_671543.1	xylose isomerase [Escherichia coli 536] >ref YP_001460360.1	361	361	100%	1e-123	98%
NP_290150.1	xylA gene product [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933] >re	361	361	100%	1e-123	98%
NP_418022.1	D-xylose isomerase [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]	361	361	100%	1e-123	98%
ZP_07164274.1	xylose isomerase [Escherichia coli MS 116-1] >ref ZP_071698	361	361	100%	1e-123	98%
ZP_04001537.1	xylose isomerase [Escherichia coli 83972] >ref ZP_07102175.	361	361	100%	1e-123	98%
EGB70131.1	xylose isomerase [Escherichia coli TW10509]	360	360	100%	3e-123	98%
EGX20703.1	xylose isomerase [Escherichia coli TX1999]	359	359	100%	5e-123	98%
ZP_06664294.1	xylose isomerase [Escherichia coli B088] >gb EFE61432.1 xyl	359	359	100%	5e-123	98%
YP_002414718.1	xylose isomerase [Escherichia coli UMN026] >ref ZP_0665111.	359	359	100%	7e-123	98%
ZP_07117034.1	xylose isomerase [Escherichia coli MS 198-1] >ref ZP_071843	359	359	100%	8e-123	98%
YP_003231930.1	xylose isomerase [Escherichia coli O26:H11 str. 11368] >gb E	358	358	100%	1e-122	98%
YP_001465041.1	xylose isomerase [Escherichia coli E24377A] >ref ZP_0302715	358	358	100%	1e-122	98%
ZP_07095431.1	xylose isomerase [Escherichia coli MS 107-1] >ref ZP_071415	358	358	100%	1e-122	98%
EGI25129.1	xylose isomerase [Escherichia coli TA206]	358	358	100%	1e-122	98%
EGP23107.1	Xylose isomerase [Escherichia coli PCN033]	357	357	100%	3e-122	97%
YP_003236698.1	D-xylose isomerase XylA [Escherichia coli O111:H- str. 11128]	357	357	100%	3e-122	97%
EGI39362.1	xylose isomerase [Escherichia coli TA280]	357	357	100%	3e-122	97%
ZP_06655668.1	xylose isomerase [Escherichia coli B354] >gb EFF11140.1 xyl	357	357	100%	6e-122	97%

```

>[ref|ZP_06934532.1| xylose isomerase [Escherichia coli OP50]
Length=290

Score = 361 bits (926), Expect = 9e-126
Identities = 169/172 (98%), Positives = 169/172 (98%), Gaps = 0/172 (0%)
Frame = +1

Query 1 DQLDRVRYEGSKSSNPLAFRHYNPDELVLGKRMEEHLRFAACYWHTFCWNGXDMXGVGAF 180
Sbjct 6 DQLDRVRYEGSKSSNPLAFRHYNPDELVLGKRMEEHLRFAACYWHTFCWNG DM GVGAF 65

Query 181 NRPWQQPGEALALAKRKADVAFFHHKLHVPFYCFHDVDVSPGASLKEYINNFAQMVDV 360
Sbjct 66 NRPWQQPGEALALAKRKADVAFFHHKLHVPFYCFHDVDVSPGASLKEYINNFAQMVDV 125

Query 361 LAGKQEEESGVKLLWGTXNCFINPRYGAGAAATNPDPEVFSWAATQVVVTAMEAT 516
Sbjct 126 LAGKQEEESGVKLLWGT NCFINPRYGAGAAATNPDPEVFSWAATQVVVTAMEAT 177

>[gb|EGC10472.1| xylose isomerase [Escherichia coli E1167]
Length=440

Score = 361 bits (926), Expect = 1e-123
Identities = 169/172 (98%), Positives = 169/172 (98%), Gaps = 0/172 (0%)
Frame = +1

Query 1 DQLDRVRYEGSKSSNPLAFRHYNPDELVLGKRMEEHLRFAACYWHTFCWNGXDMXGVGAF 180
Sbjct 6 DQLDRVRYEGSKSSNPLAFRHYNPDELVLGKRMEEHLRFAACYWHTFCWNG DM GVGAF 65

Query 181 NRPWQQPGEALALAKRKADVAFFHHKLHVPFYCFHDVDVSPGASLKEYINNFAQMVDV 360
Sbjct 66 NRPWQQPGEALALAKRKADVAFFHHKLHVPFYCFHDVDVSPGASLKEYINNFAQMVDV 125

Query 361 LAGKQEEESGVKLLWGTXNCFINPRYGAGAAATNPDPEVFSWAATQVVVTAMEAT 516
Sbjct 126 LAGKQEEESGVKLLWGT NCFINPRYGAGAAATNPDPEVFSWAATQVVVTAMEAT 177

```

Anexo G – II) Sequência obtida do sequenciamento de *xylAB* com iniciador *forward* para esse operon.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EFZ46606.1	xylulokinase [Escherichia coli E128010]	346	346	99%	1e-116	99%
ZP_07120711.1	xylulokinase [Escherichia coli MS 84-1] >ref ZP_07210726.1	346	346	99%	1e-116	99%
ZP_03027139.1	xylulokinase [Escherichia coli B7A] >ref ZP_03042973.1 xylul	346	346	99%	1e-116	99%
YP_001465040.1	xylulokinase [Escherichia coli E24377A] >ref ZP_07141506.1	346	346	99%	1e-116	99%
EFZ59851.1	xylulokinase [Escherichia coli LT-68]	344	344	99%	4e-116	99%
EFU44755.1	carbohydrate kinase, FGGY family protein [Escherichia coli MS	336	336	99%	7e-116	98%
EGX02253.1	xylulokinase [Escherichia coli STEC_MHI813]	340	340	99%	1e-114	99%
EGB31263.1	xylulokinase [Escherichia coli E1520] >gb EGB35743.1 xylulok	340	340	99%	1e-114	99%
EFZ74675.1	xylulokinase [Escherichia coli RN587/1]	340	340	99%	1e-114	98%
EGI19293.1	xylulokinase [Escherichia coli M718]	340	340	99%	1e-114	98%
ZP_07136883.1	xylulokinase [Escherichia coli MS 115-1] >gb EFJ95892.1 xyl	340	340	99%	1e-114	99%
ZP_06659649.1	xylulokinase [Escherichia coli B185] >gb EFF04573.1 xylulokin	340	340	99%	1e-114	99%
NP_290149.1	xylB gene product [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933] >re	340	340	99%	1e-114	99%
NP_418021.1	xylulokinase [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655] >ref	340	340	99%	1e-114	99%
YP_001460359.1	xylulokinase [Escherichia coli HS] >ref ZP_02999342.1 xylulo	340	340	99%	1e-114	99%
EGW64158.1	xylulokinase [Escherichia coli STEC_C165-02]	340	340	99%	3e-114	99%
EGP23106.1	Xylulose kinase [Escherichia coli PCN033]	340	340	99%	3e-114	99%
EGB70132.1	xylulokinase [Escherichia coli TW10509]	340	340	99%	3e-114	99%
ZP_06655667.1	xylulokinase [Escherichia coli B354] >gb EFF11139.1 xylulokin	340	340	99%	3e-114	99%
YP_002414717.1	xylulokinase [Escherichia coli UMN026] >ref ZP_06651111.1 :	340	340	99%	3e-114	99%
EFW68556.1	Xylulose kinase [Escherichia coli WV_060327]	339	339	99%	6e-114	98%
YP_002400065.1	xylulokinase [Escherichia coli ED1a] >gb EGI25128.1 xylulokin	339	339	99%	6e-114	98%
YP_002331280.1	xylB gene product [Escherichia coli O127:H6 str. E2348/69]	339	339	99%	6e-114	98%
ZP_07184385.1	xylulokinase [Escherichia coli MS 69-1] >gb EFJ82382.1 xylul	338	338	99%	1e-113	98%
YP_001723159.1	unnamed protein product [Escherichia coli ATCC 8739]	338	338	99%	1e-113	98%
ZP_07782304.1	xylulokinase [Escherichia coli 2362-75] >gb EFR15261.1 xylu	337	337	99%	2e-113	98%
EGI48810.1	xylulokinase [Escherichia coli H299]	337	337	99%	2e-113	98%
EGH38141.1	xylulose kinase [Escherichia coli AA86] >gb EGI14037.1 xylul	337	337	99%	2e-113	98%
EGB76578.1	xylulokinase [Escherichia coli MS 57-2]	337	337	99%	3e-113	98%

```
>gb|EF246606.1| xylulokinase [Escherichia coli E128010]
Length=484

Score = 346 bits (887), Expect = 1e-116
Identities = 199/200 (99%), Positives = 199/200 (99%), Gaps = 0/200 (0%)
Frame = -3

Query 601 ALPQRWHLMSVMLSAAASCLDWVAKLTGLCNVPALIAAAQQADESAPVWFLPYLSGERTP 422
Sbjct 280 ALPQRWHLMSVMLSAAASCLDWVAKLTGLCNVPALIAAAQQADESAPVWFLPYLSGERTP 339

Query 421 HNNPQAKGVFFGLTHQHGPNELARAVLEGVGYALADGMDVVHACGIKPQSVTLIGGGARS 242
Sbjct 340 HNNPQAKGVFFGLTHQHGPNELARAVLEGVGYALADGMDVVHACGIKPQSVTLIGGGARS 399

Query 241 EYWRQMLADISGQQLDYRTGGDVGPalgaarlaqiaANPEKsliellpqlpleqshLPDA 62
Sbjct 400 EYWRQMLADISGQQLDYRTGGDVGPalgaarlaqiaANPEKsliellpqlpleqshLPDA 459

Query 61 QRYAXYQPRRETFRRLYQQL 2
Sbjct 460 QRYAAYQPRRETFRRLYQQL 479
```

```
>ref|ZP_07120711.1| xylulokinase [Escherichia coli MS 84-1]
ref|ZP_07210726.1| xylulokinase [Escherichia coli MS 124-1]
gb|EFJ88722.1| xylulokinase [Escherichia coli MS 84-1]
gb|EFK67855.1| xylulokinase [Escherichia coli MS 124-1]
gb|EFU34062.1| xylulokinase [Escherichia coli MS 85-1]
gb|EGX20702.1| xylulokinase [Escherichia coli TX1999]
Length=484

Score = 346 bits (887), Expect = 1e-116
Identities = 199/200 (99%), Positives = 199/200 (99%), Gaps = 0/200 (0%)
Frame = -3

Query 601 ALPQRWHLMSVMLSAAASCLDWVAKLTGLCNVPALIAAAQQADESAPVWFLPYLSGERTP 422
Sbjct 280 ALPQRWHLMSVMLSAAASCLDWVAKLTGLCNVPALIAAAQQADESAPVWFLPYLSGERTP 339

Query 421 HNNPQAKGVFFGLTHQHGPNELARAVLEGVGYALADGMDVVHACGIKPQSVTLIGGGARS 242
Sbjct 340 HNNPQAKGVFFGLTHQHGPNELARAVLEGVGYALADGMDVVHACGIKPQSVTLIGGGARS 399

Query 241 EYWRQMLADISGQQLDYRTGGDVGPalgaarlaqiaANPEKsliellpqlpleqshLPDA 62
Sbjct 400 EYWRQMLADISGQQLDYRTGGDVGPalgaarlaqiaANPEKsliellpqlpleqshLPDA 459

Query 61 QRYAXYQPRRETFRRLYQQL 2
Sbjct 460 QRYAAYQPRRETFRRLYQQL 479
```

Anexo G – III) Sequência obtida do sequenciamento de *xylFGH* com iniciador *forward* para esse operon.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
ZP_07182487.1	conserved hypothetical protein [Escherichia coli MS 196-1] >	119	119	96%	1e-33	70%
EGP23108.1	D-xylose-binding periplasmic protein [Escherichia coli PCN033]	119	119	96%	1e-32	70%
EF274673.1	D-xylose ABC transporter, D-xylose-binding protein [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	119	119	96%	1e-32	70%
EFZ59853.1	D-xylose ABC transporter, D-xylose-binding protein [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	119	119	96%	1e-32	70%
EFZ41649.1	D-xylose ABC transporter, D-xylose-binding protein [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	119	119	96%	1e-32	70%
EFW75993.1	Xylose ABC transporter, periplasmic xylose-binding protein XylF [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	119	119	96%	1e-32	70%
ZP_07152027.1	D-xylose ABC transporter, D-xylose-binding protein [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	119	119	96%	1e-32	70%
YP_002414719.1	D-xylose transporter subunit XylF [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	119	119	96%	1e-32	70%
ZP_02999819.1	D-xylose ABC transporter, periplasmic D-xylose-binding protein [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	119	119	96%	1e-32	70%
ZP_02822411.1	D-xylose ABC transporter, periplasmic D-xylose-binding protein [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	119	119	96%	1e-32	70%
YP_001460361.1	D-xylose transporter subunit XylF [Escherichia coli HS] >ref Y	119	119	96%	1e-32	70%
YP_671544.1	D-xylose transporter subunit XylF [Escherichia coli 536] >ref Y	119	119	96%	1e-32	70%
NP_290151.1	xylF gene product [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933] >re	119	119	96%	1e-32	70%
NP_418023.1	D-xylose transporter subunit [Escherichia coli str. K-12 substr	119	119	96%	1e-32	70%
NP_756248.1	D-xylose transporter subunit XylF [Escherichia coli CFT073] >	119	119	96%	2e-32	70%

>[gb|EF274673.1|](#) D-xylose ABC transporter, D-xylose-binding protein [Escherichia coli RN587/1]
Length=330

Score = 119 bits (298), Expect = 1e-32
Identities = 66/94 (70%), Positives = 72/94 (77%), Gaps = 1/94 (1%)
Frame = +2

```
Query 11  LGMAVDDLRLDAGMPLR-YFCEKGXISRLKVFVXSANGNEXPQMSQIEXXIBRGVXVLVW 187
          +GMA+DDLRL+   R F +K   KV FV SANGNE QMSQIE I+RGV VLV+
Sbjct 28  IGMAIDDLRLERWQKDRDIFVKKAESLGAKVFVQSANGNEETQMSQIENMINRGVDVLVI 87

Query 188 IPYNGQVLSNVVKKAKQEGIKVLPYDRMINDADI 289
          IPYNGQVLSNVVK AKQEGIKVL YDRMINDADI
Sbjct 88  IPYNGQVLSNVVKEAKQEGIKVLAYDRMINDADI 121
```

>[gb|EF259853.1|](#) D-xylose ABC transporter, D-xylose-binding protein [Escherichia coli LT-68]
Length=330

Score = 119 bits (298), Expect = 1e-32
Identities = 66/94 (70%), Positives = 72/94 (77%), Gaps = 1/94 (1%)
Frame = +2

```
Query 11  LGMAVDDLRLDAGMPLR-YFCEKGXISRLKVFVXSANGNEXPQMSQIEXXIBRGVXVLVW 187
          +GMA+DDLRL+   R F +K   KV FV SANGNE QMSQIE I+RGV VLV+
Sbjct 28  IGMAIDDLRLERWQKDRDIFVKKAESLGAKVFVQSANGNEETQMSQIENMINRGVDVLVI 87

Query 188 IPYNGQVLSNVVKKAKQEGIKVLPYDRMINDADI 289
          IPYNGQVLSNVVK AKQEGIKVL YDRMINDADI
Sbjct 88  IPYNGQVLSNVVKEAKQEGIKVLAYDRMINDADI 121
```

>[gb|EF241649.1|](#) D-xylose ABC transporter, D-xylose-binding protein [Escherichia coli EPECa14]
Length=330

Score = 119 bits (298), Expect = 1e-32
Identities = 66/94 (70%), Positives = 72/94 (77%), Gaps = 1/94 (1%)
Frame = +2

```
Query 11  LGMAVDDLRLDAGMPLR-YFCEKGXISRLKVFVXSANGNEXPQMSQIEXXIBRGVXVLVW 187
          +GMA+DDLRL+   R F +K   KV FV SANGNE QMSQIE I+RGV VLV+
Sbjct 28  IGMAIDDLRLERWQKDRDIFVKKAESLGAKVFVQSANGNEETQMSQIENMINRGVDVLVI 87

Query 188 IPYNGQVLSNVVKKAKQEGIKVLPYDRMINDADI 289
          IPYNGQVLSNVVK AKQEGIKVL YDRMINDADI
Sbjct 88  IPYNGQVLSNVVKEAKQEGIKVLAYDRMINDADI 121
```

Anexo H

Apresentação dos resultados obtidos nos experimentos de crescimento e produção pelas linhagens recombinantes e seus controles sem inserto.

Anexo H – I) Consumo de açúcares e produção de etanol e ácidos por linhagens recombinantes de *E. coli* KO11 e pela linhagem não etanologênica *E. coli* W3110 cultivadas em meio NBS com glicose (15 g/l) e xilose (15 g/l)

Linhagem	Tempo (h)	MSC (g/L)	pH In. Fin.	Glicose (g/L)	DP (±)	Xilose (g/L)	DP (±)	Ác. pirúvico (g/L)	DP (±)	Ác. Succínico (g/L)	DP (±)	Ác. Láctico (g/L)	DP (±)	Ác. Fórmico (g/L)	DP (±)	Ác. Acético (g/L)	DP (±)	Etanol g/L	DP (±)	Y _{Et/Subst} (g Et/ g Subst)
KO11 pBBR1MCS-2 (LFM 307)	0	-----	7,00	-----	15,04	0,110	15,07	0,041	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,41
	12	0,5	7,00	5,70	8,81	0,057	11,50	0,296	0,062	0,006	0,000	0,000	0,389	0,087	0,203	0,000	0,210	0,000	2,26	0,552
	24	0,6	7,00	5,03	7,29	1,048	10,64	0,308	0,069	0,006	0,000	0,000	0,857	0,024	0,990	0,040	0,974	0,029	3,64	0,144
	48	0,6	7,00	4,74	6,10	1,270	9,98	0,165	0,074	0,003	0,000	0,000	1,209	0,062	1,289	0,179	1,314	0,106	4,94	0,037
	72	0,6	7,00	4,58	4,87	0,068	9,36	0,589	0,094	0,008	0,000	0,000	1,212	0,528	1,357	0,035	1,393	0,468	6,52	0,162
KO11 pBBR1MCS-2::xyL4B (LFM 168)	0	-----	7,00	-----	15,44	0,211	15,36	0,361	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,46
	12	0,5	7,00	5,58	8,18	0,222	11,78	0,021	0,040	0,010	0,000	0,000	0,367	0,156	0,299	0,020	0,220	0,056	2,52	0,219
	24	0,4	7,00	4,98	7,39	0,054	11,36	0,002	0,059	0,001	0,000	0,000	0,835	0,034	0,959	0,252	1,147	0,154	3,89	0,226
	48	0,4	7,00	4,62	7,10	0,131	10,79	0,249	0,062	0,004	0,000	0,000	1,206	0,191	1,340	0,291	1,394	0,118	5,00	0,412
	72	0,6	7,00	4,51	5,87	0,121	10,72	0,141	0,086	0,002	0,000	0,000	1,245	0,114	1,416	0,086	1,490	0,057	6,58	0,208
KO11 pBBR1MCS-5 (LFM 995)	0	-----	7,00	-----	15,20	0,231	15,91	0,338	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,32
	12	0,4	7,00	5,51	13,07	0,349	14,25	0,818	0,068	0,003	0,000	0,000	0,294	0,055	0,352	0,024	0,312	0,949	1,92	0,020
	24	0,4	7,00	4,75	10,45	0,434	13,50	1,042	0,074	0,017	0,000	0,000	0,909	0,520	0,894	1,787	0,798	0,381	2,79	0,136
	48	0,4	7,00	4,52	6,94	0,231	11,58	0,588	0,083	0,008	0,000	0,000	1,333	0,303	1,406	0,120	1,412	0,177	3,42	0,176
	72	0,4	7,00	4,38	6,87	0,246	10,52	0,519	0,106	0,008	0,000	0,000	1,381	0,339	1,410	0,660	1,416	0,221	4,39	0,233
KO11 pBBR1MCS-5::xyLFGH (LFM 319)	0	-----	7,00	-----	15,29	0,102	15,68	0,126	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,08
	12	0,0	7,00	6,68	14,62	0,059	15,11	0,296	0,008	0,003	0,000	0,000	0,086	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,12	0,000
	24	0,0	7,00	6,60	14,41	0,197	14,70	0,209	0,016	0,016	0,000	0,000	0,093	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,25	0,001
	48	0,2	7,00	6,36	13,35	0,290	14,06	0,938	0,026	0,006	0,000	0,000	0,877	0,005	0,362	0,026	0,348	0,008	0,57	0,044
	72	0,3	7,00	5,98	12,95	0,022	13,45	0,542	0,077	0,002	0,000	0,000	0,122	0,031	0,654	0,157	0,611	0,030	0,77	0,013
<i>E. coli</i> W3110	0	-----	7,00	-----	15,10	0,103	15,37	0,065	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,12
	12	0,1	7,00	5,00	12,47	0,355	12,60	1,037	0,070	0,008	0,000	0,000	1,404	0,124	1,139	0,000	0,000	0,144	0,49	0,106
	24	0,1	7,00	4,95	8,00	0,237	10,12	0,196	0,073	0,011	0,000	0,000	2,466	0,452	1,166	0,000	0,000	0,259	0,96	0,155
	48	0,2	7,00	4,55	7,54	0,157	8,59	0,534	0,076	0,005	2,364	0,013	2,709	0,131	1,204	0,072	1,348	0,030	1,57	0,030
	72	0,3	7,00	4,16	6,95	0,084	8,34	0,088	0,086	0,006	2,853	0,090	3,897	0,182	1,817	0,438	3,330	0,076	1,87	0,028

Síglas: pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final · MSC - massa seca celular · DP - Desvio padrão · Y(Et/Açúcar) - fator de conversão de glicose e xilose em etanol. Dados obtidos a partir da média de dois experimentos, cada um deles com duplicata analítica.

Anexo H – II) Consumo de xilose e produção de etanol e ácidos por linhagens recombinantes de *E. coli* KO11 e pela linhagem não etanológica *E. coli* W3110 cultivadas em meio NBS com xilose (15 g/l)

Linhagem	Tempo (h)	MSC (g/L)	pH In. Fin.	Xilose (g/L)	DP (±)	Ác. pirúvico (g/L)	DP (±)	Ác. Succínico (g/L)	DP (±)	Ác. Láctico (g/L)	DP (±)	Ác. Fórmico (g/L)	DP (±)	Ác. Acético (g/L)	DP (±)	Etanol g/L	DP (±)	Y _{Et/Xil} (g Et/ g Xil)
KO11 pBBR1MCS-2 (LFM 307)	0	-----	7,00	-----	14,83	0,240	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,34
	12	0,4	7,00	5,90	8,80	0,520	0,000	0,000	0,000	0,000	0,223	0,256	0,150	1,016	0,140	0,583	2,09	
	24	0,5	7,00	5,73	6,01	1,248	0,000	0,000	0,000	0,000	0,564	0,025	0,441	0,040	0,474	0,054	3,03	
	48	0,4	7,00	5,44	5,51	1,170	0,000	0,000	0,000	0,000	0,701	0,049	0,643	0,179	0,694	0,214	3,65	
	72	0,4	7,00	4,98	3,12	0,675	0,000	0,000	0,000	0,000	0,992	0,044	1,004	0,035	1,163	0,015	3,95	
KO11 pBBR1MCS-2::xyL4B (LFM 168)	0	-----	7,00	-----	14,78	0,274	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,43
	12	0,5	7,00	5,98	8,31	0,663	0,000	0,000	0,000	0,000	0,220	0,303	0,161	0,629	0,158	0,554	2,19	
	24	0,4	7,00	5,71	6,56	0,541	0,000	0,000	0,000	0,000	0,649	0,150	0,390	0,252	0,447	0,210	3,18	
	48	0,4	7,00	5,30	4,02	0,310	0,000	0,000	0,000	0,000	0,791	0,207	0,639	0,291	0,692	0,320	4,37	
	72	0,6	7,00	4,93	1,65	0,209	0,000	0,000	0,000	0,000	1,018	0,100	1,082	0,086	1,116	0,238	5,58	
KO11 pBBR1MCS-5 (LFM 995)	0	-----	7,00	-----	15,09	0,649	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,31
	12	0,4	7,00	5,91	11,21	0,715	0,000	0,000	0,000	0,000	0,130	0,001	0,191	0,024	0,172	0,020	1,34	
	24	0,4	7,00	5,75	9,25	0,665	0,000	0,000	0,000	0,000	0,502	0,178	0,364	1,787	0,328	0,255	2,01	
	48	0,4	7,00	5,38	6,67	0,309	0,000	0,000	0,000	0,000	0,645	0,064	0,792	0,120	0,732	0,185	2,40	
	72	0,4	7,00	4,97	6,12	0,455	0,000	0,000	0,000	0,000	0,994	0,378	1,005	0,660	1,001	0,504	2,76	
KO11 pBBR1MCS-5::xyLFGH (LFM 319)	0	-----	7,00	-----	14,87	0,296	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,13
	12	0,0	7,00	6,68	14,79	0,017	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	24	0,0	7,00	6,60	14,24	0,397	0,001	0,000	0,000	0,000	0,007	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,05	
	48	0,2	7,00	6,36	14,13	0,390	0,001	0,000	0,000	0,000	0,028	0,001	0,159	0,026	0,148	0,064	0,07	
	72	0,3	7,00	5,98	14,11	0,684	0,001	0,000	0,000	0,000	0,107	0,009	0,669	0,157	1,111	0,148	0,10	
<i>E. coli</i> W3110	0	-----	7,00	-----	15,43	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030	0,000	0,089	0,000	0,067	0,000	0,00	0,05
	12	0,1	7,00	5,40	14,14	0,471	0,000	0,000	0,000	0,000	0,102	0,000	0,191	0,000	0,178	0,000	0,00	
	24	0,1	7,00	5,05	11,35	0,633	0,000	0,000	0,518	0,228	0,240	0,006	0,890	0,000	0,800	0,000	0,00	
	48	0,2	7,00	4,41	9,53	0,025	0,000	0,000	1,044	0,080	1,915	0,049	1,366	0,072	1,348	0,479	0,51	
	72	0,3	7,00	4,28	5,40	0,088	0,000	0,000	1,122	0,078	2,618	1,034	1,666	0,438	2,330	0,567	0,52	

Siglas: pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final · MSC - massa seca celular · DP - Desvio padrão · Y(Et/Xil) - fator de conversão de xilose em etanol. Dados obtidos a partir da média de dois experimentos, cada um deles com duplicata analítica.

Anexo H – III) Produção de poli-3-hidroxibutirato e consumo de açúcares (glicose e xilose) por linhagens recombinantes de *B. sacchari* cultivadas em meio mineral com glicose (15 g/l) e xilose (15 g/l)

Linhagem	Tempo (h)	pH		MSC (g/L)	PHB (% MSC)	PHA (g/L)	DP (±)	XR (g/L)	Glicose (g/L)	DP (±)	Xilose (g/L)	DP (±)	Y(PHB/Açúcar) (g PHB/ g Açúcar)
		In.	Fin.										
LFM 101 pBBR1MCS-2 (LFM 308)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	15,47	0,29	14,88	0,30	0,10
	24	7,0	5,49	3,08	48,76	1,50	0,09	1,58	9,54	0,93	7,71	8,91	
	48	7,0	4,58	4,55	57,73	2,62	0,71	1,92	5,65	0,54	14,95	0,23	
	72	7,0	4,91	4,74	62,45	2,96	0,46	1,78	0,89	1,02	0,00	0,00	
LFM 101 pBBR1MCS-2::xyLAB (LFM 147)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	14,64	0,17	15,00	0,26	0,09
	24	7,0	5,58	3,31	48,69	1,61	0,19	1,70	7,75	0,70	7,36	8,50	
	48	7,0	4,76	4,44	56,18	2,49	0,23	1,94	3,61	0,73	15,05	0,34	
	72	7,0	5,79	4,39	59,09	2,59	0,07	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00	
LFM 101 pBBR1MCS-5 (LFM 317)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	15,14	0,06	14,88	0,16	0,13
	24	7,0	5,54	3,02	45,50	1,38	0,12	1,65	10,07	0,65	11,35	0,24	
	48	7,0	4,82	3,87	54,55	2,11	0,28	1,76	7,92	0,60	10,76	0,13	
	72	7,0	4,63	4,44	54,92	2,44	0,14	2,00	2,32	0,33	8,42	0,32	
LFM 101 pBBR1MCS-5::xyFGH (LFM 318)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	15,16	0,77	14,97	0,46	0,12
	24	7,0	5,72	2,97	46,48	1,38	0,10	1,59	8,90	0,77	10,82	1,19	
	48	7,0	4,62	3,96	54,44	2,16	0,12	1,81	4,63	1,22	9,44	0,51	
	72	7,0	4,36	4,35	58,47	2,54	0,19	1,81	0,46	0,50	8,62	0,49	
LFM 101 pBBR1MCS-2 pBBR1MCS- 5 (LFM 996)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	14,75	0,15	14,69	0,35	0,13
	24	7,0	5,96	2,82	39,24	1,11	0,04	1,71	10,37	0,01	12,52	0,24	
	48	7,0	4,98	3,94	51,61	2,03	0,10	1,90	6,27	0,63	11,18	0,48	
	72	7,0	5,01	4,53	57,28	2,59	0,06	1,94	0,00	0,00	10,05	0,22	
LFM 101 pBBR1MCS-2::xyLAB pBBR1MCS-5::xyFGH (LFM 997)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	15,33	0,02	14,86	0,33	0,11
	24	7,0	6,05	2,53	35,46	0,90	0,02	1,63	8,50	0,59	12,00	0,49	
	48	7,0	4,90	3,74	50,52	1,89	0,18	1,85	2,48	0,22	10,50	0,46	
	72	7,0	4,97	3,83	55,87	2,14	0,99	1,69	0,00	0,00	10,03	0,65	

Siglas: pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final · MSC - massa seca celular · PHB - poli-3-hidroxibutirato · X_R - Concentração celular residual · DP - Desvio padrão · Y(PHB/Açúcar) - fator de conversão de glicose e xilose em PHB. Dados obtidos a partir da média de dois experimentos, cada um deles com duplicata analítica.

Anexo H – IV) Produção de poli-3-hidroxibutirato e consumo de açúcares (glicose e xilose) por linhagens recombinantes de *B. sacchari* cultivadas em meio mineral com xilose (15 g/l)

Linhagem	Tempo (h)	pH		MSC (g/L)	PHB (%MSC)	PHA (g/L)	DP (±)	XR (g/L)	Xilose (g/L)	DP (±)	Y(PHB/Xil) (g PHB/ g Xil)
		In.	Fin.								
LFM 101 pBBR1MCS-2 (LFM 308)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	14,87	0,26	0,24
	24	7,0	6,44	2,78	40,13	1,11	0,05	1,66	7,31	0,57	
	48	7,0	5,40	4,71	57,60	2,71	0,47	1,99	3,94	0,28	
	72	7,0	5,03	5,03	59,72	3,00	0,15	2,02	2,41	0,78	
LFM 101 pBBR1MCS-2::xyLAB (LFM 147)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	15,36	0,38	0,18
	24	7,0	6,35	2,62	35,45	0,93	0,02	1,69	8,76	0,85	
	48	7,0	5,48	4,14	52,31	2,17	0,09	1,97	6,50	0,58	
	72	7,0	5,00	4,43	53,05	2,35	0,20	2,08	2,18	0,20	
LFM 101 pBBR1MCS-5 (LFM 317)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	14,85	0,27	0,29
	24	7,0	6,07	3,03	41,72	1,27	0,27	1,77	10,12	0,27	
	48	7,0	5,74	5,13	56,51	2,90	0,12	2,23	4,932	0,29	
	72	7,0	5,05	5,57	58,66	3,27	0,89	2,30	3,694	0,24	
LFM 101 pBBR1MCS-5::xyFGH (LFM 318)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	14,54	0,28	0,24
	24	7,0	6,54	2,01	30,92	0,62	0,49	1,39	8,69	0,54	
	48	7,0	6,16	4,53	57,37	2,60	0,65	1,93	4,50	0,59	
	72	7,0	5,17	4,84	58,35	2,83	0,66	2,02	2,83	0,52	
LFM 101 pBBR1MCS-2 pBBR1MCS-5 (LFM 996)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	14,94	0,12	0,19
	24	7,0	6,48	1,67	11,39	0,19	0,04	1,48	10,53	0,55	
	48	7,0	6,07	4,05	47,96	1,94	0,40	2,11	5,95	0,69	
	72	7,0	5,02	4,61	50,75	2,34	0,01	2,27	2,86	0,13	
LFM 101 pBBR1MCS-2::xyLAB pBBR1MCS-5::xyFGH (LFM 997)	0	7,0	----	----	----	----	----	----	15,73	0,35	0,17
	24	7,0	6,63	1,11	9,85	0,11	0,02	1,00	11,05	0,48	
	48	7,0	6,02	3,54	46,94	1,66	0,31	1,88	6,25	0,14	
	72	7,0	5,12	3,76	51,66	1,94	0,21	1,82	4,63	0,31	

Siglas: pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final · MSC - massa seca celular · PHB - poli-3-hidroxibutirato · X_R - Concentração celular residual · DP - Desvio padrão · Y(PHB/Xil) - fator de conversão de xilose em PHB. Dados obtidos a partir da média de dois experimentos, cada um deles com duplicata analítica.

Anexo H – V) Produção de poli-3-hidroxibutirato e consumo de xilose por linhagens *B. sacchari* LFM 101 pBBR1MCS-5, LFM 536 pBBR1MCS-5 e LFM 536 pBBR1MCS-5::xy/FGH cultivadas em meio mineral com xilose

Linhagem	Tempo (h)	pH		MSC (g/L)	PHB (% MSC)	PHB (g/L)	DP (±)	XR (g/L)	Xilose (g/L)	DP (±)	Y _{PHB/Xil} (g PHB/g Xil)
		In.	Fin.								
LFM 101 pBBR1MCS-5 (LFM 317)	0	7,0	—	—	—	—	—	—	14,85	0,27	0,29
	24	7,0	6,07	3,03	41,72	1,27	0,27	1,77	10,12	0,27	
	48	7,0	5,74	5,13	56,51	2,90	0,12	2,23	4,93	0,29	
	72	7,0	5,05	5,57	58,66	3,27	0,89	2,30	3,69	0,24	
LFM 536 pBBR1MCS-5 (LFM 315)	0	7,0	—	—	—	—	—	—	15,46	0,05	0,04
	24	7,0	6,67	0,87	6,87	0,06	0,04	0,81	13,79	0,19	
	48	7,0	6,28	1,28	7,32	0,09	0,40	1,19	12,26	0,71	
	72	7,0	5,61	1,66	7,81	0,13	0,01	1,53	12,00	0,46	
LFM 536 pBBR1MCS-5::xy/FGH (LFM 316)	0	7,0	—	—	—	—	—	—	14,79	0,37	0,26
	24	7,0	6,78	1,82	10,82	0,20	0,02	1,62	12,81	2,49	
	48	7,0	6,42	3,68	48,33	1,78	0,31	1,90	6,07	0,38	
	72	7,0	6,35	4,41	57,99	2,56	0,21	1,85	4,83	0,88	

Siglas: pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final · MSC - massa seca celular · PHB - poli-3-hidroxibutirato · X_R - Concentração celular residual · DP - Desvio padrão · Y(PHB/Xil) - fator de conversão de xilose em PHB. Dados obtidos a partir da média de dois experimentos, cada um deles com duplicata analítica.