

**Juliano Cherix**

**Avaliação de genes para o catabolismo de xilose e seu potencial para geração de bioprodutos**

**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**

**São Paulo  
2015**

**Juliano Cherix**

**Avaliação de genes para o catabolismo de xilose e seu potencial para geração de bioprodutos**

**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  
2015**

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

Cherix, Juliano.

Avaliação de genes para o catabolismo de xilose e seu potencial para geração de bioprodutos / Juliano Cherix. -- São Paulo, 2015.

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 polihidroxicanoatos a partir de fontes renováveis.

Versão do título para o inglês: Evaluation of xylose catabolism genes and its potential for the generation of bioproducts.

1. *Burkholderia sacchari* 2. Xilose 3. Polihidroxicanoatos 4. Xilose isomerase 5. P3HB 6. Via isomerase 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/SBIB04/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):                    Juliano Cherix.

Título da Dissertação:        Avaliação de genes para o catabolismo de xilose e seu potencial para geração de bioprodutos.

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

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

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) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 540/12 referente ao projeto intitulado: “*Avaliação de genes para o catabolismo de xilose e seu potencial para a geração de bioprodutos*” sob a responsabilidade de **Juliano Cherix**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 08 de agosto de 2012.

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

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

## AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Luiziana Ferreira da Silva pela orientação e confiança em mim depositada, pelos conhecimentos transmitidos, apoio e experiência adquirida.

Ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez pelo direcionamento, pela paciência e pelas valiosas discussões ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Marilda Keico Taciro por toda a sua ajuda e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, fonte de constante apoio e incentivo durante todos esses anos de estudo. Obrigada pai, mãe, Katia e Patrick pelo amor, paciência e compreensão.

À minha namorada Madelaine por estar sempre ao meu lado, nos momentos mais fáceis e difíceis, fonte de constante apoio e incentivo durante todos esses anos de estudo.

Ao meu amigo Leonardo, por todas as valiosas conversas, e pelo constante apoio e incentivo durante todos esses anos de estudo.

Ao Edmar, Camilo, Dr. Karel e à Linda, Aline e Dr. Thatiane por terem contribuído em etapas importantes ao longo deste estudo.

Ao Aelson, técnico do laboratório por toda a ajuda e paciência.

Aos meus companheiros de laboratório Karina, Johana, Débora, Carlos, Liege, Lucas, Diana, Natália, Karen, Mariana, Marina, Thandara, Bernardo, Amanda, Gabriela, Paulo, Jhoanne, Cris, Gisele, Juliana, Henrique, Rogerio, Siddharta e Cesar, sempre dispostos a me ajudar no que fosse preciso.

Aos meus familiares e amigos que me deram força e contribuíram comigo de alguma forma durante esta etapa da minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Proc. FAPESP 2012/11529-0).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

## RESUMO

CHERIX, J. **Avaliação de genes para o catabolismo de xilose e seu potencial para geração de bioprodutos.** 2015. 140 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Recentemente, tem havido um grande esforço no país na obtenção de etanol de segunda geração (ou 2G) por via microbiana, tendo como matéria-prima o bagaço de cana-de-açúcar. Para ser metabolizado por microrganismos, este ou qualquer material lignocelulósico, necessita ser submetido à hidrólise, ácida ou enzimática, liberando a celulose e hemicelulose do complexo formado com a lignina, com posterior quebra dos polímeros de açúcares e liberação de uma mistura de hexoses e pentoses, principalmente glicose, xilose e arabinose. Ainda que a xilose seja um dos principais componentes da lignocelulose e o segundo açúcar mais abundante da natureza, a sua utilização eficiente ainda representa uma barreira técnica. Duas limitações para o consumo microbiano desta pentose têm sido destacadas: a repressão catabólica quando em mistura de açúcares e a ineficiência do consumo de xilose comparado com o consumo de glicose. Como a levedura produtora de etanol ainda não é capaz de utilizar eficientemente a xilose, caso apenas a glicose oriunda do bagaço seja utilizada para etanol 2G, estima-se como subproduto uma disponibilidade de xilose da ordem de  $10^7$  ton/ano. Assim, há necessidade de estudos para viabilizar seu uso para produzir etanol 2G ou outros produtos microbianos, como os biopolímeros da família dos polihidroxicanoatos (PHA). Neste contexto, este trabalho foi proposto com objetivo principal de buscar por genes envolvidos no metabolismo de xilose que contenham modificações capazes de gerar enzimas mais eficientes no consumo deste açúcar, expressá-los em *Burkholderia sacchari*, uma grande produtora de PHA, avaliando os efeitos sobre o consumo desta pentose e seus impactos sobre a produção de biopolímeros da família dos PHA. Foram levantadas e comparadas *in silico* sequências da proteína xilose isomerase, produto do gene *xylA*, que transforma a xilose em xilulose, estabelecendo variações entre os diferentes grupos de bactérias presentes nas famílias *Enterobacteriaceae* e *Burkholderiaceae*. Com esta análise observou-se que na sua grande maioria as sequências são bem conservadas, a não ser para as bactérias *Photorhabdus luminescens* e *Enterobacter sp. Ag1* que apresentaram uma mutação indicada como melhoradora da atividade da enzima. A análise do draft do genoma de *B. sacchari* indicou que esta bactéria apresenta os genes *xylABFGH*, da via da xilose isomerase, orientados no mesmo sentido, e *xylR* orientado no sentido contrário. Observou-se que esta bactéria apresenta ainda quatro genes similares aos de outra via de metabolismo de xilose, a via de Weimberg, composta por cinco genes. Visando melhorar o consumo de xilose em *B. sacchari*, com base nesta análise preliminar foram então selecionados os seguintes genes codificadores de xilose isomerase, para serem nela inseridos e avaliados: *xylA<sub>Bc</sub>* e *xylA<sub>Pl</sub>*, respectivamente de *B. cenocepacia* e *Photorhabdus luminescens* e da própria *B. sacchari*, *xylA<sub>Bs</sub>*, genes de *B. xenovorans* (*xylA<sub>Bx</sub>*) e de *B. phymatum* (*xylA<sub>Bp</sub>*). Foi ainda sintetizado o gene de *B. sacchari* (*xylA\**) no qual foram inseridas as seguintes modificações, descritas na literatura como capazes de aumentar a interação entre enzima substrato e a estabilidade da enzima, resultando no aumento do consumo de xilose em outros organismos: E15D, E114G, E129D, T142S, A177T e V433I. Assim, foram obtidos seis genes codificadores de xilose isomerase, incluindo

o da própria *B. sacchari*, clonados em pBBR1MSC-2 que permitiram a construção de seis recombinantes de *B. sacchari*, além de um controle abrigando o vetor sem inserto. Estes recombinantes foram avaliados em experimentos em frascos agitados, medindo-se o consumo de xilose, produção de polihidroxicanoatos e a atividade da enzima xilose isomerase. Os resultados indicaram que as medidas de atividade enzimática da xilose isomerase nos recombinantes de *B. sacchari*, abrigando os genes *xylA<sub>Bx</sub>*, *xylA<sub>Bs</sub>* e *xylA<sub>Bp</sub>* tiveram um aumento de 113%, 52% e 39%, respectivamente, quando comparadas com a linhagem controle. Obteve-se um aumento na eficiência de conversão de xilose em P3HB de aproximadamente 30% para as linhagens recombinantes abrigando os genes *xylA<sub>Bs</sub>*, *xylA\** e *xylA<sub>Bc</sub>*, e de 40% no caso daquelas abrigando os genes *xylA<sub>Bp</sub>* e *xylA<sub>Bx</sub>*, quando comparadas com a linhagem controle. As linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xylA<sub>Bs</sub>* e *xylA\** tiveram um aumento de aproximadamente 30%, e aquelas abrigando os genes *xylA<sub>Bp</sub>* e *xylA<sub>Bx</sub>* de 23%, no consumo de xilose quando comparadas com a linhagem controle. Essas quatro linhagens recombinantes foram aquelas que conseguiram produzir maior quantidade de PHB, aproximadamente 70% a mais do que linhagem controle. No caso da linhagem *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xylA<sub>Bc</sub>* o aumento foi de aproximadamente 40%. Essa linhagem foi também aquela que teve maior eficiência de conversão de xilose em células, aproximadamente 22% a mais que a linhagem controle.

**Palavras Chave:** *Burkholderia sacchari*. Xilose. Polihidroxicanoatos. Xilose isomerase. Via isomerase. P3HB.



## ABSTRACT

CHERIX, J. **Evaluation of xylose catabolism genes and their potential for the generation of bioproducts.** 2015. 140 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Recently there has been a lot of effort in the country (Brazil) to obtain second-generation ethanol (or 2G) by microbial way using, as the main material, the sugarcane bagasse. In order to be metabolized by microorganisms, this or any lignocellulosic material needs to be subjected to hydrolysis, acid or enzymatic, freeing the cellulose and hemicellulose from the complex formed with the lignin, with subsequent breakdown of sugar polymers and the release of a mixture of hexoses and pentoses, especially glucose, xylose and arabinose. Although the xylose is one of the main components of lignocellulose and the second most abundant sugar in nature, its efficient use still represents a technical barrier. Two limitations to microbial consumption of the pentose have been discussed: the catabolite repression when in a mixture of sugars and the inefficient consumption of xylose compared with the consumption of glucose. Since the ethanol producing yeast still is not capable of efficiently using xylose, if only the glucose derived from the bagasse is used for 2G ethanol, it is estimated as a byproduct a xylose availability of  $10^7$  order tons / year. Thus, we need studies to enable its use to produce 2G ethanol or other microbial products such as biopolymers of the family of polyhydroxyalkanoates (PHA). In this context, this work was proposed with the main purpose of searching for genes involved in the metabolism of xylose that contains modifications able to generate more efficient enzymes in the consumption of this sugar, expressing them in *Burkholderia sacchari*, a major PHA producer, assessing the effects on the consumption of this pentose and its impacts on biopolymer production of the family of PHA. Sequences of the xylose isomerase protein, product of *xylA* gene, which is responsible for the transformation of xylose in xylulose, were raised and compared *in silico*, setting variations between different groups of bacteria in the *Enterobacteriaceae* and *Burkholderiaceae* families. This analysis showed that the majority of sequences are well maintained, except for the *Phototribadus luminescens* and *Enterobacter sp. Ag1* bacteria that had a mutation indicated as improving the activity of the enzyme. The analysis of *B. sacchari* genome draft indicated that this bacteria has *xylABFGH* genes, the xylose isomerase pathway, facing the same way, and *xylR* oriented in the opposite direction. It was observed that this bacteria has 4 similar genes to another xylose pathway, the Weimberg's, composed of five genes. In order to improve the consumption of xylose in *B. sacchari*, based on this preliminary analysis, the following xylose isomerase codifying genes were selected to be inserted therein and evaluated: *xylA<sub>Bc</sub>*, *xylA<sub>Pl</sub>*, *xylA<sub>Bx</sub>* and *xylA<sub>Bp</sub>* respectively from *B. cenocepacia*, *P. luminescens*, *B. xenovorans* and *B. phymatum* and, *xylA<sub>Bs</sub>*, from *B. sacchari*. The *B. sacchari* gene (*xylA\**) was also synthesized and the following modifications were inserted as described in literature as capable of increasing the interaction between the enzyme and its substrate and enzyme stability, resulting in the increase of xylose consumption in other organisms: E15D, E114G, E129D, T142S, A177T V433I. Thus, six genes encoding xylose isomerase were obtained, including the one from *B. sacchari*. They were cloned into pBBR1MSC-2 which allowed the construction of six *B. sacchari* recombinant strains, and a control harboring the empty vector.

These recombinant strains were evaluated in shake flask experiments, measuring the xylose consumption, polyhydroxyalkanoates production and the activity of xylose isomerase enzyme. The results indicated that the enzymatic activity of xylose isomerase in the recombinant strains of *B. sacchari*, harboring either *xyIA<sub>Bx</sub>*, *xyIA<sub>Bs</sub>* or *xyIA<sub>Bp</sub>* gene had an increase of 113%, 52% and 39%, respectively, compared to the control strain. An increase in the conversion efficiency of xylose in P3HB was obtained of approximately 30% for the recombinant strains harboring either *xyIA<sub>Bs</sub>*, *xyIA\** or *xyIA<sub>Bc</sub>* gene and 40% for those harboring *xyIA<sub>Bp</sub>* or *xyIA<sub>Bx</sub>* gene, compared with the control strain. Recombinant strains harboring *xyIA<sub>Bs</sub>* or *xyIA\** gene had an increase of approximately 30%, and those harboring the gene *xyIA<sub>Bx</sub>* or *xyIA<sub>Bp</sub>* of 23%, in the xylose consumption compared to the control strain. These four recombinant strains were those that were able to produce greater quantities of P3HB, approximately 70% more than the control strain. In the case of the *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xyIA<sub>Bc</sub>* strain, the increase was approximately 40%. This strain was also the one that had higher xylose conversion efficiency in cells, approximately 22% more than the control line.

**Keywords:** *Burkholderia sacchari*. Xylose. Polyhydroxyalkanoates. Xylose isomerase. Isomerase pathway. P3HB.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura – 2.1** Representação das vias do metabolismo de xilose Oxidoredutase e Isomerase (MATSUSHIKA et al., 2009) 23
- Figura – 2.2** Representação das vias do metabolismo de xilose de Weimberg e de Dahms (WEIMBERG, 1961; DAHMS, 1974; JOHNSEN et al., 2009) 24
- Figura – 4.1** Esquema de cultivo para mutação e seleção de clones mutantes xil- (sac+). MMS ou MMX 1/1: Meio mineral com adição de 1 g/L de sacarose ou xilose; Amp: Antibiótico ampicilina 42
- Figura – 4.2** Representação das reações do ensaio enzimático acoplado para medição da atividade enzimática da xilose isomerase. O consumo de NADH foi medido utilizando um espectrofotômetro de placa a 340 nm 43
- Figura – 5.1** Árvore filogenética da proteína xilose isomerase, produto do gene *xylA*, na família Enterobacteriaceae. A xilose isomerase de *B. sacchari* foi utilizada como “out group”. O número nas intersecções representa a porcentagem do bootstrap 47
- Figura – 5.2** Árvore filogenética da proteína xilose isomerase, produto do gene *xylA*, na família Burkholderiaceae. A xilose isomerase de *E. coli* foi utilizada como “out group”. O número nas intersecções representa a porcentagem do bootstrap 48
- Figura – 5.3** Alinhamento das enzimas xilose isomerases de *B. sacchari*, outras *Burkholderias* e de *Piromyces sp. E2*. Em vermelho estão ressaltados os aminoácidos importantes para o sítio ativo da enzima. Em azul alguns dos aminoácidos que foram modificados em *Piromyces*, para aumentar a atividade da enzima (Lee et al., 2012). Essas modificações estão mostradas na parte de cima dos círculos azuis, G – glicina; D – aspartato; S – serina; T – Treonina. Em verde alguns aminoácidos que são importantes para a ligação com metais que são essenciais para o funcionamento da enzima. O alinhamento completo apresenta 440 aminoácidos (anexo 1), aqui está exposto somente uma parte deste alinhamento. 50
- Figura – 5.4** Organização da via isomerase do metabolismo de xilose em *B. sacchari* – *xylA* (xilose isomerase), *xylB* (xiluloquinase) *xylFGH* (transportador do tipo ABC), *xylR* (regulador). As setas representam os promotores e os círculos verdes os sítios de ligação das proteínas XYLR e CRP. 53
- Figura – 5.5** Representação das organizações dos genes do metabolismo de xilose da via isomerase das bactérias *B. sacchari*, *B. cenocepacia J2315* e *E. coli KO11*. XI: xilose isomerase; XK: xiluloquinase; *xylR\**: Anotado como regulador do tipo *araC*, mas com alta similaridade com *xylR* de *Burkholderia thailandensis E264* 53

- Figura – 5.6** Representação da organização dos genes do metabolismo de xilose da via Weimberg da bactéria *C. crescentus*. *xylD*: Xilonato desidratase; *xylC*: Xilonolactonase; *xylB*: Xilose desidrogenase; *xylA*: semialdeído  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase; *xylX*: 2-ceto-3-desoxixilonato desidratase **54**
- Figura – 5.7** Esquema representando a via de Weimberg em *Caulobacter crescentus* (*xylBCDXA*), esses genes procurados em *Pseudomonas putida* (PP1444, 1170, 3417, 5128, 2834 e 3602) e em *B. sacchari* (BS9, BS11, BS3, BS6, BS13, BS7 e BS1). A porcentagem de similaridade e o número de aminoácidos alinhados também estão expostos. Para os genes de *B. sacchari* foi colocado à porcentagem de aminoácidos alinhados comparado com o total presente na proteína em questão **55**
- Figura – 5.8** Representação da via Oxidoreductase de metabolismo de xilose presente em *Saccharomyces cerevisia* **56**
- Figura – 5.9** Representação da via de Dahms descrita em uma espécie de *Pseudomonas* **58**
- Figura – 5.10** Representação da metodologia utilizada para construção do “knock out” do gene *xylA* em *B. sacchari*. Os retângulos sem pontilhado são referentes à parte do genoma de *B. sacchari*; os retângulos pontilhados são as mesmas sequências dos retângulos sem pontilhado, porém clonados no plasmídeo pNPTS138. K: Canamicina; *sacB*: gene *sacB*; -----: vetor pNPTS138 **62**
- Figura – 5.11** Representação dos genes da via isomerase de metabolismo de xilose em *B. sacchari* e dos fragmentos up*SxylA* e down*SxylA* assim como dos iniciadores utilizados para a amplificação destes últimos **63**
- Figura – 5.12** Representação do vetor de clonagem pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995). Kan: gene de resistência a canamicina; mob: genes de mobilização; rep: genes de replicação; *lacZ*: gene *lacZ*; |||||: sítio de múltipla clonagem com todas as enzimas de restrição presentes nesta região **63**
- Figura – 5.13** Representação do vetor pNPTS138 (M.R.K. Alley). *colE1 ori*: Origem de replicação em *E. coli*; M13ori: origem de replicação do fago M13; *nptI*: região que possui resistência a canamicina; *sacB*: gene *sacB*; *oriT*: genes de transferência; *alpha lacZ*: gene *lacZ* situado no sítio de múltipla clonagem **64**
- Figura – 5.14** Foto da eletroforese em gel de agarose dos fragmentos, up*SxylA* (930pb) e down*SxylA* (1001pb), amplificados com a enzima Hifidelity. Nos poços da esquerda em cada figura estão apresentados o marcador de peso molecular 1kb **65**

- Figura – 5.15** Foto da eletroforese do PCR de colônia da linhagem *E. coli DH5α* pBBR1MCS-2::upS<sub>xy</sub>LA e *E. coli DH5α* pBBR1MCS-2::downS<sub>xy</sub>LA. A1-A5: colônias selecionadas para *E. coli DH5α* pBBR1MCS-2::upS<sub>xy</sub>LA; A-: controle negativo; A+: Controle positivo; B1-B5: colônias selecionadas para *E. coli DH5α* pBBR1MCS-2::downS<sub>xy</sub>LA; B-: controle negativo; B+: controle positivo. As flechas mostram as colônias selecionadas para preservação 66
- Figura – 5.16** Foto da eletroforese do PCR de colônia da linhagem *E. coli DH5α* pNPTS138::upS<sub>xy</sub>LA e *E. coli DH5α* pNPTS138::downS<sub>xy</sub>LA. A1-A5: colônias selecionadas para *E. coli DH5α* pNPTS138::upS<sub>xy</sub>LA; A-: controle negativo; A+: Controle positivo; B1-B5: colônias selecionadas para *E. coli DH5α* pNPTS138::downS<sub>xy</sub>LA; B-: controle negativo; B+: controle positivo. As flechas mostram as colônias selecionadas para preservação 67
- Figura – 5.17** Foto da eletroforese dos plasmídeos pNPTS138 sem inserto (5361pb) e pNPTS138::upS<sub>xy</sub>LA (6291pb) digeridos ou não com as enzimas de restrição *HindIII* e *BamHI*. 1: pNPTS138 sem inserto não digerido; 2: pNPTS138::upS<sub>xy</sub>LA não digerido; 3: pNPTS138 sem inserto, digerido com *HindIII* e *BamHI*; 4: pNPTS138::upS<sub>xy</sub>LA, digerido com *HindIII* e *BamHI* 68
- Figura – 5.18** Foto da eletroforese do PCR de colônia da linhagem *E. coli DH5α* pNPTS138::upS+downS<sub>xy</sub>LA. 1-12: clones testados; +: controle positivo; -: controle negativo 69
- Figura – 5.19** Foto da eletroforese do plasmídeo pNPTS138::upS+downS<sub>xy</sub>LA (7292pb) e pNPTS138 (5361pb), antes e depois da digestão com a enzima *HindIII*. 1: pNPTS138::upS+downS<sub>xy</sub>LA após digestão; 2: pNPTS138 após digestão; 3: pNPTS138::upS+downS<sub>xy</sub>LA; 4: pNPTS138 69
- Figura – 5.20** Foto da eletroforese do PCR de colônia da linhagem *E. coli S17-1* pNPTS138::upS+downS<sub>xy</sub>LA. 1-12: clones testados; C+: controle positivo; C-: controle negativo 72
- Figura – 5.21** Representação do primeiro evento de recombinação homóloga e dos iniciadores (PF<sub>ApaI</sub> e PR<sub>BamHI</sub>) utilizados para verificação através do PCR de colônia 72
- Figura – 5.22** Fotos da eletroforese do PCR de colônia da linhagem *B. sacchari* pNPTS138::upS+downS<sub>xy</sub>LA. 1-16: clones testados; +: controle positivo; -: controle negativo 73

- Figura – 5.23** Foto da eletroforese em gel de agarose do novo plasmídeo digerido e não digerido, das três colônias selecionadas. 1D: colônia 1 plasmídeo digerido com BamHI; 1: colônia 1 plasmídeo não digerido; 2D: colônia 2 plasmídeo digerido com BamHI; 2: colônia 2 plasmídeo não digerido; 3D: colônia 3 plasmídeo digerido com BamHI; 3: colônia 3 plasmídeo não digerido **74**
- Figura – 5.24** Representação dos diferentes métodos utilizados para a conjugação entre a linhagem *B. sacchari* e *E. coli* pNPTS138::upS+downS*xylA*. MMG1K: meio mineral com 1 g/L de glicose e adição de canamicina 50 µg/mL **75**
- Figura – 5.25** Foto da eletroforese do PCR de colônia da conjugação entre as linhagens *B. sacchari* e *E. coli* S17-1 pNPTS138::upS+downS*xylA*. 1-15: clones testados; 2+: controle positivo utilizando como DNA molde o DNA genômico extraído de *B. sacchari* e o DNA plasmidial extraído pNPTS138::upS+downS*xylA* ;+: controle positivo utilizando como DNA molde o DNA genômico extraído de *B. sacchari*; -: controle negativo. As setas em vermelho indicam as bandas esperadas (1931pb e 3254) **76**
- Figura – 5.26** Curva de sobrevivência da bactéria *B. sacchari* a radiação UV **78**
- Figura – 5.27:** Curva da porcentagem dos sobreviventes de *B. sacchari* a radiação UV **78**
- Figura – 5.28:** Esquema de cultivo para mutação e seleção de clones mutantes xil<sup>+</sup> (sac<sup>+</sup>). MMS 10/3 ou MMX 1/1: Meio mineral com adição de 10 ou 1 g/L de sacarose ou xilose respectivamente; Amp: Antibiótico ampicilina **79**
- Figura – 5.29** Foto mostrando o processo de triagem utilizado. À direita, uma placa de MMS e a esquerda uma placa de MMX **80**
- Figura – 5.30** Fotos das eletroforeses em gel de agarose das ampliações do gene *xylA<sub>BS</sub>*. Gradiente: PCR com gradiente de temperaturas em grau Celsius (°C); para temperatura de 55 °C foi adicionado DMSO; a flecha indica a temperatura escolhida para as demais ampliações. Phusion: PCR utilizando a enzima Phusion de alta fidelidade. Tamanho do gene *xylA<sub>BS</sub>*: 1374pb **83**

**Figura – 5.31:** Fotos das eletroforeses em gel de agarose para amplificação do gene *xylA<sub>Bc</sub>*. Gradiente: Gradiente de temperaturas da amplificação utilizando a enzima Taq polimerase; 52-60: temperaturas em grau Celsius (°C) testadas; para temperatura de 55 °C foi adicionado DMSO; a flecha indica a temperatura escolhida para as demais amplificações (55 °C). Phusion: Tentativa de amplificar o gene com a enzima de alta fidelidade Phusion. PCR colônia: Confirmação da presença do plasmídeo com o gene de interesse na recombinante *B. sacchari* pBBR1MCS2::*xylA<sub>Bc</sub>*; 1-6: colônias testadas; seta indica a colônia selecionada para os experimentos subsequentes. +: controle positivo; -: controle negativo. Tamanho do gene *xylA<sub>Bc</sub>*: 1374 pb

85

**Figura – 5.32** Fotos das eletroforeses em gel de agarose para amplificação do gene *xylA<sub>Pl</sub>*. Gradiente: Gradiente de temperaturas da amplificação utilizando a enzima Taq polimerase; 52-60: temperaturas em grau Celsius (°C) testadas; a flecha indica a temperatura escolhida para as demais amplificações (58 °C). Phusion: Amplificação do gene com a enzima de alta fidelidade Phusion; as flechas indicam a banda esperada (1430 pb). PCR colônia: Confirmação da presença do plasmídeo com o gene de interesse na recombinante *B. sacchari* pBBR1MCS2::*xylA<sub>Pl</sub>*; 1-10: colônias testadas utilizando os iniciadores M13 (1582 pb); seta indica a colônia selecionada para os experimentos subsequentes. -: controle negativo

86

**Figura – 5.33** Fotos das eletroforeses em gel de agarose das bactérias recombinantes de *B. sacchari* após eletroporação dos plasmídeos pBBR1MCS-2::*xylA\** / *xylA<sub>Bx</sub>* / *xylA<sub>Bp</sub>*. 1-16: diferentes colônias utilizadas como DNA molde para o PCR. A seta mostra qual colônia foi utilizada nos experimentos subsequentes. *xylA\**: 1556 pb; *xylA<sub>Bx</sub>*: 1319 pb; *xylA<sub>Bp</sub>*: 1323 pb

87

**Figura – 5.34** Atividade enzimática específica da enzima xilose isomerase para as diferentes linhagens recombinantes de *B. sacchari*. Sobre cada coluna está apresentado o valor médio de atividade específica determinada e o desvio padrão. Também está apresentado em preto a porcentagem de aumento da atividade quando comparada com a linhagem controle e em vermelho quando comparada com a linhagem 3, *B. sacchari* pBBR1MSC-2::*xylAbs*.

89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela – 4.1</b>	Bactérias e plasmídeos utilizados no trabalho	<b>30</b>
<b>Tabela – 4.2</b>	Composição do meio LB	<b>32</b>
<b>Tabela – 4.3</b>	Composição do meio MM	<b>32</b>
<b>Tabela – 4.4</b>	Iniciadores sintetizados para a amplificação de genes xyl. Os sítios de restrição estão sublinhados e especificados na tabela	<b>34</b>
<b>Tabela – 5.1</b>	Distribuição das sequências obtidas através o trabalho de metagenômica realizado no laboratório da professora Aline, do departamento de Química da USP	<b>59</b>
<b>Tabela – 5.2</b>	Produção de P3HB por <i>B. sacchari</i> selvagem e seus recombinantes abrigando diferentes genes xylA	<b>94</b>



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Polihidroxialcanoatos</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Bagaço de cana-de-açúcar</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Metabolismo de xilose</b>	<b>23</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>29</b>
<b>4 MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Microrganismos, plasmídeos e preservação</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Condições de cultivo</b>	<b>31</b>
<b>4.3 Meios de cultura</b>	<b>32</b>
<b>4.4 Análise do draft do genoma de <i>B. sacchari</i></b>	<b>32</b>
<b>4.5 Alinhamentos e construção de árvores filogenéticas</b>	<b>33</b>
<b>4.6 Análise da biblioteca metagenômica</b>	<b>33</b>
<b>4.7 Manipulação do DNA</b>	<b>33</b>
<b>4.7.1 Extração de DNA genômico e plasmidial</b>	<b>33</b>
<b>4.7.2 Construção dos iniciadores</b>	<b>33</b>
<b>4.7.3 Reações de PCR</b>	<b>34</b>
<b>4.7.4 Visualização do DNA</b>	<b>37</b>
<b>4.7.5 Purificação dos produtos de PCR obtidos</b>	<b>37</b>
<b>4.7.6 Digestão dos clones com enzimas de restrição</b>	<b>38</b>
<b>4.7.7 Reação de sequenciamento</b>	<b>38</b>
<b>4.7.8 Reação de ligação</b>	<b>38</b>
<b>4.7.9 Eletroporação</b>	<b>38</b>
<b>4.7.10 Conjugação</b>	<b>39</b>
<b>4.8 Construção do plasmídeo pNPTS138::upS+downS<sub>xylA</sub></b>	<b>40</b>
<b>4.9 Mutação por radiação UV e seleção de clones de <i>B. sacchari</i> deficientes no consumo de xilose (xil<sup>-</sup>)</b>	<b>41</b>

<b>4.9.1 Curva de sobrevivência à radiação</b>	<b>41</b>
<b>4.9.2 Seleção de clones de <i>B. sacchari</i> deficientes no consumo de xilose (<i>xil<sup>-</sup></i>)</b>	<b>41</b>
<b>4.10 Síntese de genes para construção de recombinantes</b>	<b>42</b>
<b>4.11 Ensaio para medir a atividade enzimática da enzima xilose isomerase</b>	<b>43</b>
<b>4.12 Avaliação da produção de PHA a partir de xilose</b>	<b>44</b>
<b>4.12.1 Teor e composição do polímero</b>	<b>44</b>
<b>4.12.2 Biomassa</b>	<b>45</b>
<b>4.12.3 Carboidratos</b>	<b>45</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Levantamento de genes e operons envolvidos no metabolismo de xilose</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Seleção de genes</b>	<b>48</b>
<b>5.3 Análise de genes do metabolismo de xilose no draft do genoma de <i>B. sacchari</i></b>	<b>52</b>
<b>5.3.1 Via Isomerase</b>	<b>52</b>
<b>5.3.2 Via de Weimberg</b>	<b>54</b>
<b>5.3.3 Via Oxidoreductase</b>	<b>56</b>
<b>5.3.4 Via de Dahms</b>	<b>57</b>
<b>5.4 Busca de genes na biblioteca metagenômica</b>	<b>58</b>
<b>5.5 Experimentos para gerar mutante de <i>B. sacchari</i> deficiente no gene <i>xylA</i></b>	<b>60</b>
<b>5.5.1 Construção do cassete <i>upS+downSxylA</i></b>	<b>63</b>
<b>5.5.2 Inserção do cassete <i>upS+downSxylA</i> em <i>B. sacchari</i></b>	<b>70</b>
<b>a) Eletroporação</b>	<b>70</b>
<b>b) Conjugação</b>	<b>71</b>
<b>5.5.3 Obtenção de mutantes de <i>B. sacchari xil<sup>-</sup></i> por irradiação UV</b>	<b>77</b>
<b>a) Curva de sobrevivência a radiação</b>	<b>77</b>
<b>b) Seleção de mutantes <i>xil<sup>-</sup></i> (<i>sac<sup>+</sup></i>)</b>	<b>79</b>
<b>5.6 Construção dos recombinantes de <i>B. sacchari</i></b>	<b>81</b>
<b>5.6.1 Genes amplificados e clonados em <i>B. sacchari</i></b>	<b>83</b>
<b>a) <i>xylA</i> de <i>B. sacchari</i></b>	<b>83</b>
<b>b) <i>xylA</i> de <i>B. cenocepacia</i></b>	<b>84</b>
<b>c) <i>xylA</i> de <i>P. luminescens</i></b>	<b>85</b>
<b>5.6.2 Genes sintetizados e clonados em <i>B. sacchari</i></b>	<b>86</b>
<b>5.7 Análise dos recombinantes de <i>B. sacchari</i></b>	<b>87</b>
<b>5.7.1 Análise da atividade enzimática da proteína xilose isomerase dos recombinantes de <i>B. sacchari</i></b>	<b>88</b>

<i>5.7.2 Análise da produção de PHA por linhagens recombinantes a partir de xilose</i>	91
<b>6 CONCLUSÕES FINAIS</b>	96
<b>6.1 Levantamento de genes e operons envolvidos no metabolismo de xilose</b>	96
<b>6.2 Seleção de genes</b>	96
<b>6.3 Análise de genes do metabolismo de xilose no draft do genoma de <i>B. sacchari</i></b>	96
<b>6.4 Busca de genes na Biblioteca metagenômica</b>	96
<b>6.5 Construção de mutantes de <i>B. sacchari</i> inativo no gene <i>xylA</i></b>	97
<b>6.6 Construção dos recombinantes de <i>B. sacchari</i></b>	97
<b>6.7 Avaliação da produção de PHA por linhagens recombinantes de <i>B. sacchari</i> a partir de xilose</b>	97
<b>7 SUGESTÕES DE ATIVIDADES ADICIONAIS</b>	99
<b>REFERÊNCIAS</b>	100
<b>ANEXOS</b>	109
<b>Anexo – 1: Alinhamento completo da figura 5.3, das sequências da proteína xilose isomerase das diferentes bactérias estudadas.</b>	109
<b>Anexo – 2: Alinhamento dos possíveis genes <i>xylB</i> encontrados em <i>B. sacchari</i></b>	113
<b>Anexo – 3: Resultado do sequenciamento dos fragmentos up<i>SxylA</i> e down<i>SxylA</i></b>	114
<b>Anexo – 4: Resultado do sequenciamento do cassete upS+down<i>SxylA</i></b>	117
<b>Anexo – 5: Obtenção de mutantes de <i>B. sacchari</i> xil- por irradiação UV, dados crus</b>	120
<b>Anexo – 6: Resultado do sequenciamento dos genes <i>xylA<sub>Bs</sub></i> e <i>xylA<sub>Bc</sub></i></b>	121
<b>Anexo – 7: Produtos fornecidos pela empresa GenOne</b>	125
<b>Anexo – 8: Ensaio Enzimático da proteína xilose isomerase</b>	133
<b>Anexo – 9: Análise da produção de PHA por linhagens recombinantes a partir de xilose</b>	136

## 1 INTRODUÇÃO

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 dos combustíveis fósseis (Jojima et al., 2010). Os materiais lignocelulósicos são os recursos orgânicos renováveis mais abundantes no planeta (Silva et al., 2004). 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 utilizadas para a produção de etanol (Doran-Peterson et al., 2008) e de polihidroxialcanoatos (PHA), uma família de polímeros para a geração de plástico biodegradável. (LOPES et al., 2014; SASAKI et al., 2008; SILVA et al., 2014).

Na procura de novas estratégias mais amigáveis com o meio ambiente, o uso do bioetanol tomou força na década dos anos 1970 (Goldemberg, 2008) e a tecnologia de produção a partir de biomassa começou a se desenvolver. Sendo líder na produção de açúcar refinado a partir de cana, o Brasil posicionou-se num bom lugar para explorar a opção do etanol como alternativa à gasolina. Como consequência do investimento a tecnologia tem melhorado consideravelmente, porém, ainda existe um excesso de bagaço de cana que não é utilizado para gerar energia e pode ser alvo na produção de outros compostos já que para atingir o máximo grau de eficiência tem que se garantir o uso dos açúcares presentes nesse bagaço (SILVA et al., 2014; WISSELINK et al., 2009).

Os bioplásticos são cada vez mais estudados e são propostos como uma alternativa para a substituição dos plásticos de origem petroquímica. Neste contexto, destacam-se os polihidroxialcanoatos (PHA) que compõem um grupo bastante diversificado de poliésteres acumulados por um grande número de bactérias (Hazer, Steinbüchel, 2007) e já que apresentam propriedades termoplásticas além de serem biodegradáveis e biocompatíveis estes são um dos focos das atenções da comunidade científica (AKARAONYE, 2010).

O PHA produzido a partir de hidrolisado de bagaço de cana tem sido proposto como uma alternativa viável para melhorar a eficiência das usinas de bioetanol (Albuquerque et al., 2007; Lopes et al., 2014; Silva et al., 2004; Silva et al., 2014) e um dos objetivos principais nesta área da pesquisa é aumentar o fator de conversão dos açúcares do bagaço de cana em PHA, e já que a xilose é um dos polissacarídeos que está em maior porcentagem no bagaço,

procura-se aumentar o rendimento de PHA a partir de xilose, sendo este um pré-requisito para a produção desse biopolímero num nível industrial.

Um dos principais fatores limitantes para a produção industrial deste poliéster natural é o elevado custo associado à fonte de carbono (Keenan et al., 2006). Por essa razão, têm sido feitos esforços para utilizar substratos de baixo custo como materiais lignocelulósicos renováveis. Duas plataformas são consideradas para a produção de PHA a partir subprodutos agrícolas e resíduos florestais: (1) hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos que geram uma mistura de açúcares incluindo principalmente glicose, xilose e arabinose (Silva et al., 2004) ou (2) hidrolisados hemicelulósicos ricos em xilose (KEENAN et al., 2004; SILVA et al., 2014).

A xilose é um dos principais constituintes da matéria-prima nas abordagens descritas na literatura e o segundo açúcar mais abundante na natureza. No entanto a sua utilização eficiente apresenta barreiras técnicas para vários bioprocessos (Jeffries, 2006; Saha, 2003), incluindo a produção de etanol (Jeffries, Jin, 2004) e de PHA (SILVA et al., 2004).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Polihidroxicanoatos**

Os polihidroxicanoatos (PHA) são termoplásticos naturais que são produzidos por uma grande variedade de bactérias, que sintetizam estes poliésteres para o armazenamento de carbono e energia (Hazer, Steinbüchel, 2007). Estes polímeros são acumulados em forma de grânulos intracelulares, fenômeno que acontece em maior medida quando o microrganismo está sob um fator limitante no crescimento e com excesso de fonte de carbono simultaneamente. A limitação que origina o acúmulo de PHA pode ser em alguns macronutrientes como o nitrogênio e fósforo e também em alguns micronutrientes como o magnésio e o ferro (Lopes, 2010; Pan et al., 2012). Tem-se reportado acúmulo destes grânulos em valores que atingem cerca de 80% da massa celular seca (Rodrigues et al., 2000) e uma vez esgotada a fonte de carbono, o microrganismo tem a facilidade em usar esses grânulos para continuar com seu crescimento, uma vez que haja os micronutrientes necessários (KADOURI et al., 2003).

O membro da família dos PHA mais estudado e frequentemente encontrado entre as bactérias é o homopolímero poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) que, por causa de suas propriedades materiais muito semelhantes às do polipropileno, é um composto muito promissor como plástico biodegradável (Tokiwa, Ugwu, 2007). Além do monômero 3-hidroxi-butilil-CoA (3HB), cerca de 150 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes dos PHA produzidos por bactérias a partir de diferentes fontes de carbono (Rehm, 2007). A composição monomérica é essencial para determinar as propriedades físicas e mecânicas e, conseqüentemente, a aplicação do PHA. O custo da fonte de carbono pode representar até 30% da produção de PHA (Nonato et al., 2001). Assim, diversos materiais e resíduos agroindustriais têm sido testados como fonte de carbono para bactérias produtoras de PHA, tanto para obter polímeros com diferentes composições monoméricas como para reduzir os custos de sua produção (LOPES et al., 2014; SILVA et al., 2007).

### **2.2 Bagaço de cana-de-açúcar**

Um dos resíduos mais estudados no Brasil para ser utilizado em diferentes processos industriais é o bagaço de cana de açúcar, sua produção estimada para a temporada 2013/14 é de 653,519 milhões de toneladas (UNICA, 2014). Segundo dados do IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, hoje o Brasil possui mais de 400 usinas de etanol

concentradas principalmente no Estado de São Paulo. O bagaço de cana é usado atualmente em usinas de açúcar como fonte de calor nas caldeiras para geração de vapor, aquecimento do caldo da cana e operação das usinas, procurando poupar energia no processo (Macedo et al., 2008; Silva et al., 2014). No entanto, existe uma porcentagem excedente de bagaço que pode ser utilizado para outros fins, especialmente para a produção de produtos com elevado valor agregada.

A lignocelulose, principal componente do bagaço de cana, corresponde a uma mistura de lignina e polímeros de carboidratos (celulose, hemicelulose e pectina). A hemicelulose é o segundo tipo mais comum de polissacarídeo na natureza, representa entre 20 e 35% da biomassa lignocelulolítica, que, adicionalmente, contém 35-50% de celulose e 10-25% de lignina (DORAN-PETERSON et al., 2008).

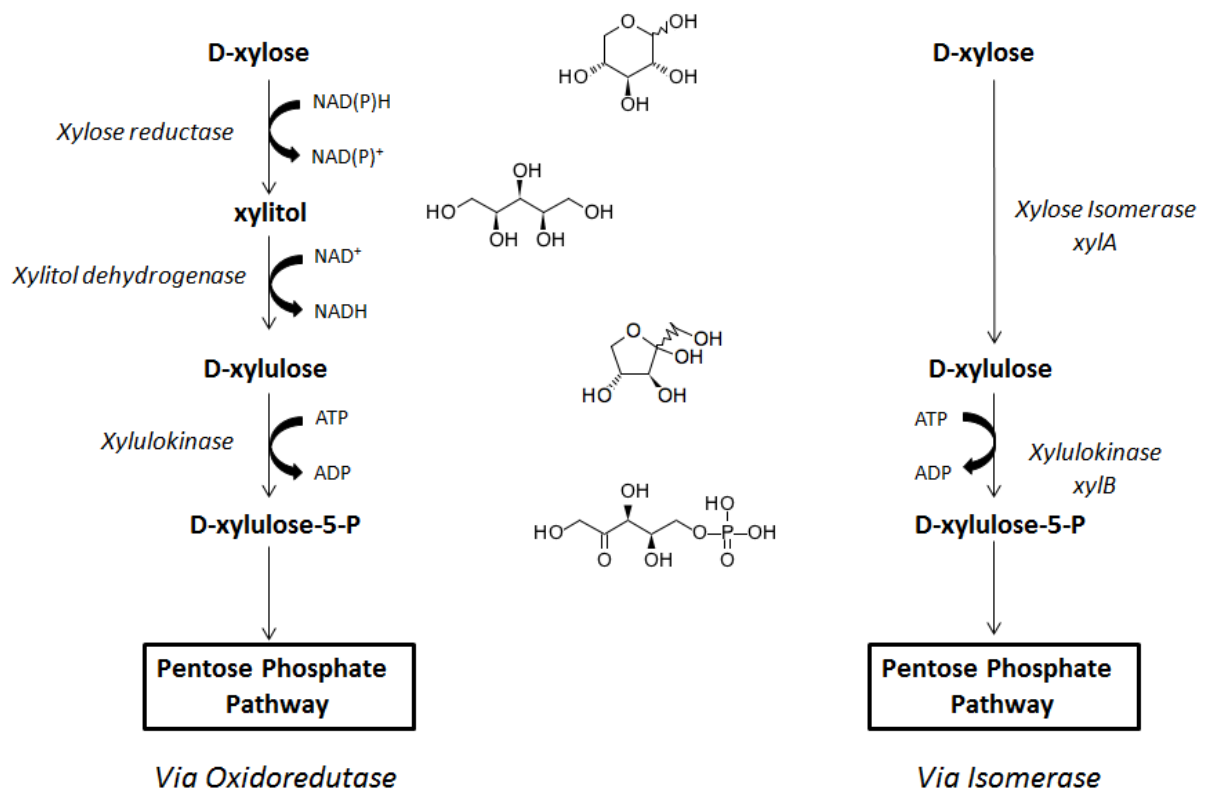
A fim de que sejam utilizados por microrganismos produzindo etanol, PHA ou outros materiais, os resíduos lignocelulósicos necessitam ser submetidos à hidrólise, processo que pode ser catalisado por ácidos ou enzimas celulolíticas (Chandel, 2013; Martin et al., 2002). Enquanto o processo enzimático depende de enzimas comerciais, que representam um custo significativo para o processo, a hidrólise mediada por ácidos gera uma mistura complexa de substâncias tóxicas aos microrganismos, na qual se incluem acetatos, ácidos alifáticos, compostos fenólicos e aromáticos. (Carvalho, 2001; Felipe et al., 1997). Esses resíduos tóxicos reduzem a produtividade, consistindo em uma barreira na utilização de materiais lignocelulósicos (Doran-Peterson et al., 2008; Ingram et al., 1999). Diversas estratégias para reduzir a toxicidade dos hidrolisados têm sido estudadas. As resinas de troca iônica, o uso de carvão ativado, a destoxificação enzimática utilizando a lacase, tratamentos alcalinos e o "overliming" com hidróxido de cálcio estão entre as estratégias de destoxificação que foram investigadas no passado (Chandel et al., 2007; Chandel et al., 2007b; Chandel et al., 2007c; Chandel, 2013; Jurado et al., 2009; Silva et al., 2002; Villarreal et al., 2006). Outras estratégias, incluindo mudanças nas metodologias de fermentação e engenharia metabólica (introdução de genes de ligninase ou lacase), foram introduzidas para superar o efeito dos inibidores degradantes das paredes celulares (Larsson et al., 2001). O uso de linhagens resistentes a esses compostos tóxicos também tem sido buscado (LOPES, 2010; LOPES et al., 2014).

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, xilose e arabinose (Lee, 1997). Ainda que a xilose seja um dos principais componentes da lignocelulose e o segundo açúcar mais abundante da natureza, a sua utilização eficiente ainda representa uma barreira técnica.

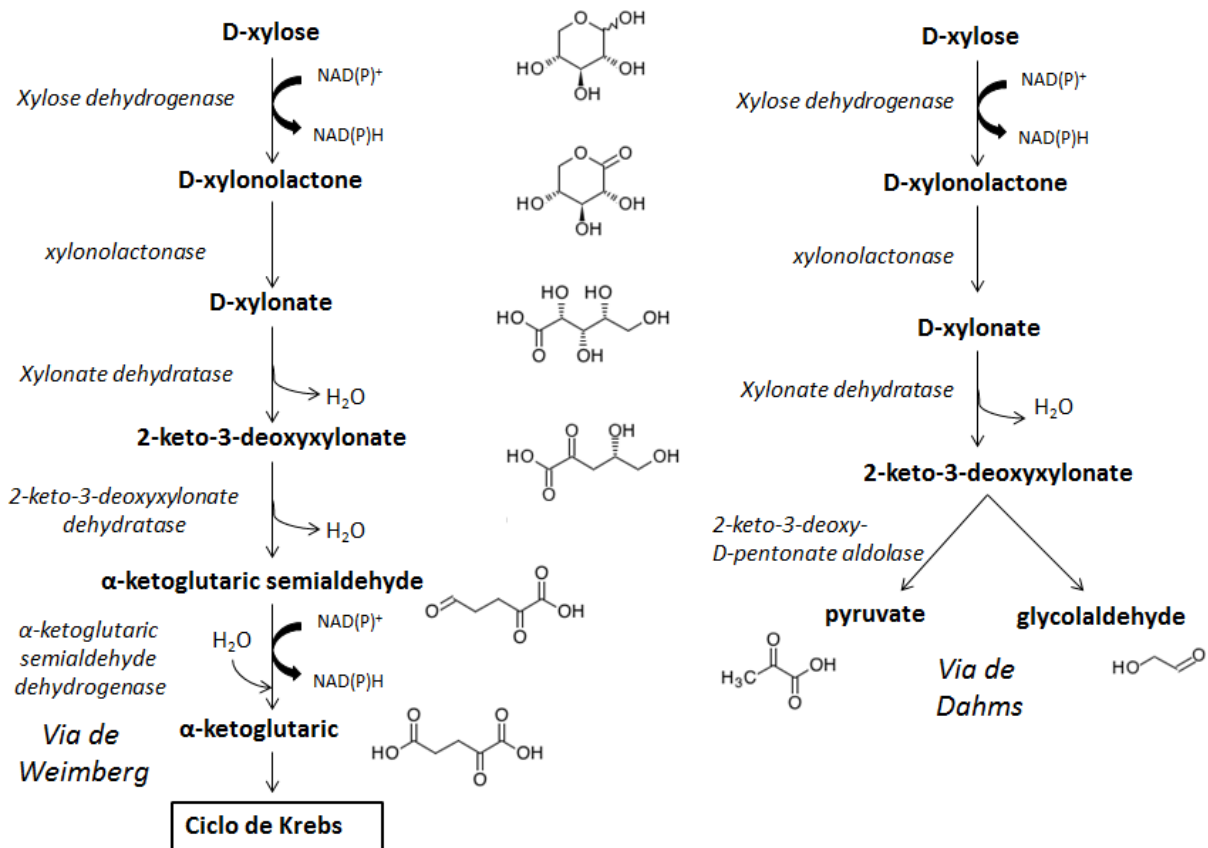
### 2.3 Metabolismo de xilose

As vias metabólicas para o consumo de xilose descritas na literatura são: via Oxidoreductase, via Isomerase, via de Weimberg e Via de Dahms, apresentadas a seguir (figura 2.1 e 2.2):



**Figura – 2.1:** Representação das vias do metabolismo de xilose Oxidoreductase e Isomerase (MATSUSHIKA et al., 2009).





**Figura – 2.2:** Representação das vias do metabolismo de xilose de Weimberg e de Dahms (WEIMBERG, 1961; DAHMS, 1974; JOHNSEN et al., 2009).

Diversos trabalhos, que serão comentados mais adiante, já foram realizados no intuito de tentar melhorar o consumo deste açúcar, tanto em leveduras como em bactérias para a produção de etanol e PHA. Duas limitações são aparentemente o principal problema do consumo desta pentose: a repressão catabólica quando em mistura de açúcares e a ineficiência do consumo de xilose. Uma vez transpostos estes obstáculos, resta o desafio da transferência dos resultados dos experimentos acadêmicos para sua aplicação na prática industrial (VAN MARIS et al., 2006).

Em vários trabalhos observou-se que existe um consumo preferencial de glicose quando em mistura com xilose nos experimentos de produção de etanol, PHA e outros que utilizam o hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar (Deutscher et al., 2006; Freire, 2012; Gosset, 2005; Hernandez-Montalvo et al., 2001; Lopes et al., 2011; Silva et al., 2004). Este consumo preferencial de certos carboidratos em uma mistura de fontes de carbono é chamado repressão catabólica carbônica (CCR). Em *E. coli*, bem como em outros Gram negativos e alguns Gram positivos, a CCR é mediada por proteínas do sistema fosfotransferase (PTS, do inglês *phosphotransferase system*). Esse sistema modula a repressão catabólica através de reguladores globais de transcrição, que em bactérias Gram negativas, corresponde ao

complexo AMP cíclico-proteína de repressão catabólica (CRP, também denominada CAP do inglês “Catabolite gene Activator Protein”). Em bactérias Gram-negativas, na ausência de glicose, uma enzima componente do sistema PTS (EIIAGlc) permanece fosforilada, ativando a enzima adenilato ciclase, que catalisa a produção de AMPc, necessário para a ativação de CRP (Deutscher et al., 2006). Na presença de glicose, no entanto, a enzima EIIAGlc é desfosforilada, inibindo a transcrição dos genes responsáveis pelo transporte e catabolismo de outros açúcares não transportados por esse sistema, como a xilose por exemplo.

A CCR contribui para a redução da produtividade em processos industriais, devido ao consumo sequencial dos açúcares, o que tem levado à modificação genética de diversas linhagens com o objetivo de abolir este fenômeno, a fim de permitir o consumo simultâneo de mistura de açúcares, aumentando a produtividade (GOSSET, 2005; LOPES, 2010; LOPES et al., 2011).

Outro ponto chave para produção de bioprodutos a partir da xilose é conseguir melhorar a eficiência de consumo deste açúcar pelos microrganismos, que, como apresentado em diferentes trabalhos, não são capazes de utilizar essa pentose com o mesmo rendimento que é observado quando se utiliza glicose (Lee, 1997; Lopes et al., 2009b). Uma tentativa que tem sido empregada para aumentar a velocidade de consumo de pentoses é a superexpressão de genes chaves do metabolismo de xilose (Freire, 2012; Lopes et al., 2009b; Tao et al., 2001). Em *E. coli* KO11, o transporte de xilose envolve três componentes principais (transporte ABC), codificados pelos genes *xylF* (proteína periplasmática), *xylG* (permease) e *xylH* (ATPase), que estão organizados em um único operon (*xylFGH*) (Song, Park, 1997). Outros sistemas de transportes existem, como o produto dos genes *xylE* e *xylT*, que consiste em um sistema quimiosmótico do tipo simporte de prótons, de baixa afinidade (Sofia et al., 1994). Já o catabolismo desse açúcar em *E. coli* KO11 é iniciado pelos produtos dos genes *xylA* (xilose isomerase) e *xylB* (xiluloquinase), organizados em um segundo operon (*xylAB*), que assim como *xylFGH* é controlado positivamente tanto pelo produto de *xylR* como pela proteína CRP (Song, Park, 1997). O gene *xylR*, que se localiza à montante de *xylFGH*, caracteriza-se por apresentar um promotor alvo fraco e seu produto reconhece sequências consenso localizadas nas regiões promotoras de *xylAB* e *xylFGH* (IA e IF), ativando a transcrição por associar-se diretamente a componentes do aparato transcricional (Song, Park, 1997).

Recentemente, tem havido um grande esforço na obtenção de etanol de segunda geração tendo como matéria prima o bagaço de cana-de-açúcar. Tem se considerado possível a produção de etanol a partir de hemicelulose e celulose, desde que haja uma profunda análise dos processos de pré-tratamento hidrólise e fermentação no sentido de se chegar a um desenvolvimento sustentável (Antunes et al., 2014; Caldeira-Pires et al., 2013; Dias et al., 2011; Goldemberg, 2008; Lopes et al., 2014). Para tentar realizar esse processo foram feitos diversos trabalhos tanto em leveduras como em bactérias na finalidade de melhorar o consumo de xilose, que parece ser o obstáculo principal para a utilização deste tipo de substrato em presença ou ausência de glicose.

Grande parte das leveduras, principalmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, são grandes produtoras de etanol a partir de glicose, no entanto não são normalmente capazes de fermentar xilose e arabinose, prejudicando o rendimento do processo (Jarboe et al., 2007). Por outro lado, ainda que algumas espécies de leveduras tenham sido reportadas como capazes de produzir etanol a partir de xilose, a taxa de conversão e o rendimento são muito baixos (Matsushika et al., 2009). Desta maneira, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de torná-las mais eficientes nesse aspecto (Antunes et al., 2014; Jin, Jeffries, 2003; Hahn-Hagerdal et al., 2001; Hahn-Haegerdal et al., 2007; Lee et al., 2012; Matsushika et al., 2009).

Uma das estratégias utilizadas para melhorar o consumo de xilose foi introduzir o gene *xylA*, que codifica a proteína xilose isomerase, da via isomerase do metabolismo de xilose, de diferentes microrganismos, na levedura *Saccharomyces cerevisiae* para melhorar a utilização de xilose para a produção de bioetanol. Esta levedura não pode naturalmente assimilar a xilose presente na hemicelulose, porém pode utilizar a xilulose, produto da reação da enzima xilose isomerase em presença de xilose (Hector et al., 2013; Madhavan et al., 2009; Matsushika et al., 2009; Van Maris et al., 2007; Van Vleet, Jeffries, 2009; Wang et al., 2013). Genes *xylA* de espécies de *Burkholderia* têm sido utilizados com sucesso para capacitar *Saccharomyces cerevisiae* a produzir etanol a partir de xilose (DE FIGUEIREDO VILELA et al., 2013).

A proteína xilose isomerase já foi muito estudada por apresentar grande interesse na indústria alimentar para a fabricação de frutose, pois ela não somente tem afinidade por xilose, mas pode catalisar a reação que transforma a glicose em frutose (Asboth, Naray-Szabo, 2000). Esta enzima apresenta também um grande potencial para a utilização de

resíduos lignocelulósicos, uma vez que a xilose é o segundo açúcar mais abundante neste tipo de resíduo (ZHOU et al., 2012).

Estes estudos mostram que esta enzima possui uma afinidade pelo substrato e uma eficiência catalítica que teriam potencial para serem melhoradas e que algumas mutações em específicos aminoácidos poderiam melhorar estes parâmetros (Asboth, Naray-Szabo, 2000). Por esta razão, muitos estudos tem se voltado para o melhoramento desta enzima em particular. O seu próprio mecanismo enzimático continua em fase de elucidação e apenas em 2010 Kovalevsky *et al.* resolveram sua estrutura por cristalografia de nêutrons, a qual proporcionou uma melhor compreensão do rearranjo dos átomos de hidrogênio durante o ciclo catalítico desta enzima (KOVALEVSKY et al., 2010).

Estudos sobre mutações na xilose isomerase têm sido realizados no intuito de melhorar a eficiência catalítica dessa enzima, mudar a suas propriedades físicas e alterar a especificidade ao substrato. A maioria das mutações foram feitas perto do sítio ativo da enzima ou na interface entre as subunidades (Karimäki et al., 2004; Lee et al., 2012; Meng et al., 1991; Sriprapundh, Vieille, Zeikus, 2003). A cristalografia e os estudos sobre mutações na proteína xilose isomerase não forneceram somente uma melhor compreensão sobre a estrutura da proteína, mas também demonstraram um melhor conhecimento sobre a interação desta enzima com o substrato e o mecanismo desta reação (ASBOTH, NARAY-SZABO, 2000; FENN et al., 2004; GARCIA-VILOCA et al., 2003; HU et al., 1997; PATEL et al., 2012; WHITLOW et al., 1991;).

Outra possibilidade para o aproveitamento de hidrolisados para gerar bioprodutos seria construir biorefinarias em usinas de açúcar e álcool. A glicose poderia ser utilizada para produzir etanol pela levedura, enquanto a xilose poderia ser usada para gerar outros produtos como os PHA (LOPES, 2010; NONATO et al., 2001; RAICHER, 2011; SILVA et al., 2014).

Neste sentido, um importante trabalho realizado em nosso laboratório foi o isolamento e identificação da nova espécie bacteriana, Gram-negativa, denominada *Burkholderia sacchari* (Bramer et al., 2001) que, quando comparada com *Cupriavidus necator* DSM 545 (anteriormente denominada *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*), uma excelente produtora de PHA (Reinecke, Steinbuechel, 2009), tem a vantagem de ser capaz de crescer em sacarose, acumulando até 80% da massa celular na forma de PHB em condições não otimizadas (GOMEZ et al., 1996).

Considerando que a maioria das bactérias apresentam tanto CCR como um consumo pouco eficiente de xilose, outros estudos foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar o consumo de xilose em bactérias capazes de acumular PHA. Recombinantes com a repressão catabólica parcialmente abolida vêm sendo construídos e testados frente a misturas de açúcares e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de PHA (Lopes et al., 2011). Foi verificado que um mutante de *B. sacchari*, com mutação no sistema PTS, mas capaz de crescer em glicose (PTS-Glu+), provavelmente transportada por outro sistema, consumiu glicose e arabinose simultaneamente, mas ainda apresentou consumo atrasado de xilose. Esse resultado poderia indicar que a repressão catabólica foi parcialmente abolida nesse mutante ou que como já foi observado em *E. coli*, a arabinose possui um sistema de repressão para a xilose através do produto do gene *araC* (TASHA et al., 2010).

Através de uma estratégia diferente para aumentar o consumo de xilose, foi clonado o gene *xylA* de *B. sacchari*, que foi capaz de restituir parcialmente a capacidade de crescimento em xilose a mutantes *xil-* desta mesma bactéria (Lopes et al., 2009b). Em continuação, observou-se que em *B. sacchari* LFM 101 nenhum efeito (positivo ou negativo) sobre o consumo de xilose e produção de poli-3-hidroxi-butirato foi obtido com a inserção de maior número de cópias dos genes *xylAB* e/ou *xylFGH* de *E. coli* KO11 (FREIRE, 2012).

Neste contexto, e com o draft do genoma de *B. sacchari* recém sequenciado pelo laboratório de bioprodutos (Alexandrino et al., 2014), foi proposto este trabalho, que pretendeu entender melhor o metabolismo de xilose na bactéria *Burkholderia sacchari* e compará-lo com outras bactérias. O intuito é de descobrir novos genes potenciais para melhorar o consumo deste açúcar para geração de bioprodutos, como os PHA.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi buscar por genes envolvidos no metabolismo de xilose, expressá-los em *Burkholderia sacchari*, visando melhorar a eficiência no consumo deste açúcar, avaliando os efeitos sobre o seu consumo e os impactos sobre a produção de biopolímeros da família dos polihidroxialcanoatos (PHA).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Foi feito um levantamento de sequências da proteína xilose isomerase, produto do gene *xylA*, de bactérias das famílias *Burkholderiaceae* et *Enterobacteriaceae*. Estas foram alinhadas e árvores filogenéticas foram construídas.
- Foi feita a seleção de genes, que foram em seguida clonados em *B. sacchari*, nestas árvores filogenéticas. Dois fatores foram utilizados para seleção dos genes, aqueles que apresentaram as variações sugeridas na literatura como melhoradoras da atividade enzimática e de bactérias da família das *Burkholderiaceae*.
- Genes contendo modificações reportadas na literatura como melhoradoras da atividade enzimática, foram pesquisados *in silico* em biblioteca metagenômica desenvolvida pela Profa. Aline Maria da Silva a partir de composteiras do Parque Zoológico de São Paulo.
- Uma análise do genoma de *B. sacchari* foi feita na qual foram procuradas as diferentes vias de metabolismo de xilose propostas na literatura.
- Os genes selecionados anteriormente, foram clonados no vetor pBBR1MCS-2 e os plasmídeos construídos foram inseridos em *B. sacchari*, construindo 7 linhagens recombinantes.
- Com os recombinantes obtidos, foram feitos experimentos de atividade enzimática da proteína xilose isomerase e experimentos em frascos agitados em meio mineral com xilose como única fonte de carbono, comparando-se o consumo de xilose e a produção de PHA com as linhagens selvagem e controle.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos, plasmídeos e preservação

As linhagens, os plasmídeos e os genes que foram utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 4.1. A preservação foi feita por liofilização (Silva et al., 1992) ou suspensão em glicerol (20% m/v) e estoque em freezer a -80 °C.

**Tabela – 4.1** - Bactérias e plasmídeos utilizados no trabalho.

Bactérias/Plasmídeos	Características	Referência
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101	LMG 19450 Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>+</sup> , Kan <sup>s</sup> , Amp <sup>s</sup> , Tc <sup>s</sup>	Brämer <i>et al.</i> , 2001
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 LFM 1382	CBMAI 0625	CBMAI
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1 LFM 1389	Bactéria entomopatogênica.	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> DH5α	F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1219	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ-	Invitrogen
<i>E. coli</i> S17-1 LFM 209	Tc <sup>s</sup> , recA, genes <i>tra</i> do plasmídeo RP4 integrado no DNA genômico.	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> S17-1 LFM 1366	<i>E. coli</i> S17-1 abrigando o plasmídeo pNPTS138::upS+downS <sub>xyIA</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH5α LFM 1209	<i>E. coli</i> DH5α abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::upS <sub>xyIA</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH5α LFM 1210	<i>E. coli</i> DH5α abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::downS <sub>xyIA</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH5α LFM 1211	<i>E. coli</i> DH5α abrigando plasmídeo pNPTS138::upS <sub>xyIA</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH5α LFM 1212	<i>E. coli</i> DH5α abrigando plasmídeo pNPTS138::downS <sub>xyIA</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH5α LFM 1250	<i>E. coli</i> DH5α abrigando plasmídeo pNPTS138::upS+downS <sub>xyIA</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1414	<i>E. coli</i> DH10B abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA <sub>Bs</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1409	<i>E. coli</i> DH10B abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA <sub>Bc</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1415	<i>E. coli</i> DH5α abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA <sub>Bx</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1416	<i>E. coli</i> DH10B abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA <sub>DeP,phy</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1381	<i>E. coli</i> DH10B abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA*	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1417	<i>E. coli</i> DH10B abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA <sub>Pl</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1380	<i>E. coli</i> DH10B abrigando plasmídeo pBSK-xyIA*	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1418	<i>E. coli</i> DH10B abrigando plasmídeo pCloneEZ-NRS::xyIA <sub>Bs</sub>	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1419	<i>E. coli</i> DH10B abrigando plasmídeo pCloneEZ-NRS::xyIA <sub>Bp</sub>	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 1405	<i>B. sacchari</i> abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 1406	<i>B. sacchari</i> abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA <sub>Bs</sub>	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 1408	<i>B. sacchari</i> abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA <sub>Bc</sub>	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 1420	<i>B. sacchari</i> abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA <sub>Bx</sub>	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 1421	<i>B. sacchari</i> abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA <sub>Bp</sub>	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 1407	<i>B. sacchari</i> abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2::xyIA*	Este trabalho

<i>B. sacchari</i> LFM 1422	<i>B. sacchari</i> abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2:: <i>xyLA<sub>PI</sub></i>	Este trabalho
pBBR1MCS-2	Plasmídeo mobilizável com amplo espectro de hospedeiros (5,144 Kb), Km <sup>r</sup> .	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pNPTS138	Plasmídeo de curto espectro de hospedeiros (5361 Kb), com gene de transferência M13ori, oriT, colE1 Km <sup>r</sup> , sacB <sup>+</sup> .	M.R.K. Alley, Anac or Phar-maceuticals Inc., PaloAlto, California.
pBSK- <i>xyLA</i> *	Plasmídeo derivado do pBluescript II SK com resistência a ampicilina e com o gene sintético <i>xyLA</i> * (4234pb).	GenOne
pCloneEZ-NRS:: <i>xyLA<sub>Bx</sub></i>	Plasmídeo pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp com resistência a ampicilina e contendo o gene sintético <i>xyLA</i> de <i>Burkholderia xenovorans LB400</i> (3245pb).	GenOne
pCloneEZ-NRS:: <i>xyLA<sub>Bp</sub></i>	Plasmídeo pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp com resistência a ampicilina e contendo o gene sintético <i>xyLA</i> de <i>Burkholderia phymatum STM815</i> (3248pb).	GenOne
pBBR1MCS-2::upS <i>xyLA</i>	Plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo um fragmento de 930Kb situado a montante (upStream) do gene <i>xyLA</i> .	Este trabalho
pBBR1MCS-2::downS <i>xyLA</i>	Plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo um fragmento de 1001Kb situado a jusante (downStream) do gene <i>xyLA</i> .	Este trabalho
pNPTS138::upS <i>xyLA</i>	Plasmídeo pNPTS138 contendo um fragmento de 930Kb situado a montante (upStream) do gene <i>xyLA</i> .	Este trabalho
pNPTS138::downS <i>xyLA</i>	Plasmídeo pNPTS138 contendo um fragmento de 1001Kb situado a jusante (downStream) do gene <i>xyLA</i> .	Este trabalho
pNPTS138::upS+downS <i>xyLA</i>	Plasmídeo pNPTS138 contendo os fragmentos de 930 e 1001Kb situados a montante e a jusante do gene <i>xyLA</i> respectivamente.	Este trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>xyLA<sub>Bs</sub></i>	Plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo o gene <i>xyLA</i> de <i>B. sacchari</i> .	Este trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>xyLA<sub>Bc</sub></i>	Plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo o gene <i>xyLA</i> de <i>B. cenocepacia</i> .	Este trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>xyLA<sub>Bx</sub></i>	Plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo o gene <i>xyLA</i> de <i>B. xenovorans</i> .	Este trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>xyLA<sub>Bp</sub></i>	Plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo o gene <i>xyLA</i> de <i>B. phymatum</i> .	Este trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>xyLA</i> *	Plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo o gene <i>xyLA</i> de <i>B. sacchari</i> sintetizado com as mutações ditas melhoradoras.	Este trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>xyLA<sub>PI</sub></i>	Plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo o gene <i>xyLA</i> de <i>P. luminescens</i> .	Este trabalho

LFM - Laboratório de Fisiologia de Microorganismos do ICB-USP; ATCC - *American Type Cell Culture*; Sac<sup>+</sup>- crescimento em sacarose; PHA<sup>+</sup> - acúmulo de PHA; Hx<sup>-</sup> - ausência de crescimento em ácido hexanóico; Kan<sup>s</sup> - sensibilidade à canamicina; Amp<sup>s</sup> - sensibilidade à ampicilina; Tc<sup>s</sup> - sensibilidade à tetraciclina; Kan<sup>r</sup> - resistência à canamicina; sacB<sup>+</sup> - genes *sacB*.

## 4.2 Condições de cultivo

As culturas microbianas de *E. coli* contendo os diferentes plasmídeos, assim como de *B. sacchari* foram cultivadas em meio líquido e/ou sólido de Luria Bertani (LB), contendo antibióticos quando necessário (Sambrook, 1989). As culturas microbianas de *B. sacchari* contendo os diferentes plasmídeos, também foram cultivadas em meio líquido e/ou sólido de meio mineral (MM), contendo os antibióticos, quando requerido, e xilose, glicose ou sacarose quando necessário (Rocha et al., 2008). As linhagens de *E. coli* foram cultivadas a 37 °C, sob agitação de 150-200 rpm durante 20 horas e as de *B. sacchari* foram cultivadas a 30 °C, com agitação de 150-200 rpm durante 24 horas (h).



### 4.3 Meios de cultura

#### Meio Luria Bertani - LB

**Tabela – 4.2** – Composição do meio LB

Componente	Concentração
Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de Sódio	10 g/L

#### Meio Mineral - MM

**Tabela – 4.3** – Composição do meio MM

Componente	Concentração
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g/L
Solução de elementos traços	1,0 mL/L
Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6%	1,0 mL/L
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O Sol. 1%	1,0 mL/L
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O Sol. 20%	1,0 mL/L

A solução de elementos traços continha: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,30 g/L; CoCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O 0,20 g/L; ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0,10 g/L; MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O 0,03 g/L; NaMoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O 0,03 g/L; NiCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O 0,02 g/L; CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O 0,01 g/L.

Os meios de cultura sólidos foram obtidos pela adição de ágar 15-20 g/L à composição dos meios líquidos acima citados. Canamicina foi utilizada para a seleção de clones na concentração de 50 µg/mL.

### 4.4 Análise do draft do genoma de *B. sacchari*

Foi recentemente obtido um draft do genoma da bactéria *B. sacchari* por sequenciamento na plataforma Roche GS FLX Titanium pela empresa Macrogen. Genes de interesse envolvidos no catabolismo de xilose de outras *Burkholderias* foram obtidos no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Utilizando o programa Bioedit (Biosciences, 1997) estas sequências foram alinhadas com o genoma de *B. sacchari*. Em seguida, utilizando os programas Artemis (Sanger Institute) para

fazer a anotação dos genes, e o Softberry (Softberry, Inc.) para prever os genes e operons, foram encontrados e anotados os potenciais genes do metabolismo de xilose nesta bactéria.

#### **4.5 Alinhamentos e construção de árvores filogenéticas**

Os genes anotados no genoma de *B. sacchari* foram alinhados com os seus homólogos em outras espécies de *Burkholderias* obtidas no NCBI. O alinhamento foi feito utilizando três diferentes ferramentas eletrônicas, como critério de comparação e verificação, do *European Bioinformatics Institute*, Clustal W2, Muscle e T-Coffee. Esses alinhamentos foram utilizados para construção de árvores filogenéticas utilizando o programa MEGA (Tamura K, 2011). Para a montagem dessas árvores, foi utilizado o método “neighbor join” e o “bootstrap” foi calculado reamostrado 500 vezes (TAMURA K, 2011).

#### **4.6 Análise da biblioteca metagenômica**

Genes do metabolismo de xilose foram procurados em dados obtidos a partir da biblioteca metagenômica fornecida pela Dra. Aline Maria da Silva do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP (MARTINS et al., 2013). A busca foi feita utilizando o número E.C. ou K.O. das enzimas de interesse em um banco de dados virtual.

#### **4.7 Manipulação do DNA**

##### ***4.7.1 Extração de DNA genômico e plasmidial***

O DNA genômico de *B. sacchari* LFM101 utilizado durante este trabalho foi extraído utilizando o kit Dneasy Blood & Tissue da Quiagen, conforme instruções do fabricante. Para a utilização dos vetores de clonagem pBBR1MCS-2 e pNPTS138, estes foram extraídos de um cultivo de *E. coli* S17-1 portadora destes vetores em meio LB com canamicina (LBK), utilizando-se para isso o kit de extração de DNA plasmidial QIAprep® Spin Miniprep da Qiagen. Após a extração plasmidial, as amostras foram quantificadas em NanoDrop 2000 e confirmadas por digestão e eletroforese em gel de agarose.

##### ***4.7.2 Construção dos iniciadores***

O desenho dos iniciadores foi feito a partir de sequências obtidas através da análise do draft do genoma recém-sequenciado de *B. sacchari* ou de sequências obtidas no NCBI das diferentes bactérias utilizadas. Para a construção do cassete upS+downS $xyLA$ , foi feito o desenho dos iniciadores para amplificação das regiões à montante (upS $xyLA$  - 930pb) e à jusante (downS $xyLA$  1001pb) do possível gene  $xyLA$ . A construção e análise *in silico* dos

iniciadores foi feita utilizando-se o programa Serial Cloner (Softonic). Com este programa foi possível saber quais os sítios de restrição eram apropriados para serem utilizados e assim estes foram inseridos nas extremidades dos iniciadores (tabela 4.4).

**Tabela – 4.4** - Iniciadores sintetizados para a amplificação de genes *xyl*. Os sítios de restrição estão sublinhados e especificados na tabela.

Iniciadores sintetizados	Sítios de restrição	Denominação
1F – [5'-CTATAT <u>GGGCCCA</u> ATGCCGTGCATCAGACAG-3']	<i>ApaI</i>	<i>PFapaI</i>
1R – [5'-CAAGATA <u>AAGCTT</u> GAAATACGACATGTCGTCTCC-3']	<i>HindIII</i>	<i>PRHindIII</i>
2F – [5'-CATAATA <u>AAGCTT</u> ATTTACGGCCAACGCTGAGCG-3']	<i>HindIII</i>	<i>PFHindIII</i>
2R – [5'-CAGAT <u>GGGATCCG</u> ACATGAGATGCCATGTGC-3']	<i>BamHI</i>	<i>PRBamHI</i>
3F – [5'-GCTAGCA <u>AAGCTT</u> TCGCTGTGCATCGACCAAG-3']	<i>HindIII</i>	<i>PFxylA<sub>Bs</sub></i>
3R – [5'-AGCGTAG <u>GGATCC</u> TCAGCGTTGGCCGTAAATC-3']	<i>BamHI</i>	<i>PRxylA<sub>Bs</sub></i>
4F – [5'-GCATAGA <u>AAGCTT</u> TGCAACAAGAACCCGCACG-3']	<i>HindIII</i>	<i>PFxylA<sub>Bc</sub></i>
4R – [5'-ACTGAC <u>GGATCC</u> TCAGCGCAACCCGTAGAT-3']	<i>BamHI</i>	<i>PRxylA<sub>Bc</sub></i>
5F – [5'-GCTACTTCGAGCATATCCCC-3']	-	<i>PFxylA<sub>Bx</sub></i>
5R – [5'-TCAACGGCCACTGTAGATTG-3']	-	<i>PRxylA<sub>Bx</sub></i>
6F – [5'-GAGCTACTTCGAACACCTCC-3']	-	<i>PFxylA<sub>Bp</sub></i>
6R – [5'-CACTTCGCCGACGAGAAAATC-3']	-	<i>PRxylA<sub>Bp</sub></i>
7F – [5'-TACGAT <u>GGGCCCGT</u> GAGAGAGTGCAGCCAAC-3']	<i>ApaI</i>	<i>PFxylA<sub>Pl</sub></i>
7R – [5'-ACTGC <u>AGGATCC</u> CGCCTATTGAGATAGGCTC-3']	<i>BamHI</i>	<i>PRxylA<sub>Pl</sub></i>
8F – [5'-TGTA <sup>AA</sup> ACGACGGCCAGT-3']	-	<i>PFM13</i>
8R – [5'-CAGGAAACAGCTATGACCATG-3']	-	<i>PRM13</i>

### 4.7.3 Reações de PCR

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient ou Vapo.protect da marca Eppendorf ou Veriti 96 well thermal cycler da marca Applied Biosystems). Para a amplificação e clonagem dos fragmentos up*SxylA* e down*SxylA* foi utilizado a HotStar HiFidelity DNA Polimerase. Para a amplificação e clonagem dos genes *xylA* de *B. sacchari*, *B. cenocepacia* e *P. luminescens*, foi utilizado à enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Estas enzimas, além da atividade de polimerização de DNA, possuem 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 e Phusion High-Fidelity DNA Polimerase, Thermo Scientific). As condições utilizadas foram àquelas indicadas pelo fabricante.

Para um volume de 25 µL de reação utilizando HotStar Hifidelity:

HotStar Hifidelity DNA polimerase	0,5 µL
5x HotStar Hifidelity Buffer	5,0 µL
Iniciador <i>foward</i> (5 µM)	1,0 µL
Iniciador <i>reverse</i> (5 µM)	1,0 µL
DNA (< 250 ng/ µL)	1,0 µL
Água livre de nuclease	15 µL
Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck)	1,5 µL

Para um volume de 20µL de reação utilizando Phusion:

Phusion DNA Polimerase	0,2 µL
5x Phusion HF buffer	4,0 µL
10mM dNTPs	0,4 µL
Iniciador <i>foward</i> (5 µM)	2,0 µL
Iniciador <i>reverse</i> (5 µM)	2,0 µL
DNA	1,0 µL
Água livre de nuclease	8,4 µL
Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck)	3,0 µL

Quando necessário foi adicionado cloreto de magnésio em quantidades variadas.

As reações de amplificação com a enzima HotStar foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 95 °C por 5 minutos, seguidas de subsequentes ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. Esse ciclo foi repetido 30 vezes.

As reações de amplificação com a enzima Phusion foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 98 °C por 1 minuto, seguidas de subsequentes ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a X °C (temperatura varia dependendo do iniciador utilizado) por 20 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Esse ciclo foi repetido 30 vezes seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Os amplicons foram purificados utilizando para isso o kit PCR Purification da Qiagen, conforme as instruções descritas pelo fabricante. 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/>).

Para as demais reações de PCR e de PCR de colônia, com finalidade essencialmente de confirmar a inserção dos fragmentos clonados no vetor e seleção das colônias positivas, foi utilizado a Taq DNA polimerase presente no GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA). As condições utilizadas foram as seguintes:

Para um volume de 10 µL de reação de PCR:

PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)*	6,0 µL
Iniciador <i>foward</i> (5 µM)	1,0 µL
Iniciador <i>reverse</i> (5 µM)	1,0 µL
DNA (< 250 ng/µL)	1,0 µL
Água livre de nuclease	0,5 µL
Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck)	0,5 µL

\* 50 U/mL Taq DNA polimerase, 400 µM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Para um volume de 12 µL de reação de PCR de colônia:

PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)*	6,25 µL
Iniciador <i>foward</i> (5 µM)	1,25 µL
Iniciador <i>reverse</i> (5 µM)	1,25 µL
DNA (< 250 ng/µL)	1 colônia
Água livre de nuclease	2,25 µL
Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck)	1,0 µL

\* 50 U/mL Taq DNA polimerase, 400 µM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

As reações de amplificação foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos, seguidas de subsequentes ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a X °C (depende do iniciador utilizado) de 1 a 3 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Esse ciclo foi repetido 30 vezes, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

#### 4.7.4 Visualização do DNA

Para visualização e análise do DNA provenientes de digestões, extrações e produtos de PCR, foram realizadas corridas de eletroforese em géis de agarose elaborados na concentração de 0,8% (m/v). A solução TAE foi utilizada para dissolver a agarose, bem como o tampão de corrida (SAMBROOK, 1989).

##### Solução TAE

Tris-base (hidroximetil aminometano)	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA de cálcio e sódio (etileno diamina tetrapétalo de cálcio e sódio) 0,5 M	100 mL
H <sub>2</sub> O q.b.	1000 mL

A agarose dissolvida em TAE foi levada ao micro-ondas por 1 minuto e em seguida adicionou-se *SYBR<sup>®</sup> Safe* na proporção de 1 µL de SYBR para 10 mL de agarose diluída em TAE. Após a solidificação do gel, as amostras de DNA foram aplicadas a este, que foi submetido a corridas eletroforéticas de 60-120 V, 80 mA, 80 W por 1-2 horas. Ao final da corrida eletroforética, os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV (254 nm) em transiluminador (Multidoc-It Digital Imaging system UV transilluminator, USA). Foi aplicado no primeiro poço da canaleta do gel, o marcador de peso molecular de DNA, *1kb plus fermentas*, para orientação na seleção dos fragmentos obtidos.

#### 4.7.5 Purificação dos produtos de PCR obtidos

Para o isolamento e a purificação do produto de interesse de cada reação de PCR após a separação e visualização dos fragmentos por corrida eletroforética em gel de agarose, foram utilizados dois tipos de kits dependendo da presença de bandas inespecíficas. Para o isolamento a partir do gel de agarose, quando havia presença de bandas inespecíficas, foi utilizado o QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, USA) e para os produtos de PCR que só apresentavam o amplicon de interesse foi utilizado o QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, USA), conforme instruções dos fabricantes. Este mesmo procedimento foi utilizado para purificar as digestões.

#### 4.7.6 *Digestão dos clones com enzimas de restrição*

Os DNAs plasmidiais previamente extraídos foram digeridos com enzimas de restrição do tipo *FastDigest*<sup>®</sup> (Fermentas Life Sciences), com volume final de 60 µL. As reações de digestão ocorreram de acordo com as orientações do fabricante, seguindo as concentrações, temperatura e tempo de incubação, específicos de cada enzima.

#### 4.7.7 *Reação de sequenciamento*

Após a purificação dos fragmentos amplificados, estes foram utilizados para a reação de sequenciamento no **Centro de Estudos do Genoma Humano - USP**, com o **ABI 3730 DNA Analyser** (Applied Biosystems, USA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o **BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit**. As sequências consenso foram obtidas pelos softwares Pregaprep e GAP oferecidos pelo programa Staden Package (Bonfield, Staden, 1996) e posteriormente comparadas com as sequências obtidas através da análise do genoma de *B. sacchari*.

#### 4.7.8 *Reação de ligação*

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).

#### 4.7.9 *Eletroporação*

Células eletrocompetentes das linhagens *E. coli DH5a*, *E. coli DH10B* e *B. sacchari*, foram preparadas conforme descrito por Ausubel, 1992 (Ausubel, 1992). Inoculou-se uma colônia da bactéria em meio LB líquido durante 16 horas a 37 °C em agitador rotativo. Após a incubação, a densidade ótica (D.O.610nm) foi determinada e um volume adequado de meio LB foi adicionado ao cultivo, de modo a se obter D.O.610 nm inicial de 0,1 unidades de absorvância e 500 mL de cultura final. O cultivo foi então incubado a 37 °C em agitador rotativo e medições de D.O. foram realizadas, até atingir D.O.610 nm = 0,5.

Atingida a D.O. adequada, transferiu-se a cultura para tubos de centrifuga pré-resfriados, mantida em banho de gelo (15 min), e centrifugadas (15 min, 8000 rpm, 4 °C). Descartando o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 mL de água milli-Q estéril e gelada, e foram centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Esse procedimento foi repetido duas vezes e na terceira repetição, a água milli-Q estéril foi substituída por glicerol 10%. O sobrenadante foi mais uma vez desprezado e as células foram

ressuspendidas em 1mL de glicerol 10% gelado, distribuídas em alíquotas de 40  $\mu$ L e conservadas em freezer -80 °C.

Para transformação das células eletrocompetentes foi adicionado 1 $\mu$ L do plasmídeo à alíquota de células eletrocompetentes. A mistura foi então transferida para cubetas de eletroporação de 0,2 cm, previamente resfriadas. As células foram eletroporadas a pulsos de 2500 V, capacitância de 25  $\mu$ F e resistência de 200  $\Omega$ . Adicionou-se 1,0 mL de meio LB às células, que foram incubadas a 37 °C por uma hora no caso de *E. coli* e a 30 °C de 2 às 24 horas no caso de *B. sacchari*. Posteriormente, as células foram semeadas em meio LB sólido contendo canamicina, e IPTG e X-Gal quando necessário, e incubadas a 37 °C por 24 horas ou 30 °C por 48 h, no caso de *E. coli* e *B. sacchari* respectivamente.

#### **4.7.10 Conjugação**

##### Método 1:

Uma cultura de *B. sacchari* em MM com 1 g/L de glicose (MMG1), incubada por 24 h, foi semeada em placa com MMG1 acrescido de canamicina 50  $\mu$ g/mL (MMG1K). Células de *E. coli* S17-1 contendo os plasmídeos foram semeadas pontualmente, com auxílio de palitos estéreis, contendo meio MMG1K sólido com *B. sacchari*, incubando-se a 30 °C durante 48 horas. As colônias de *B. sacchari* recombinantes assim obtidas, foram isoladas através de repicagens sucessivas em MMG1K ou MMS1K (MM contendo sacarose 1 g/L e canamicina 50  $\mu$ g/mL), e finalmente, LBK.

##### Método 2:

Uma cultura de *B. sacchari* foi cultivada em LB líquido por 24 horas a 30 °C e 150 rpm. O mesmo foi feito com uma cultura de *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo pNPTS138::upS+downSxylA porém em meio LBK a 37 °C. Em seguida, de 1 a 25 mL de cada cultura foram centrifugados e suspensos em 0,5 ou 1 mL LB e foram misturados em um tubo de ensaio o qual ficou a 30 °C sem agitação por 24 horas. Depois essa mistura foi centrifugada, suspensa em salina 0,85% e semeada em placas de MMG1K e incubadas a 30 °C de 48 horas a 96 horas. As colônias de *B. sacchari* recombinantes assim obtidas foram testadas por PCR de colônia e foram isoladas através de repicagens sucessivas em MMG1K ou MMS1K e finalmente, LBK.



### Método 3:

Uma cultura de *B. sacchari* foi cultivada em LB líquido por 24 horas a 30 °C e 150 rpm. O mesmo foi feito com uma cultura de *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo pNPTS138::upS+downS*xylA*, porém em meio LBK a 37 °C. Em seguida utilizando um sistema de filtração foram filtrados em uma membrana estéril 1 mL da cultura de *B. sacchari* e em cima desta, 1 mL da cultura de *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo e assim sucessivamente por 5 camadas de cada bactéria. Essa membrana foi colocada em uma placa de meio LB e incubada a 30 °C por 24 horas. Foi feita a lavagem desta membrana com salina 0,85% e então a cultura celular foi centrifugada, ressuspensa em 0,5 mL de salina 0,85% e semeada em placas de MMG1K, as quais foram incubadas a 30 °C de 48 horas a 96 horas. As colônias de *B. sacchari* recombinantes assim obtidas foram testadas por PCR de colônia e foram isoladas através de repicagens sucessivas em MMG1K ou MMS1K e finalmente, LBK.

#### **4.8 Construção do plasmídeo pNPTS138::upS+downS*xylA***

Os amplicons upS*xylA* (região à montante do gene *xylA*) e downS*xylA* (região à jusante do gene *xylA*), foram primeiramente amplificados por reação de PCR utilizando a enzima HiFidelity. Estes fragmentos purificados foram encaminhados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, conforme o protocolo descrito no site da instituição (<http://genoma.ib.usp.br/>). Estes fragmentos foram então digeridos com as enzimas de restrição adequadas (upS*xylA* – *Apal/HindIII*; downS*xylA* – *HindIII/BamHI*) e em seguida ligados separadamente ao vetor pBBR1MCS-2 (pGEM®-T Easy Vector, Promega Corporation) por uma T4 DNA ligase, incubados 18- 24 horas a 16 °C e inseridos em *E. coli* *DH5α* por eletroporação (Sambrook, 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 canamicina (LBK). Os plasmídeos foram então extraídos dos transformantes, digeridos com o par de enzimas de restrição adequado já mencionados (tabela 4.4) e as amostras foram analisadas em gel de agarose (0,8% m/v). O kit Qiaquick Gel Extraction da marca Qiagen foi utilizado quando a extração de DNA a partir do gel de agarose foi necessária. Confirmada a inserção de upS*xylA* e downS*xylA* no pBBR1MCS-2, esses amplicons foram ligados ao vetor pNPTS138 após sua digestão com as enzimas de restrições adequadas. 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 NanoDrop 2000.

Os plasmídeos pNPTS138 com dois amplicons separados foram inseridos em *E. coli DH5α* por eletroporação. Os transformantes foram selecionados em meio sólido LBK com a adição de IPTG e X-Gal e confirmados através do PCR de colônia e analisados em gel de agarose (0,8% m/v). Em seguida, o plasmídeo pNPTS138::upS<sub>xylA</sub> foi digerido com o par de enzimas de restrição *HindIII/BamHI* e ligado com o fragmento previamente purificado e digerido downS<sub>xylA</sub>. Esta construção foi inserida por eletroporação em *E. coli DH5α*. A seleção dos transformantes foi feita em meio sólido LBK e confirmados através do PCR de colônia e analisados em gel de agarose (0,8% m/v). Este plasmídeo foi extraído e suas 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/>).

#### **4.9 Mutação por radiação UV e seleção de clones de *B. sacchari* deficientes no consumo de xilose (xil<sup>-</sup>)**

##### **4.9.1 Curva de sobrevivência à radiação**

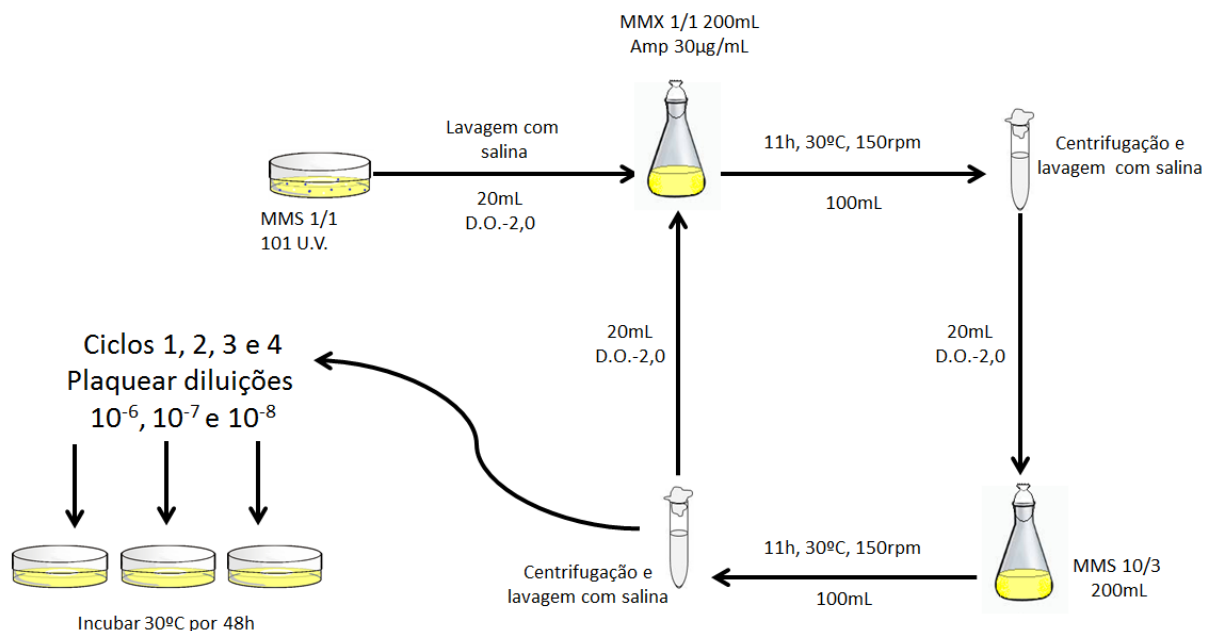
A radiação ultravioleta (UV) (comprimento de onda 254 nm e potência da lâmpada 15 Watt) foi empregada para determinação da sobrevivência de *B. sacchari* em função do tempo de exposição, para definir condições necessárias à obtenção de uma faixa de sobreviventes entre 1 e 10% da população original (Silva et al., 1998). O armário para irradiação utilizado tem uma altura total de 47,0 cm, uma largura de 47,4 cm e a distancia das placas até a luz UV é de 43 cm.

Uma cultura bacteriana em LB (24 h) foi submetida a diluições decimais seriadas. Volumes de 100 µl de diluições apropriadas foram semeados em MM sólido com sacarose 1 g/L (MMS1), utilizando-se alça de Drigalski. Os meios com as culturas bacterianas foram rapidamente irradiadas por diferentes períodos de tempo, protegidas da luz branca e incubadas em ambiente escuro durante 48 horas. Após a incubação, fez-se a contagem de unidades formadoras de colônia por unidade de volume (UFC/mL), definindo-se a condição para se obter a sobrevivência desejada (MENDONÇA, 2009).

##### **4.9.2 Seleção de clones de *B. sacchari* deficientes no consumo de xilose (xil<sup>-</sup>)**

A mutação e a seleção de clones xil<sup>-</sup> foi realizada segundo Silva (1998) Mendonça (2009) com algumas modificações. Diluições apropriadas de uma cultura de *B. sacchari* em LB foram inoculadas em MMS1, sendo imediatamente irradiadas por diferentes tempos com

luz UV, 254 nm, e incubadas no escuro por 48 horas. Clones obtidos após irradiação foram recolhidos, suspensos, centrifugados, lavados e ressuspensos em solução salina 0,85% de modo a se atingir uma D.O.<sub>610</sub> = 2,0. Para reduzir o número de células capazes de utilizar xilose, 20 mL desta suspensão foram adicionados a 180 mL de MM com xilose 1 g/L e ampicilina (30 µg/ml) (MMX1A), incubando-se por 11 horas. A seguir, o cultivo foi centrifugado e lavado, acertando novamente a D.O.<sub>610</sub> em 2,0. 20 mL da cultura foram reinoculados em MM (nitrogênio 3g/L) com sacarose 10 g/L (MMS10/3), reincubando-se por 11 horas. O ciclo de cultivos em MMX1A e MMS10/3 foi repetido mais três vezes. Após cada cultivo, clones mutantes foram isolados em placas de MMS1, os quais foram testados com relação à capacidade de crescer em xilose (MMX1) como única fonte de carbono. Este procedimento está esquematizado na figura 4.1.



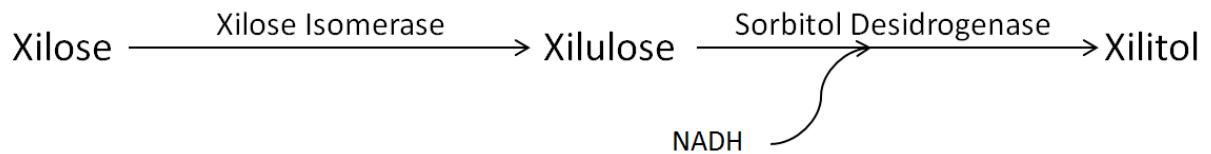
**Figura – 4.1-** Esquema de cultivo para mutação e seleção de clones mutantes xil<sup>-</sup> (sac<sup>+</sup>). MMS ou MMX 1/1: Meio mineral com adição de 1 g/L de sacarose ou xilose; Amp: Antibiótico ampicilina.

#### 4.10 Síntese de genes para construção de recombinantes

Para construção das linhagens de *B. sacchari* abrigando os genes *xylA\**, *xylA<sub>Bp</sub>* e *xylA<sub>Bx</sub>*, foi realizada a síntese desses genes através da empresa GenOne. As seqüências utilizadas foram obtidas no draft do genoma recém-sequenciado de *B. sacchari* e no NCBI.

#### 4.11 Ensaio para medir a atividade enzimática da enzima xilose isomerase

Para medir a atividade enzimática da proteína xilose isomerase foi utilizado um método acoplado. Neste, a xilose será isomerizada a xilulose, pela enzima xilose isomerase, e este produto será utilizado junto com a coenzima nicotinamida adenina dinucleótido hidreto (NADH) para formação de xilitol, reação catalisada pela enzima sorbitol desidrogenase (figura 4.2). Durante o experimento foi medido a absorbância em 340 nm referente ao NADH que é consumido ao longo da segunda reação.



**Figura – 4.2:** Representação das reações do ensaio enzimático acoplado para medição da atividade enzimática da xilose isomerase. O consumo de NADH foi medido utilizando um espectrofotômetro de placa a 340 nm.

O ensaio enzimático foi realizado segundo (Kersters-Hilderson et al., 1987) com algumas alterações. Culturas de *B. sacchari* selvagem e recombinantes foram crescidas em 10mL de meio líquido MMX ou MMXK (4 g/L de xilose) durante 24 horas. As culturas foram centrifugadas e lavadas com o tampão de lavagem (10% glicerol, 40 mM pH8,0 Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl e 10 mM β-mercaptoetanol) e suspensas em 1 mL do mesmo tampão. A partir deste momento todas as preparações seguintes foram realizadas no gelo. Em seguida, essas culturas foram sonicadas utilizando um sonicador de ponta fina (Lab-Line Instruments). Foram realizados 10 pulsos de 5 segundos com um intervalo de 5 segundos entre eles com uma amplitude de potencia de 20% do total. A solução formada foi centrifugada e o sobrenadante, contendo os extratos celulares, foi recuperado. As medições foram realizadas utilizando placas de 96 poços no equipamento “Synergy H1 microplate reader” da marca BioTek. Em cada poço foi adicionado 35 μL de extrato celular ou tampão de lavagem no caso do controle negativo, 15 μL da enzima Sorbitol Desidrogenase (em uma mistura de 2,5 mL de 200 mM Tris e 2,5 mL de glicerol 100% a 10 U/mL) e 250 μL de tampão de medição (50 mM pH 7,5Tris, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM TEA, 0,2 mM NADH e 50 mM xilose). A medição foi feita através da absorbância em 340 nm durante 26 minutos. Em seguida foi medida a concentração de proteína de cada extrato pela metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976). A curva padrão de Bradford está no anexo 8.

## **4.12 Avaliação da produção de PHA a partir de xilose**

Para avaliação quantitativa, as linhagens recombinantes de *B. sacchari* foram inoculadas em MMX líquido contendo canamicina, quando necessário, e incubadas em agitador rotativo a 30 °C por 24 horas a 150rpm. Após esse período, foi medida a absorbância da cultura e foi inoculada a quantidade necessária para começar o ensaio com uma D.O. de 0,4 tomando em conta o volume máximo do cultivo de 50 mL. O inóculo foi feito em MMX líquido contendo canamicina, quando necessário, com xilose 15 g/L e com nitrogênio em concentração limitada, de forma a se obter condições propícias ao acúmulo de PHA. Estes cultivos foram incubados a 30 °C por 72 horas a 150 rpm. Foram retiradas amostras com 0, 24, 48 e 72 horas de cultivo para análises posteriores (determinação de biomassa, xilose e PHA). Para todos os ensaios foram realizados cultivos em triplicata, conforme previamente descritos por Gomez et al., 1996.

### **4.12.1 Teor e composição do polímero**

Quantidade e composição de PHA: A quantidade e composição de PHA foram determinadas por cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (Riis, Mai, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos de vidro, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2mL de 1,2-dicloreto e 100 µL de uma solução de ácido benzoico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram submetidos a uma temperatura de 100 °C por 3 horas. Após o resfriamento, foram adicionados aos tubos 4 mL de água destilada, agitando-os por 30 segundos. Após a separação da fase aquosa da fase orgânica, descartou-se a aquosa e a orgânica foi utilizada para a análise. As amostras foram analisadas por cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (Riis, Mai, 1988) (Gomez, 2000). Foi utilizado cromatógrafo gasoso HP7890A Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5% difenil-95%dimetil-polisiloxane, comprimento 30 m, diâmetro 320 mm, espessura do filme 0,25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições: gás de arraste - Hélio (0,6 mL/min); Temperatura do injetor: 250 °C; Temperatura do detector: 300°C; Sistema de detecção: ionização de chama (FID); Programa de temperaturas do forno: 100 °C por 3 minuto (6 C/min), elevação da temperatura até 180 °C por 5 minutos (6 °C/min) e até 240 °C por 1 minuto.

### **4.12.2 Biomassa**

A massa seca foi determinada por gravimetria, centrifugando-se 10 mL do cultivo (10600 x g, 10min, 4 °C) e submetendo-o à liofilização.

Para cada amostra foi medida a densidade celular em espectrofotômetro (Varian Cary 50 UV-visible spectrophotometer, Agilent Technology  $\lambda=610$  nm)

#### **4.12.3 Carboidratos**

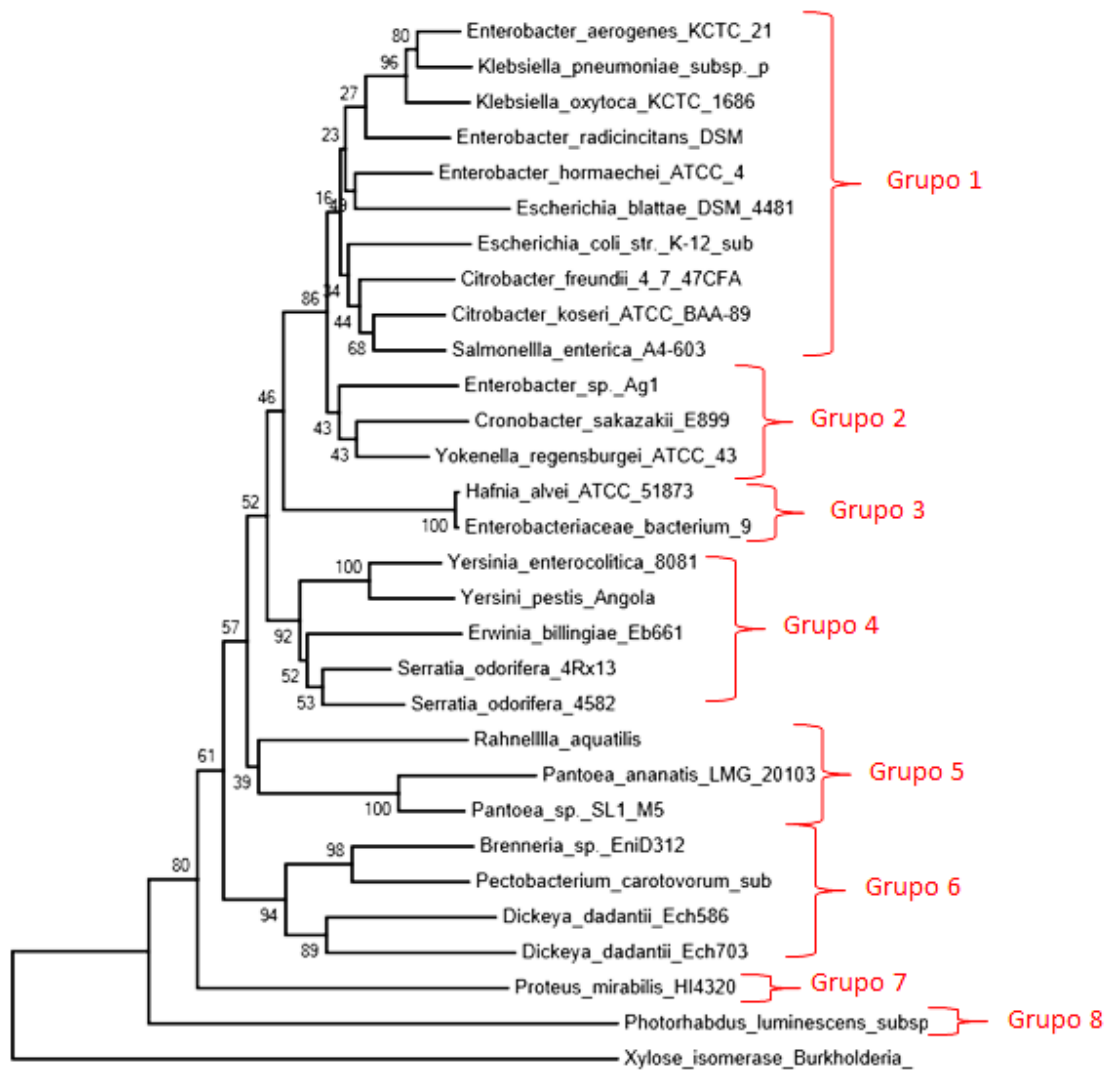
A concentração de xilose foi determinada por cromatografia de fase líquida (HPLC). O método utilizado: coluna Aminex- HPX-87H (Biorad); temperatura do detector - RI 40o C; vazão da fase móvel - 0,3 mL/min; temperatura da coluna – 30 °C.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Levantamento de genes e operons envolvidos no metabolismo de xilose

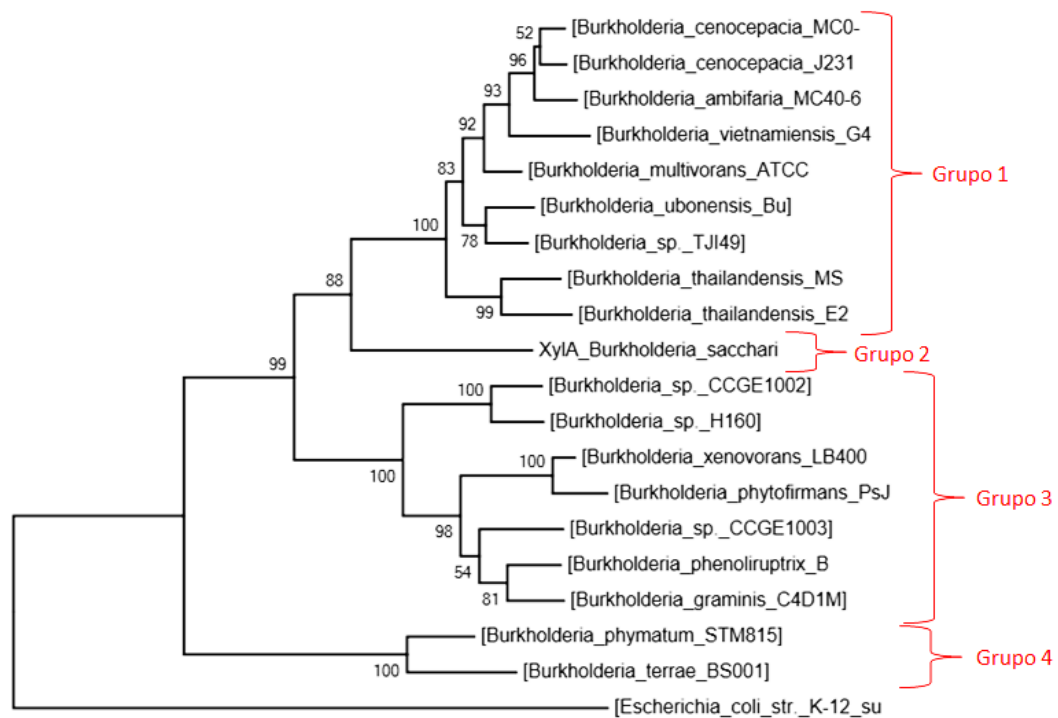
Inicialmente, foi feito o levantamento das sequências proteicas da enzima xilose isomerase, codificada pelo gene de catabolismo de xilose, *xylA*, nas famílias *Burkholderiaceae* e *Enterobacteriaceae*. Esse levantamento foi feito no NCBI, utilizando como base a sequência da proteína xilose isomerase de *E. coli*, a qual já foi bem descrita na literatura (Song, Park, 1997). Essas sequências foram alinhadas utilizando três diferentes ferramentas eletrônicas, como critério de comparação e verificação, do *European Bioinformatics Institute*, Clustal W2, Muscle e T-Coffee. Na maioria dos alinhamentos, foi utilizada a sequência de aminoácidos, uma vez que o código genético é redundante e considerar nucleotídeos pode trazer informações duvidosas. Foram obtidas e alinhadas 32 sequências de *Burkholderiaceae* e 55 de *Enterobacteriaceae*. Esses alinhamentos foram utilizados para construção de árvores filogenéticas. Durante o alinhamento, sequências muito similares (acima de 95% de similaridade) foram agrupadas e consideradas um só organismo deste grupo para elaborar a árvore. Sequências incompletas (menos de 430 aminoácidos) foram descartadas. A sequência de *xylA* de *B. sacchari* descrita por Lopes et al. 2009b foi incluída nesta árvore. Dados complementares dos genes de metabolismo de xilose nesta bactéria foram posteriormente analisados detalhadamente, conforme descrito mais adiante (item 5.3). As árvores filogenéticas construídas se encontram na Figura 5.1 e 5.2.

Esses resultados mostram que existe certa diferença entre a proteína xilose isomerase, produto do gene *xylA*, na família *Enterobacteriaceae* (figura 5.1) assim como na família *Burkholderiaceae* (figura 5.2). Pode-se dividir cada árvore em alguns grupos, 8 para as *Enterobacteriaceae* e 4 para as *Burkholderiaceae*. Estes grupos foram assim separados por estar em ramos distintos, o que indica a presença de certas diferenças na sequência da proteína estudada. Desta forma, as proteínas xilose isomerase dos grupos mais distantes (grupos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, figura 5.1 e grupo 1, 3 e 4, figura 5.2) das bactérias já bem conhecidas, no caso *E. coli* (Grupo 1, figura 5.1), e *B. sacchari* (grupo 2, figura 5.2) são aqueles considerados mais interessantes. Os critérios para se considerar um gene promissor foram baseados na literatura e estão discutidos no item 5.2.



**Figura – 5.1:** Árvore filogenética da proteína xilose isomerase, produto do gene *xylA*, na família *Enterobacteriaceae*. A xilose isomerase de *B. sacchari* foi utilizada como “out group”. O número nas intersecções representa a percentagem do bootstrap.





**Figura – 5.2:** Árvore filogenética da proteína xilose isomerase, produto do gene *xylA*, na família *Burkholderiaceae*. A xilose isomerase de *E. coli* foi utilizada como “out group”. O número nas intersecções representa a porcentagem do bootstrap.

## 5.2 Seleção de genes

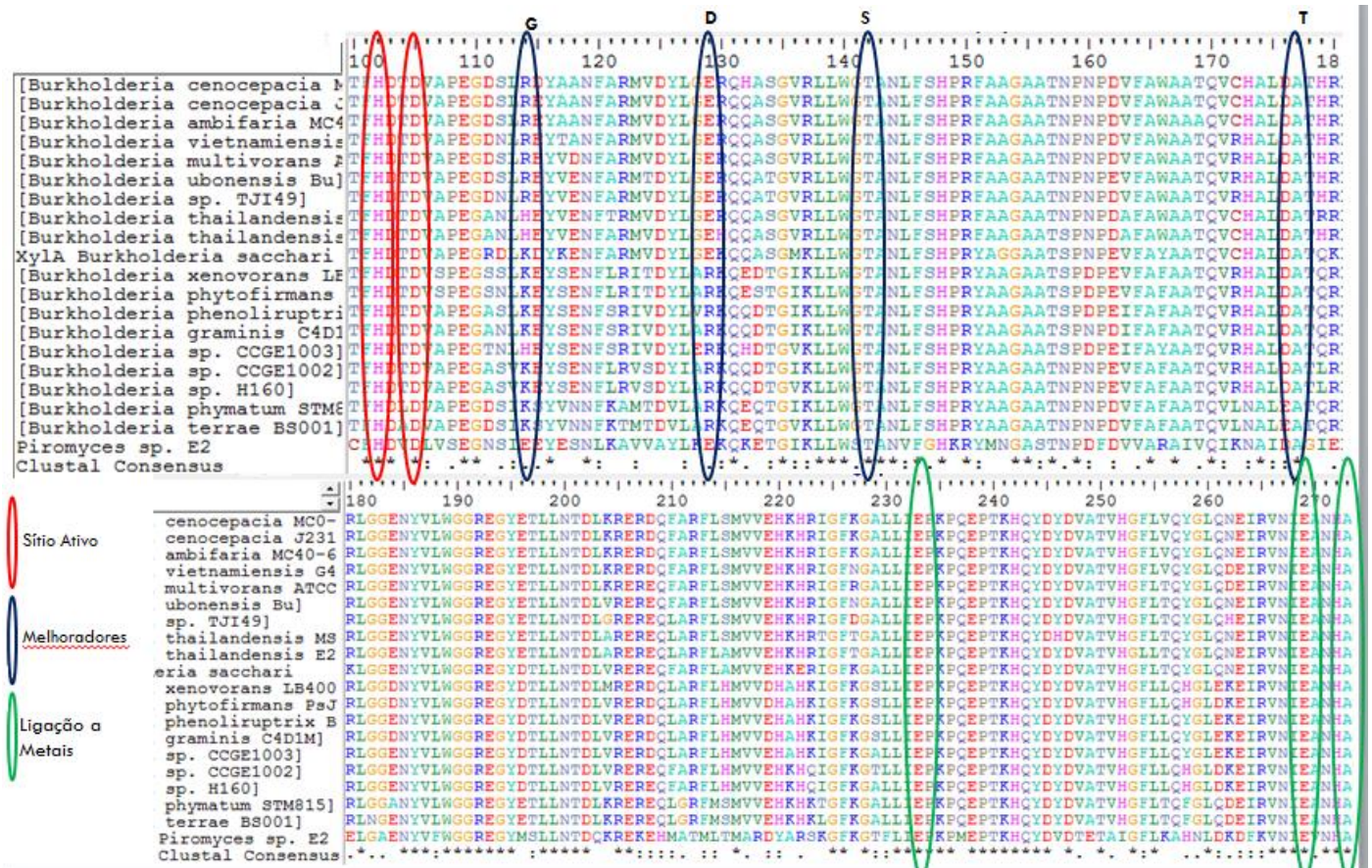
A partir das árvores filogenéticas os grupos de genes candidatos à seleção se encontram nos grupos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, figura 5.1 e grupo 1, 3 e 4, figura 5.2. Esses grupos seriam os escolhidos por estarem distantes das bactérias já conhecidas.

Como os resultados indicam que os genes apresentam diferenças, entretanto não se sabe se elas trazem alguma melhoria para a função da enzima xilose isomerase, o que poderia influenciar o consumo de xilose, foi feita uma busca de indicadores de tal melhoria na literatura.

Sabe-se que o sítio ativo desta enzima possui dois aminoácidos essenciais, uma histidina na posição 100 e um aspartato na posição 103 (no caso da *Burkholderia phymatum STM815*) e qualquer mutação nesses aminoácidos inibe a função desta enzima (Asboth, Naray-Szabo, 2000). Outros aminoácidos essenciais são aqueles que se ligam a metais, principalmente o magnésio, que é essencial para a atividade desta enzima (Asboth, Naray-Szabo, 2000). Estes dois grupos de aminoácidos essenciais são bem conservados em *Pyromices sp. E2*, *Burkholderiaceae* e *Enterobacteriaceae*. Outra informação importante

sobre esta enzima é que ela funciona somente quando suas subunidades estão associadas a outras na forma de dímeros e tetrâmeros (ASBOTH, NARAY-SZABO, 2000; LEE et al., 2012).

Deste modo, foram procurados quais aminoácidos poderiam ser alterados para melhorar a eficiência desta proteína. Um trabalho recente em leveduras que tinha como objetivo melhorar a atividade da enzima xilose isomerase de *Piromyces sp. E2* conseguiu aumentar a atividade enzimática em 77% após uma evolução dirigida (Lee et al., 2012). No total foram alterados seis aminoácidos (E15D, E114G, E129D, T142S, A177T e V433I) que, segundo este trabalho, melhoram a interação enzima substrato (T142S e A177T), com mutações perto do sítio ativo, e a estabilidade da enzima (E15D e V433I), com mutações perto dos sítios de ligação entre os monômeros. Utilizando este trabalho como modelo, foi pesquisado como se comportam esses aminoácidos nas xiloses isomerases de *Burkholderiaceae* e *Enterobacteriaceae*. Um exemplo de uma região do alinhamento feito nas *Burkholderiaceae* indicando diferentes aminoácidos importantes está exposto na figura 5.3, o alinhamento completo se encontra no anexo 1.



**Figura – 5.3:** Alinhamento das enzimas xilose isomerases de *B. sacchari*, outras *Burkholderias* e de *Piromyces sp. E2*. Em vermelho estão ressaltados os aminoácidos importantes para o sítio ativo da enzima. Em azul alguns dos aminoácidos que foram modificados em *Piromyces*, para aumentar a atividade da enzima (Lee et al., 2012). Essas modificações estão mostradas na parte de cima dos círculos azuis, G – glicina; D – aspartato; S – serina; T – Treonina. Em verde alguns aminoácidos que são importantes para a ligação com metais que são essenciais para o funcionamento da enzima. O alinhamento completo apresenta 440 aminoácidos (anexo 1), aqui está exposto somente uma parte deste alinhamento.

As sequências das bactérias *Photorhabdus luminescens* e *Enterobacter sp. AgI* apresentaram uma mutação indicada por Lee et al. (2012), V433I. Observa-se que as mutações descritas como melhoradoras não ocorrem naturalmente, sendo esses aminoácidos altamente conservados. Além disso, os autores demonstraram que somente uma mutação não é suficiente para o melhoramento esperado, ao contrário uma combinação de 6 mutações foi necessária.

Assim, naturalmente não foi encontrada uma sequência promissora com esta análise *in silico*, associada à busca por mutações melhoradoras.

Neste ponto do desenvolvimento deste trabalho, estes resultados foram apresentados no seminário de biologia molecular do Depto de Bioquímica da USP e algumas sugestões/comentários foram discutidos sobre a dificuldade de expressão desses

genes heterólogos em *B. sacchari* devido ao códon preferencial de cada bactéria, sugerindo-se que alguns genes selecionados fossem sintetizados baseados neste códon de preferência para serem introduzidos e testados no hospedeiro *B. sacchari* selecionado, o que será levado em conta nos próximos passos.

Ao analisarmos trabalhos da literatura, conclui-se que a xilose isomerase (codificada pelo gene *xylA*) tem sido o foco no qual os autores têm investido para o melhoramento da capacidade de organismos a utilizarem a xilose (De Figueiredo Vilela et al., 2013; Hector et al., 2013; Kurosawa et al., 2013; Lee et al., 2012; Lopes et al., 2009b; Madhavan et al., 2009; Maehara et al., 2013; Van Vleet, Jeffries, 2009; Wang et al., 2013; Zhou et al., 2012). Alguns trabalhos dizem que a presença do gene *xylB* (figura 2.1) para os organismos que não a possuem é essencial para o fluxo do metabolismo na direção do catabolismo deste açúcar (Lee et al., 2012). Entretanto, como nosso organismo hospedeiro para novos genes, *B. sacchari*, já possui este gene, a inserção de um novo *xylA* seria suficiente para testar melhoramentos do uso da xilose. Embora melhoramentos da capacidade catalítica de enzimas sejam considerados trabalhos hercúleos para alguns autores, estes também consideram que, no caso da xilose isomerase existiria um amplo espaço para tais melhoras. Embora esta afirmativa tenha sido feita em 2000 por Asbóth & Náráy-Szabó, somente em 2012 foi encontrado um melhoramento realizado e testado com sucesso (Lee et al., 2012). Tendo isso em mente, foi dada ênfase em estudar o gene *xylA*.

Quanto à *xylFGH*, trata-se de um transportador do tipo ABC específico para xilose que envolve três componentes principais codificados pelos genes *xylF* (proteína periplasmática), *xylG* (permease) e *xylH* (ATPase), que estão organizados em um único operon (*xylFGH*) (Song, Park, 1997). Outros sistemas de transportes existem, como o produto dos genes *xylE* e *xylT* que consiste em um sistema quimiosmótico do tipo simporte de prótons, de baixa afinidade (Sofia et al., 1994). Porém, como a bactéria *E. coli KO11*, que possui estes dois transportadores (ABC e simporte) ainda não consegue consumir xilose eficientemente (Freire, 2012), provavelmente outras limitações estão associadas a esta deficiência.

Devido à organização complexa do operon *xylFGH* e da composição da proteína codificada sua substituição apresenta uma barreira complicada. Assim este trabalho se encontra sob responsabilidade de Linda Guamán, aluna de doutorado do laboratório de Bioprodutos, compondo a linha de pesquisa onde o presente trabalho também está inserido.

No decorrer deste trabalho, recebemos o draft do genoma de *Burkholderia sacchari* que se encontra em fase de organização. Para obter este draft, o genoma de *B. sacchari* foi submetido ao pirosequenciamento segundo o protocolo do 454 GS FLX Titanium da Roche. Foram obtidos 125 contigs, totalizando 7.264.556pb, com um N50 de 214.117pb e com 785.665 reads.

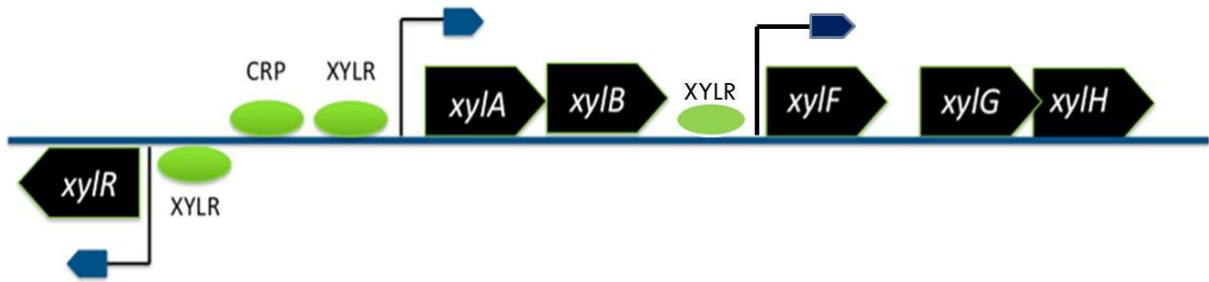
Diante desses dados, foi feita uma busca para verificar que vias metabólicas de xilose estariam codificadas neste genoma, o que será comentado a seguir.

### **5.3 Análise de genes do metabolismo de xilose no draft do genoma de *B. sacchari***

Utilizando o draft do genoma da bactéria *B. sacchari*, ainda na forma de contigs, foram procuradas as diferentes vias do metabolismo de xilose nesta bactéria.

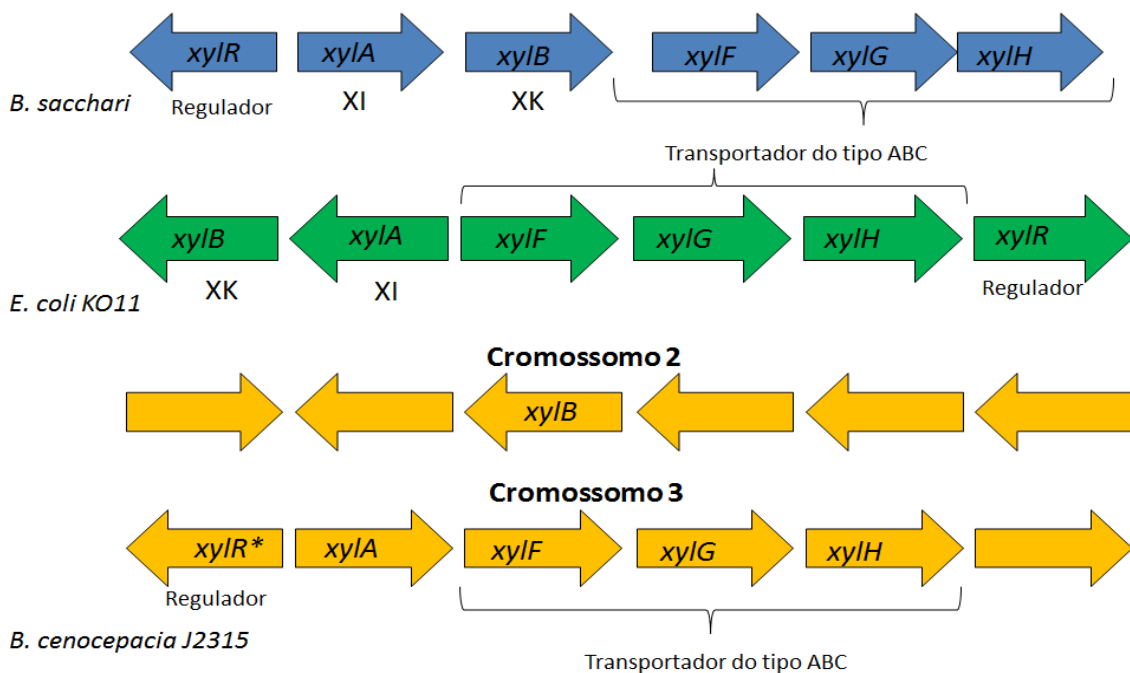
#### **5.3.1 Via Isomerase**

Em primeiro lugar, foi feita a busca dos genes relativos à via isomerase para o metabolismo de xilose. Foi utilizada uma sequência do gene *xylA*, que codifica a enzima xilose isomerase, obtida de trabalhos anteriores (Lopes et al., 2011) e sequências de genes da via isomerase de outras bactérias obtidas no NCBI. Utilizando os programas Artemis, Softberry e Bioedit foi possível encontrar todos os genes da via isomerase assim como possíveis promotores e sítios de ligação das proteínas XYLR (regulador da transcrição) e CRP (proteína envolvida na repressão catabólica carbônica) (figura 5.4). Essas sequências foram alinhadas no Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) no NCBI. Esta via é composta pelos genes *xylR*, *xylAB* e *xylFGH*. O gene *xylR* é um regulador da transcrição dos genes do metabolismo de xilose, que no caso de *E.coli*, funciona como um ativador da transcrição em presença de xilose. O gene *xylA* codifica para a enzima xilose isomerase, que catalisa a reação de conversão de xilose para xilulose e o gene *xylB* codifica para a enzima que catalisa a reação convertendo xilulose para xilulose-5-fosfato, a qual é incorporada na via das pentoses no metabolismo central. O genes *xylFGH* codificam para um transportador do tipo ABC, específico para xilose que utiliza ATP.



**Figura – 5.4:** Organização da via isomerase do metabolismo de xilose em *B. sacchari* – *xylA* (xilose isomerase), *xylB* (xiluloquinase) *xylFGH* (transportador do tipo ABC), *xylR* (regulador). As setas representam os promotores e os círculos verdes os sítios de ligação das proteínas XYLR e CRP.

Esta é a principal via encontrada em bactérias e sua organização varia dependendo do grupo e mesmo da espécie. Comparou-se então a organização deste operon em *B. sacchari*, *B. cenocepacia J2315* e *E. coli KO11*, como mostra a figura 5.5. Este operon está organizado de três maneiras diferentes nestas três bactérias. No caso de *B. sacchari*, os genes *xylABFGH* estão no mesmo sentido, enquanto o gene *xylR* está orientado no sentido contrário e todos se encontram na mesma região do genoma. Por outro lado, em *B. cenocepacia J2315*, os genes *xylAFGH* e *xylR* estão orientados conforme os de *B. sacchari* e se encontram na mesma região no genoma, porém o gene *xylB* se encontra em outro cromossomo. No caso de *E. coli KO11*, os genes *xylFGH* e *xylR* estão orientados no mesmo sentido enquanto os genes *xylAB* estão orientados no sentido contrário.

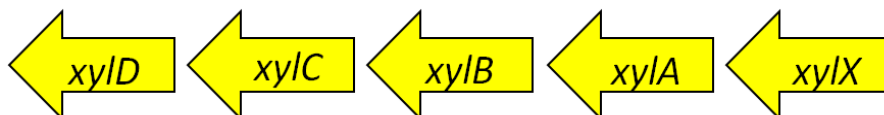


**Figura – 5.5:** Representação das organizações dos genes do metabolismo de xilose da via isomerase das bactérias *B. sacchari*, *B. cenocepacia J2315* e *E. coli KO11*. XI: xilose isomerase; XK: xiluloquinase; *xylR\**: Anotado como regulador do tipo *araC*, mas com alta similaridade com *xylR* de *Burkholderia thailandensis E264*.

Em diversas bactérias o gene *xylB* está presente em mais de uma cópia no genoma (Freire, 2012). Uma delas normalmente junto com o operon, e uma ou mais cópias em outras regiões. No caso de *B. sacchari*, foram encontrados dois outros genes com alta similaridade com a sequência de *xylB* em outras regiões do genoma. Um deles (*xylB-2*) apresenta um “query cover” (qc), ou seja, porcentagem da proteína ou gene que foi alinhado, de 99% e uma identidade (id), ou seja, porcentagem de bases ou aminoácidos alinhados dentro do qc, de 56% com o gene *xylB* de *B. sacchari*. O interessante é que este mesmo gene apresenta um qc de 100% e uma id de 84% com o gene *xylB* de *Burkholderia phytofirmans*. O terceiro (*xylB-3*) possível *xylB* encontrado em *B. sacchari*, apresenta uma qc de 84% e uma id de 33% com o *xylB* de *B. sacchari*. O mesmo gene apresenta um qc de 97% e uma id de 62% com o gene *xylB* de *Burkholderia phenoliruptrix*. O alinhamento destes três genes estão no anexo 2. Ainda não se sabe se estes genes estão ativos ou não e se possuem alguma função no metabolismo de xilose.

### 5.3.2 Via de Weimberg

Nesta etapa, foi procurada a via de Weimberg de metabolismo de xilose no genoma de *B. sacchari*. Esta via foi descrita pela primeira vez em 1960 por Ralph Weimberg em um estudo com a bactéria *Pseudomonas fragi* (Weimberg, 1961). Outras bactérias apresentam esta via de metabolismo de xilose, como por exemplo, *Caulobacter crescentus* (Stephens et al., 2007), onde ela está bem descrita, razão pela qual os seus genes foram utilizados como base para se fazer a procura. É uma via de metabolismo de xilose completamente diferente da via isomerase por apresentar enzimas e intermediários diferentes. Em *C. crescentus*, esta via está organizada na forma de um operon, *xyIXABCD* (figura 5.6). A xilose vai ser transformada em  $\alpha$ -cetoglutarato o qual entrará no metabolismo central através do ciclo de Krebs, diferente da via isomerase que entra pela via das pentoses.

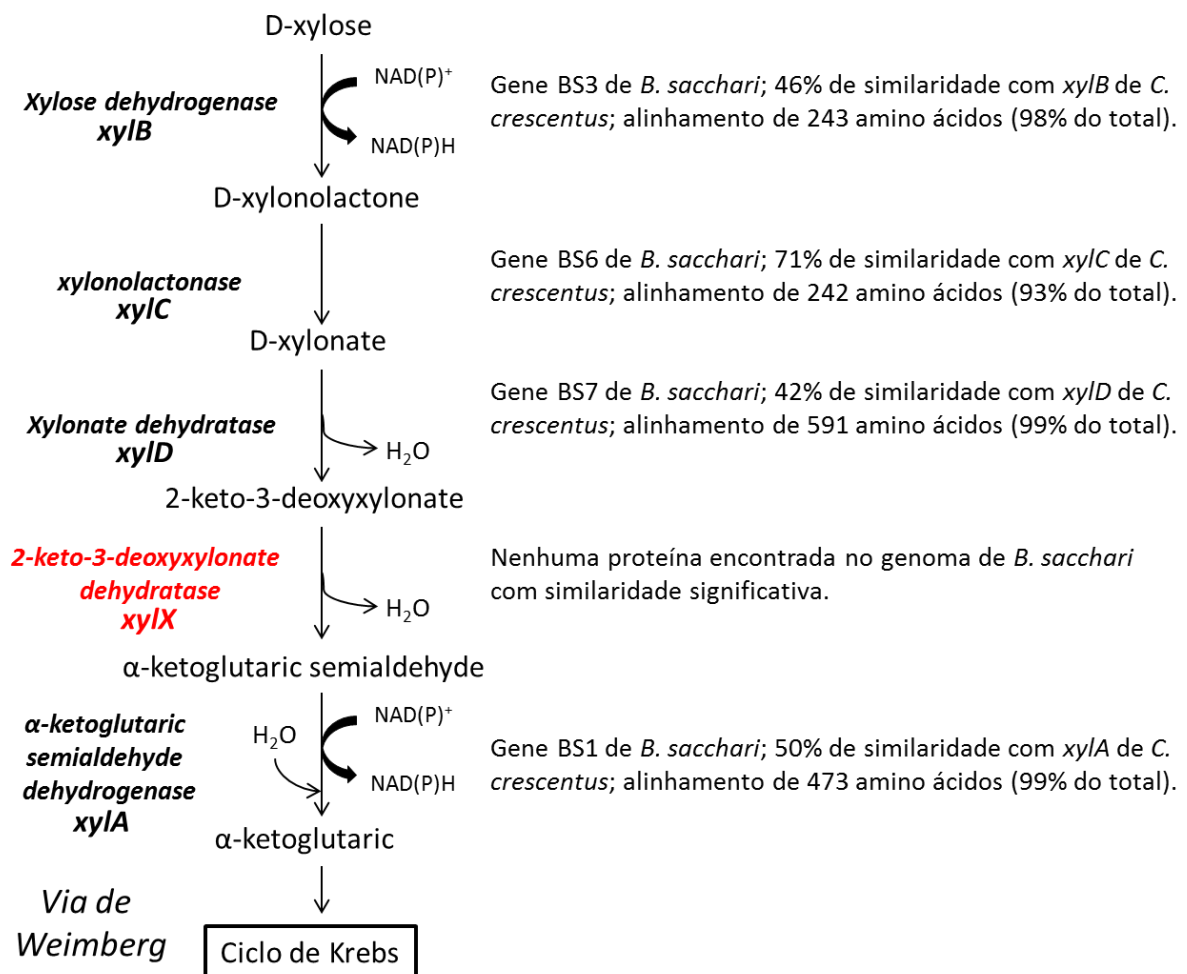


**Figura – 5.6:** Representação da organização dos genes do metabolismo de xilose da via Weimberg da bactéria *C. crescentus*. *xyID*: Xilonato desidratase; *xyIC*: Xilonolactonase; *xyIB*: Xilose desidrogenase; *xyIA*: semialdeído  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase; *xyIX*: 2-ceto-3-desoxixilonato desidratase.

Um trabalho na literatura (Meijnen et al., 2009) descreve a introdução da via Weimberg de *C. crescentus* em uma *Pseudomonas putida S12* incapaz de crescer em um meio

contendo xilose como a única fonte de carbono. A descoberta mais interessante foi que não era necessária a introdução de todos os genes da via de Weimberg para que esta bactéria conseguisse consumir xilose. Na verdade, apenas o gene *xylD* era necessário, porém a introdução em conjunto dos genes *xylXAD* aumentava o crescimento e consumo deste açúcar. Utilizando a sequência proteica dos genes da via de Weimberg de catabolismo de xilose de *C. crescentus*, foi possível encontrar diferentes proteínas similares em *P. putida S12*.

Desta maneira, foi utilizado o mesmo conceito para estudar a presença desta via em *B. sacchari*. Em primeiro, foram procurados os genes de *C. crescentus* no genoma de *B. sacchari*. O resultado está exposto na figura 5.7. É possível notar que *B. sacchari* apresenta genes com similaridades significativas aos de *C. crescentus*, com exceção de *xylX*, que codifica para uma 2-ceto-3-deoxi-D-xilonato desidratase. Talvez fosse possível resgatar esta via de metabolismo de xilose em *B. sacchari* com a introdução do gene de *C. crescentus* que não foi nela encontrado.



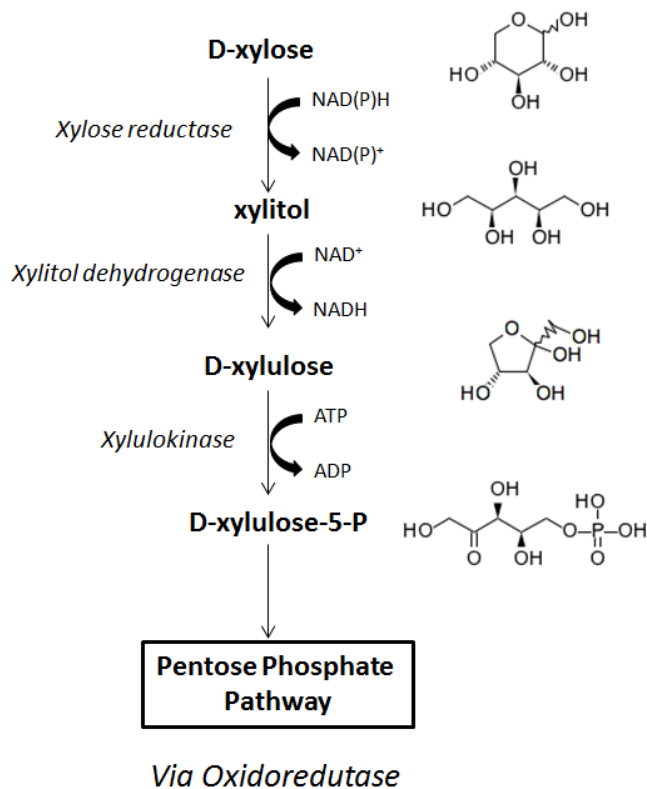
**Figura – 5.7:** Esquema representando a via de Weimberg em *Caulobacter crescentus* (*xylBCDXA*) e os diferentes genes encontrados no genoma de *B. sacchari* (BS3, BS6, BS7 e BS1). A porcentagem de similaridade



e o número de aminoácidos alinhados também estão expostos. Para os genes de *B. sacchari* foi colocado à porcentagem de aminoácidos alinhados comparado com o total presente na proteína em questão.

### 5.3.3 Via Oxidoreductase

A via Oxidoreductase de metabolismo de xilose é a principal via encontrada em leveduras, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* e poucas bactérias possuem ou expressão esta via (Matsushika et al., 2009). Ela apresenta como diferença para a via isomerase que a xilose é transformada em xilulose em duas etapas passando por um intermediário de xilitol. Em seguida, a xilulose é transformada em xilulose-5-fosfato, como na via isomerase, e entra na via das pentoses, como mostra a figura 5.8.



**Figura – 5.8:** Representação da via Oxidoreductase de metabolismo de xilose presente em *Saccharomyces cerevisiae*.

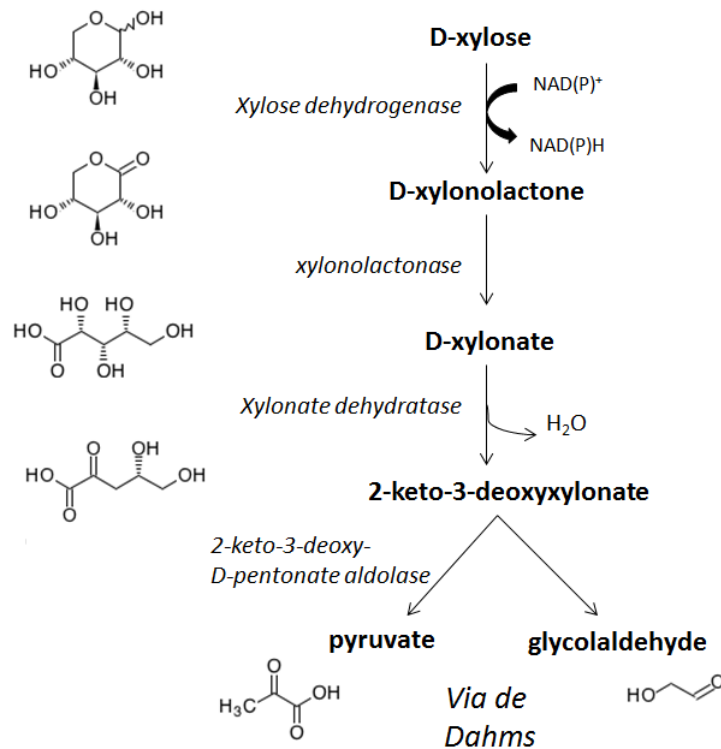
Um problema já bem descrito na literatura desta via, é que na sua grande maioria, os microrganismos vão fazer a primeira reação utilizando o NADPH, como cofator, e a segunda utilizando o  $\text{NAD}^+$  o que acaba levando a um desbalanço dos cofatores (De Figueiredo Vilela et al., 2013; Hector et al., 2013; Jeffries, Jin, 2004; Jeffries, 2006; Lee et al., 2012; Matsushika et al., 2009; Van Maris et al., 2007; Zhou et al., 2012). Para encontrar um

equilíbrio, o xilitol será excretado, diminuindo assim a produção de qualquer produto a partir desta fonte de carbono. O xilitol é um produto interessante que pode ser utilizado em diversos processos (Sarrouh, Da Silva, 2013; Silva et al., 2011), porém não é de interesse quando se pretende gerar outros produtos a partir de xilose. Muitos tentaram encontrar enzimas com preferências para outros cofatores, porém ainda não foi conseguido eliminar totalmente a excreção de xilitol (Jeffries, Jin, 2004; Matsushika et al., 2009). Os genes de *S. cerevisiae* foram utilizados para procurar esta via em *B. sacchari*. Nenhuma similaridade significativa foi encontrada. Como esta via apresenta o problema de desbalanço de cofatores, excreção de xilitol e já foi muito bem descrita na literatura, foi escolhido não prosseguir com maiores investigações. Desta forma, esta via não será estudada em mais detalhes ao decorrer deste trabalho.

#### **5.3.4 Via de Dahms**

Esta via foi descrita pela primeira vez por Stephen Dahms em 1974 em uma espécie de *Pseudomonas* (Dahms, 1974). É uma via similar a via de Weimberg, porém, o intermediário 2-ceto-3-deoxililonato é clivado por uma aldolase em piruvato e glicolaldeido, como mostra a figura 5.9.

Foi feita uma procura no NCBI, assim como no *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e outros sites, porém mais nenhuma informação foi encontrada além de dois artigos escritos por Stephen Dahms nos anos 70. Desta forma, não foi conseguido encontrar nenhuma sequência referente à enzima do último passo da via, uma 2-ceto-3-deoxi-D-pentonato-aldolase. Assim não foi possível procurar um gene responsável por esta reação em *B. sacchari*. Pela falta de informação, foi decidido não investigar em mais profundidade a via de Dahms ao decorrer deste trabalho.



**Figura – 5.9:** Representação da via de Dahms descrita em uma espécie de *Pseudomonas*.

Uma vez procuradas as diferentes vias do metabolismo de xilose em *B. sacchari*, foi possível concluir que provavelmente esta bactéria utiliza a via isomerase e sua organização gênica foi indicada. Ela também apresenta algumas enzimas similares àquelas utilizadas na via de Weimberg. Provavelmente são enzimas que possuem outra função na célula bacteriana, porém talvez pudessem restituir esta via se fossem complementadas. Assim, esses resultados reforçaram nosso interesse em investigar a via isomerase em mais detalhes para tentar melhorar esta via já existente e assim aumentar o consumo de xilose em *B. sacchari*. No momento, o draft do genoma de *B. sacchari* está em fase de organização e montagem sendo objeto do trabalho de Mestrado de Paulo Alexandrino em colaboração com o professor André Fujita do programa de pós-graduação de Bioinformática.

Na etapa a seguir deste trabalho, foram procurados novos genes de possível interesse (conforme definido no item 5.2) em um banco metagenômico.

#### 5.4 Busca de genes na biblioteca metagenômica

Foram disponibilizados dados obtidos pela Dra Aline Maria da Silva do IQ USP em colaboração com a Fundação Parque Zoológico de São Paulo, no qual se levantou o metagenoma de amostras de compostagem desta última instituição. O trabalho de

metagenômica foi realizado em duas condições diferentes durante o processo de compostagem, ZC1 e ZC2. ZC1 foi construído a partir de uma amostra retirada durante uma operação de compostagem após 8 dias de início do processo (Zoo Composting 1, ZC1), enquanto ZC2 foi coletada após 60 dias (Zoo composting 2, ZC2) (MARTINS et al., 2013).

Os dados disponibilizados a partir das amostras acima para a busca dos genes de interesse foram preliminarmente analisados com o auxílio de Luciana Principal Antunes, daquele grupo do IQ. Os dados gerados por este grupo sobre o metagenoma foram publicados no final de abril de 2013 (Martins et al., 2013). O sistema de armazenamento de dados disponibilizado do banco metagenômico era baseado no número E.C. das enzimas potencialmente neles codificadas. Assim, para buscar novas potenciais xiloses isomerases, buscou-se neste banco por regiões com similaridades para genes codificadores de E.C. 5.3.1.5. (xilose isomerase). Também foi feita uma busca para os outros genes do metabolismo de xilose da via isomerase : E.C. 2.7.1.17 (xiluloquinase), E.C. 3.6.3.17 (ATPase transportadora de monossacarídeo), K10543 (proteína de ligação à xilose) e K10544 (proteína permease de xilose).

A partir desta análise foram obtidas 5085 sequências referentes aos diferentes genes da via isomerase de metabolismo de xilose distribuídos conforme a tabela 5.1.

**Tabela – 5.1:** Número de sequências obtidas através do trabalho de metagenômica realizado no laboratório da professora Aline, do departamento de Química da USP.

<b>ID da enzima</b>	<b>Nome</b>	<b>Metagenoma ZC1</b>	<b>Metagenoma ZC2</b>
<b>EC:5.3.1.5</b>	<b>Xylose isomerase (<i>xyIA</i>)</b>	<b>244</b>	<b>220</b>
EC:2.7.1.17	Xylulokinase ( <i>xyIB</i> )	618	449
EC:3.6.3.17	Monosaccharide-transporting ATPase ( <i>xyIH</i> )	2239	1167
KO:K10543	D-xylose transport system substrate-binding protein ( <i>xyIF</i> )	49	32
KO:K10544	D-xylose transport system permease protein ( <i>xyIG</i> )	40	27

ZC1 e ZC2 representam as duas situações diferentes durante o processo de compostagem, realizado no zoológico de São Paulo, durante o qual as amostras foram coletadas. E.C. – Enzyme code; KO – KEGG Orthology.

Para cada enzima pesquisada, foi gerado um conjunto de arquivos em formato txt indicando possíveis sequências codificadoras daquela enzima. Observou-se que os tamanhos das sequências fornecidas são bastante heterogêneas variando de 28 a 438 aminoácidos, sendo na sua grande maioria em torno de 100 aminoácidos, ou seja, incompletas. Os arquivos txt do grupo da xilose isomerase com as maiores sequências (152 a 438 aminoácidos) foram

submetidos a um alinhamento no NCBI utilizando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Foi observada similaridade destas sequências com aquelas já descritas para organismos degradadores de biomassa e sua presença coincidiu com a composição recém descrita destas duas comunidades ZC1 e ZC2 (Martins et al., 2013).

O próximo passo para verificar diferenças entre essas sequências e aquelas da bactéria hospedeira para construção dos recombinantes, seria o alinhamento e construção de árvore filogenética para verificar tanto a presença de aminoácidos melhoradores da atividade enzimática, quanto para identificar o posicionamento destas sequências filogeneticamente em relação às sequências previamente estudadas. Entretanto, para isso, utilizando as ferramentas de construção de árvore filogenética é necessário ter sequências de tamanhos similares. O que se pode perceber analisando os dados do metagenoma foi que as sequências não eram somente de tamanhos diferentes, mas também representavam regiões diferentes da proteína xilose isomerase. Outro problema é que as sequências que não sejam de *Burkholderiaceae* ou *Enterobacteriaceae* não teriam utilidade numa árvore destes grupos, pois seriam naturalmente distantes.

Diante deste cenário, os dados foram reanalisados no intuito de conseguir encontrar uma sequência de interesse completa. As informações do metagenoma foram liberadas publicamente no IMG/M e no MG-RAST ([http://img.jgi.doe.gov/m/doc/about\\_index.html](http://img.jgi.doe.gov/m/doc/about_index.html) e <http://metagenomics.anl.gov/>), não tendo sido identificadas sequências completas de genes alvo. Assim a conclusão é que a busca em biblioteca metagenômica, no nosso caso, foi infrutífera e, portanto, foi dada ênfase na introdução das modificações ditas melhoradoras descritas na literatura para xilose isomerase (item 5.6).

### **5.5 Experimentos para gerar mutante de *B. sacchari* deficiente no gene *xylA***

O hospedeiro ideal para avaliar a atividade de outros genes *xylA* seria uma *B. sacchari* afetada neste gene nativo. Duas metodologias foram empregadas para se gerar tal mutante: mutação por dupla recombinação homóloga, empregando o vetor suicida pNPTS138 e contra seleção por expressão do gene *sacB* contido no vetor, e ainda o uso de radiação UV para gerar tais mutantes. Foram realizados e repetidos exaustivamente os experimentos planejados para se obter tais mutantes sem sucesso. Todos esses experimentos estão minuciosamente detalhados neste item 5.5, não tendo havido êxito na obtenção do mutante alvo.

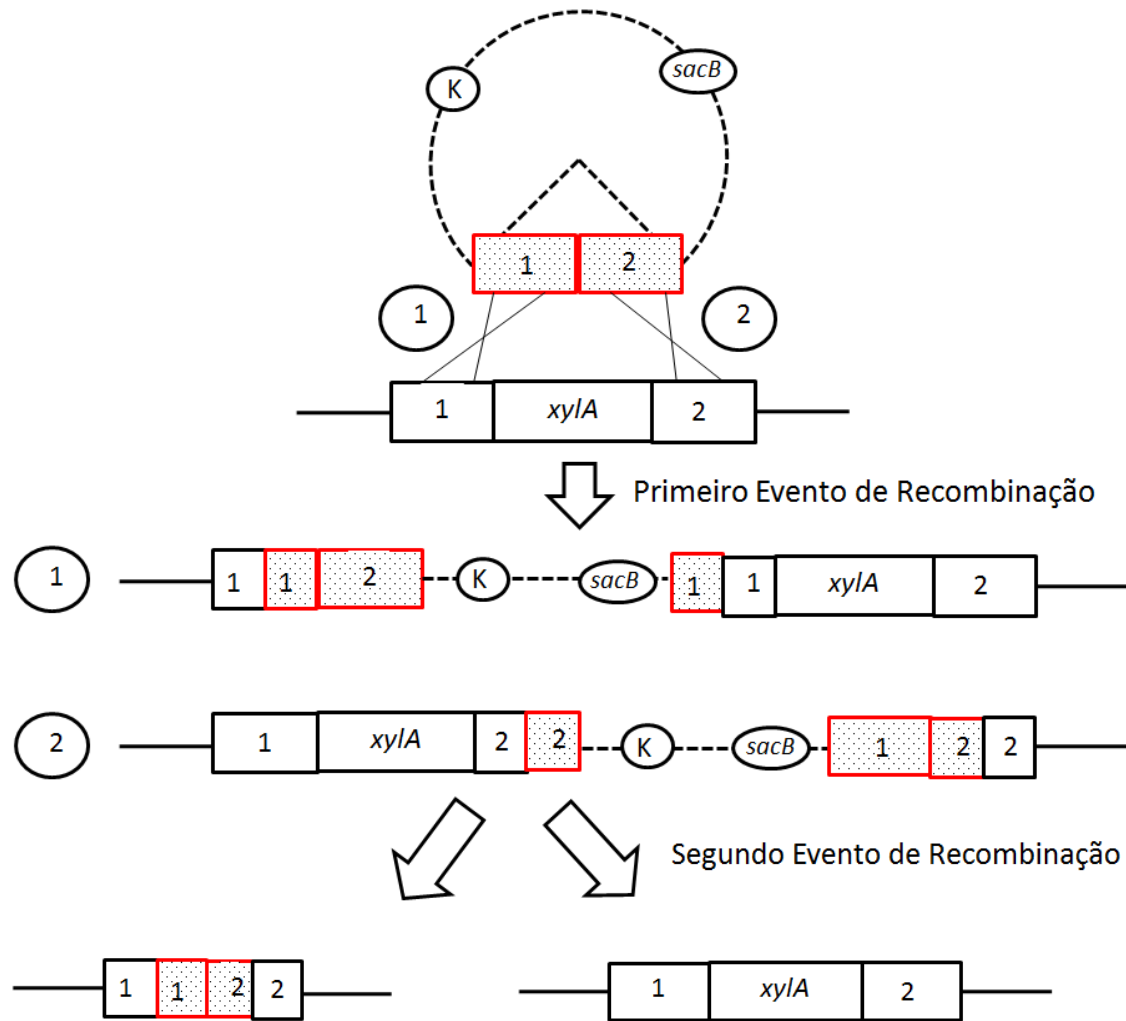
No caso do uso do pNPTS138, esta ferramenta foi reportada na contra seleção para obter mutações sítio específicas em *E. coli* (Donnenberg, Kaper, 1991), *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Anabaena sp*, *Rhizobium sp*, *Pseudomonas aeruginosa* (Reyrat et al., 1998), *Caulobacter crescentus* (Italiani, Marques, 2005), bem como Gram positivos como *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* (Jäger et al., 1992; Jäger et al., 1995) e micobactérias (Pelicic et al., 1996). Mesmo no nosso laboratório, a ferramenta foi usada com sucesso no passado (Pereira et al., 2009), entretanto as atuais tentativas falharam, mesmo para inativar outros genes. Para contornar este problema, novos clones contendo pNPTS138 não manipulados em nosso laboratório foram testados (cedidos pela profa. Marilis V. Marques). Os testes foram realizados em paralelo em experimentos realizados na State University of New York (SUNY ESF) por Thatiane Mendonça no laboratório do Prof Christopher Nomura (que testaram inclusive novos vetores readquiridos de laboratórios dos EUA) e novas recombinações não foram bem sucedidas.

Os testes para obter mutantes por irradiação UV geraram 4080 colônias de interesse, ou seja, possivelmente afetados no gene *xylA*, e dessas, 96, algumas do terceiro e outras do quarto ciclo, pareciam ter um crescimento afetado em xilose, o que não se confirmou ao se reinocular esses clones em meio com xilose. Assim, não foi possível encontrar um mutante afetado no crescimento de xilose, possivelmente devido ao baixo número de células utilizadas no começo do experimento, como dependemos de uma mutação aleatória, precisamos partir de um número total de células muito elevado. Não foi possível repetir o experimento com um número maior de células, devido ao longo tempo necessário para todas as etapas, principalmente a de triagem. Mesmo se fosse possível obter um mutante incapaz de crescer em xilose, ainda seria necessário identificar onde este mutante estaria afetado, uma vez que o que estamos interessados é em um mutante afetado no gene *xylA* para podermos ter uma plataforma para testar os demais genes *xylA* escolhidos anteriormente.

Diante deste cenário, foi adotada a estratégia de sintetizar genes com as mutações descritas na literatura, ou oriundas de *Burkholderia* mais distantes filogeneticamente de *B. sacchari* e inserir na própria *B. sacchari* de maneira extracromosomal, utilizando o vetor pBBR1MCS-2.

O detalhamento de cada ponto das atividades resumidas acima se encontra a seguir:

No primeiro caso foi proposto introduzir na *B. sacchari* um plasmídeo, pNPTS138, com um cassete previamente construído, que consiste de duas sequências, uma à montante (upS $xyA$ ) e outra à jusante (downS $xyA$ ) do gene que se pretende excisar, no caso, o gene  $xyA$ , conforme esquema na figura 5.10. O vetor, suicida em *B. sacchari*, irá se integrar no genoma da bactéria num primeiro evento de recombinação, selecionado pela resistência à canamicina. Este evento pode acontecer de duas maneiras diferentes, dependendo de qual fragmento do cassete vai realizar a recombinação, como mostrado na figura 5.10. Para excisar completamente o gene alvo, se induz um segundo evento de recombinação, novamente possível de ocorrer por dois eventos diferentes: ou o genoma volta ao que era no início, ou ele incorpora o cassete construído, excisando o gene alvo, como mostra a figura 5.10. Para induzir a segunda recombinação e selecionar aqueles que perderam o plasmídeo, emprega-se a contra seleção baseada nos efeitos letais da expressão do gene  $sacB$  (*Bacillus subtilis*) presente no plasmídeo pNPTS138.



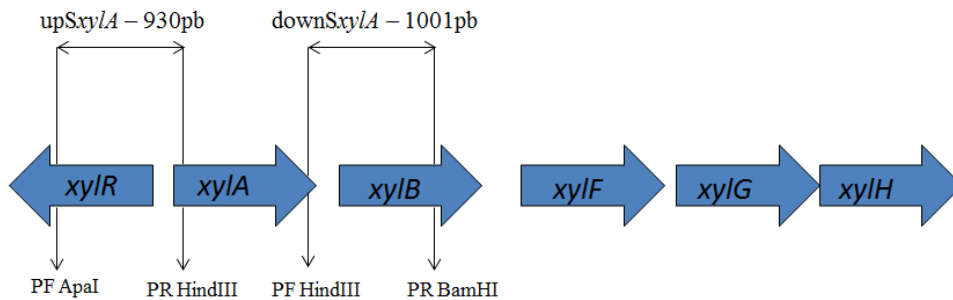
**Figura – 5.10:** Representação da metodologia utilizada para construção do “knock out” do gene *xylA* em *B. sacchari*. Os retângulos sem pontilhado são referentes à parte do genoma de *B. sacchari*; os retângulos pontilhados são as mesmas sequências dos retângulos sem pontilhado, porém clonados no plasmídeo pNPTS138. K: Canamicina; *sacB*: gene *sacB*; -----: vetor pNPTS138.

Quando a cultura é cultivada em sacarose (0,1-10%), o produto do gene *sacB* transforma a sacarose em um polímero derivado de frutose (levanas), que se acumula no espaço periplasmático causando morte celular dos clones que retiverem o plasmídeo (Donnenberg, Kaper, 1991; Jäger et al., 1995; Pelicic et al., 1996; Reyrat et al., 1998, Yano et al, 2005).

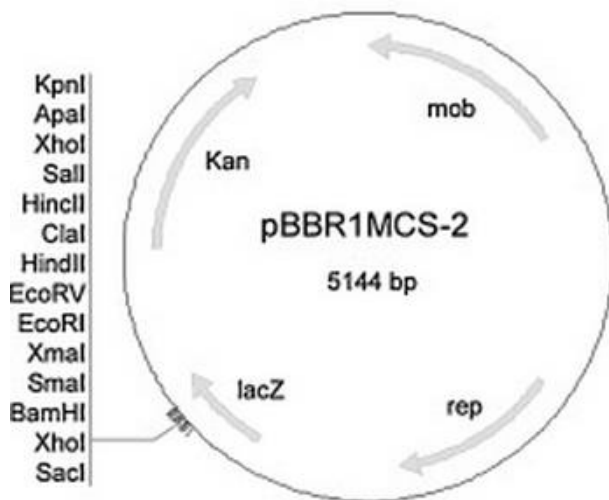
### 5.5.1 Construção do cassete *upS+downS xylA*

Para a construção do cassete *upS+downS<sub>xylA</sub>* (figura 5.11)., foram clonados os fragmentos *upS* e *downS<sub>xylA</sub>* separadamente no vetor pBBR1MCS-2 (figura 5.12).



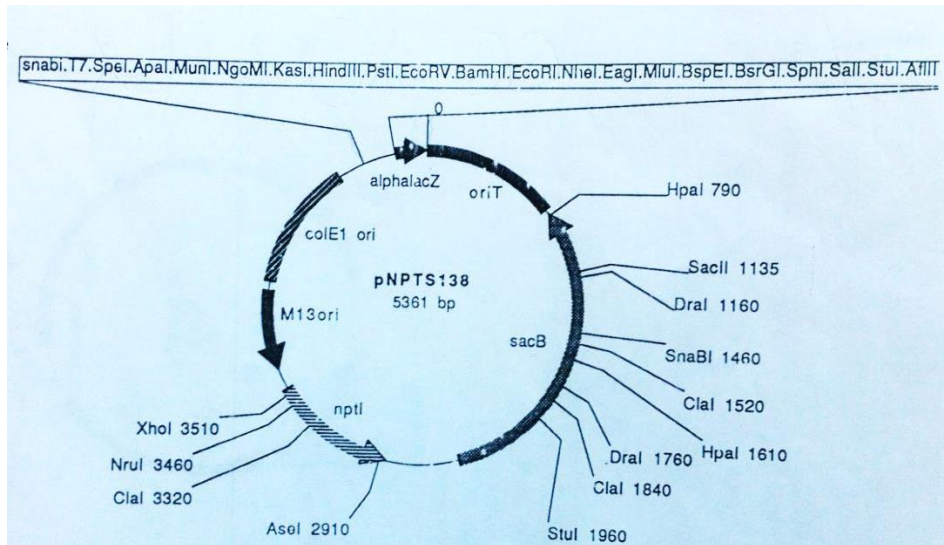


**Figura – 5.11:** Representação dos genes da via isomerase de metabolismo de xilose em *B. sacchari* e dos fragmentos upSxyIA e downSxyIA assim como dos iniciadores utilizados para a amplificação destes últimos.



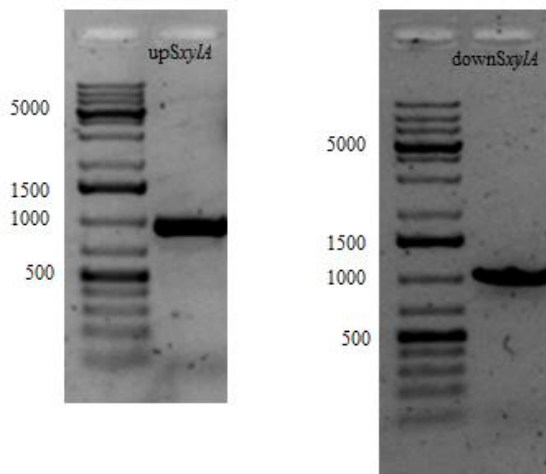
**Figura – 5.12:** Representação do vetor de clonagem pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995). Kan: gene de resistência a canamicina; mob: genes de mobilização; rep: genes de replicação; lacZ: gene lacZ; |||||: sítio de múltipla clonagem com todas as enzimas de restrição presentes nesta região.

A partir do draft do genoma de *B. sacchari* desenhou-se um par de iniciadores para cada fragmento (PF *ApaI* e PR *HindIII* para upSxyIA e PF *HindIII* e PR *BamHI* para downSxyIA), que amplificam uma região a montante do gene *xyIA* (upSxyIA) de 930pb que inclui os seis primeiros aminoácidos (18 nucleotídeos iniciais de *xyIA*, figura 5.11). Sítios de restrição, *ApaI* e *HindIII*, foram inseridos para efetuar a clonagem nos vetores pBBR1MCS-2 e pNPTS138 (figuras 5.12 e 5.13). O mesmo foi feito com a região a jusante de *xyIA* (downSxyIA), de 1001pb que contém mais uma vez seis aminoácidos da parte final do gene (figura 5.11), neste caso inserindo sítios de restrição *HindIII* e *BamHI*. O cassete construído inclui uma pequena parte do gene *xyIA*, de 12 aminoácidos, que não deve interferir nos experimentos futuros.



**Figura – 5.13:** Representação do vetor pNPTS138 (M.R.K. Alley). colE1 ori: Origem de replicação em *E. coli*; M13ori: origem de replicação do fago M13; nptI: região que possui resistência a canamicina; sacB: gene *sacB*; oriT: genes de transferência; alpha lacZ: gene *lacZ* situado no sítio de múltipla clonagem.

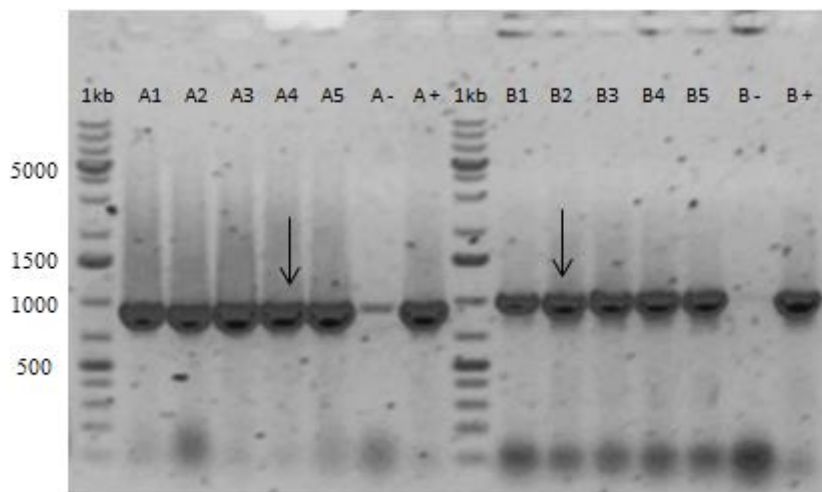
Resultados das reações de amplificação dos dois fragmentos estão na figura 5.14.



**Figura – 5.14:** Foto da eletroforese em gel de agarose dos fragmentos, upSxyLA (930pb) e downSxyLA (1001pb), amplificados com a enzima Hifidelity. Nos poços da esquerda em cada figura estão apresentados o marcador de peso molecular 1kb.

Os amplicons, 930pb para up*SxylA* e 1001pb down*SxylA* (figura 5.14) foram sequenciados confirmando-se a sua integridade e identidade com o gene de *B. sacchari* (Anexo 3).

Após digestão adequada (*Apal* e *HindIII* no caso do fragmento up*SxylA*, e *HindIII* e *BamHI* no caso de down*SxylA*), cada fragmento foi clonado em pBBR1MCS-2 (figura 5.12) e inseridos por eletroporação separadamente na bactéria *E. coli DH5α*, selecionando-se com os transformantes por resistência a canamicina, e por alfa complementação frente à IPTG e X-Gal. A análise da presença dos fragmentos nos clones positivos pode ser vista na figura 5.15.

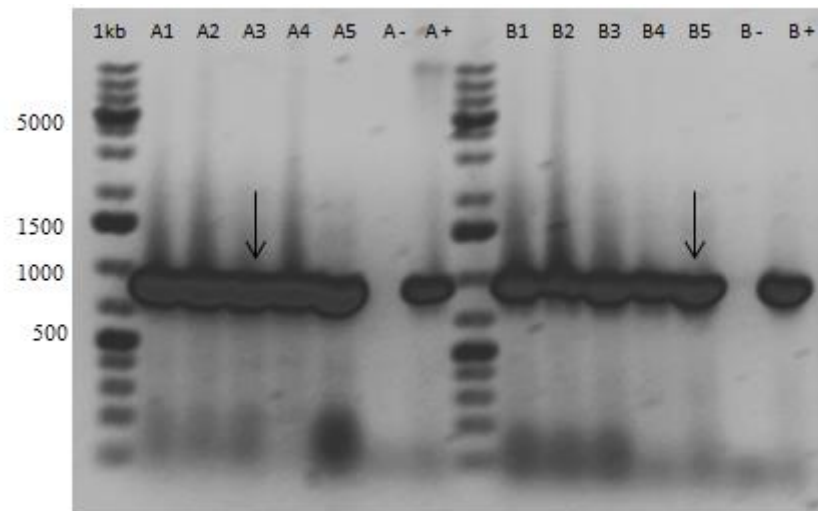


**Figura – 5.15:** Foto da eletroforese do PCR de colônia da linhagem *E. coli DH5α* pBBR1MCS-2::up*SxylA* e *E. coli DH5α* pBBR1MCS-2::down*SxylA*. A1-A5: colônias selecionadas para *E. coli DH5α* pBBR1MCS-2::up*SxylA*; A-: controle negativo; A+: Controle positivo; B1-B5: colônias selecionadas para *E. coli DH5α* pBBR1MCS-2::down*SxylA*; B-: controle negativo; B+: controle positivo. As flechas mostram as colônias selecionadas para preservação.

Foram testadas cinco colônias de cada eletroporação, como controle negativo foram utilizadas colônias azuis e como controle positivo, DNA genômico de *B. sacchari*. Foram observados fragmentos de 930pb (up*SxylA*) para as amostras A1 a A5 e de 1001pb (down*SxylA*) pra as amostras B1 a B5, o que indica a presença do fragmento respectivo. Para preservação foram escolhidas as colônias A4 e B2 devido ao fato de apresentarem maior concentração do fragmento após a amplificação, representada pelo tamanho da banda no gel. No controle negativo A- aparece uma banda, pois neste caso foi utilizada como controle uma

colônia azul, ou seja, aquela que possui o plasmídeo, porém não o fragmento. Provavelmente ela estava contaminada com uma pequena colônia branca, o que explicaria a aparição deste fragmento. O controle negativo mais correto para esta situação é a ausência de DNA, o que permite testar os materiais utilizados e prevenir qualquer contaminação, critério que foi utilizado para as demais reações de PCR.

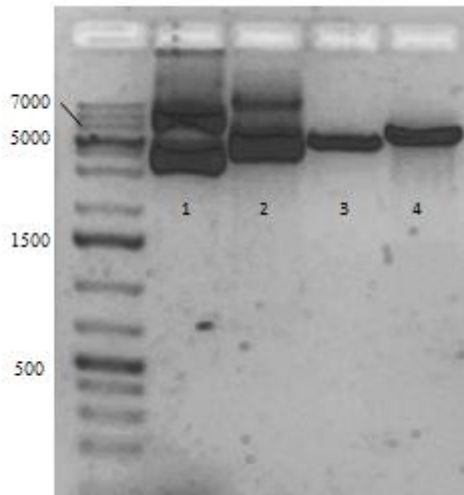
O mesmo procedimento foi feito com o vetor pNPTS138. A figura 5.16 mostra uma eletroforese dos amplicons obtidos na amplificação de amostra direta das colônias brancas selecionadas.



**Figura – 5.16:** Foto da eletroforese do PCR de colônia da linhagem *E. coli DH5α* pNPTS138::upSxyA e *E. coli DH5α* pNPTS138::downSxyA. A1-A5: colônias selecionadas para *E. coli DH5α* pNPTS138::upSxyA; A-: controle negativo; A+: controle positivo; B1-B5: colônias selecionadas para *E. coli DH5α* pNPTS138::downSxyA; B-: controle negativo; B+: controle positivo. As flechas mostram as colônias selecionadas para preservação.

Foram testadas cinco colônias de cada eletroporação, como controle negativo não foi adicionado DNA e como controle positivo, DNA genômico de *B. sacchari*. Todas as colônias testadas deram um resultado positivo uma vez que as amostras A1 a A5 possuem aproximadamente 930pb (upSxyA) e as amostras B1 a B5 1001pb (downSxyA). Para preservação foram escolhidas as colônias A3 e B5 devido ao fato de apresentarem maior concentração do fragmento após a amplificação, representada pelo tamanho da banda no gel.

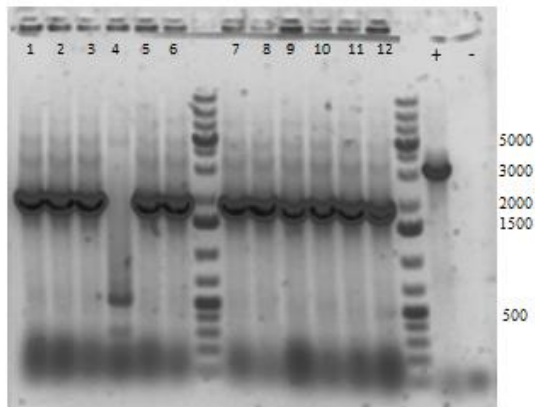
Em seguida foi feita a extração do plasmídeo pNPTS138::upSxyA e sua digestão com as enzimas *HindIII* e *BamHI*, como mostra a figura 5.17.



**Figura – 5.17:** Foto da eletroforese dos plasmídeos pNPTS138 sem inserto (5361pb) e pNPTS138::upSxyIA (6291pb) digeridos ou não com as enzimas de restrição *HindIII* e *BamHI*. 1: pNPTS138 sem inserto não digerido; 2: pNPTS138::upSxyIA não digerido; 3: pNPTS138 sem inserto, digerido com *HindIII* e *BamHI*; 4: pNPTS138::upSxyIA, digerido com *HindIII* e *BamHI*.

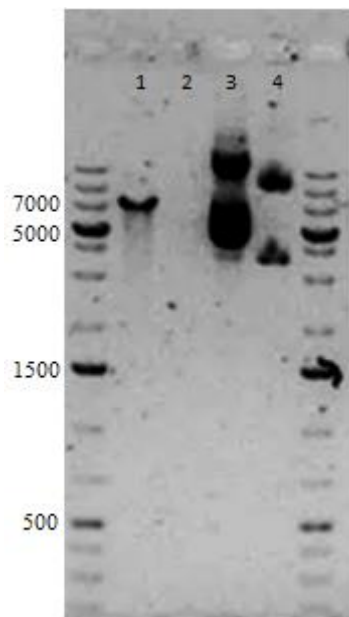
Nos poços 1 e 2 estão apresentados os plasmídeos pNPTS138 sem inserto (5361pb) e pNPTS138::upSxyIA (6291pb) não digeridos respectivamente. Como pode ser observado, as bandas representadas pelas diferentes formas de enovelamento do plasmídeo, estão mais altas no poço 2 que no 1. Nos poços 3 e 4 que representam o vetor pNPTS138 (5361pb) e o plasmídeo pNPTS138::upSxyIA (6291pb) digeridos respectivamente. Mais uma vez, é observado que no poço 4 a banda está mais elevada que no poço 3, o que representa a presença do fragmento upSxyIA.

Depois foi feita a ligação entre o pNPTS138::upSxyIA digerido e o fragmento downSxyIA digerido com as mesmas enzimas. Foi feita a eletroporação para inserir este novo plasmídeo, pNPTS138::upS+downSxyIA em *E. coli DH5α*. Desta vez, não havia seleção com a cor das colônias e foi feito o PCR de 12 colônia para selecionar as colônias positivas para a presença do cassete upS+downSxyIA. O PCR de colônia foi realizado com os iniciadores PF *ApaI* e PR *BamHI* para a amplificação do fragmento upS+downSxyIA (1931pb) (figura 5.18). Das 12 colônias testadas apenas uma, a colônia 4, não apresentava o plasmídeo com o fragmento upS+downSxyIA inserido. Como controle positivo foi utilizado o DNA genômico de *B. sacchari* e como controle negativo não foi adicionado DNA.



**Figura – 5.18:** Foto da eletroforese do PCR de colônia da linhagem *E. coli* DH5α pNPTS138::upS+downS $xy$ LA. 1-12: clones testados; +: controle positivo; -: controle negativo.

Uma vez construída esta linhagem foi feita a extração do plasmídeo, pNPTS138::upS+downS $xy$ LA, para confirmação da integridade da sequência do cassete. Em primeiro, foi corrido um gel para confirmar o tamanho após digestão com a enzima de restrição *HindIII* (figura 5.19).



**Figura – 5.19:** Foto da eletroforese do plasmídeo pNPTS138::upS+downS $xy$ LA (7292pb) e pNPTS138 (5361pb), antes e depois da digestão com a enzima *HindIII*. 1: pNPTS138::upS+downS $xy$ LA após digestão; 2: pNPTS138 após digestão; 3: pNPTS138::upS+downS $xy$ LA; 4: pNPTS138.

A figura 5.19 mostra uma eletroforese do plasmídeo extraído da linhagem *E. coli DH5α* pNPTS138::upS+downS*xylA*. O poço 1 apresenta o plasmídeo com o cassete extraído digerido (5361pb + 1931pb = 7292pb), e o poço 2 o pNPTS138 sem inserto digerido, o qual não aparece por baixa concentração ou por um erro experimental. Nos poços 3 e 4 estão representados os plasmídeos pNPTS138::upS+downS*xylA* e pNPTS138, sem inserto, não digeridos respectivamente onde é observado que o plasmídeo com inserto é maior do que o sem inserto. Este plasmídeo foi então enviado para sequenciamento. Esta reação foi realizada utilizando os quatro iniciadores desenhados para poder ter o sequenciamento de cada fragmento nos dois sentidos. Após verificação do sequenciamento, foi confirmada a integridade do cassete upS+downS*xylA* (Anexo 4).

A próxima etapa consistiu na inserção desta construção em *B. sacchari* e seleção dos mutantes. Estes mutantes serão os hospedeiros das sequências do gene *xylA* selecionados, que serão então comparados com *B. sacchari* selvagem com relação à eficiência de consumo de xilose e produção de PHA.

### 5.5.2 Inserção do cassete upS+downS *xylA* em *B. sacchari*

#### a) Eletroporação

Em uma primeira tentativa o plasmídeo pNPTS138::upS+downS*xylA* foi introduzido em *B. sacchari* por eletroporação. Como este plasmídeo é suicida em *B. sacchari* e, portanto ele só será inserido no genoma através de um evento de recombinação homóloga, o que depende da maquinaria da célula, foi decidido deixar as células se recuperando após a eletroporação em LB por mais tempo do que é descrito como necessário para esta técnica (1-2 h). Neste caso as células ficaram se recuperando por 7 horas e 30 minutos ou 18 horas e 30 minutos e depois foi feito o espalhamento em três placas de meio LB com canamicina para cada tempo e mantidas a 30 °C por até cinco dias. Não houve crescimento em nenhuma das placas. Foi repetido o experimento, porém desta vez o tempo de recuperação foi de 7 horas ou 20 horas. Mais uma vez não foi obtido colônia alguma.

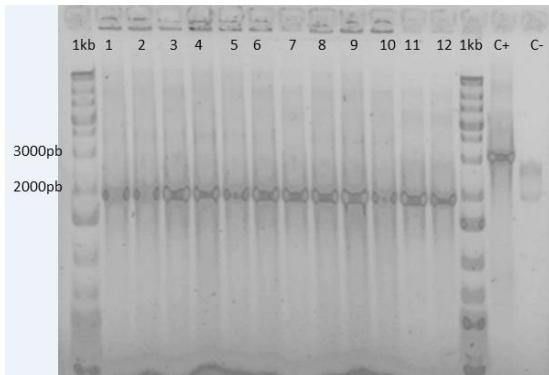
Foi feito um teste para ter certeza que as células eletrocompetentes estavam funcionando corretamente, no qual o plasmídeo pBBR1MCS-2 foi inserido por eletroporação tanto em *B.*

*sacchari* quanto em *E. coli DH5α*. Foram obtidas colônias com as duas linhagens, porém o que foi possível perceber é que o número de colônias foi de um fator de aproximadamente 100x maior em *E. coli DH5α* do que em *B. sacchari*. Uma hipótese para explicar este resultado é que o programa utilizado para a eletroporação foi descrito para *E. coli* e não para *Burkholderia*. Outras tentativas foram realizadas utilizando o programa para *Pseudomonas* no qual uma cubeta de maior volume é utilizada, mas o resultado foi o mesmo, nenhuma colônia cresceu. Como esta técnica não está bem descrita para *Burkholderia* e é pouco eficiente, e por outro lado como estamos utilizando um plasmídeo suicida que depende de um evento de recombinação homóloga, ou seja, que ocorre raramente ou em uma quantidade reduzida, foi decidido utilizar a técnica de conjugação, a qual se tem maior taxa de transformação para *Burkholderia*.

#### b) Conjugação

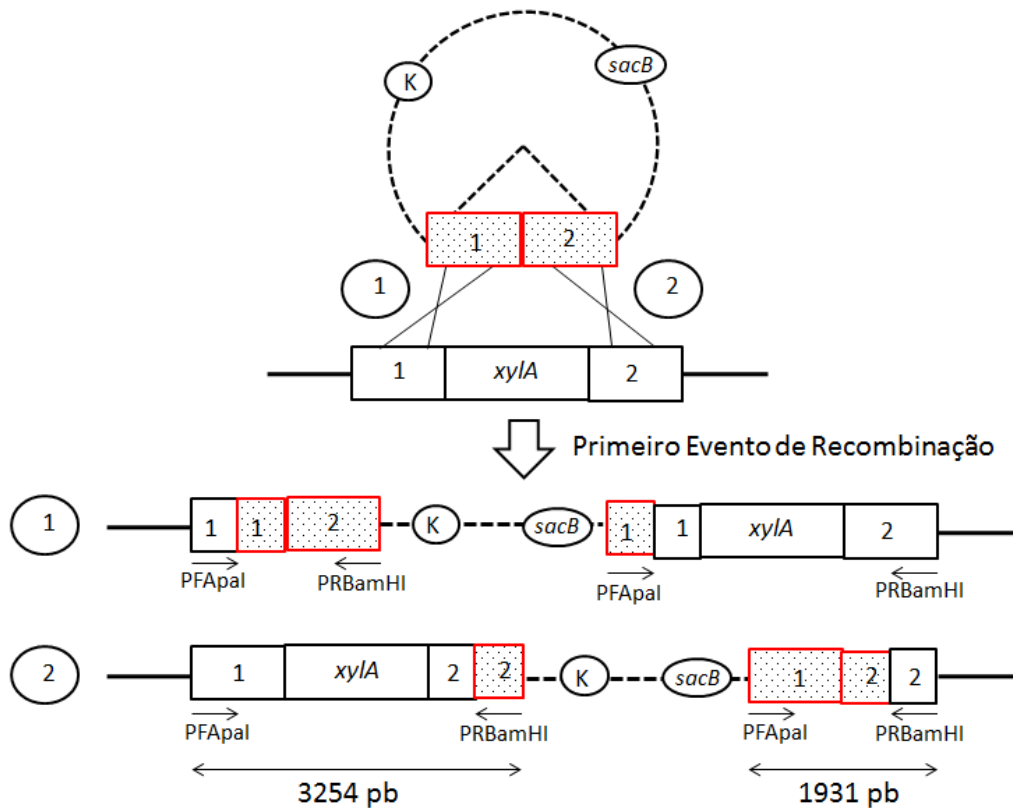
Para poder realizar a conjugação foi necessário introduzir o plasmídeo pNPTS138::upS+downS*xylA* na linhagem *E. coli S17-1* que possui a maquinaria necessária para realizar a transferência do plasmídeo. Desta forma, este plasmídeo foi inserido por eletroporação em *E. coli S17-1* e a figura (5.20) mostra o PCR de colônia que confirma a presença do plasmídeo nesta linhagem que contém o cassete upS+downS*xylA* (1931pb). Foram testadas 12 colônias utilizando os iniciadores PFApaI e PRBamHI e como controle positivo foi utilizado o DNA genômico de *B. sacchari*. No controle negativo não foi adicionado DNA, mas foi possível notar duas bandas. Foi refeito um controle negativo utilizando o mesmo material e não foi possível observar nenhuma banda (dados não mostrados). Provavelmente um erro experimental acabou comprometendo o controle negativo neste experimento.





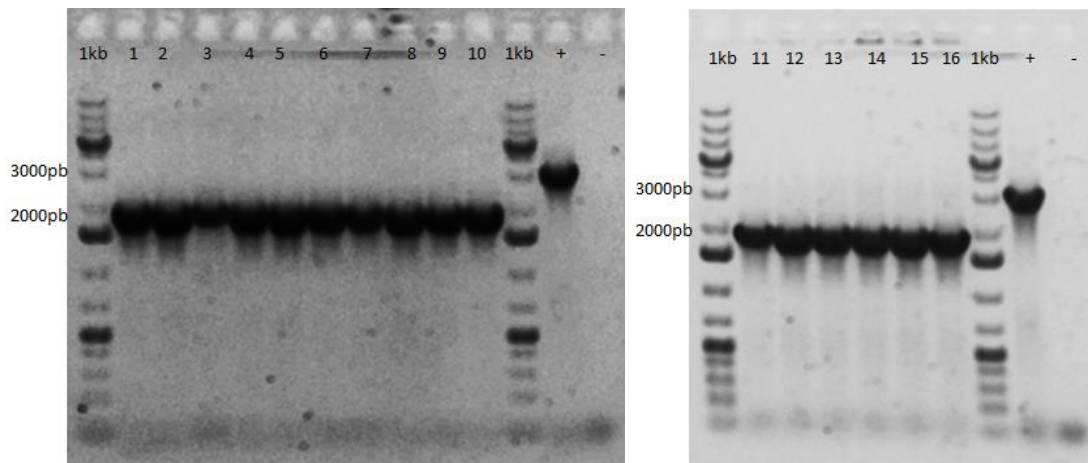
**Figura – 5.20:** Foto da eletroforese do PCR de colônia da linhagem *E. coli* S17-1 pNPTS138::upS+downSxyIA. 1-12: clones testados; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

Após a conjugação entre *B. sacchari* e *E. coli* S17-1 pNPTS138::upS+downSxyIA, o que é esperado caso o primeiro evento de recombinação tenha acontecido é a presença de duas bandas no gel quando utilizado os iniciadores PFApaI e PRBamHI, pois como mostra a figura 5.21, não importa como a recombinação vai acontecer, teremos uma duplicação dos fragmentos 1 e 2. Como os iniciadores utilizados amplificam o começo da região 1 e o final da região 2 teremos os amplicons de tamanho 1931pb e 3254pb como explicado na figura 5.21.



**Figura – 5.21:** Representação do primeiro evento de recombinação homóloga e dos iniciadores (PFApaI e PRBamHI) utilizados para verificação através do PCR de colônia.

A técnica utilizada para fazer a conjugação foi misturar 0,5 mL de cada cultura, *B. sacchari* e *E. coli* S17-1 pNPTS138::upS+downS<sub>xylA</sub>, após centrifugação e ressuspensão em LB, em um tubo de ensaio. Este foi incubado a 30 °C por 24 horas sem agitação para permitir não somente que a conjugação aconteça, mas também a recombinação homóloga. Em seguida, após centrifugação e ressuspensão em salina 0,85%, a suspensão celular foi semeada em placas de meio mineral com 1 g/L de glicose e adição de canamicina (MMG1K) e estas foram incubadas a 30 °C por 48 horas. As poucas colônias que cresceram (16) foram testadas por PCR como apresentado na figura 5.22. Como foi possível perceber, nenhuma colônia apresentou as duas bandas previstas. Uma explicação para este resultado poderia ser que como temos duas bandas a ser amplificadas utilizando os mesmos iniciadores, a de menor tamanho teria sido amplificada mais vezes e somente esta teria aparecido no gel. Por esta razão foi decidido continuar utilizando a colônia número 8 que apresentou uma das bandas esperadas.



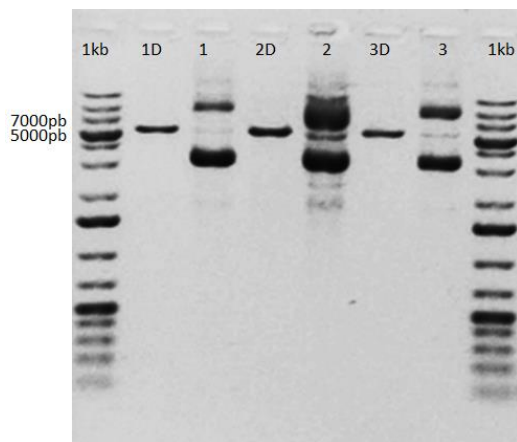
**Figura – 5.22:** Fotos da eletroforese do PCR de colônia da linhagem *B. sacchari* pNPTS138::upS+downS<sub>xylA</sub>. 1-16: clones testados; +: controle positivo; -: controle negativo.

A próxima etapa foi selecionar o segundo evento de recombinação homóloga deixando a bactéria *B. sacchari* pNPTS138::upS+downS<sub>xylA</sub> crescer durante dois dias em meio líquido LB sem antibiótico. O segundo evento de recombinação acontece espontaneamente e vai fazer com que a bactéria perca o plasmídeo pNPTS138 como mostrado na figura 5.10. Em seguida, a cultura foi semeada em placas de meio mineral contendo 5% e 10% de sacarose (MMS) e incubadas durante 48 horas a 30 °C. O resultado foi a formação de um tapete de células nas placas, tanto com 5% como 10% de sacarose. Este não era o resultado esperado, pois as bactérias que possuem o plasmídeo pNPTS138 não seriam capaz de crescer em sacarose pois o gene *sacB*

está presente no vetor como já discutido anteriormente. Desta forma, as únicas bactérias que seriam capazes de crescer nas placas de MMS seriam aquelas que sofreram o segundo evento de recombinação, um evento que acontece espontaneamente com uma frequência muito baixa. Assim, o esperado seria o crescimento de poucas colônias e não a formação de um tapete.

Uma explicação possível seria uma mutação no gene *sacB* que possibilitaria as células que possuem o pNPTS138 crescerem em meio contendo sacarose. Para verificar o funcionamento do gene *sacB* foi semeada a bactéria *E. coli* S17-1 pNPTS138::upS+downS*xylA* em meio LBS com 5% e 10% e incubada a 37 °C por 24 horas. O resultado foi que houve crescimento das placas com sacarose tanto 5% como 10%. Outra aluna, Thatiane Mendonça, que tentava utilizar o mesmo sistema para o “knock-out” de outro gene, obteve o mesmo problema. Desta maneira, um novo plasmídeo pNPTS138 foi concedido pela professora Marílis do Valle Marques.

A primeira etapa realizada com o novo plasmídeo foi a sua eletroporação em uma linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Em seguida três colônias foram selecionadas e foi feita uma extração plasmidial e a digestão do plasmídeo com a enzima BamHI (5361pb), como mostrado na figura 5.23.

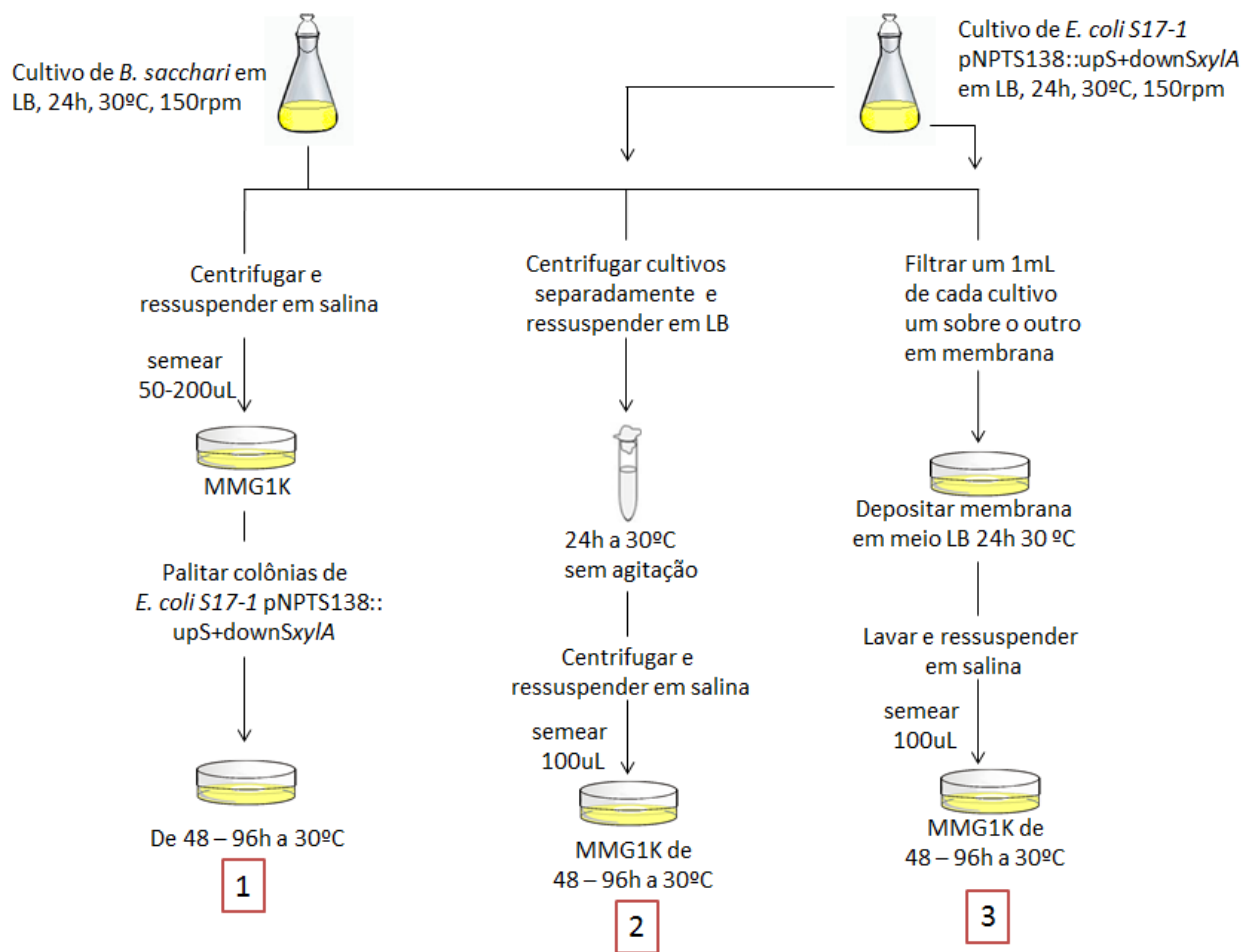


**Figura – 5.23:** Foto da eletroforese em gel de agarose do novo plasmídeo digerido e não digerido, das três colônias selecionadas. 1D: colônia 1 plasmídeo digerido com BamHI; 1: colônia 1 plasmídeo não digerido; 2D: colônia 2 plasmídeo digerido com BamHI; 2: colônia 2 plasmídeo não digerido; 3D: colônia 3 plasmídeo digerido com BamHI; 3: colônia 3 plasmídeo não digerido.

O plasmídeo 3 foi escolhido por apresentar o tamanho esperado. Em seguida, foi feita a digestão dupla com as enzimas ApaI e BamHI do antigo plasmídeo pNPTS138::upS+downS*xylA* e a extração do fragmento upS+downS*xylA* do gel. Depois, foi feita a ligação “overnight” entre o

plasmídeo novo digerido e o cassete digerido pelas mesmas enzimas. Por fim foi feita a eletroporação da ligação em uma *E. coli* S17-1 e algumas colônias que cresceram foram testadas por PCR de colônia e foram confirmadas positivas.

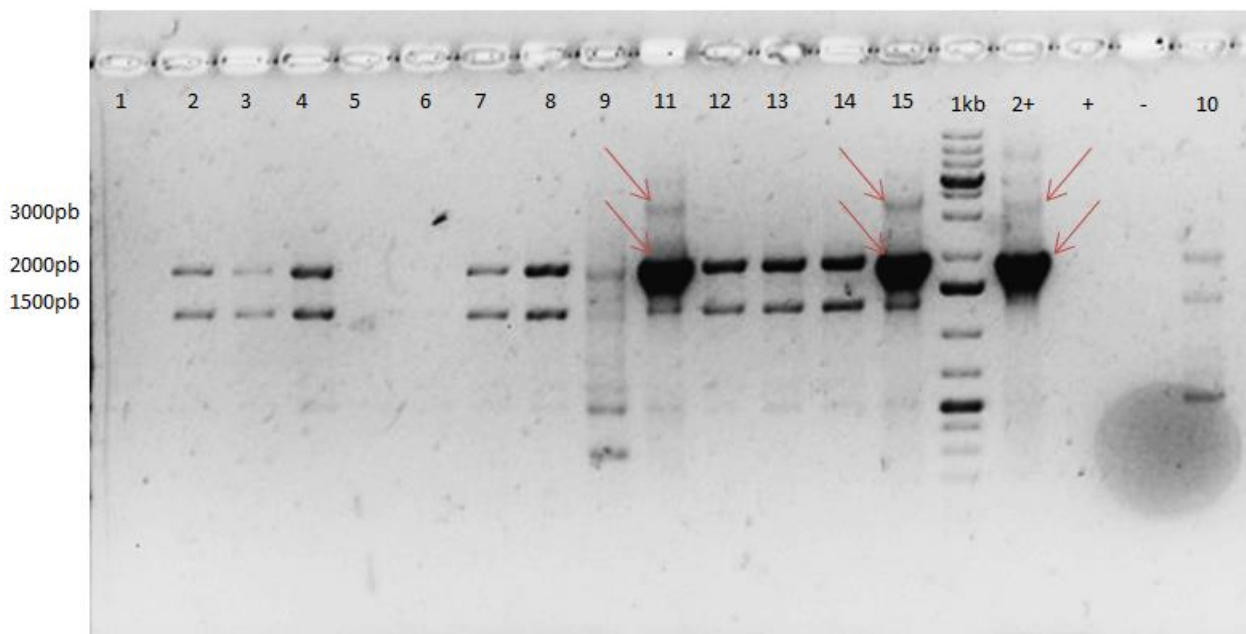
Uma vez com a linhagem de *E. coli* S17-1 pNPTS138::upS+downSxyIA reconstruída com o novo plasmídeo pNPTS138, foi realizada novamente a conjugação. Desta vez foi decidido utilizar diferentes técnicas de conjugação baseadas em trabalhos anteriores (Gomez, 2000; Perreira et al., 2009; Silva, 1998). As técnicas utilizadas estão ilustradas na figura 5.24.



**Figura – 5.24:** Representação dos diferentes métodos utilizados para a conjugação entre a linhagem *B. sacchari* e *E. coli* pNPTS138::upS+downSxyIA. MMG1K: meio mineral com 1 g/L de glicose e adição de canamicina 50 µg/mL.

Para técnica 1 foram utilizadas 4 placas de MMG1K, onde foi semeado 50, 100, 150 ou 200 µL do cultivo de *B. sacchari*. Para as técnicas 2 e 3 foram utilizadas 5 placas de MMG1K. No caso de todos os métodos cresceram poucas colônias em algumas placas. O método que se

obteve o maior número de colônias foi o método 1 e estas foram testadas por PCR, como mostrado na figura 5.25. Para um dos controles positivos utilizado neste PCR (2+), foi utilizado como DNA molde o DNA genômico extraído de *B. sacchari* e o DNA plasmidial extraído pNPTS138::upS+downS<sub>xy</sub>/A para tentar simular a situação de amplificar duas bandas de tamanhos diferentes com os mesmos iniciadores. Como é possível notar na figura 5.25 para este controle (2+) foi possível obter as duas bandas esperadas, uma de 1931pb e outra de 3254pb. Uma das bandas está mais forte do que a outra provavelmente por que o DNA plasmidial se encontra muito mais concentrado que o DNA genômico. O controle positivo (+), não deu certo provavelmente por um erro experimental.



**Figura – 5.25:** Foto da eletroforese do PCR de colônia da conjugação entre as linhagens *B. sacchari* e *E. coli* S17-1 pNPTS138::upS+downS<sub>xy</sub>/A. 1-15: clones testados; 2+: controle positivo utilizando como DNA molde o DNA genômico extraído de *B. sacchari* e o DNA plasmidial extraído pNPTS138::upS+downS<sub>xy</sub>/A ;+: controle positivo utilizando como DNA molde o DNA genômico extraído de *B. sacchari*; -: controle negativo. As setas em vermelho indicam as bandas esperadas (1931pb e 3254).

Para os clones 1-15, somente os clones 11 e 15 obtiveram as duas bandas esperadas. Todos os clones quando feito o PCR de colônia foi feito também um repique em MMG1K e deixado a 30 °C por 48 horas. Nesta placa de repique somente quatro clones cresceram e os clones 11 e 15 não cresceram. Desta forma, esses clones foram perdidos. Foi feita a técnica de coloração de gram com os clones que cresceram e no microscópio foi possível ver um bastonete gram-negativo grande presente, morfologia muito diferente de *B. sacchari* que normalmente se

apresenta como pequenos coccus-bacillus gram-negativos. Foi concluído que provavelmente o que cresceu se trata de uma contaminação.

Para os clones encontrados nas duas outras técnicas de conjugação foi decidido fazer um repique da colônia em MMG1K antes de fazer o PCR, pois foi pensado que talvez como as colônias eram pequenas, quando feito o PCR não teria sobrado células para o repique. O resultado para todas as colônias foram o mesmo que antes, nenhum repique conseguiu crescer no novo meio MMG1K.

O experimento foi refeito, porém desta vez somente utilizando o primeira técnica de conjugação. Foi tentado fazer o repique antes do PCR e mais uma vez nenhuma colônia conseguiu crescer. Foi pensado que talvez as colônias não eram recombinantes de *B. sacchari* e que talvez não foi possível fazer o primeiro evento de recombinação. O resultado da figura 5.25 poderia ser explicado pelo fato que na placa tinha o DNA das duas células, *B. sacchari* que seria a origem da banda maior, e *E. coli S17-1 pNPTS138::upS+downSxylA* que seria a origem da banda menor, e não de uma *B. sacchari* recombinante.

Como não foi possível atingir o resultado desejado de construir uma recombinante de *B. sacchari* com um “knock-out” no gene *xylA* utilizando a técnica de recombinação homóloga através do plasmídeo pNPTS138, foi decidido tentar utilizar outra técnica baseada na exposição a luz ultra violeta e no reparo do DNA.

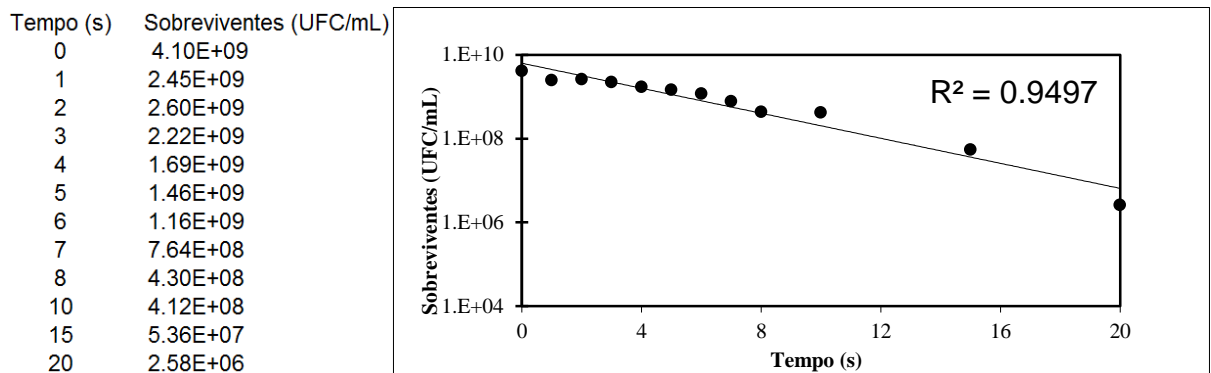
### **5.5.3 Obtenção de mutantes de *B. sacchari xil<sup>-</sup>* por irradiação UV**

Nesta etapa, foi utilizado outra técnica, baseada na exposição à radiação UV e no sistema de reparo do DNA, no intuito de se obter uma recombinante de *B. sacchari* com um “knock-out” no gene *xylA*. Em trabalhos anteriores em nosso laboratório (Mendonça, 2009; Silva, 1998), foram feitos recombinantes de *B. sacchari* utilizando a irradiação com luz ultravioleta.

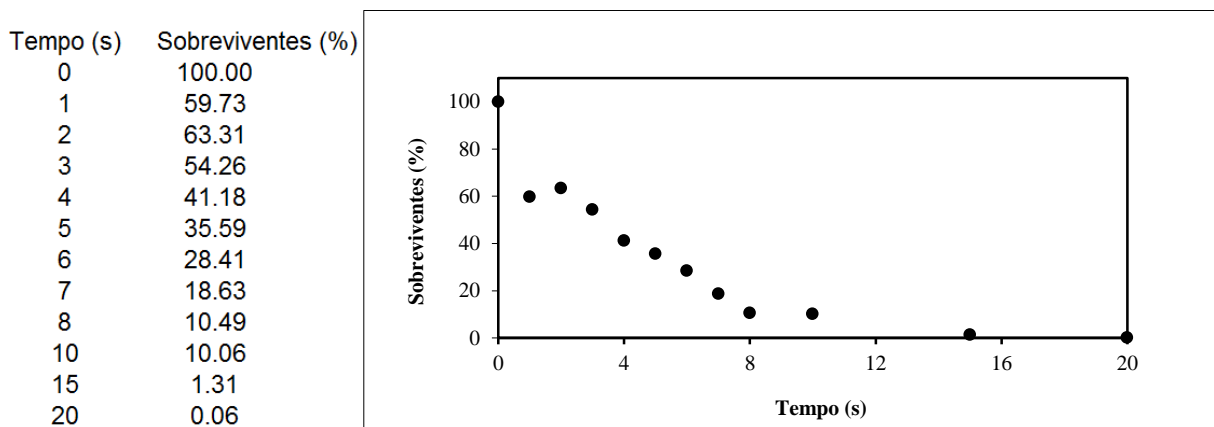
#### *a) Curva de sobrevivência a radiação*

Como em trabalhos anteriores (Mendonça, 2009; Silva, 1998) já foram bem determinados os tempos de exposição à radiação UV necessários para atingir a porcentagem de sobreviventes adequada (entre 1e 10%), nos tempos de 6 e 7 segundos foi feito um número maior de placas

(cinco para cada diluição no lugar de três) para serem utilizadas para a etapa de seleção dos mutantes. A curva de sobrevivência a radiação UV foi refeita para ter certeza que os tempos escolhidos para a próxima etapa estejam corretos e porque o armário para irradiação possui dimensões um pouco diferentes daquelas utilizadas nos outros trabalhos. As figuras 5.26 e 5.27 representam a curva de sobrevivência de *B. sacchari* a radiação UV e a curva da porcentagem de sobreviventes, respectivamente. No anexo 5 estão os dados crus com os quais foram feitos os gráficos.



**Figura – 5.26:** Curva de sobrevivência da bactéria *B. sacchari* a radiação UV.



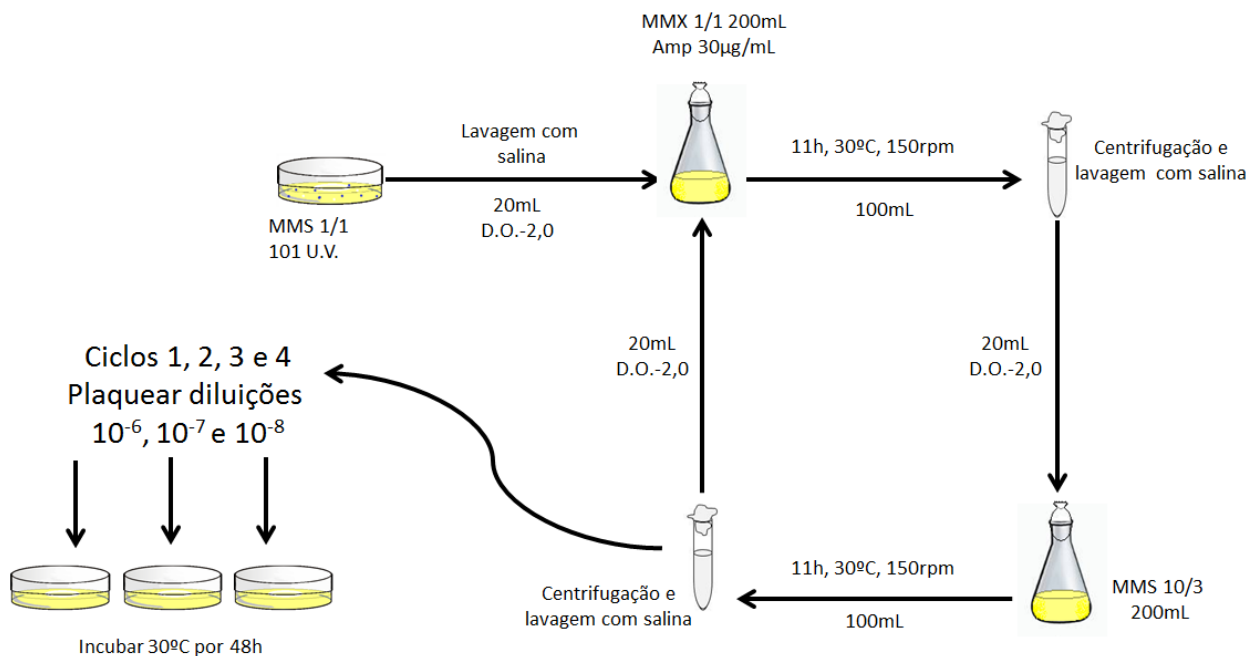
**Figura – 5.27:** Curva da porcentagem dos sobreviventes de *B. sacchari* a radiação UV.

Para a próxima etapa que consistiu na seleção dos mutantes  $xil^-$  foram coletadas as colônias das placas dos tempos 7 a 15 segundos. As placas do tempo 7 segundos foram escolhidas mesmo que fora da porcentagem de sobreviventes planejada pois era um dos tempos que foi feito maior número de placas e ainda está relativamente próximo aos 10%.

b) Seleção dos mutantes *UV xil<sup>-</sup> (sac<sup>+</sup>)*

Uma vez obtidos os mutantes por irradiação UV é necessário fazer um procedimento de seleção e triagem para encontrar aqueles que nos interessam, ou seja, que perderam a capacidade de consumir xilose (*xil<sup>-</sup>*).

A etapa de seleção foi realizada através de ciclos de enriquecimento nos quais as colônias coletadas na etapa anterior foram inoculadas em um meio mineral com xilose e ampicilina por 11 horas. Em seguida, uma parte deste meio foi inoculada em um meio mineral com sacarose sem antibiótico por 11 horas. Por fim o ciclo recomeça inoculando uma parte deste meio em um novo meio mineral com xilose e ampicilina. No final de cada ciclo diluições foram feitas e inoculadas em placas de MMS. A figura 5.28 ilustra este experimento.

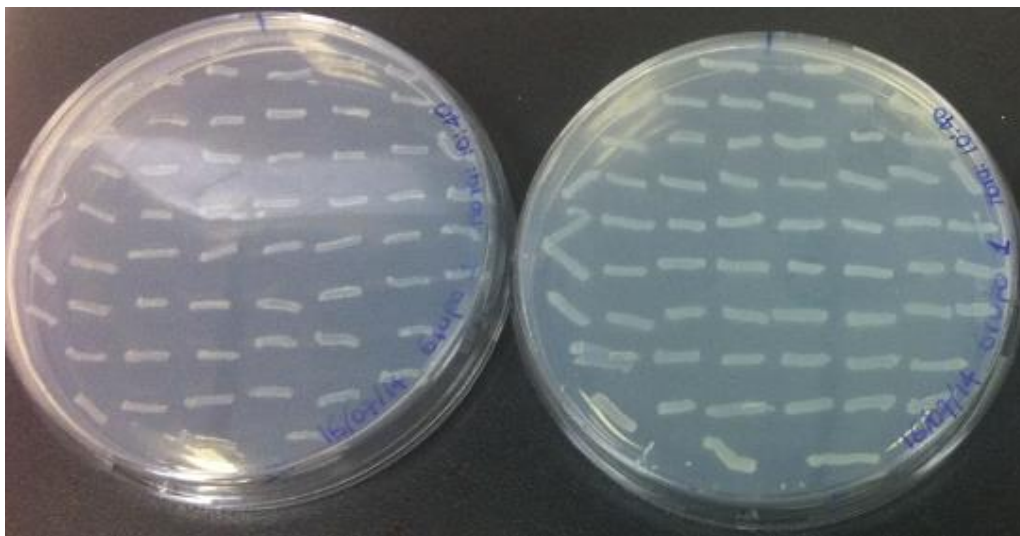


**Figura – 5.28:** Esquema de cultivo para mutação e seleção de clones mutantes *xil<sup>-</sup> (sac<sup>+</sup>)*. MMS 10/3 ou MMX 1/1: Meio mineral com adição de 10 ou 1 g/L de sacarose ou xilose respectivamente; Amp: Antibiótico ampicilina.

O antibiótico beta-lactâmico vai ter uma ação somente nas bactérias capazes de crescer em xilose favorecendo assim em cada ciclo as bactérias incapazes de crescer em xilose. O MMS é utilizado para assegurar que as bactérias selecionadas ainda sejam capazes de crescer em sacarose e para que elas se recuperem do ciclo com o antibiótico.



As colônias que cresceram nas placas de MMS de cada ciclo passaram por uma etapa de triagem, na qual elas eram repicadas em MMS e MMX para selecionar aquelas que são capazes de crescer em sacarose, mas que não são mais capazes de crescer em xilose. A figura 5.29 mostra o processo de triagem.



**Figura – 5.29:** Foto mostrando o processo de triagem utilizado. À direita, uma placa de MMS e a esquerda uma placa de MMX.

No total foram testadas 4080 colônias e dessas, 96, algumas do terceiro e outras do quarto ciclo, pareciam ter um crescimento afetado em xilose. Desta forma, esses mutantes foram repicados em um MMX novamente. Neste novo meio, não foi possível notar nenhuma alteração no crescimento quando comparado com o controle, à bactéria *B. sacchari* selvagem.

No final não foi possível encontrar um mutante afetado no crescimento de xilose utilizando a técnica de mutação por radiação UV. Uma explicação seria o baixo número de células utilizadas no começo do experimento, como dependemos de uma mutação aleatória, precisamos partir de um número total de células muito elevado. Não foi possível repetir o experimento com um número maior de células, devido ao longo tempo necessário para todas as etapas, principalmente a de triagem. Mesmo se fosse possível obter o mutante que não cresce em xilose, ainda seria necessário identificar onde este mutante estaria afetado, uma vez que o que estamos interessados é em um mutante afetado no gene *xyIA*.

Como não foi possível construir um mutante de *B. sacchari* “knock-out” no gene *xyIA* utilizando a técnica de recombinação homóloga com o plasmídeo pNPTS138 ou através da

radiação UV, foi decidido introduzir os diferentes genes *xylA* escolhidos na bactéria *B. sacchari* selvagem de maneira extracromosomal, utilizando o vetor pBBR1MCS-2.

## 5.6 Construção dos recombinantes de *B. sacchari*

Dados as dificuldades relatadas, optou-se por inserir na linhagem selvagem diferentes genes *xylA* que codificam para proteína xilose isomerase. Os genes selecionados foram escolhidos tomando em conta dois principais fatores. O primeiro fator é a presença das mutações ditas melhoradoras por (Lee et al., 2012), como já foi discutido no item 5.2. Para esta situação foram selecionados dois genes *xylA*, o primeiro da bactéria *Photorhabdus luminescens subsp. laumondii TTO1*, que foi gentilmente doada pelo professor Carlos Eduardo Winter do departamento de parasitologia do ICB-USP, que apresenta uma das mutações melhoradoras, V433I. Este gene foi identificado como *xylA<sub>Pl</sub>*. O segundo gene selecionado foi o gene *xylA* da própria *B. sacchari* com as mutações descritas como melhoradoras (E15D, E114G, E129D, T142S, A177T e V433I). Neste caso a sequência do gene alvo foi obtida no draft do genoma de *B. sacchari* e foram feitas as modificações nos códons específicos para se obter a sequência de aminoácidos desejada. A sequência modificada foi enviada para ser sintetizada pela empresa GenOne. O gene assim obtido foi identificado como *xylA\**.

O segundo fator que foi utilizado para seleção dos genes a serem testados foi a distância filogenética das bactérias quando comparadas com a *B. sacchari*, como já foi discutido no item 5.1 e 5.2. Como não foi encontrada nenhuma mutação melhoradora nos demais genes *xylA* analisados e como não foi encontrado mais nenhum dado na literatura que pudesse indicar qual enzima poderia ser mais eficiente, foi decidido testar alguns dos genes *xylA* de bactérias da família das *Burkholderiaceae*. Desta forma, seria possível construir uma nova informação sobre a enzima xilose isomerase na família das *Burkholderiaceae* que pode ser útil para futuros trabalhos. Foi escolhida uma bactéria de cada grupo filogenético da família das *Burkholderiaceae* da figura 5.2 A preferência foi dada por bactérias que eram mais facilmente adquiridas e que apresentavam maior conteúdo informativo na literatura. Para aquelas com maior dificuldade de aquisição, foi feita a síntese do gene alvo.

A bactéria escolhida do grupo 1 da figura 5.2 foi a *Burkholderia cenocepacia J2315* que foi adquirida pelo nosso laboratório através do CBMAI (Coleção Brasileira de Microrganismos

de Ambiente e Indústria) do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas). Este gene foi identificado como *xylA<sub>Bc</sub>*. A bactéria escolhida do grupo 2 foi a própria *B. sacchari*, sendo a única representante, para comparar sua expressão com os demais genes testados. Este gene foi identificado como *xylA<sub>Bs</sub>*. A bactéria escolhida do grupo 3 foi a *Burkholderia xenovorans LB400* e aquela escolhida do grupo 4 foi a *Burkholderia phymatum STM815*. Os seus respectivos genes *xylA* foram identificados como *xylA<sub>Bx</sub>* e *xylA<sub>Bp</sub>*. Não foi possível adquirir estas bactérias e, portanto, foi realizada a síntese de seus genes *xylA* através a empresa GenOne.

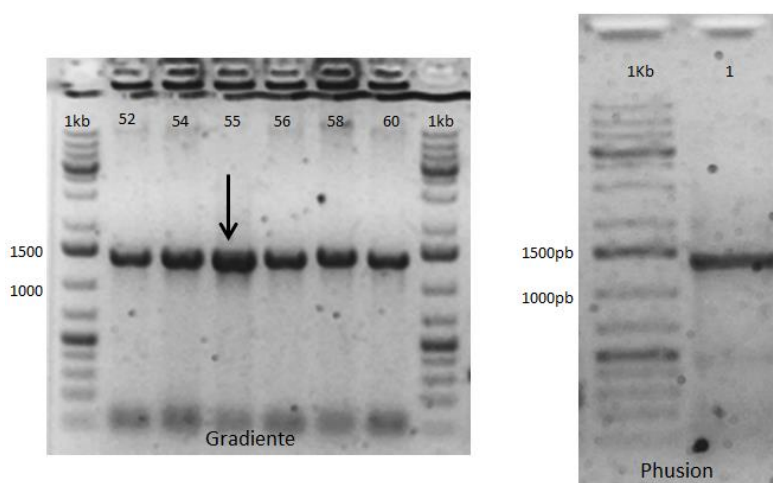
Para a expressão dos diferentes genes *xylA* escolhidos anteriormente foi utilizado o vetor pBBR1MCS-2 que já foi mencionado (item 5.5.1). Este vetor tem uma origem de replicação promíscua ativa em *B. sacchari* (Kovach et al., 1995). Para ser utilizado como vetor de expressão, ele possui o promotor do gene *lac* que está direcionado para o sítio de múltipla clonagem (MCS). Este promotor pode ser utilizado para expressão, pois a bactéria *B. sacchari* não possui o gene *lacI* em seu genoma. Os genes que foram amplificados e clonados a partir de culturas bacterianas (*xylA<sub>Bs</sub>*, *xylA<sub>Bc</sub>* e *xylA<sub>Pt</sub>*) foram clonados com a suas próprias sequências “Shine-Dalgarno” para o início da tradução, e utilizam o promotor *lac* para a transcrição. Para os demais genes sintetizados foi introduzido a sequência “Shine-Dalgarno” de *B. sacchari*. Como controle foi construída uma linhagem de *B. sacchari* com o vetor pBBR1MCS-2 vazio (LFM 1405).

### 5.6.1 Genes amplificados e clonados em *B. sacchari*

#### a) *xylA B. sacchari*

O gene *xylA* de *B. sacchari* foi amplificado com iniciadores específicos (PF e PR *xylA<sub>Bs</sub>* Item 4.8.2) desenhados a partir do draft do genoma recém sequenciado (Alexandrino et al., 2014). Estes iniciadores introduziram, no fragmento amplificado, sítios para as enzimas de restrição HindIII e BamHI para o gene poder ser em seguida clonado no vetor pBBR1MCS-2. Para padronização do PCR foi realizado um gradiente, no qual foram analisadas seis temperaturas (52, 54, 55, 56, 58 e 60 °C) para anelamento dos iniciadores como mostrado na figura 5.30. Para uma das temperaturas, 55 °C, foi utilizado o reagente DMSO que ajuda em alguns casos para melhorar o anelamento dos iniciadores. Para as demais ampliações do gene *xylA<sub>Bs</sub>* foi utilizada a temperatura de 55 °C com adição de DMSO (nas quantidades determinadas no item 4.8.3). Em

seguida, foi feita a amplificação com a enzima de alta fidelidade Phusion como mostrado na figura 5.30, tendo se obtido um amplicon no tamanho esperado (1374pb). Este amplicon foi utilizado para a clonagem no vetor pBBR1MCS-2, foi enviado para sequenciamento e foi possível conferir a integridade do fragmento (anexo 6).



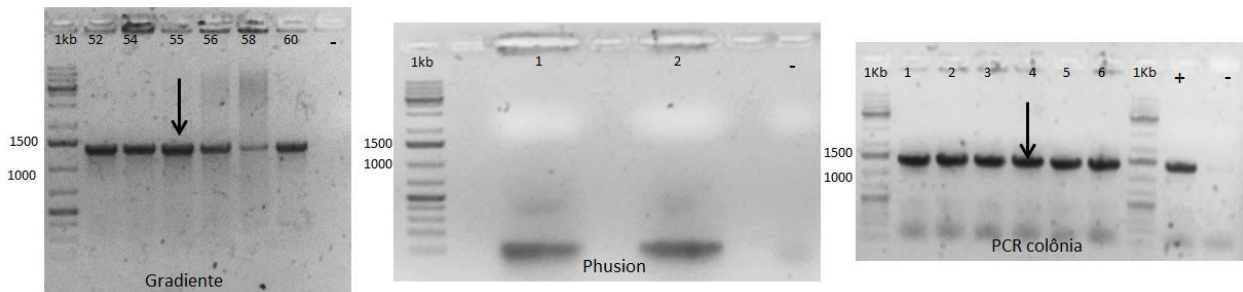
**Figura – 5.30:** Fotos das eletroforeses em gel de agarose das amplificações do gene *xylA<sub>Bs</sub>*. Gradiente: PCR com gradiente de temperaturas em grau Celsius (°C); para temperatura de 55 °C foi adicionado DMSO; a flecha indica a temperatura escolhida para as demais amplificações. Phusion: PCR utilizando a enzima Phusion de alta fidelidade. Tamanho do gene *xylA<sub>Bs</sub>*: 1374pb.

Após digestão do amplicon e do vetor, com as enzimas indicadas anteriormente, esses foram ligados formando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*xylA<sub>Bs</sub>*. Este foi inserido em *B. sacchari* por eletroporação para construção da linhagem *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xylA<sub>Bs</sub>* (LFM 1406). Para confirmar a presença do plasmídeo e do gene de interesse, foram utilizados os iniciadores M13 que são sequências presentes no plasmídeo pBBR1MCS-2 flanqueando o sítio de múltipla clonagem onde os diferentes genes foram inseridos. Estes iniciadores foram utilizados uma vez que aqueles específicos para amplificar o gene *xylA* de *B. sacchari* iriam amplificar também o gene presente no cromossomo da bactéria.

#### b) *xylA* de *B. cenocepacia*

O gene *xylA* de *B. cenocepacia* foi amplificado com iniciadores específicos (PF e PR *xylA<sub>Bc</sub>* item 4.8.2), que foram desenhados a partir da sequência do gene *xylA* de *Burkholderia cenocepacia* J2315 obtida no NCBI. Estes iniciadores introduziram, no fragmento amplificado,

sítios para as enzimas de restrição HindIII e BamHI para o gene alvo poder ser em seguida clonado no vetor pBBR1MCS-2. Para padronização do PCR, foi utilizado a enzima Taq Polimerase e foi realizado um gradiente, no qual foram analisadas seis temperaturas (52, 54, 55, 56, 58 e 60 °C) para anelamento dos iniciadores como mostrado na figura 5.31 Para uma das temperaturas, 55 °C, foi utilizado o reagente DMSO. Em seguida, foi tentado amplificar este fragmento com a enzima Phusion de alta fidelidade e não foi possível obter uma boa amplificação com esta enzima como mostrado na figura 5.31 Desta maneira, foi decidido amplificar este gene para clonagem utilizando a enzima Taq polimerase, tendo se obtido um amplicon no tamanho esperado (1374 pb). Este amplicon foi utilizado para a clonagem no pBBR1MCS-2, foi enviado para sequenciamento e foi possível conferir a integridade do fragmento (anexo 6). Após digestão do amplicon e do vetor, com as enzimas indicadas anteriormente, esses foram ligados formando o plasmídeo pBBR1MCS-2::xylA<sub>BC</sub>. Este foi inserido em *B. sacchari* por eletroporação para construção da linhagem *B. sacchari* pBBR1MCS2::xylA<sub>BC</sub> (LFM 1408). A figura 5.31 mostra o PCR de colônia, feito com os iniciadores específicos para o gene xylA<sub>BC</sub>, que confirma a presença do plasmídeo e do gene de interesse.

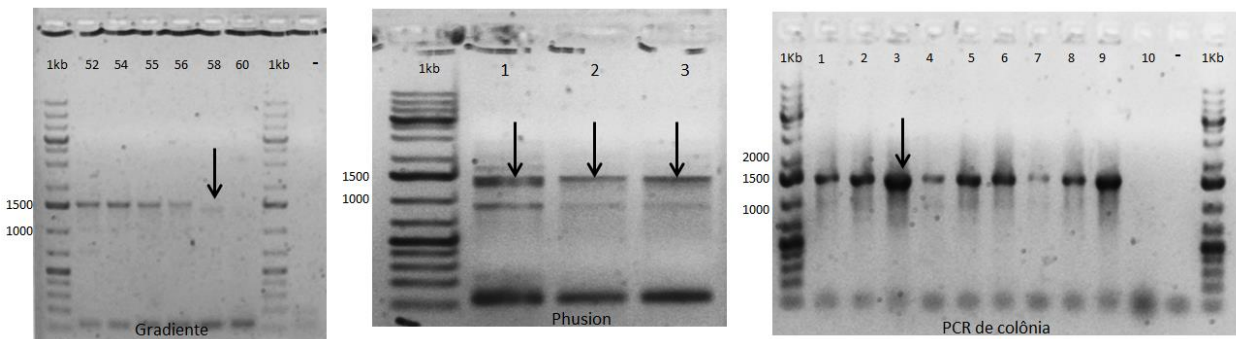


**Figura – 5.31:** Fotos das eletroforeses em gel de agarose para amplificação do gene xylA<sub>BC</sub>. Gradiente: Gradiente de temperaturas da amplificação utilizando a enzima Taq polimerase; 52-60: temperaturas em grau Celsius (°C) testadas; para temperatura de 55 °C foi adicionado DMSO; a flecha indica a temperatura escolhida para as demais amplificações (55 °C). Phusion: Tentativa de amplificar o gene com a enzima de alta fidelidade Phusion. PCR colônia: Confirmação da presença do plasmídeo com o gene de interesse na recombinante *B. sacchari* pBBR1MCS2::xylA<sub>BC</sub>; 1-6: colônias testadas; seta indica a colônia selecionada para os experimentos subsequentes. +: controle positivo; -: controle negativo. Tamanho do gene xylA<sub>BC</sub>: 1374 pb.

### c) xylA de *P. luminescens*

O gene xylA de *P. luminescens* foi amplificado com iniciadores específicos (PF e PR xylA<sub>PI</sub> item 4.8.2) desenhados a partir da sequência do gene xylA de *Photorhabdus luminescens subsp laumondii TTO1* obtida no NCBI. Estes iniciadores introduziram sítios para as enzimas de restrição ApaI e BamHI para o gene alvo poder ser em seguida clonado no vetor pBBR1MCS-2.

Para padronização do PCR foi realizado um gradiente, no qual foram analisadas seis temperaturas (52, 54, 55, 56, 58 e 60 °C) para o anelamento dos iniciadores como mostrado na figura 5.32. O tamanho esperado do amplicon é de 1430 pb, portanto, a temperatura de 58 °C foi escolhida para as demais amplificações. Em seguida, foi feita a amplificação com a enzima de alta fidelidade Phusion como mostrado na figura 5.32, tendo se obtido um amplicon no tamanho esperado (1430 pb). Este amplicon foi utilizado para a clonagem no vetor pBBR1MCS-2, foi enviado para sequenciamento e foi possível conferir a integridade do fragmento. Após digestão do amplicon e do vetor, com as enzimas indicadas anteriormente, esses foram ligados formando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*xyIA<sub>PI</sub>*. Este foi inserido em *B. sacchari* por eletroporação para construção da linhagem *B. sacchari* pBBR1MCS2::*xyIA<sub>PI</sub>* (LFM 1422). A figura 5.32 mostra o PCR de colônia da linhagem recombinante, feito com os iniciadores M13, uma vez que os iniciadores específicos para o gene *xyIA<sub>PI</sub>* amplificam bandas inespecíficas quando utilizado a Taq polimerase. Esta figura confirma a presença do plasmídeo e do gene de interesse.



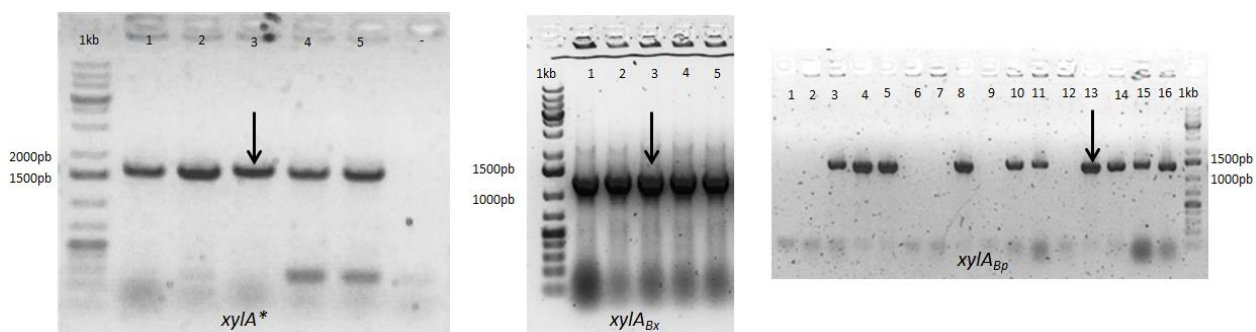
**Figura – 5.32:** Fotos das eletroforeses em gel de agarose para amplificação do gene *xyIA<sub>PI</sub>*. Gradiente: Gradiente de temperaturas da amplificação utilizando a enzima Taq polimerase; 52-60: temperaturas em grau Celsius (°C) testadas; a flecha indica a temperatura escolhida para as demais amplificações (58 °C). Phusion: Amplificação do gene com a enzima de alta fidelidade Phusion; as flechas indicam a banda esperada (1430 pb). PCR colônia: Confirmação da presença do plasmídeo com o gene de interesse na recombinante *B. sacchari* pBBR1MCS2::*xyIA<sub>PI</sub>*; 1-10: colônias testadas utilizando os iniciadores M13 (1582 pb); seta indica a colônia selecionada para os experimentos subsequentes. -: controle negativo.

### 5.6.2 Genes sintetizados e clonados em *B. sacchari*

Os demais genes escolhidos para serem testados, *xyIA\**, *xyIA<sub>Bx</sub>* e *xyIA<sub>Bp</sub>* foram sintetizados pela empresa GenOne. Esta empresa envia o gene sintetizado dentro de um plasmídeo (pBSK ou pCloneEZ-NRS) com as enzimas de restrição que foram escolhidas para fazer a clonagem no

pBBR1MCS-2. Os produtos fornecidos pela empresa estão no anexo 7. Para os três genes foram escolhidas as enzimas HindIII e BamHI.

A primeira etapa foi fazer a eletroporação dos plasmídeos com os genes sintetizados em três linhagens de *E.coli DH10B* (LFM 1380, 1418 e 1419). Em seguida, estes plasmídeos foram extraídos e digeridos com as enzimas HindIII e BamHI. Foi feita uma eletroforese em gel de agarose para separar os esqueletos dos plasmídeos dos genes sintetizados, os quais foram extraídos do gel e purificados. Em paralelo foi feita a digestão do vetor pBBR1MCS-2 com as mesmas enzimas utilizadas anteriormente. Por fim, foram feitas as ligações dos amplicons com o pBBR1MCS-2 e os plasmídeos formados foram inseridos em *B. sacchari* por eletroporação. A figura 5.33 representa a amplificação dos genes *xyIA\**, *xyIA<sub>Bx</sub>* e *xyIA<sub>Bp</sub>* após a eletroporação dos respectivos plasmídeos em *B. sacchari*. Para o gene *xyIA\** foram utilizados os iniciadores M13, pois, a sequência do gene *xyIA\** é praticamente igual aquela do gene da xilose isomerase presente no genoma da *B. sacchari*. Para os demais genes *xyIA* foram utilizados iniciadores específicos. Foram obtidos os tamanhos esperados para cada gene amplificado, 1556 pb para o gene *xyIA\**, 1319 pb para o gene *xyIA<sub>Bx</sub>* e 1323 para o gene *xyIA<sub>Bp</sub>*.



**Figura – 5.33:** Fotos das eletroforeses em gel de agarose das bactérias recombinantes de *B. sacchari* após eletroporação dos plasmídeos pBBR1MCS-2::*xyIA\** / *xyIA<sub>Bx</sub>* / *xyIA<sub>Bp</sub>*. 1-16: diferentes colônias utilizadas como DNA molde para o PCR. A seta mostra qual colônia foi utilizada nos experimentos subsequentes. *xyIA\**: 1556 pb; *xyIA<sub>Bx</sub>*: 1319 pb; *xyIA<sub>Bp</sub>*: 1323 pb.

Nesta etapa foram obtidos sete recombinantes de *B. sacchari* e o equivalente em *E. coli DH10B* (tabela 4.1). Todos os plasmídeos construídos também foram inseridos em *E. coli DH10B*, pois, é possível ter um rendimento para extração de plasmídeo muito maior com essa linhagem quando comparado com *B. sacchari* devido à diferença de crescimento entre as duas bactérias e pelo fato que diferentes linhagens de *E.coli* foram construídas geneticamente para serem mais eficientes para diversos experimentos de biologia molecular, como a clonagem.

Uma vez os recombinantes de *B. sacchari* construídos, estes serão testados em duas etapas: uma primeira medindo a atividade enzimática da enzima xilose isomerase; uma segunda através de um ensaio para medir crescimento, consumo de açúcar e produção de PHA utilizando xilose como única fonte de carbono.

### **5.7 Análise dos recombinantes de *B. sacchari***

Para analisar os diferentes recombinantes de *B. sacchari* construídos, foi decidido fazer dois ensaios diferentes. Um primeiro no qual foi medida a atividade da proteína xilose isomerase através de um ensaio enzimático acoplado. Esta medição nos proporcionou duas principais informações: se a construção do nosso plasmídeo está funcional dentro das células, ou seja, se o nosso gene de interesse está sendo transcrito, traduzido e se a proteína está funcional; e qual enzima tem maior atividade específica pela xilose. Em um segundo ensaio em batelada durante 72 horas no qual foi medido o crescimento celular, o consumo de açúcar e a produção de PHA a partir de xilose como única fonte de carbono. Esse experimento permite avaliar se as melhorias observadas nas atividades enzimáticas podem ser correlacionadas a uma maior eficiência no consumo de xilose ou na produção de polímero.

#### **5.7.1 Análise da atividade enzimática da proteína xilose isomerase dos recombinantes de *B. sacchari*.**

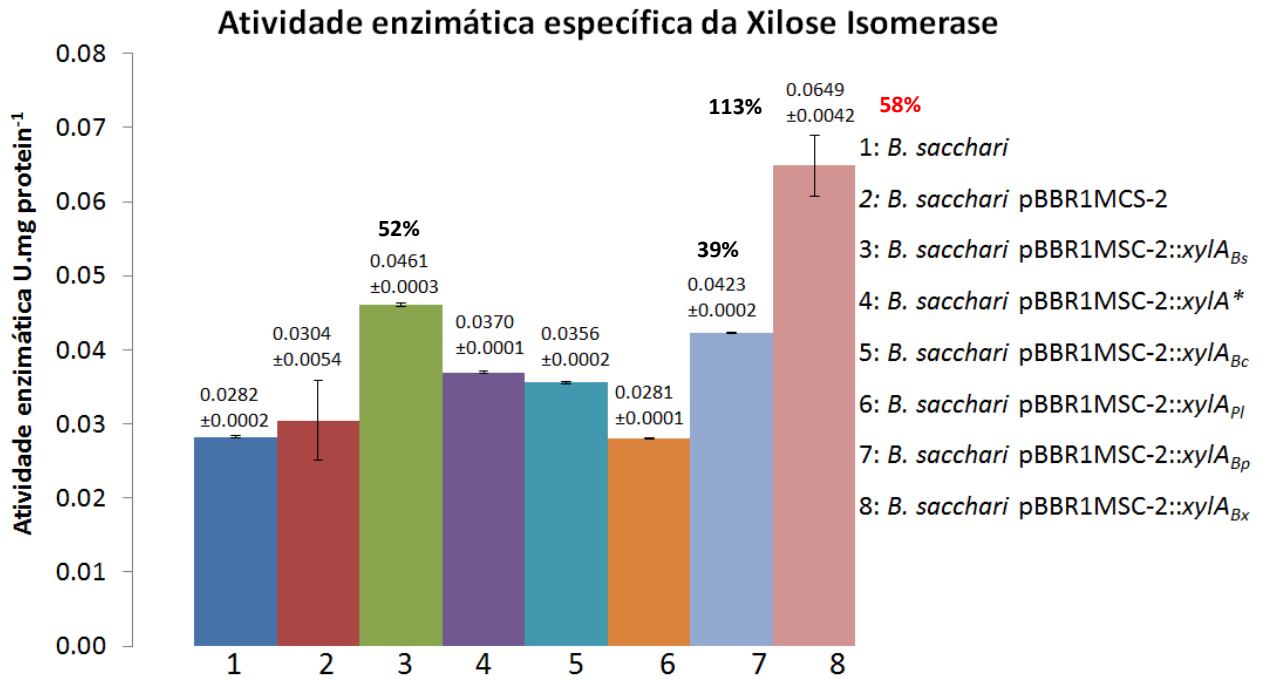
A primeira análise feita com os recombinantes de *B. sacchari* construídos anteriormente foi um ensaio para medir as diferentes atividades enzimáticas da proteína de xilose isomerase (XI). Em trabalhos anteriores em nosso laboratório, já foi feita a medição da atividade enzimática da XI (Lopes et al., 2009b) utilizando o método cisteína-carbazole, descrito por Dische em 1949. Para alguns autores este método é pouco sensível e não muito reprodutível além de apresentar uma limitação com excesso de substrato e utilizar ácido sulfúrico concentrado (Kerstens-Hilderson et al., 1986; Schenk, Bisswanger, 1998). Por outro lado, em nosso laboratório foi adquirido um espectrofotômetro de microplaca de 96 poços (“Synergy H1 microplate reader” da marca BioTek). Com este equipamento é possível fazer medições de alguns intermediários de reações enzimáticas, como NAD(H) e NADP(H), através das quais, em conjunto com outras medidas, é possível deduzir a atividade enzimática. Por estas razões, foi decidido implantar, em nosso laboratório, uma nova técnica para medição da atividade enzimática da proteína XI baseada



em um ensaio enzimático acoplado. Durante este ensaio a xilose é isomerizada a xilulose pela XI, que é convertida a xilitol pela sorbitol desidrogenase (SDH). Para formação de xilitol é necessária a oxidação de NADH, que pode ser medida através de variações na absorbância a 340nm (item 4.11) (Kerstens-Hilderson et al., 1986). Desta forma, é uma medição indireta da atividade da XI, pois, o que realmente está sendo medido é uma variação da quantidade de NADH decorrente da reação enzimática da SDH. Foram necessários dois meses para a padronização deste ensaio.

O ensaio consiste na mistura do extrato celular de cada cultura bacteriana a ser testada, com a SDH e um tampão de medição que contém NADH e xilose. A xilose, SDH e NADH estão em quantidades saturantes, deixando assim, o extrato celular como limitante para poder fazer a medição da XI. Foi realizado para todas as medições um branco, no qual todos os ingredientes são adicionados menos o extrato celular e este valor é subtraído de todas as medições. Esta informação é muito importante para confirmar que a SDH não está convertendo a xilose em xilitol. As culturas bacterianas foram cultivadas em MMX por 24 horas, o que indica que as XI medidas são decorrentes da expressão de genes presentes nos plasmídeos e no genoma de *B. sacchari*.

O resultado obtido pelo aparelho é um gráfico da oxidação de NADH em função do tempo. A inclinação da curva vai nos informar a velocidade da oxidação de NADH que representa indiretamente a velocidade da reação realizada pela XI. Para conseguir calcular a atividade enzimática específica da enzima XI, definida como a quantidade de substrato consumido ou produto formado por unidade de tempo por unidade de proteína, é necessário saber qual a concentração de proteína de cada um dos extratos celulares utilizados. Para isso foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1975). Os resultados das atividades enzimáticas específicas das diferentes linhagens recombinantes de *B. sacchari* estão na figura 5.34. No anexo 8 estão expostos a curva padrão de Bradford, assim como a tabela excel utilizada para calcular a atividade específica da xilose isomerase.



**Figura – 5.34:** Atividade enzimática específica da enzima xilose isomerase para as diferentes linhagens recombinantes de *B. sacchari*. Sobre cada coluna está apresentado o valor médio de atividade específica determinada e o desvio padrão. Também está apresentado em preto a porcentagem de aumento da atividade quando comparada com a linhagem controle e em vermelho quando comparada com a linhagem 3, *B. sacchari* pBBR1MCS-2::xylA<sub>bs</sub>.

A linhagem controle, *B. sacchari* pBBR1MCS-2 (2), teve uma atividade enzimática muito próxima da linhagem selvagem (0,0304 comparado com 0,0282) concluindo que a presença do plasmídeo, assim como a utilização de antibiótico, não interferiu neste experimento. A linhagem *B. sacchari* pBBR1MCS-2::xylA<sub>Bx</sub> (8) foi aquela que apresentou maior atividade enzimática específica quando comparada com a linhagem controle (2), um aumento de aproximadamente 113%. A segunda linhagem com maior atividade da proteína XI foi a *B. sacchari* pBBR1MCS-2::xylA<sub>Bs</sub> (3) com um aumento de aproximadamente 52% quando comparada com a linhagem controle. Esse valor é similar a aquele encontrado em outro trabalho que mediu a atividade desta linhagem e que obteve um aumento perto de 70% (Lopes et al.,2009b). Outra linhagem que obteve um aumento significativo, 39%, foi a *B. sacchari* pBBR1MCS-2::xylA<sub>Bp</sub> (7). Para as demais linhagens de *B. sacchari*, com o plasmídeo pBBR1MCS-2 com os genes xylA\* (4), xylA<sub>Bc</sub> (5) e xylA<sub>Pl</sub> (6), não foi possível observar um aumento tão expressivo, sendo valores similares à linhagem controle. Outra comparação que pode ser feita, é utilizar a linhagem *B. sacchari* pBBR1MCS-2::xylA<sub>Bs</sub> (3) como base de comparação, uma vez que o que queremos encontrar é uma xilose isomerase melhor do que aquela presente em *B. sacchari*. Neste caso, a única que teve um aumento na atividade enzimática foi aquela de *B. xenovorans* com 58% de aumento.

Essas diferenças nas atividades enzimáticas da xilose isomerase mostram que existe diferenças em cada uma delas que podem proporcionar uma melhor eficiência no uso da xilose. Como já discutido na introdução e no item 5.2, a xilose isomerase é uma enzima pobre enzimaticamente e poderia ser melhorada através de algumas mutações, como aquelas sugeridas por Lee et al., 2012, no caso da xilose isomerase de *Piromyces sp.* Os principais pontos que poderiam melhorar a atividade da enzima são a ligação entre enzima substrato e a estabilidade da enzima, a qual precisa formar dímeros e tetrâmeros para estar ativa. Desta forma, as diferenças observadas nos experimentos enzimáticos realizados, são um reflexo das pequenas diferenças na sequência de cada um dos genes *xyIA* escolhidos, que muda a estrutura da proteína de uma maneira que em alguns casos uma seja mais eficiente do que a outra. É importante lembrar que para todos os recombinantes o promotor utilizado foi o mesmo, o promotor lac, presente no plasmídeo pBBR1MCS-2.

Em trabalhos futuros, poderia ser feita uma análise da estrutura tridimensional de cada uma das enzimas testadas para tentar encontrar modificações que permitam a elaboração de uma enzima com maior eficiência enzimática.

Outro experimento para trabalhos futuros, para completar este resultado seria repetir o mesmo ensaio, porém crescendo as diferentes culturas em meio mineral com glicose. Como já comentado no item 2.3, é descrito na literatura, para algumas bactérias, uma repressão catabólica dos genes para o metabolismo de xilose quando em presença de glicose. Desta maneira, em um experimento como este, talvez pudesse ser medido somente a atividade enzimática da proteína que está sendo expressa pelo plasmídeo, uma vez que a xilose isomerase endógena estaria inativa ou reprimida.

A conclusão desta etapa é que os extratos das linhagens de *B. sacchari* abrigando os genes *xyIA<sub>Bv</sub>*, *xyIA<sub>Bs</sub>* e *xyIA<sub>Bp</sub>* tiveram uma atividade enzimática específica da proteína xilose isomerase superior ao controle, sendo que a recombinante abrigando o primeiro gene é aquela com maior atividade enzimática específica, perto de 113% a mais que o controle. Na próxima etapa vamos observar se podemos fazer uma correlação entre esses dados e aqueles obtidos com o próximo experimento, que mediu o crescimento, consumo de açúcar e produção de PHA a partir de xilose como única fonte de carbono.

### 5.7.2 Análise da produção de PHA por linhagens recombinantes a partir de xilose

Nesta etapa, foram realizados cultivos em batelada com a linhagem selvagem de *B. sacchari* e todas as linhagens recombinantes construídas. Este experimento foi realizado em MMX, com 15 g/L de xilose, 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e com adição de canamicina, no caso das linhagens recombinantes. Foram retiradas amostras com 0, 24, 48 e 72 horas de cultivo. Os resultados estão expostos na Tabela 5.2. Os dados utilizados para construção da tabela 5.2 estão no anexo 9.

Com relação à produção de polihidroxialcanoatos (PHA), para todas as linhagens o único tipo de PHA encontrado foi o P3HB, que é o normalmente produzido por *B. sacchari* a partir de xilose como já foi demonstrado em trabalhos anteriores (Lopes et al., 2009a; Lopes et al., 2009b; Silva et al., 2004). Foram avaliadas duas diferentes características, a concentração de P3HB em g/L, ou seja, a quantidade de P3HB produzida e a eficiência de conversão de xilose em P3HB, ou seja, quantos gramas de P3HB podem ser gerado por grama de xilose consumida, representados na Tabela 5.2 pelo fator de conversão  $Y_{\text{PHB}/\text{Xilose}}$ . Os recombinantes de *B. sacchari* abrangendo os genes  $xyIA_{Bx}$ ,  $xyIA_{Bs}$ ,  $xyIA_{Bp}$  e  $xyIA^*$  foram capazes de produzir aproximadamente 70% a mais de P3HB do que a linhagem controle com o pBBR1MCS-2 vazio. Para a linhagem recombinante *B. sacchari* pBBR1MCS-2:: $xyIA_{Bc}$  o aumento na produção de P3HB foi menor do que as demais recombinantes, perto de 40% quando comparado com a linhagem controle. No caso da *B. sacchari* pBBR1MCS-2:: $xyIA_{Pl}$  não foi possível notar uma diferença na produção do polímero quando comparado com a linhagem controle. Quanto à eficiência de conversão de xilose em P3HB, o resultado obtido para a linhagem controle, 0,22, é similar a outros trabalhos que obtiveram 0,26 para linhagem selvagem e 0.18 para a linhagem recombinante abrangendo o plasmídeo pBBR1MCS-2 (Lopes et al., 2009b). No caso das linhagens recombinantes deste trabalho, foi obtido um aumento de aproximadamente 30%, comparando com a linhagem controle, para as linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrangendo os genes  $xyIA_{Bs}$ ,  $xyIA^*$  e  $xyIA_{Bc}$ . Para as linhagens de *B. sacchari* abrangendo os genes  $xyIA_{Bp}$  e  $xyIA_{Bx}$  o aumento foi de aproximadamente 40% quando comparado com a linhagem controle. No caso da linhagem recombinante *B. sacchari* pBBR1MCS-2:: $xyIA_{Pl}$  não foi possível observar nenhuma diferença com o valor obtido para a linhagem controle.

No caso do consumo de xilose, as linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes, *xyIA<sub>Bs</sub>*, e *xyIA\** foram capazes de consumir aproximadamente 30% a mais do açúcar total fornecido quando comparados com a linhagem controle. As linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes, *xyIA<sub>Bp</sub>* e *xyIA<sub>Bx</sub>* consumiram aproximadamente 23% a mais de xilose do que a linhagem controle. Para as demais linhagens recombinantes, *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xyIA<sub>Bc</sub>* e *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xyIA<sub>Pl</sub>* não foi possível observar uma grande diferença no consumo de xilose quando comparado com a linhagem controle. A bactéria selvagem apresentou um valor para 72 horas de consumo de xilose incoerente, provavelmente decorrente de um erro experimental. No caso do próprio controle, o valor para 72 horas está ligeiramente maior do que o de 48 horas, isso pode ser explicado pelo fato que provavelmente o consumo entre as amostras de 48 e 72 horas não foi alterado ou a alteração da quantidade de xilose foi muito baixa para o nosso sistema detectar.

O crescimento celular foi apresentado como  $X_r$  que é a massa de células residuais por litro. Este valor foi calculado pegando a massa celular total e subtraindo a massa de P3HB. É possível perceber que, depois de 24 horas, o crescimento celular para ou diminui por causa da limitação em nitrogênio do meio utilizado, propício para o acúmulo de polímero. Os recombinantes que mais acumularam P3HB, linhagens de *B. sacchari* abrigando os genes *xyIA<sub>Bx</sub>*, *xyIA<sub>Bs</sub>*, *xyIA<sub>Bp</sub>*, *xyIA\**, são aqueles que tiveram menor crescimento entre 48 e 72 horas. As linhagens selvagem, controle e *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xyIA<sub>Pl</sub>* tiveram uma queda de crescimento entre 24 e 72, provavelmente devido à queda do pH. Foram realizados testes para identificar a presença de alguma contaminação no cultivo, mas nada foi encontrado. Experimentos em andamento em nosso laboratório, para medir a presença de ácidos nestas culturas assim como a repetição deste experimento estão sendo realizados para podermos ter maior precisão nos dados obtidos. Outro dado interessante é o fator de conversão de xilose em células ( $Y_{Xr/Xilose}$ ). As linhagens recombinantes que obtiveram maior eficiência na conversão de xilose em célula foram a *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xyIA<sub>Pl</sub>* e *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xyIA<sub>Bc</sub>*, com um aumento de 15 e 22%, respectivamente, quando comparadas com a linhagem controle.

Com os resultados obtidos durante este ensaio e utilizando os resultados obtidos para as atividades enzimáticas do experimento anterior é possível observar algumas correlações. As linhagens recombinantes que tiveram maior atividade enzimática (as linhagens de *B. sacchari*

abrigando os genes  $xyIA_{Bx}$ ,  $xyIA_{Bs}$ ,  $xyIA_{Bp}$ ) são aquelas que conseguiram ter melhores resultados de acúmulo de P3HB e consumo de xilose. Porém a diferença entre as atividades enzimáticas destes recombinantes (quando comparado com o controle um aumento de 113%, 52%, 39% para as linhagens de *B. sacchari* abrigando os genes  $xyIA_{Bx}$ ,  $xyIA_{Bs}$  e  $xyIA_{Bp}$ , respectivamente) não apareceu nos resultados de produção e consumo que foram muito similares entre eles. No caso da linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o gene  $xyIA^*$ , o resultado do ensaio enzimático não foi muito maior do que a linhagem controle, porém para a produção de P3HB e consumo de xilose foi possível observar um aumento similar as linhagem anteriores. Para as últimas duas linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes  $xyIA_{Bc}$  e  $xyIA_{Pl}$ , não foi possível observar uma diferença na atividade enzimática quando comparadas com a linhagem controle e o mesmo foi refletido para a produção de P3HB e consumo de xilose no caso daquela abrigando o gene  $xyIA_{Pl}$ . A linhagem abrigando o gene  $xyIA_{Bc}$  obteve um consumo de xilose e produção de P3HB um pouco maior que a linhagem controle.

**Tabela – 5.2:** Produção de P3HB por *B. sacchari* selvagem e seus recombinantes abrigando diferentes genes *xylA*.

<b>pH</b>								
Tempo(h) / Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	<i>xylA</i> *	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
48	3.47±0.02	4.36±0.69	6.43±0.01	6.25±0.04	6.42±0.00	5.35±0.36	6.20±0.09	6.34±0.01
72	3.40±0.00	3.69±0.10	6.37±0.02	5.92±0.12	6.31±0.01	3.87±0.10	5.74±0.37	6.30±0.04
<b>Xr (g/L)</b>								
Tempo(h) / Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	<i>xylA</i> *	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	0.12	0.21	0.52	0.24	0.25	0.25	0.20	0.10
24	1.86	2.24±0.10	1.77±0.16	2.01±0.19	1.75±0.23	1.87±0.12	1.79±0.05	1.97
48	1.74±0.10	2.12±0.15	1.97±0.14	2.01±0.20	2.01±0.15	2.34±0.06	2.02±0.24	ND
72	1.11±0.14	1.77±0.30	1.94±0.01	1.98±0.08	2.35±0.31	2.12±0.07	1.92±0.06	1.96±0.11
<b>Açúcar (g/L)</b>								
Tempo(h) / Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	<i>xylA</i> *	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	16.95	17.73	18.61	17.95	17.72	17.91	17.17	17.09
24	9.59±0.17	10.82±0.47	10.46±0.21	10.44±0.64	10.02±0.10	10.69±0.53	9.64±0.16	9.98±0.14
48	6.21±0.10	6.57±0.11	4.93±0.17	4.26±0.69	5.73±0.08	6.61±0.26	4.41±0.17	4.64±0.17
72	7.92±0.12	6.67±0.45	4.04±0.03	3.84±0.35	5.50±0.30	6.38±0.37	3.67±0.17	3.39±0.33
Consumido	9.03	11.06	14.57	14.11	12.22	11.53	13.5	13.7
<b>PHB (g/L)</b>								
Tempo(h) / Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	<i>xylA</i> *	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	0.01	0.02	0.08	0.06	0.09	0.02	0.03	0.01
24	1.74	1.64±0.13	2.09±0.00	1.85±0.22	1.93±0.19	1.52±0.09	2.28±0.23	2.01
48	2.07±0.08	2.54±0.23	3.41±0.13	3.63±0.42	3.37±0.25	2.67±0.04	4.04±0.48	ND
72	1.80±0.13	2.45±0.08	4.20±0.01	4.23±0.01	3.52±0.14	2.60±0.11	4.18±0.19	4.27±0.17
<b>Fatores de Conversão (g/g)</b>								
Linhagens	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	<i>xylA</i> *	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
$Y_{PHB/Xilose}$	0.198	0.220	0.283	0.296	0.281	0.224	0.307	0.311
$Y_{Xr/Xilose}$	0.110	0.141	0.097	0.123	0.172	0.162	0.127	0.136

Controle: *B. sacchari* pBBr1MCS-2; *xylA<sub>Bs</sub>* - *xylA<sub>Bx</sub>*: *B. sacchari* pBBr1MCS-2 com o respectivo gene da recombinante, *xylA<sub>Bs</sub>* – *xylA<sub>Bx</sub>*. Ressaltado com o contorno preto estão os dados mais importantes. ND: dados não disponíveis.

Analisando os fatores de conversão de xilose em PHB ( $Y_{P3HB/Xilose}$ ) e de xilose em células ( $Y_{Xr/Xilose}$ ) é possível observar que os recombinantes que obtiveram melhor eficiência de conversão de xilose em PHB são todas as linhagens recombinantes, exceto aquela abrigando o gene *xylA<sub>Pl</sub>*. No caso das linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xylA<sub>Bs</sub>*,

*xylA\**, *xylA<sub>Bp</sub>* e *xylA<sub>Bx</sub>*, essas foram aquelas que tiveram maior consumo de xilose e produção de P3HB e menor fator de conversão de xilose em Xr. A linhagem recombinante *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xylA<sub>Bc</sub>* obteve um valor mais alto que o controle para conversão de xilose em P3HB, porém não teve um consumo de xilose tão expressivo, mais a xilose que foi consumida foi mais eficientemente convertida em P3HB do que no caso da linhagem controle. Essa mesma linhagem foi aquela que obteve maior eficiência de conversão de xilose em célula (Xr). Quanto à linhagem recombinante *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xylA<sub>Pl</sub>*, ela não obteve valores de atividade enzimática, nem de produção de P3HB, ou consumo de xilose muito diferentes da linhagem controle. Isso pode talvez ser explicado pelo fato que este gene pertence à outra família de bactérias (*Enterobacteriaceae*) e o seu gene não foi enviado para ser sintetizado, ou seja, foi utilizado a sua própria sequência “Shine-Dalgarno” e o seu próprio códon preferencial.

Por outro lado, podemos fazer uma comparação entre os diferentes recombinantes utilizando a linhagem *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xylA<sub>Bs</sub>* como controle, para ver se a presença de uma xilose isomerase diferente daquela presente em *B. sacchari* tem alguma influência na produção de P3HB, consumo de xilose, ou no fator de conversão de xilose em P3HB. O que foi possível perceber é que todos os recombinantes apresentam resultados muito similares ou inferiores aqueles obtidos pela recombinante abrigando o gene *xylA* da própria *B. sacchari*, indicando que não foi possível perceber, com este experimento, se uma xilose isomerase é melhor do que a outra. O que foi possível perceber é que a superexpressão do gene *xylA* aumenta o consumo de xilose e a produção de P3HB. Este resultado poderia talvez ser explicado pelo fato que existe uma limitação na continuação da via do metabolismo de xilose, ou seja, a superexpressão da xilose isomerase transforma mais eficientemente a xilose em xilulose, porém a célula não possui xiluloquinase, produto do gene *xylB*, suficiente para transformar toda a xilulose produzida em xilulose-5-fosfato a qual será incorporada no metabolismo central. Desta maneira, talvez com a co-expressão do gene *xylB* seria possível observar diferenças mais marcantes entre as proteínas xilose isomerase escolhidas.



## 6 CONCLUSÕES FINAIS

### 6.1 Análise de genes do metabolismo de xilose no draft do genoma de *B. sacchari*

A bactéria *Burkholderia sacchari* provavelmente consome xilose através da via isomerase composta pelos genes *xylABFGH*, orientados no mesmo sentido, e *xylR* orientado no sentido contrário.

Esta bactéria parece apresentar genes similares aos de outra via de metabolismo de xilose, a via de Weimberg, composta por 5 genes. Esta talvez pudesse se tornar ativa se complementada e aumentar a eficiência do consumo de xilose.

Esta bactéria não parece apresentar a via de metabolismo de xilose Oxidoredutase.

Pelo grande potencial apresentado pela enzima xilose isomerase, produto do gene *xylA*, e pelas dificuldades impostas pelo transportador do tipo ABC codificado pelo operon *xylFGH*, foi decidido dar ênfase para a proteína xilose isomerase, ao decorrer deste trabalho.

### 6.2 Busca de genes na biblioteca metagenômica

As atividades de busca de genes na biblioteca metagenômica e sua inserção em mutantes mostraram-se infrutíferas, no nosso caso, já que não foram detectados genes íntegros nem operons, nem mesmo regiões, embora de pequeno tamanho, que contivessem algumas das modificações descritas na literatura como capazes de aumentar a atividade de enzimas sobre o catabolismo de xilose.

### 6.3 Construção de mutante de *B. sacchari* inativado especificamente no gene *xylA*

Duas metodologias foram empregadas para se gerar tal mutante: utilizando o vetor suicida pNPTS138 e o uso de radiação UV. Foram realizados e repetidos exaustivamente os experimentos planejados para se obter tais mutantes sem sucesso. Diante deste cenário, foi adotada a estratégia de sintetizar genes com as mutações descritas na literatura como melhoradoras, ou oriundas de *Burkholderia* mais distantes filogeneticamente de *B. sacchari* e inserir na própria *B. sacchari* de maneira extracromosomal, utilizando o vetor pBBR1MCS-2.

#### 6.4 Construção dos recombinantes de *B. sacchari*

Foram então selecionados genes codificadores de xilose isomerase para inserir em *B. sacchari* por meio do vetor pBBR1MCS-2. Os genes *xyIA<sub>Bc</sub>* e *xyIA<sub>Pl</sub>*, respectivamente de *B. cenocepacia* e *P. limnescens* e da própria *B. sacchari*, *xyIA<sub>Bs</sub>* foram amplificados a partir do DNA genômico destas bactérias. Genes de *B. xenovorans* (*xyIA<sub>Bx</sub>*) e de *B. phymatum* (*xyIA<sub>Bp</sub>*) foram sintetizados por uma empresa comercial pois as culturas não estavam disponíveis para aquisição. Foi ainda sintetizado o gene de *B. sacchari* (*xyIA\**) no qual foram inseridas as modificações, descritas na literatura, como capazes de aumentar o consumo de xilose. Assim, seis recombinantes de *B. sacchari* foram construídos, além de um controle abrigando o vetor sem inserto.

#### 6.5 Avaliação da produção de PHA por linhagens recombinantes de *B. sacchari* a partir de xilose

Os recombinantes foram avaliados em experimentos em frascos agitados, avaliando-se o consumo de xilose, produção de polihidroxialcanoatos e a atividade da enzima xilose isomerase. Os resultados indicaram que a atividade enzimática da xilose isomerase dos recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xyIA<sub>Bx</sub>*, *xyIA<sub>Bs</sub>*, *xyIA<sub>Bp</sub>* tiveram um aumento de 113%, 52% e 39% respectivamente, quando comparado com a linhagem controle abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2. Os recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xyIA<sub>Bx</sub>*, *xyIA<sub>Bs</sub>*, *xyIA<sub>Bp</sub>*, *xyIA\** foram capazes de consumir aproximadamente 30%, para *xyIA<sub>Bs</sub>* e *xyIA\**, e 23%, para *xyIA<sub>Bp</sub>* e *xyIA<sub>Bx</sub>*, a mais de xilose quando comparadas com a linhagem controle. Esses mesmos recombinantes foram aqueles que conseguiram produzir maior quantidade de P3HB, 70% a mais do que a linhagem controle. Os recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xyIA<sub>Bs</sub>*, *xyIA\** e *xyIA<sub>Bc</sub>* foram aqueles que tiveram um aumento de aproximadamente 30% a mais do que a linhagem controle na eficiência de conversão de xilose em PHB. Para as linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xyIA<sub>Bp</sub>* e *xyIA<sub>Bx</sub>*, esse aumento foi de 40%. A linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o gene *xyIA<sub>Bc</sub>* foi aquela que obteve maior eficiência de conversão de xilose em células (Xr). Para a linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o gene *xyIA<sub>Pl</sub>* não foi possível observar nenhuma diferença na atividade enzimática, consumo de xilose e produção de P3HB quando comparada com a linhagem controle. Quando os resultados

obtidos pelos diferentes recombinantes são comparados com a linhagem *B.sacchari* pBBR1MCS-2::*xyIA<sub>Bs</sub>*, foi possível perceber que não houve uma diferença muito grande entre as proteínas xilose isomerase testadas, mas que a superexpressão desta proteína aumenta tanto a produção de P3HB como o consumo de xilose na maioria dos recombinantes.

## 7 SUGESTÕES DE ATIVIDADES ADICIONAIS

A partir destes resultados, sugere-se como atividades adicionais para o melhoramento do consumo de xilose, investir na inserção, no cromossomo de *B. sacchari*, das modificações aqui testadas, ou ainda verificar se houve modificações estruturais na proteína modificada. Para a proteína xilose isomerase poderia ser desenhada a sua estrutura tridimensional para conseguir identificar possíveis aminoácidos a serem modificados para melhorar a sua atividade. Ainda poderia ser co-expresso o gene *xylB* do metabolismo de xilose para avaliar uma possível melhoria para a utilização deste açúcar e produção de PHA. A verificação da possibilidade de ativar a via de Weimberg em *B. sacchari*, pela introdução do gene codificador da enzima que completaria esta via e avaliar seus resultados sobre o consumo de xilose, seria outra sugestão. Para completar os resultados obtidos nos experimentos em frascos agitados seria interessante ter dados cinéticos de crescimento e consumo de xilose pelas linhagens recombinantes com melhor desempenho, além da linhagem controle. Isto poderia ser avaliado também com relação à repressão catabólica na presença de glicose.

## REFERÊNCIAS\*

ALEXANDRINO P., M. T. T., GUAMÁN L. P., CHERIX J., LOZANO G. C., FUJITA A., RAMOS E., LONG P., PADILLA G., TACIRO M. K., GOMEZ J. G. C., SILVA L. F. Draft Genome Sequence of the Polyhydroxyalkanoate-producing Bacterium *Burkholderia sacchari* LMG 19450 Isolated from Brazilian Sugarcane Plantation Soil. submitted, 2014.

AKARAONYE, E., KESHAVARZ, T., ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 85: 732-743 p. 2010.

ALBUQUERQUE, M. G., EIROA, M., TORRES, C., NUNES, B. R., REIS, M. A. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J Biotechnol*, v. 130, n. 4, p. 411-421, Jul 2007. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602776> >.

ANTUNES F. A. F., C. A. K., MILESSI T. S. S., SANTOS J. C., ROSA C. A., SILVAS. S. DA. Bioethanol Production from Sugarcane Bagasse by a Novel Brazilian Pentose Fermenting Yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Evaluation of Fermentation Medium. *International Journal of Chemical Engineering*, v. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/180681>, p. 8, 2014.

ASBOTH, B.; NARAY-SZABO, G. Mechanism of Action of D-Xylose Isomerase. *Current Protein & Peptide Science*, v. 1, n. 3, p. 237-254, Nov 2000. ISSN 1389-2037. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000207654100001 >.

AUSUBEL FM, B. R., KINGSTON R, MOORE DD, SEIDMAM JG, SMITH J, ET AL. **Current protocols in Molecular Biology**: New York: John Wiley & Sons 1992. 3 v.

BIOSCIENSES, I. Biological sequence alignment editor (Bioedit) 1997.

BONFIELD, J. K.; STADEN, R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. *DNA Seq*, v. 6, n. 2, p. 109-117, 1996. ISSN 1042-5179. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8907307> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-254, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRÄMER, C. O., VANDAMME, P., SILVA, L. F., GOMEZ, J. G., STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 51, n. Pt 5, p. 1709-1713, Sep 2001. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11594600> >.

CALDEIRA-PIRES, A., DA LUZ, SANDRA MARIA, PALMA-ROJAS, SILVIA, RODRIGUES, THIAGO OLIVEIRA, SILVERIO, VANESSA, HAVES, VILELA, FREDERICO, BARBOSA, PAULO CESAR, ALVES, ANA MARIA. Sustainability of the Biorefinery Industry for Fuel Production. *Energies*, v. 6, n. 1, p. 329-350, Jan 2013. ISSN 1996-1073. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000314021900019 >.

CARVALHO, L. K. G. **Fermentação de resíduos por *Escherichia coli* KO11: influência do inóculo, suplemento nutricional e neutralização do hidrolizado**. 2001. 122 (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP.

---

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

- CESÁRIO, M. T., RAPOSO, R. S., DE ALMEIDA, M. C., VAN KEULEN, F., FERREIRA, B. S., DA FONSECA, M. M. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *N Biotechnol*, Oct 2013. ISSN 1876-4347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157713> >.
- CHANDEL, A. K., CHAN, E.C., RUDRAVARAM, R., NARASU, M.L., RAO, L.V., RAVINDRA, P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal: *Biotechnol. Mol. Biol.* 2: 14-32 p. 2007b.
- CHANDEL, A.K., KAPOOR, R.K., NARASU, M.L., VISWADEVAN, V., KUMARAN, S.S.G., RAVINDER, R., RAO, L.V., TRIPATHI, K.K., LAL, B., KUHAD, R.C. Economic evaluation and environmental benefits of biofuel: an Indian perspective: *Int. J. Global Energy Issues*. 28: 357-381 p. 2007c.
- CHANDEL, ANUJ KUMAR, KAPOOR, RAJEEV KUMAR, SINGH, AJAY, KUHAD, RAMESH CHANDER. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, Jul 2007. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244821300010 >.
- CHANDEL, A. K., SILVIO SILVÉRIO DA SILVA, OM V. SINGH. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology: *BioEnergy Research*. 6: 388-401 p. 2013.
- DAHMS, A. S. 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 60, n. 4, p. 1433-1439, Oct 1974. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4423285> >.
- DE FIGUEIREDO VILELA, L., DE MELLO, V. M., REIS, V. C., BON, E. P., GONÇALVES TORRES, F. A., NEVES, B. C., ELEUTHERIO, E. C. Functional expression of *Burkholderia cenocepacia* xylose isomerase in yeast increases ethanol production from a glucose-xylose blend. *Bioresour Technol*, v. 128, p. 792-796, Jan 2013. ISSN 1873-2976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23186665> >.
- DEUTSCHER, J.; FRANCKE, C.; POSTMA, P. W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, p. 939–1031, 2006.
- DIAS, M. O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D., ROCHA, G. J., PRADELLA, J. G., ROSSELL, C. E., FILHO, R. M., BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? *Bioresour Technol*, v. 102, n. 19, p. 8964-8971, Oct 2011. ISSN 0960-8524.
- DISCHE, Z. Spectrophotometric method for the determination of free pentose and pentose in nucleotides. *J Biol Chem*, v. 181, n. 1, p. 379-392, Nov 1949. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15390421> >.
- DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun*, v. 59, n. 12, p. 4310-4317, Dec 1991. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1937792> >.
- DORAN-PETERSON, J.; COOK, D. M.; BRANDON, S. K. Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. *The Plant Journal*, p. 54, p. 582–592, 2008.
- FELIPE, M. G. A., VITOLO, M., MANCHILA, I.M., SILVA, S.S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida quilliermondii*: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18: 251-254 p. 1997.
- FENN, T. D.; RINGE, D.; PETSKO, G. A. Xylose isomerase in substrate and inhibitor michaelis states: atomic resolution studies of a metal-mediated hydride shift. *Biochemistry*, v. 43, n. 21, p. 6464-6474, Jun 2004. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157080> >.

FISCHER-LE SAUX, M., VIALARD, V., BRUNEL, B., NORMAND, P., BOEMARE, N. E. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, v. 49 Pt 4, p. 1645-1656, Oct 1999. ISSN 0020-7713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555346> >.

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. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GARCIA-VILOCA, M., ALHAMBRA, C., TRUHLAR, D. G., GAO, J. Hydride transfer catalyzed by xylose isomerase: mechanism and quantum effects. *J Comput Chem*, v. 24, n. 2, p. 177-190, Jan 2003. ISSN 0192-8651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12497598> >.

GAY, P., LE COQ, D., STEINMETZ, M., FERRARI, E., HOCH, J. A. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, v. 153, n. 3, p. 1424-1431, Mar 1983. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6402497> >.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for biofuels*, p. 10.1186/1754-6834-1-6, 2008.

GOMEZ, J. G. C. et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoate acids from carbohydrates and propionic acid.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 785-791 p. 1996.

GOMEZ, J.G.C. **Produção por *Pseudomonas* sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: Avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes**. 2000. 155 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2000.

GOSSET, G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*, v. 4, May 16 2005. ISSN 1475-2859. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000232695200001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15720001) >.

HAHN-HAGERDAL, B., WAHLBOM, C.F., GÁRDONYI, M., VAN ZYL, W.H., OTERO, R.R.C., JONSSON, L.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 73: 53-84 p. 2001.

HAHN-HAEGERDAL, B., KARHUMAA, K., JEPPSSON, M., GORWA-GRAUSLUND, M.F. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels*, v. 108, p. 147-177, 2007. ISSN 0724-6145. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000250578300006](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146652) >.

HAZER, B.; STEINBÜCHEL, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 74, n. 1, p. 1-12, Feb 2007. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146652> >.

HECTOR, R. E., DIEN, B. S., COTTA, M. A., MERTENS, J. A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. *Biotechnol Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 84, 2013. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721368> >.

HERNANDEZ-MONTALVO, V., VALLE, F, BOLIVA, F, GOSSET, G. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Appl Microbiol Biotechnol*, p. 57(1-2):186-191., 2001.

HU, H.; LIU, H.; SHI, Y. The reaction pathway of the isomerization of D-xylose catalyzed by the enzyme D-xylose isomerase: a theoretical study. *Proteins*, v. 27, n. 4, p. 545-555, Apr 1997. ISSN 0887-3585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9141134> >.

INGRAM, L. O., ALDRICH, H. C., BORGES, A. C., CAUSEY, T. B., MARTINEZ, A., MORALES, F., SALEH, A., UNDERWOOD, S. A., YOMANO, L. P., YORK, S. W., ZALDIVAR, J., ZHOU, S. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol Prog*, v. 15, n. 5, p. 855-866, 1999 Sep-Oct 1999. ISSN 8756-7938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10514255> >.

ITALIANI, V. C.; MARQUES, M. V. The transcription termination factor Rho is essential and autoregulated in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, v. 187, n. 12, p. 4290-4294, Jun 2005. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937192> >.

JARBOE, L. R., GRABAR, T. B., YOMANO, L. P., SHANMUGAN, K. T., INGRAM, L. O. Development of ethanologenic bacteria. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v. 108, p. 237-261, 2007. ISSN 0724-6145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17665158> >.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr Opin Biotechnol*, v. 17, n. 3, p. 320-326, Jun 2006. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713243> >.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 63, n. 5, p. 495-509, Feb 2004. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14595523> >.

JIN, Y. S.; JEFFRIES, T. W. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 105 -108, p. 277-286, 2003. ISSN 0273-2289. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721451> >.

JOHNSEN, U., DAMBECK, M., ZAISS, H., FUHRER, T., SOPPA, J., SAUER, U., SCHÖNHEIT, P. D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Biol Chem*, v. 284, n. 40, p. 27290-27303, Oct 2009. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584053> >.

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

JURADO, M., PRIETO, A., MARTÍNEZ-ALCALÁ, A., MARTÍNEZ, A. T., MARTÍNEZ, M. J. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour Technol*, v. 100, n. 24, p. 6378-6384, Dec 2009. ISSN 1873-2976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683434> >.

JÄGER, W., SCHÄFER, A., PÜHLER, A., LABES, G., WOHLLEBEN, W. Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*, v. 174, n. 16, p. 5462-5465, Aug 1992. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644774> >.

JÄGER, W., SCHÄFER, A., KALINOWSKI, J., PÜHLER, A. Isolation of insertion elements from gram-positive *Brevibacterium*, *Corynebacterium* and *Rhodococcus* strains using the *Bacillus subtilis* sacB gene as a positive selection marker. *FEMS Microbiol Lett*, v. 126, n. 1, p. 1-6, Feb 1995. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7896070> >.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the reserve material poly-beta-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl Environ Microbiol*, v. 69, n. 6, p. 3244-3250, Jun 2003. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788722> >.

KARIMÄKI, J., PARKKINEN, T., SANTA, H., PASTINEN, O., LEISOLA, M., ROUVINEN, J., TURUNEN, O. Engineering the substrate specificity of xylose isomerase. *Protein Eng Des Sel*, v. 17, n. 12, p. 861-869, Dec 2004. ISSN 1741-0126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713782> >.



- KEENAN, T. M., TANENBAUM, S. W., STIPANOVIC, A. J., NAKAS, J. P. Production and characterization of poly-beta-hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* utilizing xylose and levulinic acid. *Biotechnol Prog*, v. 20, n. 6, p. 1697-1704, 2004 Nov-Dec 2004. ISSN 8756-7938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15575701> >.
- KEENAN, T. M.; NAKAS, J. P.; TANENBAUM, S. W. Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 33, n. 7, p. 616-626, Jul 2006. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16761168> >.
- KERSTERS-HILDERSON H., C. M., VAN OPSTAL O., VANGRYPERRE W., DE BRUYNE C. K. Kinetic characterization of d-xylose isomerases by enzymatic assays using d-sorbitol dehydrogenase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 9, n. 3, p. 145-148, 1987.
- KOVACH, M. E., ELZER, P. H., HILL, D. S., ROBERTSON, G. T., FARRIS, M. A., ROOP, R. M., PETERSON, K. M. 4 new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBB1mcs, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, v. 166, n. 1, p. 175-176, Dec 1 1995. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TK18700028 >.
- KOVALEVSKY, A. Y., HANSON, L., FISHER, S. Z., MUSTYAKIMOV, M., MASON, S. A., FORSYTH, V. T., BLAKELEY, M. P., KEEN, D. A., WAGNER, T., CARRELL, H. L., KATZ, A. K., GLUSKER, J. P., LANGAN, P. Metal ion roles and the movement of hydrogen during reaction catalyzed by D-xylose isomerase: a joint x-ray and neutron diffraction study. *Structure*, v. 18, n. 6, p. 688-699, Jun 2010. ISSN 1878-4186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541506> >.
- KUROSAWA, K.; WEWETZER, S. J.; SINSKEY, A. J. Engineering xylose metabolism in triacylglycerol-producing *Rhodococcus opacus* for lignocellulosic fuel production. *Biotechnol Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 134, 2013. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041310> >.
- LARSSON, S.; CASSLAND, P.; JÖNSSON, L. J. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase: *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1163-1170 p. 2001.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.*, v. 56, n. 1-24, 1997.
- LEE, S. M.; JELLISON, T.; ALPER, H. S. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, v. 78, n. 16, p. 5708-5716, Aug 2012. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685138> >.
- LOPES, M. S. G., ROCHA, R. C. S, ZANOTTO, S. P. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, p. 1751-1756, 2009a.
- 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* 2009b.
- LOPES, M. S. C. **Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 2010. 129 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- LOPES, M. S., GOSSET, G., ROCHA, R. C., GOMEZ, J. G. C., SILVA, L. F. PHB biosynthesis in catabolite repression mutant of *Burkholderia sacchari*. *Curr Microbiol*, v. 63, n. 4, p. 319-326, Oct 2011.
- LOPES, M. S., GOMEZ, J. G., TACIRO, M. K., MENDONÇA, T. T., SILVA, L. F. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous removal of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 41, n. 9, p. 1353-1363, Sep 2014. ISSN 1476-5535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25059637> >.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E.; SILVA. Green house gases emissions in production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005 / 2006 averages and a prediction for 2020: *Biomass & Bioenergy*. 32: 582-595 p. 2008.

MADHAVAN, A., TAMALAMPUDI, S., USHIDA, K., KANAI, D., KATAHIRA, S., SRIVASTAVA, A., FUKUDA, H., BISARIA, V. S., KONDO, A. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 82, n. 6, p. 1067-1078, Apr 2009. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19050860> >.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128 p.

MAEHARA, T.; TAKABATAKE, K.; KANEKO, S. Expression of *Arabidopsis thaliana* xylose isomerase gene and its effect on ethanol production in *Flammulina velutipes*. *Fungal Biol*, v. 117, n. 11-12, p. 776-82, 2013 Nov-Dec 2013. ISSN 1878-6146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24295916> >.

MARTIN, C., GALBE, M., WAHLBOM, C.F., HAHN-HÄGERDAL, B., JÖNSEN, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*: *Enzyme Microb. Technol.* 31: 274-282 p. 2002.

MARTINS, L. F., ANTUNES, L. P., PASCON, R. C., DE OLIVEIRA, J. C., DIGIAMPIETRI, L. A., BARBOSA, D., PEIXOTO, B. M., VALLIM, M. A., VIANA-NIERO, C., OSTROSKI, E. H., TELLES, G. P., DIAS, Z., DA CRUZ, J. B., JULIANO, L., VERJOVSKI, LMEIDA, S., DA SILVA, A. M., SETUBAL, J. C. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the são paulo zoo park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. e61928, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637931> >.

MATSUSHIKA, A., INOUE, H., KODAKI, T., SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 84, n. 1, p. 37-53, Aug 2009. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19572128> >.

MEIJNEN, J. P.; DE WINDE, J. H.; RUIJSSENAARS, H. J. Establishment of oxidative D-xylose metabolism in *Pseudomonas putida* S12. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, n. 9, p. 2784-2791, May 2009. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270113> >.

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.

MENG, M., LEE, C., BAGDASARIAN, M., ZEIKUS, J. G. Switching substrate preference of thermophilic xylose isomerase from D-xylose to D-glucose by redesigning the substrate binding pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 88, n. 9, p. 4015-4019, May 1991. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2023950> >.

NONATO, R. V.; MANTELATTO, P. E.; ROSSELL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, n. 1-2, p. 1-5, Oct 2001. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171671100001 >.

PAN, W., PERROTTA, J. A., STIPANOVIC, A. J., NOMURA, C. T., NAKAS, J. P. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 39, n. 3, p. 459-469, Mar 2012. ISSN 1476-5535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953365> >.

PATEL, D. H., CHO, E. J., KIM, H. M., CHOI, I. S., BAE, H. J. Engineering of the catalytic site of xylose isomerase to enhance bioconversion of a non-preferential substrate. *Protein Eng Des Sel*, v. 25, n. 7, p. 331-6, Jul 2012. ISSN 1741-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22586153> >.

PELICIC, V.; REYRAT, J. M.; GICQUEL, B. Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol*, v. 178, n. 4, p. 1197-1199, Feb 1996. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576057> >.

PEREIRA, E. M., SILVA-QUEIROZ, S. R., GOMEZ, J. G. C., SILVA, L. F. Disruption of the 2-methylcitric acid cycle and evaluation of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate biosynthesis suggest alternate catabolic pathways of propionate in *Burkholderia sacchari*. *Can J Microbiol*, v. 55, n. 6, p. 688-697, Jun 2009. ISSN 1480-3275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767840> >.

PIRT, S. J. principle of microbe and cell cultivation. Wiley, 1975. 274.

RAICHER, G. **Análise econômica da produção de polímeros biodegradáveis no contexto de uma biorefinaria a partir de cana-de-açúcar**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

REHM, B. H. A. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 9, p. 41-62, 2007 2007. ISSN 1467-3037. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243237000003 >.

REINECKE, F.; STEINBUECHEL, A. *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 16, n. 1-2, p. 91-108, 2009 2009. ISSN 1464-1801. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260494300009 >.

REYRAT, J. M., PELICIC, V., GICQUEL, B., RAPPUOLI, R. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect Immun*, v. 66, n. 9, p. 4011-4017, Sep 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712740> >.

RIIS V., Mai W. Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, v. 445, n. doi:10.1016/S0021-9673(01)84535-0, p. 285-289, 1988.

ROCHA, R., SILVA, LF, TACIRO, MK, PRADELLA, JGC. Production of P3HB-co-3HV with a broad range of 3HV content at high Y3HV/Prop values by *B. sacchari* IPT 189. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, p. 24:427-431, 2008.

RODRIGUES, M. F., VALENTIN, H. E., BERGER, P. A., TRAN, M., ASRAR, J., GRUYS, K. J., STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate accumulation in *Burkholderia* sp.: a molecular approach to elucidate the genes involved in the formation of two homopolymers consisting of short-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 53, n. 4, p. 453-460, Apr 2000. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803903> >.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 30, n. 5, p. 279-291, May 2003. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12698321> >.

SAMBROOK J., F. E. F., MANIATIS T. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.

SARROUH, B.; DA SILVA, S. S. Repeated batch cell-immobilized system for the biotechnological production of xylitol as a renewable green sweetener. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 169, n. 7, p. 2101-2110, Apr 2013. ISSN 1559-0291. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23397324> >.

SASAKI, M., JOJIMA, T., INUI, M., YUKAWA, H. Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, n. 4, p. 691-699, Dec 2008. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261374300011 >.

SCHENK M., BISSWANGER H. A microplate assay for d-xylose/ d-glucose isomerase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, n. doi:10.1016/S0141-0229(98)00003-9, p. 721–723, 1998.

SILVA, A. F. D. et al. *In vitro* inhibition of adhesion of *Escherichia coli* strains by Xylitol: AGRICULTURE, AGRIBUSINESS AND BIOTECHNOLOGY. 2011.

SILVA, L., GOMEZ, JGC, OLIVEIRA, MS, ALTERTHUM, F. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of recovered cells. *Rev. Microbiol*, v. 23, n. 2, p. 117-122, 1992.

SILVA, L. F. **Estudo do catabolismo de propionato em *Burkholderia sp* visando o aumento da eficiência na produção de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (P3HB-co-3HV) – um plástico biodegradável.** 62 f. 1998. Tese (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SILVA, L.F., GOMEZ, J.C.G, ROCHA, R.C.S, TACIRO, M.K., PRADELLA, J.G.C.. Produção biotecnológica de poli-hidroxi-alcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, p. 30 (7):1732-1743, 2007.

SILVA, LF, TACIRO, MK, MICHELIN RAMOS, ME, CARTER, JM, PRADELLA, JGC, GOMEZ, JGC. Process development of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugar cane bagasse hydrolysate. *J Ind. Microbiol. Biotechnol*, p. 31, 245-254, 2004.

SILVA, L. F., TACIRO, M.K., PRADELLA, J.G.C., GOMEZ, J.G.C., CARTER, J.M., RAMOS, M.E.M. Processo de produção de PHB e seu copolímero PHB-co-HV a partir de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar: Patente, PI0207356-0 A2 depositado no INPI em 24/09/2002, sob no 004350 2002.

SILVA, L. F., TACIRO, M. K., RAICHER, G., PICCOLI, R. A., MENDONÇA, T. T., LOPES, M. S., GOMEZ, J. G. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *Int J Biol Macromol*, v. 71, p. 2-7, Nov 2014. ISSN 1879-0003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043132> >.

SIMON, R., PRIEFER, U., PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic-engineering - transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio-Technology*, v. 1, n. 9, p. 784-791, 1983. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983RQ64200021 >.

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

SONG, S.; PARK, C. Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator. *J Bacteriol*, v. 179, n. 22, p. 7025-7032, Nov 1997. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371449> >.

SRIPRAPUNDH, D.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH. *Protein Eng*, v. 16, n. 9, p. 683-690, Sep 2003. ISSN 0269-2139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14560054> >.

STEPHENS, C., CHRISTEN, B., FUCHS, T., SUNDARAM, V., WATANABE, K., JENAL, U. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, v. 189, n. 5, p. 2181-2185, Mar 2007. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172333> >.

TAMURA K, P. D., PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods: *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739 p. 2011.

- TAO, H.; GONZALEZ, R.; MARTINEZ, A. Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation.: *Journal of Bacteriology*. 183: 2979-2988 p. 2001.
- TASHA, A.; RAO, V. D.; RAO, V. C. Regulation of Arabinose and Xylose Metabolism in *Escherichia coli*.: *Applied and Environmental Microbiology*: 1524-1532 p. 2010.
- TOKIWA, Y.; UGWU, C. U. Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. *J Biotechnol*, v. 132, n. 3, p. 264-272, Nov 2007. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17543411> >.
- UNICA: União da Indústria de Cana-de-Açúcar. <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4>. 2014.
- VAN MARIS, A. J., ABBOTT, D. A., BELLISSIMI, E., VAN DEN BRINK, J., KUYPER, M., LUTTIK, M. A., WISSELINK, H. W., SCHEFFERS, W. A., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 90, n. 4, p. 391-418, Nov 2006. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17033882> >.
- VAN MARIS, A. J., WINKLER, A. A., KUYPER, M., DE LAAT, W. T., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v. 108, p. 179-204, 2007. ISSN 0724-6145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17846724> >.
- VAN VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Curr Opin Biotechnol*, v. 20, n. 3, p. 300-306, Jun 2009. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19545992> >.
- VILLARREAL, M. L. M., PRATA, A.M.R., FELIPE, M.G.A., ALMEIDA, E., SILVA, J.B. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*: *Enzyme Microbial Technol*. 40: 17-24 p. 2006.
- WANG, R., LI, L., ZHANG, B., GAO, X., WANG, D., HONG, J. Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of a xylose isomerase pathway. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 40, n. 8, p. 841-854, Aug 2013. ISSN 1476-5535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23657586> >.
- WEIMBERG, R. Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. *J Biol Chem*, v. 236, p. 629-635, Mar 1961. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13783864> >.
- WHITLOW, M., HOWARD, A. J., FINZEL, B. C., POULOS, T. L., WINBORNE, E., GILLILAND, G. L. A metal-mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1.6 Å *Streptomyces rubiginosus* structures with xylitol and D-xylose. *Proteins*, v. 9, n. 3, p. 153-173, 1991. ISSN 0887-3585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2006134> >.
- WISSELINK, H. W., TOIRKENS, M. J., WU, Q., PRONK, J. T., VAN MARIS, A. J. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, n. 4, p. 907-914, Feb 2009. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074603> >.
- ZHOU, H., CHENG, J. S., WANG, B. L., FINK, G. R., STEPHANOPOULOS, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, v. 14, n. 6, p. 611-622, Nov 2012. ISSN 1096-7184. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921355> >.

## ANEXOS

**Anexo – 1: Alinhamento completo da figura 5.3, das sequências da proteína xilose isomerase das diferentes bactérias estudadas.**

```

Burkholderia cenocepacia MC0-3      --MSYFEHIPAIRYEGPQSDNPLAYHHYDPDKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGHDI
Burkholderia cenocepacia J2315      --MSYFEHIPAIRYEGPQSDNPLAYHHYDPDKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGHDI
Burkholderia ambifaria MC40-6       --MSYFEHIPAIRYEGPQSDNPLAYHHYDAEKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGHDI
Burkholderia vietnamiensis G4       --MSYFEHIPAIRYEGPQSDNPLAYHHYDPAKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGHDM
Burkholderia multivorans ATCC 17616 --MSYFEHIPAIRYEGPQSDNPLAYHHYDRTKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGHDI
Burkholderia ubonensis              --MSYFEQIPAIRYEGPQSDNPLAYRYYDRTKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGHDI
Burkholderia TJI49                  --MSYFEQIPAIRYEGPQSDNPLAYHHYDRTKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGHDI
Burkholderia thailandensis MSMB43   --MSYFEHIPAIRYEGPQSDNPLAYRHYDRTKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGHDM
Burkholderia thailandensis E264     --MSYFEHIPAIRYEGPQSDNPLAYRHYDRTKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGQDV
Burkholderia sacchari               --MSYFEALPPIRYEGPQSDNPLAYRHYDRTKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTLVWPGVDI
Burkholderia xenovorans LB400       --MSYFEHIPEIRYEGPQSDNPLAYRHYDKSKVVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGVDI
Burkholderia phytofirmans PsJN      --MSYFEHIPEIRYEGPQSDNPLAYRHYDKSKVVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGVDI
Burkholderia phenoliruptrix BR3459a --MSYFEHIPEIRYEGPQSDNPLAYRYYDKSKVVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGVDI
Burkholderia graminis C4D1M        --MSYFEHIPEIRYEGPQSDNPLAYRHYDKSKVVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGVDI
Burkholderia CCGE1003              --MSYFEHIPEIRYEGPQSDNPLAYRHYDKSKVVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGVDI
Burkholderia CCGE1002              --MSYFEHIPQIRYEGPQSDNPLAYRHYDKTRKRVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGVDI
Burkholderia H160                  --MSYFEHIPEIRYEGPQSDNPLAYRHYDKSRKVLGKTLAEHLRIAVCYWHTFVWPGVDI
Burkholderia phymatum STM815       --MSYFEHLPAVRYEGPQSDNPFAYRHYDKDKLVLGKRMEDHLRVAVCYWHTFVWPGADM
Burkholderia terrae BS001          --MSYFEYLPVRYEGPHTENPFAYRHYDKDKLVLGKRIEDHLRVAVCYWHTFVWPGADM
Escherichia coli K-12 MG1655      -MQAYFDQLDRVRYEGSKSSNPLAFRHYNPFDELVLGKRMEEHLRFAACYWHTFCWNGADM
Enterobacter Ag1                  -MQAYFDQLDRVRYEGSKSSNPLAFRHYNPDALILGKRMEEHLRFAACYWHTFCWTGADM
Photorhabdus luminescens l. TTO1   -MHRYSFERVNRISYEGRQSNPLAFRHYNPEEILGKKMKDHLRFVAVCYWHTFCWGTDM
Piromyces E2                      MAKEYFPQIQIKIFEGKSKNPLAFHYDAAEKEVMGKKMKDWLRFAMAWWHTLCAEGADQ
                                     ** : : : ** .: ** : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *

```

```

Burkholderia cenocepacia MC0-3      FGQGAFQRPWQQPGDALERARQKADAAFEFFTKLGTFFYTFHDDTVAPEGDSLRYAANF
Burkholderia cenocepacia J2315      FGQAAFRRPWQQPGDALERARMKADAAFEFFTKLGTFFYTFHDDTVAPEGDSLREYAANF
Burkholderia ambifaria MC40-6       FGQGAFQRPWQQPGDALERARLKADAAFEFFTKLGTFFYTFHDDTVAPEGDSLREYAANF
Burkholderia vietnamiensis G4       FGQGTFFVRPWQQPGDPLERARMKADAAFEFFSKLGTFFYTFHDDTVAPEGDNLREYTNANF
Burkholderia multivorans ATCC 17616 FGQGAFRRPWQQPGDALERARQKADAAFEFFTKLGTFFYTFHDDTVAPEGDSLREYVDNF
Burkholderia ubonensis              FGQGAFRRPWQQPGDPLERARQKADAAFEFFSKLGTFFYTFHDDTVAPEGDSLREYVENF
Burkholderia TJI49                  FGQGAFFRRPWQQPGDPLERARQKADAAFEFFSKLGTFFYTFHDDTVAPEGDNLREYVENF
Burkholderia thailandensis MSMB43   FGQEAFFRRPWQQPGDPLERARQKADAAFEFFTKLGAPFYTFHDDTVAPEGANLHEYVENF
Burkholderia thailandensis E264     FGQGALRRPWQQPGDPLERARQKADAAFAFFTKLGTFFYTFHDDTVAPEGANLHEYVENF
Burkholderia sacchari               FGQGTFFHRPWQQPGDAMERARQKADAAFEFFTKLNVFFYTFHDDTVAPEGRDLKDYKENF
Burkholderia xenovorans LB400       FGQGTFFRRPWQQAGDAMERARQKADSAFEFFSKLGTFFYTFHDDTVDVSEPGSSLKEYSENF
Burkholderia phytofirmans PsJN      FGQGTFFRRPWQQAGDAMERARQKADSAFEFFSKLGTFFYTFHDDTVDVSEPGSNLKEYSENF
Burkholderia phenoliruptrix BR3459a FGQGTFFRRPWQQPGNAMEMAHLKADAAFEFFSKLGTFFYTFHDDTVAPEGASLKEYSENF
Burkholderia graminis C4D1M        FGQGTFFKRPWQQPGDAMEMAHLKADAAFEFFSKLGTFFYTFHDDTVAPEGANLKEYSENF
Burkholderia CCGE1003              FGQGTFFRRPWQQPGDAMEMAHLKADAAFEFFSKLGTFFYTFHDDTVAPEGTNLHEYSENF
Burkholderia CCGE1002              FGQGTFFRRPWQQPGDAMERARQKADAAFEFFSKLGTFFYTFHDDTVAPEGASVKEYSENF
Burkholderia H160                  FGQGTFFRRPWQQPGDAMERARQKADAAFEFFSKLGTFFYTFHDDTVAPEGASVKEYSENF
Burkholderia phymatum STM815       FGPPTFFERPWHHAGDALEMAHAKADHAFELFSLGTFFYTFHDDLVAPEGDSIKSYVNNF
Burkholderia terrae BS001          FGPPTFFERPWHRSGDALEKAHAKADHAFELFQKLGTPFYTFHDDADVAPEGDSIKSYVNNF
Escherichia coli K-12 MG1655      FGVGAFNRPWQQPGDALALAKKADVAFEFFHKLHVPFYCFHDDVDVSEPGASLKEYINNF
Enterobacter Ag1                  FGVGAFERFWQKGGDAMALAKKADVAFEFFQKLGVPFYCFHDDVDVSEPGSSLKEYLNLF
Photorhabdus luminescens l. TTO1   FGGGAFERFWQKGGDALEIAKQKVDAGFEIMQKLGIPYCFHDDVDVSEGSLSKEYIYNL
Piromyces E2                      FGGGTSKSPWNEGTDALIEIAKQKVDAGFEIMQKLGIPYCFHDDVDVSEGSLSKEYIYNL
                                     ** : * : . : : : * * . * : : ** * : * ** * : . ** . : . * * :

```

Burkholderia cenocepacia MC0-3 ARMVDYLGERQHASGVRLWGTANLFSHPRFAAGAATNPNDVFAWAATQVCHALDATHR  
 Burkholderia cenocepacia J2315 ARMVDYLGERQQASGVRLWGTANLFSHPRFAAGAATNPNDVFAWAATQVCHALDATHR  
 Burkholderia ambifaria MC40-6 ARMVDYLGERQQASGVRLWGTANLFSHPRFAAGAATNPNDVFAWAATQVCHALDATHR  
 Burkholderia vietnamiensis G4 ARMVDYLGERQQASGVRLWGTANLFSHPRFAAGAATNPNDVFAWAATQVRHALDATHR  
 Burkholderia ubonensis ARMTDYLGERQQATGVRLWGTANLFSHPRFAAGAATNPNEVFAWAATQVRHALDATHR  
 Burkholderia TJI49 ARMVDYLGERQQATGVRLWGTANLFSHPRFAAGAATNPNDVFAWAATQVRHALDATHR  
 Burkholderia thailandensis MSMB43 TRMVDYLGERQQASGVRLWGTANLFSHPRFAAGAATNPDAFAWAATQVCHALDATRR  
 Burkholderia thailandensis E264 ARMVDYLGEHQASGVRLWGTANLFSHPRFAAGAATSNPDAFAWAATQVCHALDATHR  
 Burkholderia sacchari ARMVDYLGEKQQASGMKLLWGTANLFSHPRYAGGAATSNPEVFAYAATQVCHALDATQK  
 Burkholderia xenovorans LB400 LRITDYLARKQEDTGIKLLWGTANLFSHPRYAAGAATSPDPEVFAYAATQVRHALDATQR  
 Burkholderia phytofirmans PsJN LRITDYLARKQESTGIKLLWGTANLFSHPRYAAGAATSPDPEVFAYAATQVRHALDATQR  
 Burkholderia phenoliruptrix BR3459a SRIVDYLVRKQQDTGIKLLWGTANLFSHPRYAAGAATSPDPEIFAYAATQVRHALDATQR  
 Burkholderia graminis C4D1M SRIVDYLARKQQDTGIKLLWGTANLFSHPRYAAGAATSNPDI FAYAATQVRHALDATQR  
 Burkholderia CCGE1003 SRIVDYLERKQHDGTGKLLWGTANLFSHPRYAAGAATSPDPEIFAYAATQVRHALDATQR  
 Burkholderia CCGE1002 LRVSDYIARKQQDTGIKLLWGTANLFSHPRYAAGAATNPNEVFAYAATQVRHALDATLR  
 Burkholderia H160 LRVSDYLARKQQDTGKLLWGTANLFSHPRYAAGAATNPNEVFAYAATQVRHALDATLR  
 Burkholderia phymatum STM815 KAMTDVLRKQEQGTGKLLWGTANLFSHPRYAAGAATNPNDVFAYAATQVNLNALEATQR  
 Burkholderia terrae BS001 KMTDVLARKQEQGTGKLLWGTANLFSHPRYAAGAATNPNDVFAYAATQVNLNALEATQR  
 Escherichia coli K-12 MG1655 AQMVDVLAKQQESGVKLLWGTANCFTNPRYAGGAATNPDPVEFVSWAATQVVTAMEATHK  
 Enterobacter Ag1 AQMTEVLAQKQQDSGVKLLWGTANCFTNPRYAGGAATNPDPVEFVSWAATQVVTAMEATHQ  
 Photorhabdus luminescens 1. TTO1 GVMSDILADKQAEATGKLLWGTANCFTNPRYAGGAATNPDLNIFAYASAVQVCQMOMTKK  
 Piromyces E2 KAVVAYLKEKQKGTGKLLWSTANVFGHKRYMNGASTNPDFDVARAIVQIKNAIDAGIE  
 : : :\* :\*:\*\*\*.\* \*\* : \* : \*\*.\*.\* : : . : \* .\*: .: : .

Burkholderia cenocepacia MC0-3 LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLKRERDQFARFLSMVVEHKHRIGFKGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia cenocepacia J2315 LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLKRERDQFARFLSMVVEHKHRIGFKGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia ambifaria MC40-6 LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLKRERDQFARFLSMVVEHKHRIGFKGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia vietnamiensis G4 LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLKRERDQFARFLSMVVEHKHRIGFKGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia multivorans ATCC 17616 LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLKREREQFARFLSMVVEHKHRIGFRGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia ubonensis LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLVREREQFARFLSMVVEHKHRIGFNGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia TJI49 LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLGREREQLARFLSMVVEHKHRIGFDGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia thailandensis MSMB43 LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLAREREQLARFLSMVVEHKHRIGFTGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia thailandensis E264 LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLAREREQLARFLAMVVEHKHRIGFTGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia sacchari LGGENYVLWGGREGYDTLNTDLVREREQFARFLAMVVEHKERIGFKGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia xenovorans LB400 LGGDNYVLWGGREGYDTLNTDLMRERDQLARFLHMVVDHAKKIGFKGSLLEPKPQEPT  
 Burkholderia phytofirmans PsJN LGGDNYVLWGGREGYDTLNTDLVRERDQLARFLHMVVDHAKKIGFKGSLLEPKPQEPT  
 Burkholderia phenoliruptrix BR3459a LGGDNYVLWGGREGYDTLNTDLVRERDQLARFLHMVVEHAKKIGFKGSLLEPKPQEPT  
 Burkholderia graminis C4D1M LGGDNYVLWGGREGYDTLNTDLVRERDQLARFLHMVVDHAKKIGFKGSLLEPKPQEPT  
 Burkholderia CCGE1003 LGGENYVLWGGREGYDTLNTDLVRERDQLARFLHMVVEHAKKIGFKGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia CCGE1002 LGGENYVLWGGREGYDTLNTDLVREREQFARFLHMVVEHKKHIGFKGTLLEPKPQEPT  
 Burkholderia H160 LGGENYVLWGGREGYDTLNTDLVREREQFARFLHMVVEHKKHIGFKGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia phymatum STM815 LGGANYVLWGGREGYETLLNTDLKREREQLGRFMSMVVEHKKHTGFKGALLIEPKPQEPT  
 Burkholderia terrae BS001 LNGENYVLWGGREGYETLLNTDLKREREQLGRFMSMVVEHKKHLGFKGALLIEPKPQEPT  
 Escherichia coli K-12 MG1655 LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLRQEREQLGRFMQMVVEHKKHIGFQGTLLIEPKPQEPT  
 Enterobacter Ag1 LGGENYVLWGGREGYETLLNTDLRQEREQIGRFMQMVVEHKKHIGFRGTLLIEPKPQEPT  
 Photorhabdus luminescens 1. TTO1 LGGENYVLWGGREGYESLLNTDLRQEREQIGRFMQMVVDYKYGIFQGTLLIEPKPQEPT  
 Piromyces E2 LGAENYVWGGREGYMSLLNTDQKREKEHMATMLTMARDYARSKGFKGTFLIEPKPMEPT  
 \*.. \*\*\*:\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*:::.. :. \* .: \*\* \*.:\*\*\*\*\* \*\*





Burkholderia cenocepacia MC0-3 IDVLALALERA AVL V ENDR LDALRRQRYAQWDDAFGRKILSGGYTLES LAADALARGVNP  
 Burkholderia cenocepacia J2315 IDVLALALERA AVL V ENDR LDALRRQRYAQWDDAFGRKILAGGYTLES LAADALARGVDP  
 Burkholderia ambifaria MC40-6 IDVLALALERA AVL V ENDR LDALRRQRYAQWDDAFGRKILSGGYTLQSLAEDALARGVDP  
 Burkholderia vietnamiensis G4 IDVLALALERA AVL V ENDR LDALRRQRYAQWDDAFGRKILSGGYTLQSLAEDALARGVNP  
 Burkholderia multivorans ATCC 17616 IDVLALALERA AVL V ENDR LEAMRRQRYAQWDDAFGRKILSGGYTLES LAADALARGVNP  
 Burkholderia ubonensis IDVLALALERA AVL V ENDR LDALRRQRYAQWDSAFGREILSGGYTLES LAADALARGVNP  
 Burkholderia TJI49 IDVLALALERA AVL V ENDR LDALRRQRYAQWDSAFGREILSGGYTLES LAADALARGVNP  
 Burkholderia thailandensis MSMB43 IDVLALALERA AVL V ENDR LDALRRQRYAQWDSAFGRKILAGGYSLQSLAADALARGVNP  
 Burkholderia thailandensis E264 IDVLALALERA AVL V ENDR LDALRRRRYAQWDSAFGRKILAGGYSLQSLAADALARGVNP  
 Burkholderia sacchari IDVLALALERA AVL V ENDR LQQFKQRYAGWDTEFGRKILAGGYALSSLAADAAARGLNP  
 Burkholderia xenovorans LB400 IDNLALAVERA AVL I ENDR LDQFKRQRYAGWDADFGRKILSGDYSLSLTLATDALARGLNP  
 Burkholderia phytofirmans PsJN IDNLALAVERA AVL I ENDR LDQFKRQRYSGWDAEFGRKISSGDYSLSALAEEMARGLNP  
 Burkholderia phenoliruptrix BR3459a IDNLALAVERA AVL FESDR LGQFKRQRYAGWDAEFGRKILAGDYSLSLTLAADALSRDLNP  
 Burkholderia graminis C4D1M IDNLALAVERA AVL I ENDR LGQFKRERYAGWDADFGRKILSGDYSLSLTLAADALSRDLNP  
 Burkholderia CCGE1003 IDNLALALERA AVL I GNDR LGFRRQRYAGWDADFGRKILSGDYSLSLTLAAEAVSRDLNP  
 Burkholderia CCGE1002 IDNLALGLERA AVL V ENER LEQFKRQRYAGWDGFEGRKILSGEYSLSTLAADTLARDLNP  
 Burkholderia H160 IDNLALGLERA AVL V ENER LDQFKQRYAGWDGFEGRKILSGDYSLSLTLAASLARDLNP  
 Burkholderia phymatum STM815 IDVLAVALERA AHL I EHDR LAAFKQRYAGWDSDFGRKILAGGYSLASLSDAVQRNIAP  
 Burkholderia terrae BS001 IDVIAVALERA AHL V ENDR LGAFKQRYAGWDSDFGRKVLAGGYSLASLSDAVQRNIAP  
 Escherichia coli K-12 MG1655 MDTMALALK IAARMI EDGELDKRIAQRYSGWNSLGGQILKQMSLADLAKYAQEHHLSF  
 Enterobacter Ag1 MDTMALALKVAARMVEDGELDKRVAKRYAGWNSLGGQILKQISLTLAQYAEQHKLAP  
 Photorhabdus luminescens 1. TTO1 IDTMALS LKSAVK I LVDGKLDEYVAQRYSGWNSLGRDILEGKMTLDEVAHYAETLVQEP  
 Piromyces E2 MDAMARALENAAKLLQESPYTKMKKERYASFDSGIGKDFEDGKLTLEQVVEYEGKKNNG-EP  
 :\* :\* .: . \* . : . . . \*\* : : : \* . . \* : \* :

Burkholderia cenocepacia MC0-3 RHASGAQERLENI V NQAI YGLR-  
 Burkholderia cenocepacia J2315 QHASGAQERLENI V NQAI YGLR-  
 Burkholderia ambifaria MC40-6 RHASGAQERLENI V NQAI YGLR-  
 Burkholderia vietnamiensis G4 QHVSGAQERLENI V NQAI YALR-  
 Burkholderia multivorans ATCC 17616 QHASGAQERLENI V NQAI YALR-  
 Burkholderia ubonensis RHASGAQERLENI V NQAI YGLR-  
 Burkholderia TJI49 QHASGAQERLENI V NQAI YGLR-  
 Burkholderia thailandensis MSMB43 RHASGAQERLENI V NQAI YALR-  
 Burkholderia thailandensis E264 QHASGAQERLENI V NQAI YALR-  
 Burkholderia sacchari QHASGQERLENI V NQAI YGQR-  
 Burkholderia xenovorans LB400 QHASGHQELMENI V NQAI YSGR-  
 Burkholderia phytofirmans PsJN QHASGHQELMENI V NQAI YSGR-  
 Burkholderia phenoliruptrix BR3459a QHVSGQERMENI V NQAI YSGR-  
 Burkholderia graminis C4D1M QHASGHQERMENI V NQAI YSGR-  
 Burkholderia CCGE1003 QHKSQQERMENI V NQAI YSGR-  
 Burkholderia CCGE1002 RHVSGQEQMENI V NQAI YSGR-  
 Burkholderia H160 RHVSGQEQHLENI V NQAI YSGL-  
 Burkholderia phymatum STM815 RHVSGQERLENI V NQAI FSSAK  
 Burkholderia terrae BS001 HHVSGQERLENI V NQAI YSAK  
 Escherichia coli K-12 MG1655 VHQSQRQEQLENL V NHYLFDK--  
 Enterobacter Ag1 QHQSGHQRLENL I NHYLFDN--  
 Photorhabdus luminescens 1. TTO1 KHRSGQELLENL I NRYIYD---  
 Piromyces E2 KQTSKGQELYEAIVAMYQ-----  
 : \*\* \* \* \* : :

## Anexo – 2: Alinhamento dos possíveis genes *xy1B* encontrados em *B. sacchari*

```

xy1B          -----MFIGIDLGTSGVKAVLLERAGDVIASASAPLAVSRPQPRWSEQAPEEWWRATRI
xy1B-2       -----MYLGDIDLTSEVKVLLAPDSRVIGTAGSPFTVSRPQPRWAEQDPADWWDGTRR
xy1B-3       MNAMQSRFLGIDLGTGSLKVAIVDEAGAERAAAASAYALEMPQPGWAEIDVERWWDALVL
              :*****. :*. :. . . :*. :. :. :. *** *:* ** .

xy1B          ALRELLDEVRRNGIDPAGIEALGLTGQMHGATLLNAKGEVLRPAILWNDGRSDTECIELE
xy1B-2       ALAALREKHPR---EFAEVRGIGLSGQMHGAVLLDKHDTVLRPAILWNDMRAVDECAELT
xy1B-3       ACGRLPG-----AERARVRAIGFSGQMHGVVPTDAAGHALRCAMLWPDTRAR---ASLD
              * * : * :. :*. :*****. . : . . ** *:* * * * : *

xy1B          RAVPELHDVAG---NLAMPGF TAPKLLWVRKHEPEIFARIAHVLLPKDYLRWLLTG---
xy1B-2       ARAPQLHRVAG---NLAMPGF TAPKLLWIARHEPEHFRRMACVLLPKDWLRKLTG---
xy1B-3       AWPDALHDSAANPPNPVAPGMAGPLLSWTLTHERATADATRWALQPKDWLRVRLAGSAN
              ** * . * . ***:. * * * : ** . * ***: ** * : *

xy1B          ----VLATDPSDAAGTLWLDVAKRDYSEALLSACGLTRAHMPEVFEGNEVTGTLRAELAR
xy1B-2       ----GKVS DPSDAAGTLWLDVARRDWS DALLDACNMTRAQMPALAEGSAPSGTLLPSVAR
xy1B-3       AAAGAFVADPSDACATALAAPDG-AWDFALIERLGLPARWFAPLAPSAAASGTLCADAAR
              .:*****. . * :. :. :. :. : . :*** . *

xy1B          EFGLEIIPVVAGGG-DNAAGAVGVGIVRPGDAMLSLGTSGVYFAVSDGF LANPDSAVHSF
xy1B-2       EFGLEDVVVAAGGGDNATSAIGIGAVQPGDGFVSLGTSGVLCVIGDRFRPNPASAVHAF
xy1B-3       ALGLPAGVVLAAGADTPCAVLGSGLEDGDALLTTGTGGQIVVTSS--VEPPARRGLHR
              :** *:* * . * . . : * * . ***: : * * * . . . *

xy1B          CHALPRTWHLMSVMLNAASCLDFTARLTGHDTVAALLAEAEHSNAGVDPHRPWFLPYLS
xy1B-2       CHAIPERWHQMSVVL SAASCLRWVCKLTGTDEPTLLAEVERLAP--PTLAQAPLFLPYLS
xy1B-3       YRSASGGWYAMAAMQNVGVALEAARGWLSCDWATAYAEAFAAQP-----SQT LAF LPYLS
              :. . * : * :. :. . * . . * : . . : : *****

xy1B          GERTPHNNVNAKGVFHGMTPQTTRADLANATLEGVGFALLDGMEALH-----
xy1B-2       GERTPHNDPYAQGVFFGMTHATDRALLGYAVLEGVTLALTDGLDALR-----
xy1B-3       GERSPWLDPEARGGWLGAGLDTRGVLMRAAFEGVAFALRAGLDALRGAPLHAAHAISAA
              ***:* : * : * : * * . * * : * * * : * * * : * * * :

xy1B          -----ATGLVPETITVIGGGSRSVWWTQMLADICGRALTLRAGGEVGPALGAARLA
xy1B-2       -----AAGTEVGPLSMLGGGARSAYWAQLAADVFDTPTRQHGGGETGAALGAARLG
xy1B-3       DVDSLTDVESAAA PITV LKLAGGGSVDARWRQLLADV LG-ARLDAIDCPNAAARGAALLG
              :. . :. : * * : * * : * * . . . * * * *

xy1B          HLALEPGAPLDVVCPPVLA VREPDAARHAWYREARRPTFHALYRALEPVFASGA----
xy1B-2       WLAAGG--AFDEV LAKAPVAAEYTPDAARHAALRER-LEAYRSLYRHVRPLFDPARERLA
xy1B-3       GVACGHWRMDELAALAPAATCVVQP---RADAALAQR YARFIDLYGRVRTWFAPKP----
              : * : . . . . * * : * * : * * :. . * .

```

### Anexo – 3: Resultado do sequenciamento dos fragmentos upSxylA e downSxylA

A sequência consensus obtida através do sequenciamento de cada fragmento (upSxylA (A) e downSxylA (B)) nos dois sentidos, ou seja utilizando um primer diferente para cada reação, foi alinhada com uma sequência referente ao fragmento amplificado no genoma de *B. sacchari*. Os alinhamentos foram realizados no NCBI utilizando a ferramenta BLAST. Nos dois casos observa-se que a identidade é de 100%. A reação de sequenciamento não consegue amplificar grandes porções, desta forma somente uma parte da sequência de cada fragmento foi utilizada neste alinhamento (A – 858 de 930pb; B – 884 de 1001pb).

#### 3.1 upSxylA

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1585 bits (858)	0.0	858/858 (100%)	0/858 (0%)	Plus/Plus
Query 125	GCAGCAGATGCCGCGCCCGGGCATCGGTACCGCGATCACGCCAACGGGCTTGGGCAGCG	184		
Sbjct 1	GCAGCAGATGCCGCGCCCGGGCATCGGTACCGCGATCACGCCAACGGGCTTGGGCAGCG	60		
Query 185	CATGAAGCCACGCGCTCAACTGCTCGATTGCCTGGTTCAGGACGGTGCACCTCGTGGCGA	244		
Sbjct 61	CATGAAGCCACGCGCTCAACTGCTCGATTGCCTGGTTCAGGACGGTGCACCTCGTGGCGA	120		
Query 245	GGCCGCGATAGATCGGCGCGTCCATATCTTCTGTGTGCGCGAGCGCCTGGAAGGCACGCT	304		
Sbjct 121	GGCCGCGATAGATCGGCGCGTCCATATCTTCTGTGTGCGCGAGCGCCTGGAAGGCACGCT	180		
Query 305	CGCGCTCCTGCGCCAGCGGTTCTCCAGTGCAGCGGGCAGGCTGTACATGGCGAGATGCG	364		
Sbjct 181	CGCGCTCCTGCGCCAGCGGTTCTCCAGTGCAGCGGGCAGGCTGTACATGGCGAGATGCG	240		
Query 365	GCAGCCCCGCGCCGATCAGGTGCGTCCAGGCGAGCGAGACGAGCTTTTGTGTGCGGTGG	424		
Sbjct 241	GCAGCCCCGCGCCGATCAGGTGCGTCCAGGCGAGCGAGACGAGCTTTTGTGTGCGGTGG	300		
Query 425	CGATGTAGGGCAGCGCGGTGGGGTACTGGGCGGAGTCTTCGTACGACGAGCCGACCGCCA	484		
Sbjct 301	CGATGTAGGGCAGCGCGGTGGGGTACTGGGCGGAGTCTTCGTACGACGAGCCGACCGCCA	360		
Query 485	CCACGGGAAGCGGTGAACCCTGCAGCGCTTCGGCGACGGCGGGGTGTCGAAATCGGCGA	544		
Sbjct 361	CCACGGGAAGCGGTGAACCCTGCAGCGCTTCGGCGACGGCGGGGTGTCGAAATCGGCGA	420		
Query 545	TGATGCCATCGCCTTCGAAGCGCTCGATGCCCGAGCCGGCAGCGGAAATCCTCTTCGA	604		
Sbjct 421	TGATGCCATCGCCTTCGAAGCGCTCGATGCCCGAGCCGGCAGCGGAAATCCTCTTCGA	480		
Query 605	GAAAGAGGTCCCAGGCGACGCGCTCGAGCGCAGATAGTGGCCAATGCCCGCATGATCT	664		
Sbjct 481	GAAAGAGGTCCCAGGCGACGCGCTCGAGCGCAGATAGTGGCCAATGCCCGCATGATCT	540		
Query 665	CGCGTTCGTAACCTTGTTTCGCATTGAAGAGCAGTGCATGCGGTGCGACGTCTGGGAAG	724		
Sbjct 541	CGCGTTCGTAACCTTGTTTCGCATTGAAGAGCAGTGCATGCGGTGCGACGTCTGGGAAG	600		

```

Query 725  CCGTGGCGCGGGTCATGGCATGTCGTAGGGGCCTTTTAAGCGTCTGGCTATTCTAGGCCG 784
          |||
Sbjct 601  CCGTGGCGCGGGTCATGGCATGTCGTAGGGGCCTTTTAAGCGTCTGGCTATTCTAGGCCG 660

Query 785  AGTGTGGGCCGCATGCGCGCGCCGGCGGAGGATGCTGGCAGGAAACGTTATCTGCGTCGC 844
          |||
Sbjct 661  AGTGTGGGCCGCATGCGCGCGCCGGCGGAGGATGCTGGCAGGAAACGTTATCTGCGTCGC 720

Query 845  GCAATTTTCGTAATTGCCGCCCTTCCCACCCACGGGCAGTATGAGGTCACTTCGACGGGC 904
          |||
Sbjct 721  GCAATTTTCGTAATTGCCGCCCTTCCCACCCACGGGCAGTATGAGGTCACTTCGACGGGC 780

Query 905  GCTCGCCGCTGCGCCGCAACATAACCGCCCTGCATGGGAGCCGAGCGCAAAGCGCTGAAG 964
          |||
Sbjct 781  GCTCGCCGCTGCGCCGCAACATAACCGCCCTGCATGGGAGCCGAGCGCAAAGCGCTGAAG 840

Query 965  CGCTCGCTGTGCATCGAC 982
          |||
Sbjct 841  CGCTCGCTGTGCATCGAC 858

```

### 3.2 downSxylA

```

-----
Score          Expect Identities   Gaps      Strand
1633 bits(884) 0.0      884/884 (100%) 0/884(0%) Plus/Plus

Query 44  TGCTACGGGCGCGTAGAAGCGCGTAAGCACCGGCCTGCACAAGAAAGGATGGAGACATGT 103
          |||
Sbjct 1   TGCTACGGGCGCGTAGAAGCGCGTAAGCACCGGCCTGCACAAGAAAGGATGGAGACATGT 60

Query 104 TTATCGGTATCGACCTCGGCACGTCGGGTGTCAAGGCGGTGTTGCTCGAGCGCGCCGGCG 163
          |||
Sbjct 61  TTATCGGTATCGACCTCGGCACGTCGGGTGTCAAGGCGGTGTTGCTCGAGCGCGCCGGCG 120

Query 164  ATGTGATCGCCAGCGGAGCGCGCCGCTTGCCGTCAGCCGGCCACAGCCGCGCTGGTCCG 223
          |||
Sbjct 121  ATGTGATCGCCAGCGGAGCGCGCCGCTTGCCGTCAGCCGGCCACAGCCGCGCTGGTCCG 180

Query 224  AGCAGGCGCCGGAGGAGTGGTGGCGCGGACGCGCATCGCGCTGCGCGAGTTGCTCGACG 283
          |||
Sbjct 181  AGCAGGCGCCGGAGGAGTGGTGGCGCGGACGCGCATCGCGCTGCGCGAGTTGCTCGACG 240

Query 284  AGGTACGCCGCAATGGCATCGACCCCGGGCATCGAGGCGCTCGGCCTTACCGGTCAGA 343
          |||
Sbjct 241  AGGTACGCCGCAATGGCATCGACCCCGGGCATCGAGGCGCTCGGCCTTACCGGTCAGA 300

Query 344  TGCACGGCGCGACGCTGCTCAACGCGAAGGGTGAGGTGCTGCGCCCCGCGATACTCTGGA 403
          |||
Sbjct 301  TGCACGGCGCGACGCTGCTCAACGCGAAGGGTGAGGTGCTGCGCCCCGCGATACTCTGGA 360

Query 404  ACGACGGTCGTTTCGGATAACCGAATGTATCGAGCTGGAGAGGGCCGTGCCCGAACTCCACG 463
          |||
Sbjct 361  ACGACGGTCGTTTCGGATAACCGAATGTATCGAGCTGGAGAGGGCCGTGCCCGAACTCCACG 420

Query 464  ACGTGGCGGGCAATCTCGCCATGCCGGGCTTACGGCACCCAAGCTGCTATGGGTGCGCA 523
          |||
Sbjct 421  ACGTGGCGGGCAATCTCGCCATGCCGGGCTTACGGCACCCAAGCTGCTATGGGTGCGCA 480

Query 524  AGCACGAGCCCGAAATTTTCGCGCGCATTGCGCACGTGCTGCTGCCGAAGGATTATCTGC 583
          |||
Sbjct 481  AGCACGAGCCCGAAATTTTCGCGCGCATTGCGCACGTGCTGCTGCCGAAGGATTATCTGC 540

```

```

Query  584  GCTGGCTCTTGACGGGCGTGCTCGCGACCGACCCCTCCGATGCCGCGGGAACGCTCTGGC  643
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541  GCTGGCTCTTGACGGGCGTGCTCGCGACCGACCCCTCCGATGCCGCGGGAACGCTCTGGC  600

Query  644  TCGACGTTGCGAAGCGCGACTATAGCGAGGCGCTGCTTTCGGCCTGCGGTCTCACGCGCG  703
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601  TCGACGTTGCGAAGCGCGACTATAGCGAGGCGCTGCTTTCGGCCTGCGGTCTCACGCGCG  660

Query  704  CACACATGCCCGAGGTTTTTCGAGGGCAATGAAGTCACTGGCACGTTGCGTGCGGAACTCG  763
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661  CACACATGCCCGAGGTTTTTCGAGGGCAATGAAGTCACTGGCACGTTGCGTGCGGAACTCG  720

Query  764  CACGCGAGTTCGGACTGCGTGAAATTCCCGTGGTGGCGGGCGGCGGCGATAACGCGGCGG  823
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721  CACGCGAGTTCGGACTGCGTGAAATTCCCGTGGTGGCGGGCGGCGGCGATAACGCGGCGG  780

Query  824  GCGCGGTGGGTGTGGGTATCGTGCGGCCCGGCGACGCAATGCTCTCGCTGGGCACTTCGG  883
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781  GCGCGGTGGGTGTGGGTATCGTGCGGCCCGGCGACGCAATGCTCTCGCTGGGCACTTCGG  840

Query  884  GCGTTTATTTTCGCGGTCTCGGATGGTTTTTCTCGCGAATCCGGAT  927
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841  GCGTTTATTTTCGCGGTCTCGGATGGTTTTTCTCGCGAATCCGGAT  884

```

#### Anexo – 4: Resultado do sequenciamento do cassete upS+downS<sub>xy</sub>LA

A sequência consenso obtida através do sequenciamento do cassete upS+downS<sub>xy</sub>LA de cada fragmento (upS<sub>xy</sub>LA (A) e downS<sub>xy</sub>LA (B)) nos dois sentidos. As sequências obtidas foram alinhadas com uma sequência referente ao fragmento amplificado no genoma de *B. sacchari*. Os alinhamentos foram realizados no NCBI utilizando a ferramenta BLAST. Nos dois casos observa-se que a identidade é de 100%. A reação de sequenciamento não consegue amplificar grandes porções, desta forma somente uma parte da sequência de cada fragmento foi utilizada neste alinhamento (A – 830 de 930pb; B – 877 de 1001pb).

##### 4.1 upS<sub>xy</sub>LA

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1533 bits (830)	0.0	830/830 (100%)	0/830 (0%)	Plus/Plus
Query 142	CGGGCATCGGTCACCGCATCACGCCAACGGGCTTGGGCAGCGCATGAAGCCACGCGCTC	201		
Sbjct 1	CGGGCATCGGTCACCGCATCACGCCAACGGGCTTGGGCAGCGCATGAAGCCACGCGCTC	60		
Query 202	AACTGCTCGATTGCCTGGTTCCAGGACGGTGCACCTCGTGGCGAGGCCGCGATAGATCGGC	261		
Sbjct 61	AACTGCTCGATTGCCTGGTTCCAGGACGGTGCACCTCGTGGCGAGGCCGCGATAGATCGGC	120		
Query 262	GCGTCCATATCTTCTGTGTGCGCGAGCGCCTGGAAGGCACGCTCGCGCTCCTGCGCCAG	321		
Sbjct 121	GCGTCCATATCTTCTGTGTGCGCGAGCGCCTGGAAGGCACGCTCGCGCTCCTGCGCCAG	180		
Query 322	CGGTTCTCCAGTGCACGGGCAGGCTGTACATGGCGAGATGCGGCAGCCCCGCGCCGATC	381		
Sbjct 181	CGGTTCTCCAGTGCACGGGCAGGCTGTACATGGCGAGATGCGGCAGCCCCGCGCCGATC	240		
Query 382	AGGTGCGTCCAGGCGAGCGAGACGAGCTTTTTGTTGTGCGGTGGCGATGTAGGGCAGCGG	441		
Sbjct 241	AGGTGCGTCCAGGCGAGCGAGACGAGCTTTTTGTTGTGCGGTGGCGATGTAGGGCAGCGG	300		
Query 442	GTGGGGTACTGGGCGAGTCTTCGTACGACGAGCCGACCGCCACCACGGGAAGCGGTGAA	501		
Sbjct 301	GTGGGGTACTGGGCGAGTCTTCGTACGACGAGCCGACCGCCACCACGGGAAGCGGTGAA	360		
Query 502	CCCTGCAGCGCTTCGGCGACGGCGGGTTCGTGAAATCGGCGATGATGCCATCGCCTTCG	561		
Sbjct 361	CCCTGCAGCGCTTCGGCGACGGCGGGTTCGTGAAATCGGCGATGATGCCATCGCCTTCG	420		
Query 562	AAGCGCTCGATGCCCGAGCCGGCAGCGAAATCCTCTTCGAGAAAGAGGTCCAGGCG	621		
Sbjct 421	AAGCGCTCGATGCCCGAGCCGGCAGCGAAATCCTCTTCGAGAAAGAGGTCCAGGCG	480		
Query 622	ACGCGCGTCGAGCGCAGATAGTGGCCAATGCCCGCATGATCTCGCGGTTCGTAACCTTG	681		
Sbjct 481	ACGCGCGTCGAGCGCAGATAGTGGCCAATGCCCGCATGATCTCGCGGTTCGTAACCTTG	540		
Query 682	TTCGCATTGAAGAGCAGTGCATGCGGTGCGACGTCTGGGAAGCGGTGGCGCGGGTCATG	741		
Sbjct 541	TTCGCATTGAAGAGCAGTGCATGCGGTGCGACGTCTGGGAAGCGGTGGCGCGGGTCATG	600		

```

Query 742 GCATGTCGTAGGGGCCTTTTAAGCGTCTGGCTATTCTAGGCCGAGTGTGGGCCGCATGCG 801
          |||
Sbjct 601 GCATGTCGTAGGGGCCTTTTAAGCGTCTGGCTATTCTAGGCCGAGTGTGGGCCGCATGCG 660

Query 802 CGCGCCGGCGGAGGATGCTGGCAGGAAACGTTATCTGCGTCGCGCAATTCGTAATTGCC 861
          |||
Sbjct 661 CGCGCCGGCGGAGGATGCTGGCAGGAAACGTTATCTGCGTCGCGCAATTCGTAATTGCC 720

Query 862 GCCCTTCCCACCCCACGGGCAGTATGAGGTCACCTCGACGGGCGCTCGCCGCTGCGCCGC 921
          |||
Sbjct 721 GCCCTTCCCACCCCACGGGCAGTATGAGGTCACCTCGACGGGCGCTCGCCGCTGCGCCGC 780

Query 922 AACATAACCGCCCTGCATGGGAGCCGAGCGCAAAGCGCTGAAGCGCTCGC 971
          |||
Sbjct 781 AACATAACCGCCCTGCATGGGAGCCGAGCGCAAAGCGCTGAAGCGCTCGC 830

```

## 4.2 downSxylA

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1620 bits(877)	0.0	877/877(100%)	0/877(0%)	Plus/Plus
Query 51	GGCGCGTAGAAGCGCGTAAGCACCGGCCCTGCACAAGAAAGGATGGAGACATGTTTATCGG	110		
Sbjct 1	GGCGCGTAGAAGCGCGTAAGCACCGGCCCTGCACAAGAAAGGATGGAGACATGTTTATCGG	60		
Query 111	TATCGACCTCGGCACGTCGGGTGTCAAGGCGGTGTTGCTCGAGCGCGCCGGCGATGTGAT	170		
Sbjct 61	TATCGACCTCGGCACGTCGGGTGTCAAGGCGGTGTTGCTCGAGCGCGCCGGCGATGTGAT	120		
Query 171	CGCCAGCGCGAGCGCGCCGCTTGCCGTCAGCCGGCCACAGCCGCGCTGGTCCGAGCAGGC	230		
Sbjct 121	CGCCAGCGCGAGCGCGCCGCTTGCCGTCAGCCGGCCACAGCCGCGCTGGTCCGAGCAGGC	180		
Query 231	GCCGGAGGAGTGGTGGCGCGCAGCGCATCGCGCTGCGCGAGTTGCTCGACGAGGTACG	290		
Sbjct 181	GCCGGAGGAGTGGTGGCGCGCAGCGCATCGCGCTGCGCGAGTTGCTCGACGAGGTACG	240		
Query 291	CCGCAATGGCATCGACCCCGGGGCATCGAGGCGCTCGGCCTTACCGGTGAGATGCACGG	350		
Sbjct 241	CCGCAATGGCATCGACCCCGGGGCATCGAGGCGCTCGGCCTTACCGGTGAGATGCACGG	300		
Query 351	CGCGACGCTGCTCAACGCGAAGGGTGAGGTGCTGCGCCCCGCGATACTCTGGAACGACGG	410		
Sbjct 301	CGCGACGCTGCTCAACGCGAAGGGTGAGGTGCTGCGCCCCGCGATACTCTGGAACGACGG	360		
Query 411	TCGTTCCGATAACCGAATGTATCGAGCTGGAGAGGGCCGTGCCCGAACTCCACGACGTGGC	470		
Sbjct 361	TCGTTCCGATAACCGAATGTATCGAGCTGGAGAGGGCCGTGCCCGAACTCCACGACGTGGC	420		
Query 471	GGGCAATCTCGCCATGCCGGGCTTACGGCACCCAAGCTGCTATGGGTGCGCAAGCACGA	530		
Sbjct 421	GGGCAATCTCGCCATGCCGGGCTTACGGCACCCAAGCTGCTATGGGTGCGCAAGCACGA	480		
Query 531	GCCCGAAATTTTCGCGCGCATTGCGCACGTGCTGCTGCCGAAGGATTATCTGCGCTGGCT	590		
Sbjct 481	GCCCGAAATTTTCGCGCGCATTGCGCACGTGCTGCTGCCGAAGGATTATCTGCGCTGGCT	540		
Query 591	CTTGACGGGCGTGCTCGCGACCGACCCCTCCGATGCCGCGGGAACGCTCTGGCTCGACGT	650		
Sbjct 541	CTTGACGGGCGTGCTCGCGACCGACCCCTCCGATGCCGCGGGAACGCTCTGGCTCGACGT	600		

```

Query 651 TGCGAAGCGCGACTATAGCGAGGCGCTGCTTTCGGCCTGCGGTCTCACGCGCGCACACAT 710
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 601 TGCGAAGCGCGACTATAGCGAGGCGCTGCTTTCGGCCTGCGGTCTCACGCGCGCACACAT 660

Query 711 GCCCGAGGTTTTTCGAGGGCAATGAAGTCACTGGCACGTTGCGTGCGGAACTCGCACGCGA 770
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 661 GCCCGAGGTTTTTCGAGGGCAATGAAGTCACTGGCACGTTGCGTGCGGAACTCGCACGCGA 720

Query 771 GTTCGGACTGCGTGAAATTCCTGGTGGCGGGCGCGGCGATAACGCGGGCGGGCGCGGT 830
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 721 GTTCGGACTGCGTGAAATTCCTGGTGGCGGGCGCGGCGATAACGCGGGCGGGCGCGGT 780

Query 831 GGGTGTGGGTATCGTGCGGCCCGGCGACGCAATGCTCTCGCTGGGCACTTCGGGCGTTTA 890
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 781 GGGTGTGGGTATCGTGCGGCCCGGCGACGCAATGCTCTCGCTGGGCACTTCGGGCGTTTA 840

Query 891 TTTCGCGGTCTCGGATGGTTTTTCTCGCGAATCCGGAT 927
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 841 TTTCGCGGTCTCGGATGGTTTTTCTCGCGAATCCGGAT 877

```



**Anexo – 5: Obtenção de mutantes de *B. sacchari* xil<sup>-</sup> por irradiação UV, dados crus**

Exposição UV (s)	Diluições (0,1mL)	Contagens/100uL diluição (UFC)					Média Contagens (UFC)	Sobreviventes (UFC/mL)	
0	(10 <sup>-6</sup> )	270	273	377			3.07E+02	3.07E+09	4.10E+09
	(10 <sup>-7</sup> )	29	40	38			3.57E+01	3.57E+09	
	(10 <sup>-8</sup> )	2	6	9			5.67E+00	5.67E+09	
1	(10 <sup>-6</sup> )	283	311	200			2.65E+02	2.65E+09	2.45E+09
	(10 <sup>-7</sup> )	31	24	16			2.37E+01	2.37E+09	
	(10 <sup>-8</sup> )	0	6	1			2.33E+00	2.33E+09	
2	(10 <sup>-6</sup> )	346	274	216			2.79E+02	2.79E+09	2.60E+09
	(10 <sup>-7</sup> )	35	34	41			3.67E+01	3.67E+09	
	(10 <sup>-8</sup> )	2	1	1			1.33E+00	1.33E+09	
3	(10 <sup>-5</sup> )	2108	2441	2492			2.35E+03	2.35E+09	2.22E+09
	(10 <sup>-6</sup> )	255	273	190			2.39E+02	2.39E+09	
	(10 <sup>-7</sup> )	16	18	24			1.93E+01	1.93E+09	
4	(10 <sup>-5</sup> )	1894	2225	2187			2.10E+03	2.10E+09	1.69E+09
	(10 <sup>-6</sup> )	191	199	169			1.86E+02	1.86E+09	
	(10 <sup>-7</sup> )	8	12	13			1.10E+01	1.10E+09	
5	(10 <sup>-5</sup> )	1697	1983	1831			1.84E+03	1.84E+09	1.46E+09
	(10 <sup>-6</sup> )	164	193	195			1.84E+02	1.84E+09	
	(10 <sup>-7</sup> )	13	7	1			7.00E+00	7.00E+08	
6	(10 <sup>-5</sup> )	1482	1558	1437	1462	1793	1.55E+03	1.55E+09	1.16E+09
	(10 <sup>-6</sup> )	169	149	152	120	174	1.53E+02	1.53E+09	
	(10 <sup>-7</sup> )	3	3	3	6	6	4.20E+00	4.20E+08	
7	(10 <sup>-5</sup> )	1256	1392	1064	1120	1163	1.20E+03	1.20E+09	7.64E+08
	(10 <sup>-6</sup> )	122	98	106	100	70	9.92E+01	9.92E+08	
	(10 <sup>-7</sup> )	0	1	1	3	0	1.00E+00	1.00E+08	
8	(10 <sup>-5</sup> )	1723	1449	1164			1.45E+03	1.45E+09	4.30E+08
	(10 <sup>-6</sup> )	70	91	87			8.27E+01	8.27E+08	
	(10 <sup>-7</sup> )	1	0	0			3.33E-01	3.33E+07	
10	(10 <sup>-4</sup> )	INC	INC	INC					4.12E+08
	(10 <sup>-5</sup> )	400	396	368			3.88E+02	3.88E+08	
	(10 <sup>-6</sup> )	51	34	46			4.37E+01	4.37E+08	
15	(10 <sup>-3</sup> )	INC	INC	INC					5.36E+07
	(10 <sup>-4</sup> )	376	260	610			4.15E+02	4.15E+07	
	(10 <sup>-5</sup> )	39	83	75			6.57E+01	6.57E+07	
20	(10 <sup>-2</sup> )	2073	1825	2200			2.03E+03	2.03E+06	2.58E+06
	(10 <sup>-3</sup> )	456	210	218			2.95E+02	2.95E+06	
	(10 <sup>-4</sup> )	40	23	20			2.77E+01	2.77E+06	

## Anexo – 6: Resultado do sequenciamento dos genes *xyLA<sub>Bs</sub>* e *xyLA<sub>Bc</sub>*

As sequências consenso foram obtidas através do sequenciamento dos genes *xyLA<sub>Bs</sub>* e *xyLA<sub>Bc</sub>* nos dois sentidos. Essas sequências foram alinhadas com as sequências referente ao gene *xyLA* de *B. sacchari* ou *B. cenocepacia* obtidas no draft do genoma ou no NCBI, respectivamente. Os alinhamentos foram realizados no NCBI utilizando a ferramenta BLAST. Nos dois casos observa-se que a identidade é de 100%. A reação de sequenciamento não consegue amplificar grandes porções, desta forma somente uma parte da sequência de cada fragmento foi utilizada neste alinhamento (A – 1231 de 1323pb; B – 1268 de 1323pb).

### 6.1 *xyLA<sub>Bs</sub>*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2274 bits (1231)	0.0	1231/1231 (100%)	0/1231 (0%)	Plus/Plus	
Query	49	TCGGACAATCCGCTTGCTTACCGTCACTACGATCGCACGAAGAAGGTGCTCGGCAAGACG			108
Sbjct	1	TCGGACAATCCGCTTGCTTACCGTCACTACGATCGCACGAAGAAGGTGCTCGGCAAGACG			60
Query	109	CTGGAGGAGCACCTGCGCATTGCCGTGTGCTACTGGCATAACGCTGGTGTGGCCAGGCGTC			168
Sbjct	61	CTGGAGGAGCACCTGCGCATTGCCGTGTGCTACTGGCATAACGCTGGTGTGGCCAGGCGTC			120
Query	169	GACATCTTCGGCCAGGGCACCTTTCACCGTCCGTGGCAGCAGCCTGGCGACGCGATGGAG			228
Sbjct	121	GACATCTTCGGCCAGGGCACCTTTCACCGTCCGTGGCAGCAGCCTGGCGACGCGATGGAG			180
Query	229	CGGGCGCGCCAGAAGGCCGACGCGCGTTCGAGTTCTTCACGAACTCAATGTGCCGTTT			288
Sbjct	181	CGGGCGCGCCAGAAGGCCGACGCGCGTTCGAGTTCTTCACGAACTCAATGTGCCGTTT			240
Query	289	TACACATTCCACGACACCGACGTCGCGCCGAGGGCCGTGACCTGAAGGACTACAAGGAG			348
Sbjct	241	TACACATTCCACGACACCGACGTCGCGCCGAGGGCCGTGACCTGAAGGACTACAAGGAG			300
Query	349	AACTTCGCGCGGATGGTGGATTACCTCGGCGAAAAGCAGCAGGCGAGCGGTATGAAGCTG			408
Sbjct	301	AACTTCGCGCGGATGGTGGATTACCTCGGCGAAAAGCAGCAGGCGAGCGGTATGAAGCTG			360
Query	409	TTGTGGGGTACGGCCAATCTGTTCTCGCATCCGCGTTACGCGGGCGGCGCGCCACTAGT			468
Sbjct	361	TTGTGGGGTACGGCCAATCTGTTCTCGCATCCGCGTTACGCGGGCGGCGCGCCACTAGT			420
Query	469	CCGAATCCCAGGTCTTTGCTTATGCGGCGACTCAGGTATGTCATGCGCTGGATGCCACG			528
Sbjct	421	CCGAATCCCAGGTCTTTGCTTATGCGGCGACTCAGGTATGTCATGCGCTGGATGCCACG			480
Query	529	CAAAAGCTCGGCGGCGAAAACACTACGTGCTCTGGGGCGGCCGGAAGGCTACGACACGCTG			588
Sbjct	481	CAAAAGCTCGGCGGCGAAAACACTACGTGCTCTGGGGCGGCCGGAAGGCTACGACACGCTG			540
Query	589	TTGAACACCGATCTCGTGC CGAACGCGAGCAGTTCGCGCGTTTTCTCGCGATGGTGGTC			648
Sbjct	541	TTGAACACCGATCTCGTGC CGAACGCGAGCAGTTCGCGCGTTTTCTCGCGATGGTGGTC			600

Query	649	GAGCACAAGGAGCGCATCGGCTTCAAGGGCGCGCTGCTGATCGAGCCGAAGCCGCAGGAG	708
Sbjct	601	GAGCACAAGGAGCGCATCGGCTTCAAGGGCGCGCTGCTGATCGAGCCGAAGCCGCAGGAG	660
Query	709	CCCACCAAGCACCAGTACGATTACGACGTCGCGACGGTTCATGGATTCTGACGCAATAC	768
Sbjct	661	CCCACCAAGCACCAGTACGATTACGACGTCGCGACGGTTCATGGATTCTGACGCAATAC	720
Query	769	GGACTGCAGAACGAAATTCGCGTCAACATCGAGGCGAATCACGCTACGCTCGCGGGGCAT	828
Sbjct	721	GGACTGCAGAACGAAATTCGCGTCAACATCGAGGCGAATCACGCTACGCTCGCGGGGCAT	780
Query	829	TCGTTCCATCACGAGATCGCGATGGCGCACGCGTGGGCGTGTTCGGCAGCGTGGACGCC	888
Sbjct	781	TCGTTCCATCACGAGATCGCGATGGCGCACGCGTGGGCGTGTTCGGCAGCGTGGACGCC	840
Query	889	AACCGCGGAGATCCCCAGAACGGCTGGGACACCGATCAGTTTCCGAATAGCGTGGAGGAG	948
Sbjct	841	AACCGCGGAGATCCCCAGAACGGCTGGGACACCGATCAGTTTCCGAATAGCGTGGAGGAG	900
Query	949	CTCACGCTGGCGTTCTACGAGATCTTGCGGCACGGCGGCTTACCACCGGGCGCATGAAT	1008
Sbjct	901	CTCACGCTGGCGTTCTACGAGATCTTGCGGCACGGCGGCTTACCACCGGGCGCATGAAT	960
Query	1009	TTCGACGCGAAGGTGCGGCGTCAAAGCGTGGACCCCGAAGACCTGTTCTACGGCCACGTT	1068
Sbjct	961	TTCGACGCGAAGGTGCGGCGTCAAAGCGTGGACCCCGAAGACCTGTTCTACGGCCACGTT	1020
Query	1069	GGTGCATCGACGTGCTCGCCCTCGCGCTCGAGCGTGCCGCGGTACTGGTGGAGAACGAT	1128
Sbjct	1021	GGTGCATCGACGTGCTCGCCCTCGCGCTCGAGCGTGCCGCGGTACTGGTGGAGAACGAT	1080
Query	1129	AGGCTCCAGCAGTTCAAACAGCAGCGCTATGCGGGCTGGGACACCGAGTTCGGCCGAAG	1188
Sbjct	1081	AGGCTCCAGCAGTTCAAACAGCAGCGCTATGCGGGCTGGGACACCGAGTTCGGCCGAAG	1140
Query	1189	ATTCTTGCCGGCGGTTATGCGCTTTCGTGCTGGCCGCGGATGCCGCCGCTCGTGGCCTC	1248
Sbjct	1141	ATTCTTGCCGGCGGTTATGCGCTTTCGTGCTGGCCGCGGATGCCGCCGCTCGTGGCCTC	1200
Query	1249	AATCCCAGCATGCGAGCGGCCAGCAGGAGC	1279
Sbjct	1201	AATCCCAGCATGCGAGCGGCCAGCAGGAGC	1231

## 6.2 *xyIA<sub>Bc</sub>*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2342 bits(1268)	0.0	1268/1268(100%)	0/1268(0%)	Plus/Plus	
Query	18	TATTCGCGGATTCGCTACGAAGGCCCGCAGTCGGACAACCCGCTCGCGTATCACCATTA			77
Sbjct	1	TATTCGCGGATTCGCTACGAAGGCCCGCAGTCGGACAACCCGCTCGCGTATCACCATTA			60
Query	78	CGACCCCGACAAGCGCGTGTGGCAAGACGCTCGCCGAGCATCTGCGGATCGCGGTCTG			137
Sbjct	61	CGACCCCGACAAGCGCGTGTGGCAAGACGCTCGCCGAGCATCTGCGGATCGCGGTCTG			120
Query	138	CTACTGGCACACGTTTCGTGTGGCCCGGTCACGACATCTTCGGGCAGGCCGCGTTCCGGCG			197
Sbjct	121	CTACTGGCACACGTTTCGTGTGGCCCGGTCACGACATCTTCGGGCAGGCCGCGTTCCGGCG			180



```
Query 1098 CGAACGCGCGGGCGGTGCTGGTCGAGAACGACCGGCTCGACGCGCTGCGCCGGCAGCGTTA 1157
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1081 CGAACGCGCGGGCGGTGCTGGTCGAGAACGACCGGCTCGACGCGCTGCGCCGGCAGCGTTA 1140

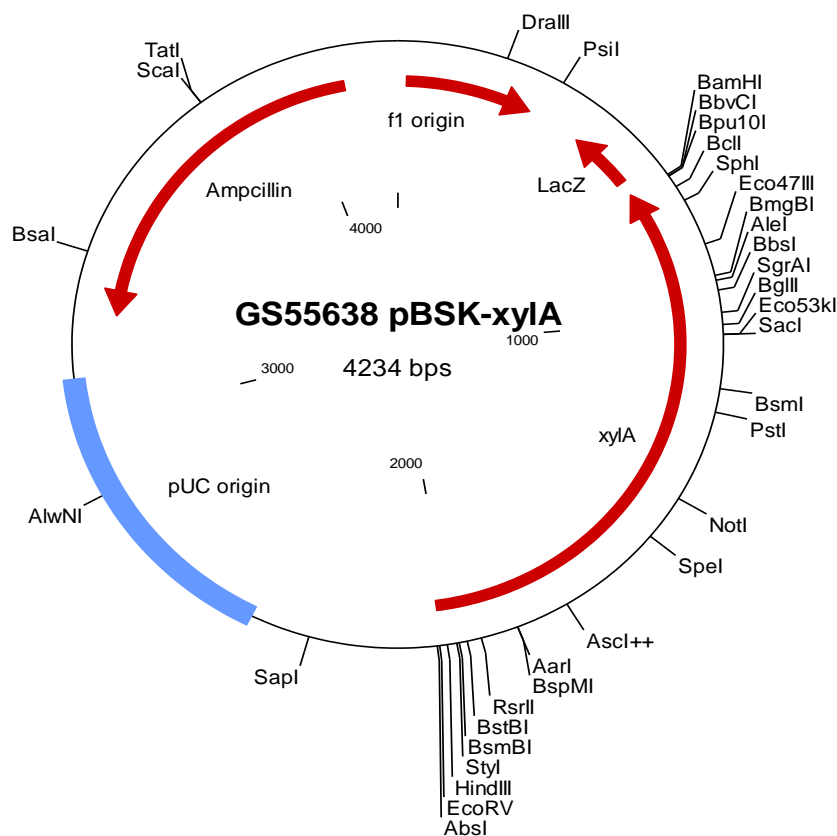
Query 1158 TGCGCAATGGGACGACGCGTTTCGGCCGCAAGATCCTGGCGGGCGGCTATACGCTGGAGTC 1217
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1141 TGCGCAATGGGACGACGCGTTTCGGCCGCAAGATCCTGGCGGGCGGCTATACGCTGGAGTC 1200

Query 1218 GCTCGCGGCCGACGCGCTCGCGCGCGGCGTGGACCCGCAACATGCGAGCGGCGCGCAGGA 1277
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1201 GCTCGCGGCCGACGCGCTCGCGCGCGGCGTGGACCCGCAACATGCGAGCGGCGCGCAGGA 1260

Query 1278 GCGGCTCG 1285
          |||||||
Sbjct 1261 GCGGCTCG 1268
```

## Anexo – 7: Produtos fornecidos pela empresa GenOne

### 7.1 *xyIA*\*



Alinhamento realizado no NCBI utilizando a ferramenta BLAST da sequência do gene *xyIA*\* original e do sequenciamento da sequência clonada no vetor pBSK. Observa-se que a identidade é de 100%.

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	2538 bits (1374)	0.0	1374/1374 (100%)	0/1374 (0%)	Plus/Plus
Query	1		TCAGTTAAGCTTTTCGCTGTGCATCGACCAAGGAGACGACATGTCGTATTTTTCGAAGCTATT		60
Sbjct	1		TCAGTTAAGCTTTTCGCTGTGCATCGACCAAGGAGACGACATGTCGTATTTTTCGAAGCTATT		60
Query	61		CCTCCGATCCGCTATGACGGTCCGCAATCGGACAATCCGCTTGCTTACCGTCACTACGAT		120
Sbjct	61		CCTCCGATCCGCTATGACGGTCCGCAATCGGACAATCCGCTTGCTTACCGTCACTACGAT		120

Query	121	CGCACGAAGAAGGTGCTCGGCAAGACGCTGGAGGAGCACCTGCGCATTGCCGTGTGCTAC	180
Sbjct	121	CGCACGAAGAAGGTGCTCGGCAAGACGCTGGAGGAGCACCTGCGCATTGCCGTGTGCTAC	180
Query	181	TGGCATAAGCTGGTGTGGCCAGGCGTCGACATCTTCGGCCAGGGCACCTTTCACCGTCCG	240
Sbjct	181	TGGCATAAGCTGGTGTGGCCAGGCGTCGACATCTTCGGCCAGGGCACCTTTCACCGTCCG	240
Query	241	TGGCAGCAGCCTGGCGACGCGATGGAGCGGGCGGCCAGAAGGCCGACGCGGCGTTCGAG	300
Sbjct	241	TGGCAGCAGCCTGGCGACGCGATGGAGCGGGCGGCCAGAAGGCCGACGCGGCGTTCGAG	300
Query	301	TTCTTCACGAAACTCAATGTGCCGTTCTACACATTCACGACACCGACGTGCGGCCGAG	360
Sbjct	301	TTCTTCACGAAACTCAATGTGCCGTTCTACACATTCACGACACCGACGTGCGGCCGAG	360
Query	361	GGCCGTGACCTGGGCGACTACAAGGAGAACTTCGCGCGGATGGTGGATTACCTCGGCGAC	420
Sbjct	361	GGCCGTGACCTGGGCGACTACAAGGAGAACTTCGCGCGGATGGTGGATTACCTCGGCGAC	420
Query	421	AAGCAGCAGGCGAGCGGTATGAAGCTGTTGTGGGGTTCGGCCAATCTGTTCTCGCATCCG	480
Sbjct	421	AAGCAGCAGGCGAGCGGTATGAAGCTGTTGTGGGGTTCGGCCAATCTGTTCTCGCATCCG	480
Query	481	CGTTACGCGGGCGGCGGCCACTAGTCCGAATCCCGAGGTCTTTGCTTATGCGGCGACT	540
Sbjct	481	CGTTACGCGGGCGGCGGCCACTAGTCCGAATCCCGAGGTCTTTGCTTATGCGGCGACT	540
Query	541	CAGGTATGTCATGCGCTGGATACGACGAAAAGCTCGGCGGCGAAAACCTACGTGCTCTGG	600
Sbjct	541	CAGGTATGTCATGCGCTGGATACGACGAAAAGCTCGGCGGCGAAAACCTACGTGCTCTGG	600
Query	601	GGCGGCCGGAAGGCTACGACACGCTGTTGAACACCGATCTCGTGC GCGAACGCGAGCAG	660
Sbjct	601	GGCGGCCGGAAGGCTACGACACGCTGTTGAACACCGATCTCGTGC GCGAACGCGAGCAG	660
Query	661	TTCGCGGTTTTTCTCGCGATGGTGGTTCGAGCACAAGGAGCGCATCGGCTTCAAGGGCGG	720
Sbjct	661	TTCGCGGTTTTTCTCGCGATGGTGGTTCGAGCACAAGGAGCGCATCGGCTTCAAGGGCGG	720
Query	721	CTGCTGATCGAGCCGAAGCCGCAGGAGCCACCAAGCACCAGTACGATTACGACGTGCGG	780
Sbjct	721	CTGCTGATCGAGCCGAAGCCGCAGGAGCCACCAAGCACCAGTACGATTACGACGTGCGG	780
Query	781	ACGGTTCATGGATTCTCTGACGCAATACGGACTGCAGAACGAAATTCGCGTCAACATCGAG	840
Sbjct	781	ACGGTTCATGGATTCTCTGACGCAATACGGACTGCAGAACGAAATTCGCGTCAACATCGAG	840
Query	841	GCGAATCACGCTACGCTCGCGGGGCATTTCGTTCCATCACGAGATCGCGATGGCGCACGCG	900
Sbjct	841	GCGAATCACGCTACGCTCGCGGGGCATTTCGTTCCATCACGAGATCGCGATGGCGCACGCG	900
Query	901	CTGGGCGTGTTCGGCAGCGTGGACGCCAACCGCGGAGATCCCCAGAACGGCTGGGACACC	960
Sbjct	901	CTGGGCGTGTTCGGCAGCGTGGACGCCAACCGCGGAGATCCCCAGAACGGCTGGGACACC	960
Query	961	GATCAGTTTCCGAATAGCGTGGAGGAGCTCACGCTGGCGTTCTACGAGATCTTGCGGCAC	1020
Sbjct	961	GATCAGTTTCCGAATAGCGTGGAGGAGCTCACGCTGGCGTTCTACGAGATCTTGCGGCAC	1020
Query	1021	GGCGGCTTACCACCGGCGGCATGAATTTTCGACGCGAAGGTGCGGCGTCAAAGCGTGGAC	1080
Sbjct	1021	GGCGGCTTACCACCGGCGGCATGAATTTTCGACGCGAAGGTGCGGCGTCAAAGCGTGGAC	1080

```

Query 1081 CCCGAAGACCTGTTCTACGGCCACGTTGGTGCGATCGACGTGCTCGCCCTCGCGCTCGAG 1140
          |||
Sbjct 1081 CCCGAAGACCTGTTCTACGGCCACGTTGGTGCGATCGACGTGCTCGCCCTCGCGCTCGAG 1140

Query 1141 CGTGCCGCGGTACTGGTGGAGAACGATAGGCTCCAGCAGTTCAAACAGCAGCGCTATGCG 1200
          |||
Sbjct 1141 CGTGCCGCGGTACTGGTGGAGAACGATAGGCTCCAGCAGTTCAAACAGCAGCGCTATGCG 1200

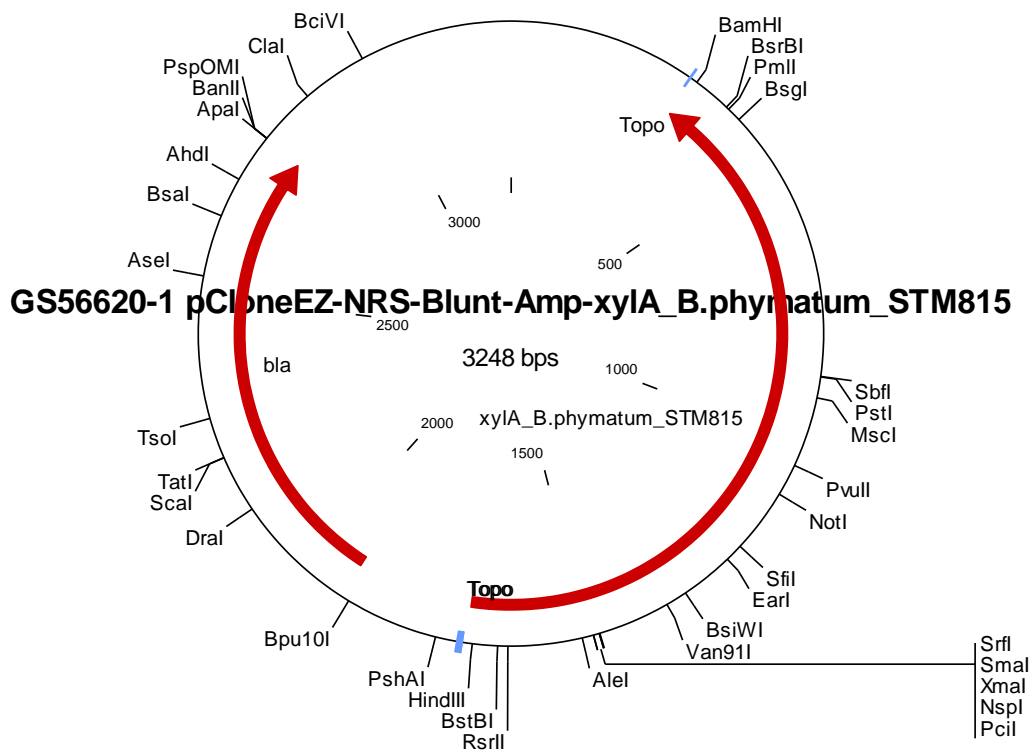
Query 1201 GGCTGGGACACCGAGTTCGGCCGCAAGATTCTTGCCGGCGGTTATGCGCTTTCGTCGCTG 1260
          |||
Sbjct 1201 GGCTGGGACACCGAGTTCGGCCGCAAGATTCTTGCCGGCGGTTATGCGCTTTCGTCGCTG 1260

Query 1261 GCCGCGGATGCCGCCGCTCGTGGCTCAATCCCCAGCATGCGAGCGGCCAGCAGGAGCGC 1320
          |||
Sbjct 1261 GCCGCGGATGCCGCCGCTCGTGGCTCAATCCCCAGCATGCGAGCGGCCAGCAGGAGCGC 1320

Query 1321 CTCGAAAACGTGATCAACCAGGCGATTTACGGCCAACGCTGAGGATCCTAGACG 1374
          |||
Sbjct 1321 CTCGAAAACGTGATCAACCAGGCGATTTACGGCCAACGCTGAGGATCCTAGACG 1374

```

## 7.2 *xylA<sub>Bp</sub>*



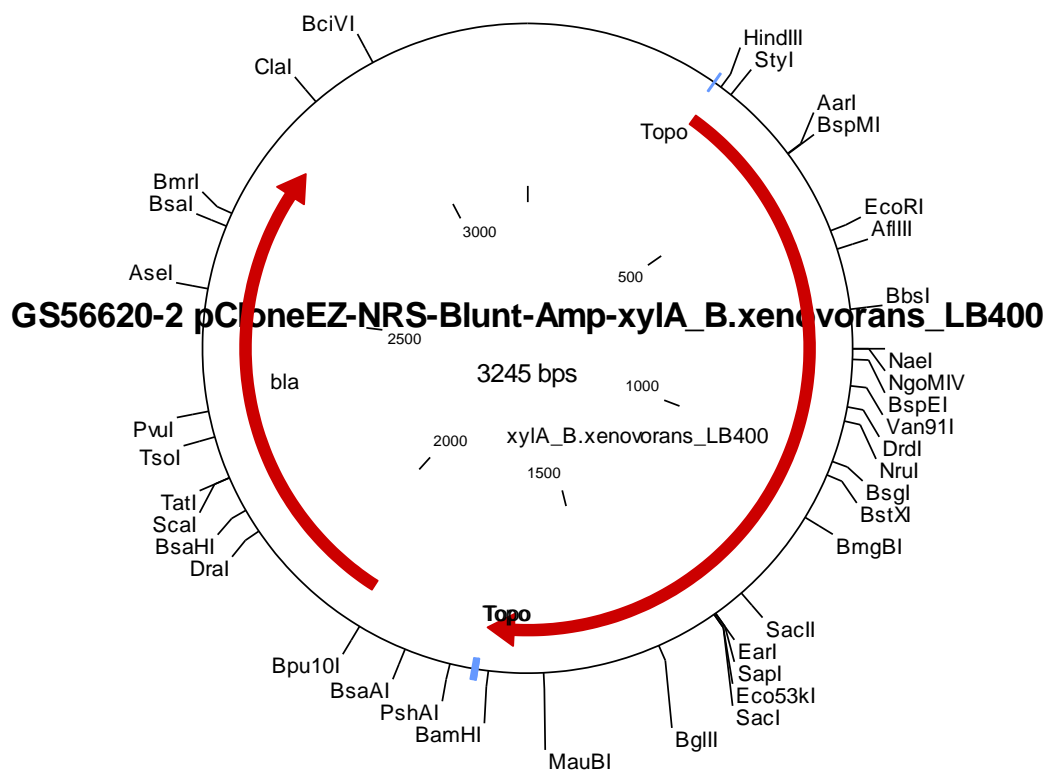


Alinhamento realizado no NCBI utilizando a ferramenta BLAST da sequência do gene *xyIA<sub>Bp</sub>* original e do sequenciamento da sequência clonada no vetor pCloneEZ-NRS. Observa-se que a identidade é de 100%.

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	2543 bits(1377)	0.0	1377/1377(100%)	0/1377(0%)	Plus/Plus	
Query	1		TCGAGTAAGCTTTCGCTGTGCATCGACCAAGGAGACGACATGAGCTACTTCGAACACCTC			60
Sbjct	1		TCGAGTAAGCTTTCGCTGTGCATCGACCAAGGAGACGACATGAGCTACTTCGAACACCTC			60
Query	61		CCCGCGGTCCGCTATGAAGGCCCCAGACGGACAACCCGTTTCGCGTATCGCCACTATGAC			120
Sbjct	61		CCCGCGGTCCGCTATGAAGGCCCCAGACGGACAACCCGTTTCGCGTATCGCCACTATGAC			120
Query	121		AAGGACAAGCTCGTCTGGGCAAGCGGATGGAAGACCACCTCCGGGTCGCGGTGTGCTAC			180
Sbjct	121		AAGGACAAGCTCGTCTGGGCAAGCGGATGGAAGACCACCTCCGGGTCGCGGTGTGCTAC			180
Query	181		TGGCACACCTTCGTGTGGCCGGGCGCGGACATGTTTCGGCCCGGGCACCTTCGAGCGCCCC			240
Sbjct	181		TGGCACACCTTCGTGTGGCCGGGCGCGGACATGTTTCGGCCCGGGCACCTTCGAGCGCCCC			240
Query	241		TGGCACACGCGGGCGACGCCCTCGAAATGGCCACGCCAAGGCGGACCACGCCTTCGAG			300
Sbjct	241		TGGCACACGCGGGCGACGCCCTCGAAATGGCCACGCCAAGGCGGACCACGCCTTCGAG			300
Query	301		CTGTTCTCGAAGCTCGGCACCCCGTTCTACACGTTCCACGACCTGGACGTCGCCCCGAG			360
Sbjct	301		CTGTTCTCGAAGCTCGGCACCCCGTTCTACACGTTCCACGACCTGGACGTCGCCCCGAG			360
Query	361		GGCGACTCGATCAAGTCGTACGTGAACAACCTCAAGGCGATGACCGACGTGCTGGCGCGC			420
Sbjct	361		GGCGACTCGATCAAGTCGTACGTGAACAACCTCAAGGCGATGACCGACGTGCTGGCGCGC			420
Query	421		AAGCAGGAACAGACGGGCATCAAGTGTCTCTGGGGCACGGCGAACCTCTTCAGCCACCCC			480
Sbjct	421		AAGCAGGAACAGACGGGCATCAAGTGTCTCTGGGGCACGGCGAACCTCTTCAGCCACCCC			480
Query	481		CGTTATGCGGCCGGCGCGGCCACGAACCCGAACCCGGACGTGTTTCGCCTTCGCCGCGACC			540
Sbjct	481		CGTTATGCGGCCGGCGCGGCCACGAACCCGAACCCGGACGTGTTTCGCCTTCGCCGCGACC			540
Query	541		CAGGTGCTGAACGCGCTGGAGGGCAGCCAGCGCCTCGGGCGGCGCAACTACGTGCTCTGG			600
Sbjct	541		CAGGTGCTGAACGCGCTGGAGGGCAGCCAGCGCCTCGGGCGGCGCAACTACGTGCTCTGG			600
Query	601		GGCGGCCGCGAGGGCTACGAGACGCTCCTGAACACGGACCTCAAGCGGAGCGCGAACAG			660
Sbjct	601		GGCGGCCGCGAGGGCTACGAGACGCTCCTGAACACGGACCTCAAGCGGAGCGCGAACAG			660
Query	661		CTGGGCCGCTTCATGTTCGATGGTGGTTCGAGCACAAGCACAAGACGGGCTTCAAGGGCGCG			720
Sbjct	661		CTGGGCCGCTTCATGTTCGATGGTGGTTCGAGCACAAGCACAAGACGGGCTTCAAGGGCGCG			720
Query	721		CTGCTCATCGAACCAGCCAGGAGCCGACGAAGCACCAGTATGACTACGACGTGGCC			780
Sbjct	721		CTGCTCATCGAACCAGCCAGGAGCCGACGAAGCACCAGTATGACTACGACGTGGCC			780

Query	781	ACGGTGCACGGCTTCCTCACCCAGTTCGGCCTGCAGGACGAAATCCGCGTGAACATCGAG	840
Sbjct	781	ACGGTGCACGGCTTCCTCACCCAGTTCGGCCTGCAGGACGAAATCCGCGTGAACATCGAG	840
Query	841	GCGAACCACGCGACCTCGCCGGCCACTCGTTCACCACGAAATCGCGAACGCCTTCGCG	900
Sbjct	841	GCGAACCACGCGACCTCGCCGGCCACTCGTTCACCACGAAATCGCGAACGCCTTCGCG	900
Query	901	CTCGGCATCTTCGGCAGCGTGGACGCGAACCGCGGCGACGCCAGAACGGCTGGGACACG	960
Sbjct	901	CTCGGCATCTTCGGCAGCGTGGACGCGAACCGCGGCGACGCCAGAACGGCTGGGACACG	960
Query	961	GACCAGTTCCCGAACCTCGGTGGAGGAACTCACGCTCGCGTTCTACGAGATCCTGCGCAAC	1020
Sbjct	961	GACCAGTTCCCGAACCTCGGTGGAGGAACTCACGCTCGCGTTCTACGAGATCCTGCGCAAC	1020
Query	1021	GGCGGCTTACCACGGGCGGCATGAACTTCGACGCGAAGGTCCGCCGTCAGTCGATCGAC	1080
Sbjct	1021	GGCGGCTTACCACGGGCGGCATGAACTTCGACGCGAAGGTCCGCCGTCAGTCGATCGAC	1080
Query	1081	CCCGAAGACATCGTGCACGGCCACATCGGCGCCATTGACGTCTCGCGGTGGCCCTCGAA	1140
Sbjct	1081	CCCGAAGACATCGTGCACGGCCACATCGGCGCCATTGACGTCTCGCGGTGGCCCTCGAA	1140
Query	1141	CGCGGGCCACCTCATTGAGCAGACCGCCTCGCCGCTTCAAGCAGCAGCGGTACGCG	1200
Sbjct	1141	CGCGGGCCACCTCATTGAGCAGACCGCCTCGCCGCTTCAAGCAGCAGCGGTACGCG	1200
Query	1201	GGCTGGGACTCGGACTTCGGCCGCAAGATCCTGGCCGGCGGCTACTCGCTGGAGAGCCTC	1260
Sbjct	1201	GGCTGGGACTCGGACTTCGGCCGCAAGATCCTGGCCGGCGGCTACTCGCTGGAGAGCCTC	1260
Query	1261	GCGAGCGACCCGTGCAGCGCAACATCGCGCCGCGCCACGTGAGCGGCCAGCAGGAGCGC	1320
Sbjct	1261	GCGAGCGACCCGTGCAGCGCAACATCGCGCCGCGCCACGTGAGCGGCCAGCAGGAGCGC	1320
Query	1321	CTGGAAAACATCGTGAACCAGGCGATTTTCTCGTCGGCGAAGTGAGGATCCGTCAGC	1377
Sbjct	1321	CTGGAAAACATCGTGAACCAGGCGATTTTCTCGTCGGCGAAGTGAGGATCCGTCAGC	1377

### 7.3 *xylA<sub>Bx</sub>*



Alinhamento realizado no NCBI utilizando a ferramenta BLAST da sequência do gene *xylA<sub>Bx</sub>* original e do sequenciamento da sequência clonada no vetor pCloneEZ-NRS. Observa-se que a identidade é de 100%.

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	2538 bits (1374)	0.0	1374/1374 (100%)	0/1374 (0%)	Plus/Plus	
Query	1		TCGAGTAAGCTTTCGCTGTGCATCGACCAAGGAGACGACATGAGCTACTTCGAGCATATC			60
Sbjct	1		TCGAGTAAGCTTTCGCTGTGCATCGACCAAGGAGACGACATGAGCTACTTCGAGCATATC			60
Query	61		CCCGAGATCCGTTACGAGGGCCCGCAAAGTGACAACCCGCTCGCATATCGGCACTACGAT			120
Sbjct	61		CCCGAGATCCGTTACGAGGGCCCGCAAAGTGACAACCCGCTCGCATATCGGCACTACGAT			120
Query	121		AAATCGAAGAAAGTGCTGGGCAAGACCCTGGAGGAACACCTGCGCATCGCCGTGTGCTAC			180
Sbjct	121		AAATCGAAGAAAGTGCTGGGCAAGACCCTGGAGGAACACCTGCGCATCGCCGTGTGCTAC			180



```
Query 1081 CCCGAAGATCTGTTCTACGGCCATATCGGCGCGATTGACAATCTGGCCCTGGCAGTCGAA 1140
          |||
Sbjct 1081 CCCGAAGATCTGTTCTACGGCCATATCGGCGCGATTGACAATCTGGCCCTGGCAGTCGAA 1140

Query 1141 CGGGCGGCCGTCCTGATCGAGAATGATCGGCTGGATCAGTTCAAGCGCCAGCGGTACGCG 1200
          |||
Sbjct 1141 CGGGCGGCCGTCCTGATCGAGAATGATCGGCTGGATCAGTTCAAGCGCCAGCGGTACGCG 1200

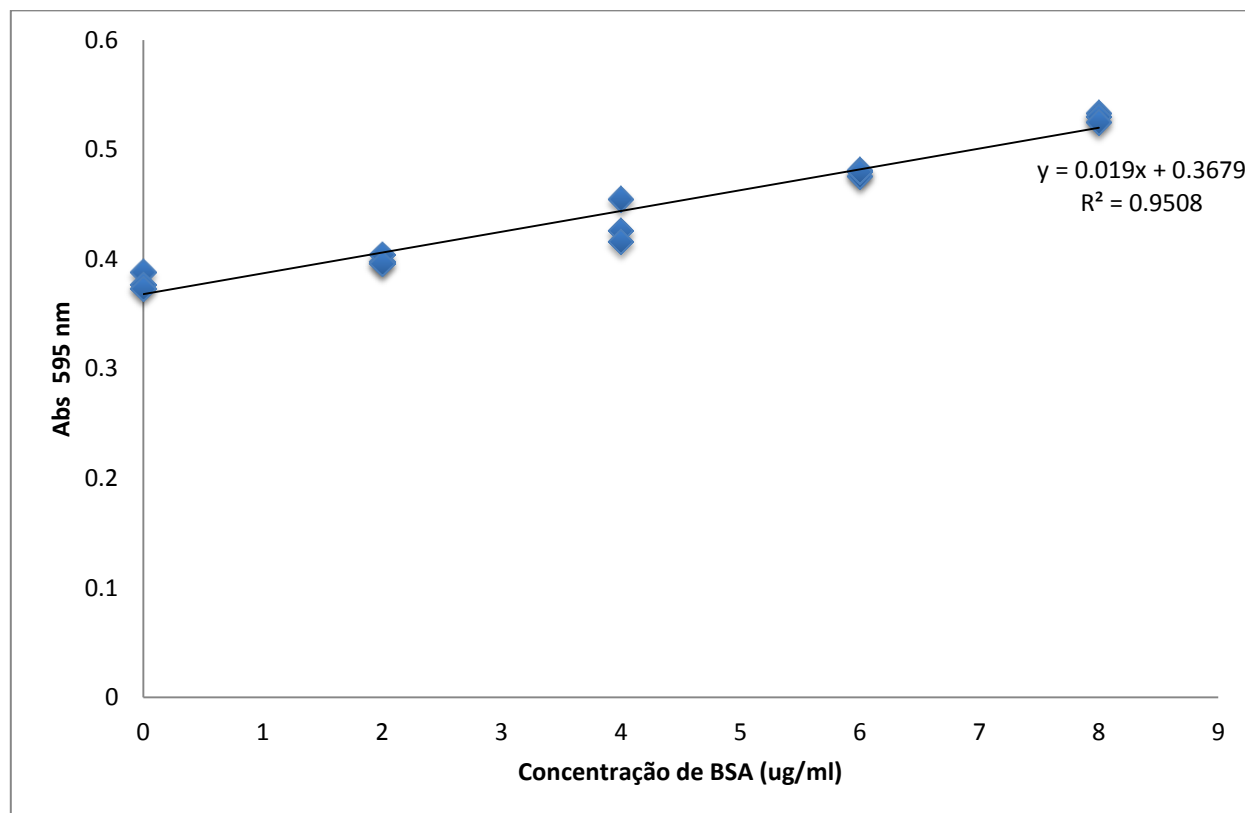
Query 1201 GGCTGGGACGCGGACTTCGGCCGAAAATTCTGAGCGGCGACTATTCGCTGTCCACGCTG 1260
          |||
Sbjct 1201 GGCTGGGACGCGGACTTCGGCCGAAAATTCTGAGCGGCGACTATTCGCTGTCCACGCTG 1260

Query 1261 GCGACCGACGCGCTCGCGCGCGGCTGAACCCGCAACACGCATCCGGCCACCAAGAAGT 1320
          |||
Sbjct 1261 GCGACCGACGCGCTCGCGCGCGGCTGAACCCGCAACACGCATCCGGCCACCAAGAAGT 1320

Query 1321 ATGGAGAACATCGTGAATCAGGCAATCTACAGTGGCCGTTGAGGATCCGTCAGC 1374
          |||
Sbjct 1321 ATGGAGAACATCGTGAATCAGGCAATCTACAGTGGCCGTTGAGGATCCGTCAGC 1374
```

## Anexo – 8: Ensaio Enzimático da proteína xilose isomerase

### 8.1 Curva padrão de Bradford



Anexo – 11.1: Curva padrão de Bradford da concentração de BSA em função da absorbância em 595nm.

### 8.2 Tabela Excel utilizada para efetuar os cálculos para determinação da atividade enzimática específica da proteína xilose isomerase

Amostra	Rate	Coef de ext (UA*(mol/L)-1* cm-1)	Extensão (cm)	coef
Selvagem	0.0020	4677.44	0.752	6220
Selvagem	0.0030	4677.44	0.752	6220
Selvagem	0.0020	4733.42	0.761	6220
Controle	0.0030	4677.44	0.752	6220
Controle	0.0020	4689.88	0.754	6220
Controle	0.0030	4689.88	0.754	6220
<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	0.0030	4720.98	0.759	6220
<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	0.0030	4770.74	0.767	6220
<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	0.0030	4783.18	0.769	6220
<i>xylA</i> *	0.0040	4745.86	0.763	6220
<i>xylA</i> *	0.0040	4733.42	0.761	6220
<i>xylA</i> *	0.0040	4708.54	0.757	6220
<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	0.0040	4727.2	0.76	6220

<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	0.0040	4683.66	0.753	6220
<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	0.0040	4733.42	0.761	6220
<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	0.0040	4702.32	0.756	6220
<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	0.0040	4720.98	0.759	6220
<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	0.0040	4733.42	0.761	6220
<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	0.0040	4720.98	0.759	6220
<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	0.0040	4708.54	0.757	6220
<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	0.0040	4752.08	0.764	6220
<i>xylA<sub>Bx</sub></i>	0.0070	4720.98	0.759	6220
<i>xylA<sub>Bx</sub></i>	0.0080	4720.98	0.759	6220
<i>xylA<sub>Bx</sub></i>	0.0070	4720.98	0.759	6220

Amostra	Vol. Extrato Cubeta (µL)	Vol. Total da cubeta (µL)	vol cubeta (L)	Conversão a micromol/min
Selvagem	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
Selvagem	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
Selvagem	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
Controle	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
Controle	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
Controle	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA</i> *	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA</i> *	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA</i> *	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bx</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bx</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00
<i>xylA<sub>Bx</sub></i>	35.00	300.00	0.0003	1000000.00

Amostra	Conversão a ml de enzima	U/ml	conc prot (mg/ml)	act esp (u/mg)
Selvagem	28.57142857	0.003665008	0.129122807	0.028383897
Selvagem	28.57142857	0.005497513	0.129122807	0.042575845
Selvagem	28.57142857	0.003621664	0.129122807	0.028048214
Controle	28.57142857	0.005497513	0.160350877	0.034284269
Controle	28.57142857	0.003655287	0.160350877	0.022795553
Controle	28.57142857	0.00548293	0.160350877	0.03419333
<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	28.57142857	0.005446811	0.117192982	0.046477279
<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	28.57142857	0.005389999	0.117192982	0.04599251
<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	28.57142857	0.005375981	0.117192982	0.045872893

<i>xyIA*</i>	28.57142857	0.007224342	0.196140351	0.036832511
<i>xyIA*</i>	28.57142857	0.007243328	0.196140351	0.036929312
<i>xyIA*</i>	28.57142857	0.007281602	0.196140351	0.037124447
<i>xyIA<sub>Bc</sub></i>	28.57142857	0.007252859	0.204210526	0.035516577
<i>xyIA<sub>Bc</sub></i>	28.57142857	0.007320282	0.204210526	0.035846744
<i>xyIA<sub>Bc</sub></i>	28.57142857	0.007243328	0.204210526	0.035469906
<i>xyIA<sub>Pl</sub></i>	28.57142857	0.007291234	0.258596491	0.028195409
<i>xyIA<sub>Pl</sub></i>	28.57142857	0.007262415	0.258596491	0.028083964
<i>xyIA<sub>Pl</sub></i>	28.57142857	0.007243328	0.258596491	0.028010156
<i>xyIA<sub>Bp</sub></i>	28.57142857	0.007262415	0.171578947	0.042326957
<i>xyIA<sub>Bp</sub></i>	28.57142857	0.007281602	0.171578947	0.042438785
<i>xyIA<sub>Bp</sub></i>	28.57142857	0.007214886	0.171578947	0.042049948
<i>xyIA<sub>Bx</sub></i>	28.57142857	0.012709226	0.205263158	0.06191674
<i>xyIA<sub>Bx</sub></i>	28.57142857	0.014524829	0.205263158	0.070761989
<i>xyIA<sub>Bx</sub></i>	28.57142857	0.012709226	0.205263158	0.06191674



### Anexo – 9: Análise da produção de PHA por linhagens recombinantes a partir de xilose

Dados utilizados para a construção da tabela 5.2:

<b>Xr (g/L)</b>								
Tempo(h)/ Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>BS</sub></i>	<i>xylA*</i>	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>PI</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	0.12	0.21	0.52	0.24	0.25	0.25	0.2	0.1
24	1.86	2.24	1.77	2.01	1.75	1.87	1.79	1.97
48	1.74	2.12	1.97	2.01	2.01	2.34	2.02	ND
72	1.11	1.77	1.94	1.98	2.35	2.12	1.92	1.96
<b>Açúcar (g/L)</b>								
Tempo(h)/ Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>BS</sub></i>	<i>xylA*</i>	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>PI</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	16.95	17.73	18.61	17.95	17.72	17.91	17.17	17.09
24	9.59	10.82	10.46	10.44	10.02	10.69	9.64	9.98
48	6.21	6.57	4.93	4.26	5.73	6.61	4.41	4.64
72	7.92	6.67	4.04	3.84	5.5	6.38	3.67	3.39
Consumido	9.03	11.06	14.57	14.11	12.22	11.53	13.5	13.7
%/controle			131.735986	127.57685	110.48825	104.24955	122.06148	123.8698
<b>PHB (%MSC)</b>								
Tempo(h)/ Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>BS</sub></i>	<i>xylA*</i>	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>PI</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	9.71	8.81	13.81	20.17	25.74	8.87	11.79	6.73
24	44.07	42.22	52.51	47.86	52.6	44.74	55.94	50.75
48	54.41	54.46	66.2	64.31	62.07	53.28	66.39	ND
72	61.91	58.38	68.21	68.15	60.13	55.03	68.49	68.54
<b>XT (g/L)</b>								
Tempo(h)/ Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>BS</sub></i>	<i>xylA*</i>	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>PI</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	0.14	0.23	0.61	0.30	0.34	0.27	0.23	0.10
24	3.60	3.88	3.85	3.86	3.67	3.39	4.06	3.98
48	3.81	4.66	5.38	5.63	5.38	5.02	6.06	6.04
72	2.91	4.22	6.15	6.20	5.87	4.72	6.11	6.23

<b>PHB (g/L)</b>								
Tempo(h)/ Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	<i>xylA</i> *	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	0.01	0.02	0.08	0.06	0.09	0.02	0.03	0.01
24	1.74	1.64	2.09	1.85	1.93	1.52	2.28	2.01
48	2.07	2.54	3.41	3.63	3.37	2.67	4.04	ND
72	1.8	2.45	4.2	4.23	3.52	2.6	4.18	4.27
%/controle			171.43	172.65	143.67	106.12	170.61	174.29
<b>YPHB/Xil (g/g)</b>								
Tempo(h)/ Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	<i>xylA</i> *	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	0.2351	0.2344	0.2466	0.2383	0.2390	0.2078	0.2988	0.2813
48	0.1918	0.2258	0.2434	0.2608	0.2736	0.2345	0.3143	ND
72	0.1982	0.2197	0.2828	0.2955	0.2807	0.2238	0.3074	0.3109
%/controle			128.70	134.51	127.75	101.84	139.91	141.53
<b>YXr/Xil (g/g)</b>								
Tempo(h)/ Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	<i>xylA</i> *	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	0.2364	0.2938	0.1534	0.2357	0.1948	0.2244	0.2112	0.2630
48	0.1508	0.1711	0.1060	0.1293	0.1468	0.1850	0.1426	ND
72	0.1096	0.1410	0.0975	0.1233	0.1718	0.1622	0.1274	0.1358
<b>YPHB/Xil (%Max)</b>								
Tempo(h)/ Linhagem	<i>B. sacchari</i>	Controle	<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	<i>xylA</i> *	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	108.63	113.01	95.99	101.59	92.85	94.60	109.32	113.20
48	72.10	84.81	75.57	83.27	90.43	89.98	97.29	ND
72	65.69	77.10	85.27	89.19	95.70	83.19	92.33	93.33

Tempo	Identificação	Volume	Massa seca	Quantidade xilose	Quantidade PHA %	pH
T0	<i>B. sacchari</i>	20.0000	0.0027	16.9460	9.7111	ND
T0	Controle	20.0000	0.0047	17.7320	8.8125	ND
T0	<i>xylA<sub>Bs</sub></i>	20.0000	0.0121	18.6060	13.8083	ND
T0	<i>xylA*</i>	20.0000	0.0060	17.9520	20.1677	ND
T0	<i>xylA<sub>Bc</sub></i>	20.0000	0.0068	17.7170	25.7377	ND
T0	<i>xylA<sub>Pl</sub></i>	20.0000	0.0055	17.9050	8.8666	ND
T0	<i>xylA<sub>Bp</sub></i>	20.0000	0.0045	17.1660	11.7936	ND
T0	<i>xylA<sub>Bx</sub></i>	20.0000	0.0021	17.0900	6.7256	ND
T24	<i>B. sacchari</i> - 1	10.0000	-0.1313	9.4540	45.0839	ND
T24	<i>B. sacchari</i> - 2	10.0000	-0.0153	9.8330	38.7752	ND
T24	<i>B. sacchari</i> - 3	10.0000	0.0360	9.4820	48.3390	ND
T24	Controle - 1	10.0000	0.0377	11.0270	44.3340	ND
T24	Controle - 2	10.0000	0.0410	10.1680	43.3557	ND
T24	Controle - 3	10.0000	0.0378	11.2610	38.9772	ND
T24	<i>xylA<sub>Bs</sub></i> - 1	10.0000	-0.0149	10.1780	49.0930	ND
T24	<i>xylA<sub>Bs</sub></i> - 2	10.0000	0.0369	10.5260	56.4585	ND
T24	<i>xylA<sub>Bs</sub></i> - 3	10.0000	0.0402	10.6730	51.9779	ND
T24	<i>xylA*</i> - 1	10.0000	0.0329	11.2150	46.8604	ND
T24	<i>xylA*</i> - 2	10.0000	0.0409	9.6490	48.3660	ND
T24	<i>xylA*</i> - 3	10.0000	0.0420	10.4510	48.3388	ND
T24	<i>xylA<sub>Bc</sub></i> - 1	10.0000	0.0409	9.9330	51.2736	ND
T24	<i>xylA<sub>Bc</sub></i> - 2	10.0000	0.0309	9.9650	53.6261	ND
T24	<i>xylA<sub>Bc</sub></i> - 3	10.0000	0.0384	10.1650	52.8933	ND
T24	<i>xylA<sub>Pl</sub></i> - 1	10.0000	0.0318	9.9510	45.7487	ND
T24	<i>xylA<sub>Pl</sub></i> - 2	10.0000	0.0365	11.1310	44.9946	ND
T24	<i>xylA<sub>Pl</sub></i> - 3	10.0000	0.0333	10.9980	43.4796	ND
T24	<i>xylA<sub>Bp</sub></i> - 1	10.0000	0.0371	9.7000	53.7447	ND
T24	<i>xylA<sub>Bp</sub></i> - 2	10.0000	0.0440	9.4270	58.3364	ND
T24	<i>xylA<sub>Bp</sub></i> - 3	10.0000	0.0408	9.7960	55.7437	ND
T24	<i>xylA<sub>Bx</sub></i> - 1	10.0000	0.0138	10.1780	50.8164	ND
T24	<i>xylA<sub>Bx</sub></i> - 2	10.0000	0.0398	9.8810	50.4629	ND
T24	<i>xylA<sub>Bx</sub></i> - 3	10.0000	0.0141	9.8950	50.9839	ND
T48	<i>B. sacchari</i> - 1	10.0000	0.0392	6.0780	55.8166	3.4600
T48	<i>B. sacchari</i> - 2	10.0000	0.0387	6.2910	51.6781	3.5000
T48	<i>B. sacchari</i> - 3	10.0000	0.0365	6.2730	55.7498	3.4500
T48	Controle - 1	10.0000	0.0476	6.4320	59.8931	5.3400
T48	Controle - 2	10.0000	0.0455	6.5850	50.5378	3.8700
T48	Controle - 3	10.0000	0.0466	6.6920	52.9577	3.8800
T48	<i>xylA<sub>Bs</sub></i> - 1	10.0000	0.1243	4.7120	71.8339	6.4300
T48	<i>xylA<sub>Bs</sub></i> - 2	10.0000	0.0564	4.9610	62.6505	6.4500
T48	<i>xylA<sub>Bs</sub></i> - 3	10.0000	0.0511	5.1200	64.1155	6.4200

T48	<i>xylA*</i> - 1	10.0000	0.0480	4.3180	63.5109	6.3000
T48	<i>xylA*</i> - 2	10.0000	0.0603	5.0640	62.6305	6.2300
T48	<i>xylA*</i> - 3	10.0000	0.0607	3.3840	66.8012	6.2200
T48	<i>xylA<sub>Bc</sub></i> - 1	10.0000	0.0547	5.6370	66.1091	6.4200
T48	<i>xylA<sub>Bc</sub></i> - 2	10.0000	0.0128	5.8240	60.9233	6.4200
T48	<i>xylA<sub>Bc</sub></i> - 3	10.0000	0.0528	5.7150	59.1724	6.4200
T48	<i>xylA<sub>Pl</sub></i> - 1	10.0000	0.0503	6.9130	52.1706	5.5300
T48	<i>xylA<sub>Pl</sub></i> - 2	10.0000	0.0506	6.6490	53.3787	4.8500
T48	<i>xylA<sub>Pl</sub></i> - 3	10.0000	0.0497	6.2750	54.2792	5.6700
T48	<i>xylA<sub>Bp</sub></i> - 1	10.0000	0.0645	4.5640	72.9885	6.2600
T48	<i>xylA<sub>Bp</sub></i> - 2	10.0000	0.0592	4.2490	60.6096	6.2700
T48	<i>xylA<sub>Bp</sub></i> - 3	10.0000	0.0582	4.6290	65.5673	6.0700
T48	<i>xylA<sub>Bx</sub></i> - 1	10.0000	0.0298	4.7720	ND	6.3400
T48	<i>xylA<sub>Bx</sub></i> - 2	10.0000	0.0195	4.5330	ND	6.3300
T48	<i>xylA<sub>Bx</sub></i> - 3	10.0000	0.0604	4.3480	ND	6.3500
T72	<i>B. sacchari</i> - 1	20.0000	0.0590	7.7440	63.9931	3.4000
T72	<i>B. sacchari</i> - 2	20.0000	0.0571	8.0180	66.0710	3.4100
T72	<i>B. sacchari</i> - 3	20.0000	0.0583	7.9930	55.6670	3.4000
T72	Controle - 1	20.0000	0.0948	6.5900	53.8894	3.8300
T72	Controle - 2	20.0000	0.0790	6.7480	61.8320	3.6400
T72	Controle - 3	20.0000	0.0793	7.6180	59.4281	3.5900
T72	<i>xylA<sub>Bs</sub></i> - 1	20.0000	0.0578	4.0270	67.8693	6.3500
T72	<i>xylA<sub>Bs</sub></i> - 2	20.0000	0.1233	4.0010	68.3748	6.4000
T72	<i>xylA<sub>Bs</sub></i> - 3	20.0000	0.1225	4.0820	68.3781	6.3600
T72	<i>xylA*</i> - 1	20.0000	0.1218	3.5590	69.2774	6.0700
T72	<i>xylA*</i> - 2	20.0000	0.1249	4.3350	67.8928	5.7800
T72	<i>xylA*</i> - 3	20.0000	0.1253	3.6170	67.2816	5.9100
T72	<i>xylA<sub>Bc</sub></i> - 1	20.0000	0.1131	5.4190	65.6566	6.3000
T72	<i>xylA<sub>Bc</sub></i> - 2	20.0000	0.1178	6.1160	58.9801	6.3200
T72	<i>xylA<sub>Bc</sub></i> - 3	20.0000	0.1211	5.5810	55.7477	6.3000
T72	<i>xylA<sub>Pl</sub></i> - 1	20.0000	0.0903	7.1120	54.0323	3.8200
T72	<i>xylA<sub>Pl</sub></i> - 2	20.0000	0.0946	6.5590	56.2960	3.7800
T72	<i>xylA<sub>Pl</sub></i> - 3	20.0000	0.0984	6.2010	54.7598	4.0200
T72	<i>xylA<sub>Bp</sub></i> - 1	20.0000	0.1268	3.7800	70.2072	5.9500
T72	<i>xylA<sub>Bp</sub></i> - 2	20.0000	0.1174	3.4270	68.0652	6.0400
T72	<i>xylA<sub>Bp</sub></i> - 3	20.0000	0.1222	3.7910	67.2038	5.2200
T72	<i>xylA<sub>Bx</sub></i> - 1	20.0000	0.1218	3.8070	66.0894	6.2500
T72	<i>xylA<sub>Bx</sub></i> - 2	20.0000	0.1245	3.3470	70.9239	6.3300
T72	<i>xylA<sub>Bx</sub></i> - 3	20.0000	0.1272	3.0140	68.5933	6.3300