



Universidade Federal de São Carlos



Departamento de Engenharia Química - DEQ
Laboratório de Fabricas Celulares - LaFaC
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ

Construção de Linhagens Recombinantes de *Xanthomonas sp.* para Produção de Goma Xantana

Mestrando (a): Davi Benedito Oliveira

Orientador (a): Prof. Dr. Adilson José da Silva

São Carlos – SP
2021

DAVI BENEDITO OLIVEIRA

**Construção de Linhagens Recombinantes de
Xanthomonas sp. para Produção de Goma Xantana**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva

Espaço reservado para catalogação.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Davi Benedito Oliveira, realizada em 23/04/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur (UFSCar)

Profa. Dra. Cintia Regina Sargo (CNPEM)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

*Aprender, errar, reconhecer e persistir. Aprender, errar, reconhecer e persistir.
Agradecer, honrar e valorizar. Por fim, aproveitar o resultado positivo ou negativo, o
conhecimento adquirido, as amizades conquistadas e, principalmente, a experiência.*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, que guiou e guia constantemente meus caminhos. Aos meus pais Lázara e José, que me dão suporte incondicional, e que se não fosse por eles nada disso seria possível, pelo amor, afeto e confiança que sempre depositaram em mim. Aos meus irmãos Luana e André, pelo carinho, afeto, amor, preocupação, apoio, conselhos e momentos de alegria e diversão.

Aos meus amigos e familiares, que sempre torcem e acreditam em mim, incentivam, me apoiam e sempre estão de prontidão para me ajudar caso eu precise. Ao meu cunhado Lucas, com quem morei desde o início do mestrado, e me deu suporte até o último instante.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Daniel, Gabriel, Josivan e Raquel, pela amizade, momentos de descontração, ajudas, dicas e aprendizado que me proporcionaram.

Aos meus parceiros de bancada e projeto Richard e Bruno. Richard, por iniciar com os trabalhos, me ambientar e ensinar o que eu precisava saber naquele início. Bruno, por entregar energia, ideias, dedicação ao projeto, e também por trazer novos conhecimentos. Ambos por serem amigos e companheiros.

À todas as pessoas que frequentam e trabalham no Departamento de Engenharia Química - UFSCar, que de alguma forma me ajudaram, trabalharam comigo, contribuíram com suporte, conselhos e *insights*, foram solícitos e amigos. Gostaria de citar nomes, mas não quero ser injusto ao esquecer de algum.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química - UFSCar que lecionaram as disciplinas que cursei nesse período, pela atenção e conhecimentos transmitidos, eles jamais serão esquecidos.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos L. Horta, pelos valiosos *insights*, correções e sugestões ao trabalho enquanto membro da banca do Exame de Qualificação.

À Prof.^a Dr.^a Maria Teresa M. Novo-Mansur, do Departamento de Genética e Evolução - UFSCar, pelas contribuições ao trabalho, sugestões ponderadas, correções e ideias, e por fazer parte das bancas de avaliação deste trabalho (Qualificação e Defesa).

À Dr.^a Cíntia Regina Sargo, do Laboratório Nacional de Biorrenováveis - LNBR / CNPEM, por fazer parte da conclusão e concretização desse trabalho, como membro da banca de Defesa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adilson José da Silva, por toda atenção, disposição, apoio, tranquilidade e equilíbrio para me ajudar a transpor todas as dificuldades do percurso, e pelos conhecimentos e experiência transmitidos a mim.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela liberação do equipamento e auxílio nas análises de fluorescência.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado processo 130092/2020-7.

À FAPESP, pelo apoio financeiro através do processo 2020/00432-92.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ da UFSCar, pela infraestrutura e oportunidade concedida.

À minha namorada, Aryádna Bittencourt de Souza Raspante, pela dedicação, amor e compreensão, por estar sempre comigo, por ser meu refúgio.

Resumo

Goma xantana é um polissacarídeo sintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas* que apresenta diversas aplicações industriais, como na produção de alimentos, cosméticos e extração de petróleo, entre outras. Não há produção nacional do composto e, por isso, o Brasil segue dependendo de importações de grandes quantidades do biopolímero. Atualmente o desenvolvimento de processos de produção da goma tem sido direcionado para a otimização de fatores como meios de cultivo, condições operacionais e tecnologias para recuperação do composto de interesse. No entanto, parte chave desse processo é o desenvolvimento de linhagens otimizadas. Nesse contexto, Kundlascht (2017) através de um modelo matemático determinístico para a síntese dos monômeros da goma xantana, identificou as reações catalisadas por UDP-Glicose pirofosforilase (UDPG-PP) e UDP-Glicose desidrogenase (UDPG-deH) como sendo possíveis gargalos da via de síntese da goma xantana, e previu o comportamento do sistema diante da super-expressão destas duas enzimas, apontando um aumento substancial na síntese dos monômeros da goma. A partir desses resultados, o presente trabalho buscou a validação da hipótese, e realizou a clonagem e transformação dos genes *galU* (UDPG-PP) e *Udg* (UDPG-deH) em *Xanthomonas campestris pv. campestris* (XCC) utilizando como base um vetor de amplo espectro de hospedeiros. Foram construídos então três plasmídeos, contendo cada gene individual e ambos genes em conjunto, denominados respectivamente pLACR1_deH, pLACR1_PP e pLACR1_OP. Para avaliação da produção de goma pelas linhagens transformadas com os novos plasmídeos, foram realizados cultivos em frascos agitados e com a avaliação de duas concentrações distintas de indutor. Os resultados obtidos mostraram até 21,7% a mais de produtividade (P_7) de goma xantana para a melhor linhagem recombinante quando comparada à linhagem parental, validando a hipótese inicial sobre os gargalos da via identificados pelas análises *in silico*.

Abstract

Xanthan gum is a polysaccharide produced by bacteria from the genus *Xanthomonas*. This biopolymer has many industrial applications such as in food and cosmetics production, oil extraction process, among others. There is no national production of this compound, which leads us to import high volumes of xanthan gum annually. Currently, the development of production processes for this biopolymer has focused on the optimization of growth media and operational parameters, as well as on downstream steps to recover the product from the fermentation broth. However, a key aspect of this process is the development of optimized strains. In this context, a deterministic model in Python developed by Kundlascht (2017) identified the reactions catalyzed by UDP-Glucose pyrophosphorylase (UDPG-PP) and UDP-Glucose dehydrogenase (UDPG-deH) as being the bottleneck of the xanthan gum biosynthesis pathway. The model predicted the system behavior with the enzymes' super-expression, indicating a significant rise in the gum monomers synthesis. From these results, the present work sought the hypothesis validation performing the cloning and the transformation of the genes *galU* (UDPG-PP) e *Udg* (UDPG-deH) in *Xanthomonas campestris pv. campestris* (XCC) using a broad host range plasmid as the backbone. Three plasmids were then produced containing each individual gene or both genes together, which were respectively named pLACR1_deH, pLACR1_PP and pLACR1_OP. To evaluate gum production by the new transformed strains with the constructed plasmids, cultures were performed in shake flasks with two different inducer concentrations. The results showed up to 21.7% more productivity (*Pr*) of xanthan gum for the best recombinant strain compared to the parental strain. This result validates the initial hypothesis about the pathway bottlenecks identified by *in silico* analysis.

Lista de Figuras

Figura 1: Importações brasileiras de goma xantana em milhões de dólares (US\$ FOB) na última década.....	17
Figura 2: Percentual da goma xantana adquirida pelo Brasil em 2019, referente aos principais países de origem do bioproduto.....	17
Figura 3: Representação esquemática da síntese dos açúcares precursores.....	22
Figura 4: Unidade de repetição estrutural da goma xantana.....	23
Figura 5: Representação esquemática da formação da estrutura de repetição de goma xantana.....	24
Figura 6: Primers para construção dos amplicons dos genes Udg e galU.....	41
Figura 7: Imagem representativa da clonagem individual do gene galU (UDPG-PP) para montagem do plasmídeo pRSm4_PP.....	42
Figura 8: Imagem representativa da clonagem individual do gene Udg (UDPG-deH) para montagem do plasmídeo pRSm4_deH.....	42
Figura 9: Primers para confirmação por PCR de colônia dos genes Udg e galU nos plasmídeos pRSm4_deH e pRSm4_PP.....	44
Figura 10: Diferentes configurações possíveis para os genes de interesse na construção do vetor de expressão.....	45
Figura 11: Imagem representativa da construção do plasmídeo pRSm4_Operon.....	45
Figura 12: Mapa do plasmídeo pRSm4_PP indicando pelos primers a região que sofreu mutação.....	46
Figura 13: Primers para mutagênese sítio-dirigida de um par de bases no plasmídeo pRSm4_deH (Udg).....	47
Figura 14: Mapa dos plasmídeos pETM7_mCherry (A) e pETM8_mCherry (B) indicando as regiões para anelamento dos primers utilizados na reação de CPEC.....	49
Figura 15: Primers para CPEC de uso geral para as construções pLACR1_mCherry, pLLUR1_mCherry, pLLUR2_mCherry.....	52

Figura 16: Imagem representativa das regiões amplificadas de vetor e inserto para construção via CPEC do plasmídeo pLACR1_mCherry.....	52
Figura 17: Primers para CPEC de uso na construção pLACR1_mCherry.	53
Figura 18: Imagem representativa das regiões amplificadas de vetor e inserto para as construções via CPEC dos plasmídeos pLLUR1_mCherry(A) e pLLUR2_mCherry(B).	54
Figura 19: Primers para CPEC de uso nas construções pLLUR1_mCherry e pLLUR2_mCherry.	55
Figura 20: Mapa do plasmídeo pLACR1_Operon, e das regiões amplificadas de vetor e inserto.....	56
Figura 21: Primers de CPEC para construção do plasmídeo pLACR1_Operon.....	57
Figura 22: Mapa do plasmídeo pLACR1_PP, e das regiões amplificadas de vetor e inserto.	58
Figura 23: Primers para CPEC usados na construção pLACR1_deH.....	59
Figura 24: Mapa do plasmídeo pLACR1_deH, e das regiões amplificadas de vetor e inserto..	59
Figura 25: Representação esquemática das posições das colônias na placa de cultivo.	63
Figura 26: Recipientes para medida de massa seca de goma xantana. Imagem A – Recipientes de metal. Imagem B – Placa petri.....	65
Figura 27: Bandas de PCR de amplificação dos genes galU e Udg de XCC.....	66
Figura 28: Bandas pós-digestão dos genes galU e Udg e do vetor pRSM4	67
Figura 29: Bandas de amplificação dos genes galU (A) e Udg (B) como método de screening da clonagem individual de cada gene no plasmídeo pRSM4.	68
Figura 30: Mapa do plasmídeo pRSM4_deH + sítios de restrição.	70
Figura 31: Bandas pós-digestão dos plasmídeos pRSM4_deH / PP.	71
Figura 32: Bandas pós-digestão dos plasmídeos pRSM4_deH / PP para obtenção de vetor e inserto para montagem do plasmídeo pRSM4_Operon.	72

Figura 33: Bandas pós-digestão para confirmação do plasmídeo pRSm4_Operon..	73
Figura 34: Amplificação falha dos genes galU e Udg, como método de screening por PCR de colônia, para transformação dos vetores pRSM4_PP e pRSM4_deH em células de Xanthomonas..	74
Figura 35: Bandas pós-digestão de confirmação do plasmídeo pLAC2 extraído de células de XCC transformadas.....	75
Figura 36: Bandas de PCR para amplificação dos fragmentos de inserto para reação de CPEC das construções pLLUR2_mCherry, pLACR1_mCherry e pLLUR1_mCherry	76
Figura 37: Bandas de PCR para amplificação dos fragmentos de vetor para reação de CPEC da construção pLLUR2_mCherry; pLACR1_mCherry e pLLUR1_mCherry.	77
Figura 38: Imagens das placas de transformação de E. coli DH5α.....	78
Figura 39: Gráficos de coluna mostrando dados médios de fluorescência normalizados pela concentração celular (OD ₆₀₀) para os plasmídeos testados	80
Figura 40: Bandas de PCR para amplificação dos fragmentos de inserto e vetor para reação de CPEC da construção pLACR1_Operon.....	82
Figura 41: Bandas pós-digestão (enzimas Sall e EcoRI) de confirmação pLACR1_Operon após transformação.	83
Figura 42: Bandas de PCR de confirmação de transformação pLACR1_Operon em Xanthomonas.	84
Figura 43: Bandas de PCR para amplificação dos fragmentos de inserto e vetor para reação de CPEC das construções pLACR1_PP e pLACR1_deH.	85
Figura 44: Bandas de PCR de DNA extraído para confirmação de transformação em Xanthomonas..	86
Figura 45: Bandas de PCR de colônia da confirmação de transformação em Xanthomonas com as construções pLACR1_PP, pLACR1_Operon e pLACR1_deH	86

Figura 46: Curvas de crescimento de Biomassa de XCC pelos métodos de densidade ótica e Massa Seca.	88
Figura 47: Curva de calibração Massa Seca versus Densidade ótica para <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	88
Figura 48: Curvas de crescimento da biomassa pelo tempo.....	89
Figura 49: Curvas $\ln(C_x)$ versus tempo.	91
Figura 50: Curvas de $\ln(C_x/C_{x0})$ (eixo Y) versus $(t - t_0)$ (eixo X), para ajuste linear e obtenção de $\mu_{m\acute{a}x}$ das linhagens avaliadas nesse estudo.....	92
Figura 51: Curvas de produção de goma xantana por tempo.	93
Figura 52: Representação gráfica dos dados de produtividade (P_r).....	95
Figura 53: Curvas de ΔP (eixo Y) versus ΔX (eixo X), para ajuste linear e obtenção do fator de conversão $Y_{P/X}$, das linhagens avaliadas nesse estudo.	99
Figura 54: Representação gráfica dos dados de produtividade por biomassa (δ_P).	101

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1: Composições das variantes do meio de cultura SYMP em g.L ⁻¹	34
Tabela 2: Plasmídeos base utilizados e seus respectivos antibióticos marcadores de resistência	35
Tabela 3: Parâmetros do termociclador para as reações de PCR.....	40
Tabela 4: Parâmetros de PCR para mutação sítio-dirigida.....	47
Tabela 5: Parâmetros da reação de PCR para amplificação dos fragmentos para CPEC.	50
Tabela 6: Parâmetros da reação de CPEC para reação de clonagem.	51
Tabela 7: Vetores de expressão e suas principais características, utilizados nesse trabalho na busca do melhor vetor para expressão dos genes Udg e galU em bactérias de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	60
Tabela 8: Valores de absorvância (600nm) e massa seca coletados do experimento de crescimento celular de XCC em frascos Erlenmyer para preparação da curva de calibração entre os métodos de quantificação celular.....	87
Tabela 9: Valores máximos de biomassa, $X_{máx}$, obtidos com as linhagens transformantes nas duas concentrações de indutor e para a linhagem de XCC natural.	90
Tabela 10: Valores de velocidade máxima específica, $\mu_{máx}$, para as linhagens transformantes de XCC nas duas concentrações de indutor e para a linhagem de XCC natural.	92
Tabela 11: Valores de produção final, P_F , para as linhagens transformantes nas duas concentrações de indutor e para a linhagem de XCC natural.	94
Tabela 12: Valores de produtividade, P_r , para as linhagens transformantes nas duas concentrações de indutor e para a linhagem de XCC natural.	95
Tabela 13: Dados obtidos a partir da Análise de Variância (ANOVA) para os dados obtidos de produtividade.	96

Tabela 14: Valores de percentual de acréscimo na produção final, P_F , e produtividade, P_r , para as linhagens transformantes na concentração de indutor de 0,005% em comparação com a linhagem de XCC natural.	98
Tabela 15: Valores do fator de rendimento de produto e biomassa, $Y_{P/X}$, para as linhagens transformantes nas duas concentrações de indutor e para a linhagem de XCC natural.....	99
Tabela 16: Dados obtidos a partir da Análise de Variância (ANOVA) para os dados obtidos de produtividade por biomassa. Comparativo entre linhagens.	101
Tabela 17: Comparativo de parâmetros de crescimento celular e produção de goma xantana entre dados de cultivos provenientes de estudos na literatura e dados provenientes de cultivos selecionados deste trabalho.	102
Quadro 1: Premissas e possíveis implementações futuras do modelo matemático desenvolvido em Python 2.6.6 por KUNDLATSCH (2017).....	27

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Objetivos	13
2.1. Geral.....	13
2.2. Objetivos Específicos e etapas para atingi-los.....	13
3. Desenvolvimento Teórico e Estado da Arte.....	15
3.1. Xanthomonas e a Goma Xantana.....	15
3.1.1. MERCADO DA GOMA	16
3.1.2. PRODUÇÃO NACIONAL DE PROPRIEDADE INTELECTUAL/INDUSTRIAL	18
3.1.3. PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DA GOMA.....	19
3.2. Via de biossíntese da Goma.....	22
3.3. Otimização do sistema	24
3.3.1. VETORES DE EXPRESSÃO UTILIZADOS NESTE TRABALHO	27
ePathBrick Vectors	27
pLAC2	29
4. Material e Métodos	32
4.1. Microrganismos, meio de cultura e cultivos	32
4.1.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	32
Meios de cultura.....	32
4.1.2. <i>XANTHOMONAS SP</i>	32
Meios de cultura.....	34
4.1.3. CONSERVAÇÃO DAS ESTIRPES / ESTOQUE.....	34
4.2. Construção dos vetores, clonagem das ORFs e expressão das proteínas	35
4.2.1. CÉLULAS COMPETENTES.....	35
E. coli DH5α	35
Xanthomonas sp.	36
4.2.2. TRATAMENTO DE PLASMÍDEOS/DNA.....	37
Extração	37
Separação e purificação	37
Quantificação e armazenamento	37
4.2.3. TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES	38
E. coli DH5α	38
Xanthomonas sp.	38

4.2.5. CLONAGEM DOS GENES <i>Udg</i> (UDPG-deH) E <i>galU</i> (UDPG-PP)	39
pRSM4_deH & pRSM4_PP	39
pRSm4_Operon	44
4.2.6. MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA	46
4.2.7. CPEC (<i>Circular Polymerase Extension Cloning</i>): CONSTRUÇÃO DE VETORES BASEADOS NO PLASMÍDEO pLAC2	48
pLAB1_mCherry(P _{BAD}), pLUV1_mCherry(P _{LAC}) e pLUV2_mCherry(P _{LAC} +CAP)	51
pLAB1_Operon_PP_deH.....	55
pLAB1_PP	57
pLAB1_deH.....	58
4.2.8. SCREENING DE TRANSFORMANTES	61
Screening por restrição.....	61
Screening por PCR de colônia	61
4.3. Métodos analíticos.....	62
4.3.1. AVALIAÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO.....	62
4.3.2. CRESCIMENTO CELULAR	63
4.3.4. PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	64
Cultivos	64
Extração da Goma.....	65
5. Resultados e Discussão	66
5.1. Clonagem dos genes <i>Udg</i> e <i>galU</i>.....	66
5.2. Mutação Sítio-Dirigida: eliminação de um sítio de <i>XbaI</i> do plasmídeo pRSM4 ..	69
5.3. Subclonagem: montagem da configuração Operon.....	71
5.4. Teste de vetores de expressão em <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>...	73
5.5. Montagem por CPEC de vetores de expressão com base no pLAC2	75
5.5.1. AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS VETORES pLUV1, pLUV2 e pLAB1 EM <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> PV. <i>CAMPESTRIS</i>	78
5.6. Montagem dos vetores de expressão pLAB1_Operon, pLAB1_PP e pLAB1_deH	81
5.6.1. CONSTRUÇÃO PLAB1_OPERON	81
5.6.2. CONSTRUÇÃO PLAB1_PP E PLAB1_DEH.....	84
5.7. Curva de calibração DO vs Massa Seca para <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>.....	87
5.8. Cultivos de avaliação: Produção de goma xantana	89
5.8.1. CRESCIMENTO CELULAR	89

velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)	90
5.8.2. PRODUÇÃO DE GOMA	93
C_P versus tempo	93
Produtividade volumétrica (Pr)	94
Porcentagem de ganho na produção e produtividade	97
5.8.3. RELAÇÕES DE BIOMASSA E PRODUTO	98
$Y_{X/P}$ [$gX(gP)^{-1}$]	98
δ_p ($gP/gX/h$)	100
5.8.4. COMPARAÇÃO DOS DADOS COM A LITERATURA	102
6. Conclusões	105
7. Trabalhos futuros	108
Referências	109
APÊNDICES	115
ANEXOS	116

1. Introdução

Xanthomonas é um gênero de bactérias gram-negativas fitopatogênicas. Alvos de muitos estudos sobre sua patogenicidade, elas também se destacam no campo industrial, principalmente pela produção da goma xantana. A goma é um exopolissacarídeo natural com diversos usos, desde a indústria farmacêutica e alimentícia, até em produtos agropecuários e recuperação terciária de petróleo. Tantas utilidades são devidas à sua característica altamente viscosa e estável. Esse produto já vem sendo utilizado na indústria desde os anos 60, quando foi aprovado pela *United States Food and Drug Administration (FDA)* para uso em alimentos.

Segundo alguns estudos e relatórios realizados por empresas internacionais de consultoria em mercado, baseados na produção e consumo da goma xantana no mundo, os dados de previsão de mercado são promissores, alguns atingindo a casa dos bilhões de dólares já no início da próxima década. Com o mercado aquecido, ainda segundo estes estudos, a taxas de crescimento anuais próximas a 6%, mercados emergentes na produção da goma como a América do Norte já apontam como promissores para os próximos anos, entrando na competição com os países da Ásia-Pacífico que atualmente são o principal mercado.

Na contramão dessa tendência, o Brasil ainda não produz a goma xantana comercialmente, e dados do Ministério da Economia mostram dezenas de milhões de dólares em gastos com a importação desse produto, uma balança extremamente desfavorável. Um dos motivos para essa situação está na baixa produção nacional de propriedade intelectual sobre o produto: nos últimos 10 anos o Brasil depositou apenas 12 patentes no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial).

Alguns grupos de pesquisa nacionais têm trabalhado na otimização do processo de produção da goma xantana, colhendo resultados promissores ao longo dos anos. O uso de várias matérias-primas de baixo custo, especialmente resíduos de outros processos industriais, tem sido avaliado por estes pesquisadores, e as condições ótimas de cultivo seguem sendo amplamente estudadas. Entretanto, o desenvolvimento de melhores linhagens produtoras, ponto crucial do processo, representa um nicho ainda pouco explorado, e é neste aspecto que este trabalho pretende dar sua contribuição científica e tecnológica.

O uso de ferramentas de engenharia genética pode contribuir de forma significativa no aprimoramento das linhagens produtoras, impulsionando o desenvolvimento de processos competitivos e de alto rendimento. Através da aplicação de ferramentas de bioinformática permitiu-se aliviar dois possíveis gargalos na via biossintética dos monômeros constituintes da goma xantana. A escolha dos alvos foi fruto do emprego de um modelo determinístico para o estudo da via metabólica de produção dos monômeros da goma. O trabalho atual buscou a validação experimental dos resultados obtidos e, com isso, também a validação da capacidade preditiva do modelo desenvolvido, tendo como principal objetivo a obtenção de uma linhagem com fenótipo de produção mais eficiente da goma xantana.

2. Objetivos

2.1. Geral

Partindo da hipótese de que a produção mais eficiente dos monômeros constituintes da goma xantana deve levar a uma maior produção do biopolímero, este projeto teve como objetivo geral avaliar experimentalmente as previsões obtidas anteriormente *in silico* para a construção de uma linhagem de *Xanthomonas sp.* que seja capaz de produzir maiores quantidades de goma a partir da otimização da produção de seus monômeros.

2.2. Objetivos Específicos e etapas para atingi-los

- i Avaliação/adaptação dos vetores de expressão para *Xanthomonas sp.*:
 - a) *Avaliação da funcionalidade (estabilidade) dos vetores pRSM4 e pLAC2 em Xanthomonas sp.;*
 - b) *Clonagem do gene que codifica a proteína mCherry nos vetores de expressão avaliados para utilizá-la como gene repórter em Xanthomonas sp.;*
 - c) *Comparação dos vetores de expressão avaliados e seleção do melhor vetor com base na quantificação do nível de expressão da proteína fluorescente mCherry em Xanthomonas sp.*

- ii Clonagem e expressão das enzimas UDP-Glicose pirofosforilase (UDPG-PP) e UDP-Glicose desidrogenase (UDPG-deH) de *Xanthomonas campestris pv. campestris*:
 - a) *Amplificação dos genes-alvo por PCR;*
 - b) *Clonagem individual dos insertos amplificados no vetor de expressão selecionado em (i);*
 - c) *subclonagem do gene que codifica UDPG-deH (Udg) no plasmídeo contendo o gene galU (que codifica a enzima UDPG-PP);*
 - d) *Transformação de células eletrocompetentes de “Xanthomonas sp.” com os vetores construídos e ensaios de expressão em frascos agitados.*

- iii Avaliação da produção de goma xantana pelas linhagens transformantes e não-transformantes:
 - a) *Cultivos em frascos agitados para comparar a produção de goma xantana das três linhagens transformantes e da linhagem não-transformante (com super-expressão de UDPG-PP, ou UDPG-deH, ou ambas as enzimas).*

3. Desenvolvimento Teórico e Estado da Arte

3.1. *Xanthomonas* e a Goma Xantana

Xanthomonas é um gênero de proteobactérias gram-negativas fitopatogênicas, atualmente composto por 20 espécies. São patógenas a diversos grupos de plantas, sendo um problema em plantações como de arroz e plantas cítricas. São responsáveis pela produção da goma xantana, um exopolissacarídeo útil na retenção de nutrientes e na movimentação das células bacterianas nas folhas das plantas (OTOBONI, 2007).

A goma xantana é um polissacarídeo natural de grande relevância industrial. Foi descoberta no Northern Regional Research Center do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos no ano de 1963 e passou a ser produzida industrialmente já no ano subsequente. Foi aprovada pelo órgão competente nesse país (*United States Food and Drug Administration, FDA*) para utilização em alimentos sem limitação de quantidade, fato especialmente relevante tendo em vista que sua maior aplicabilidade se dá na indústria alimentícia (Palaniraj et al., 2011).

No entanto, os usos da goma xantana são muito mais amplos. É utilizada na indústria farmacêutica como agente suspensor, estabilizante ou emulsificante (Jani et al., 2009). Na indústria petrolífera, é comumente empregada na recuperação terciária de petróleo, especialmente em reservatórios que apresentam lençóis freáticos com altas concentrações de cloreto de sódio e íons divalentes (Ghoumrassi-Barr et al. 2016). Em produtos agropecuários, é empregada para uniformizar a suspensão de fungicidas, herbicidas e inseticidas. Sua utilização é de especial importância em formulações baseadas em água, mais seguras e limpas que composições granulosas (ElShafei et al., 2010). É empregada como espessante em diversos produtos, incluindo produtos de limpeza, ácidos para remoção de ferrugem e tintas. Todas essas aplicações se devem a suas propriedades físico-químicas, já que a goma xantana se destaca perante outros polissacarídeos industriais por apresentar alta viscosidade em baixas concentrações e uma grande estabilidade, tanto diante de uma variação intensa de pH quanto de temperatura (Rosalam et al., 2006).

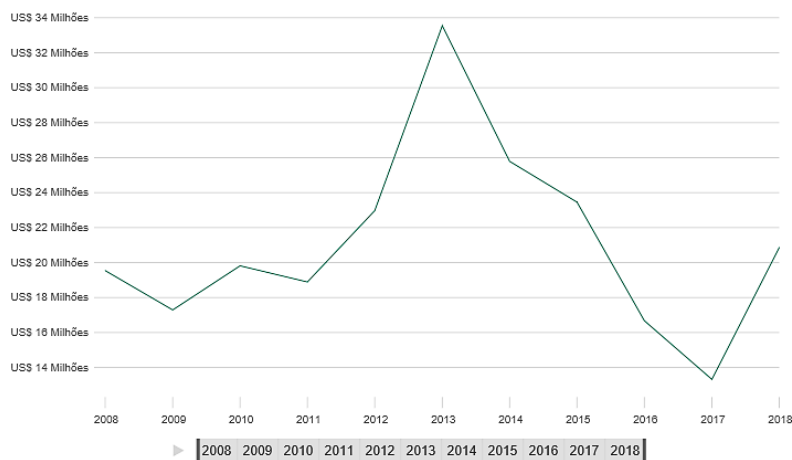
3.1.1. MERCADO DA GOMA

Com relação as previsões de mercado, alguns estudos e relatórios foram produzidos por empresas de consultoria nos últimos anos afim de destacarem as regiões que estão em alta no consumo e produção desse insumo. De acordo com relatório da empresa americana Globe Newswire (2020) é esperado um crescimento de \$798 milhões de dólares em 2018 para \$1,3 bilhão de dólares em 2025, com 7,27% de CAGR (*Compound Annual Growth Rate* ou Taxa de Crescimento Anual Composta). A empresa Global Market Insights, Inc. (2019), estima que até 2023 o tamanho de mercado da goma terá ultrapassado o crescimento de 5,5% CAGR, devido ao aumento do seu uso na indústria de bebidas, alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. O estudo da também americana Industry Experts, (2018) projeta o crescimento a 5,1% CAGR no período até 2024. Na mesma linha, o estudo da americana Market Insights Reports, (2019), prevê um crescimento de produção na taxa de 3,77%, com os principais consumidores sendo EUA, Europa e China, com mercado podendo crescer em USD 610 milhões até 2025. E para a inglesa Allied Market Research, (2017), a expectativa de mercado para a goma xantana é de atingir USD 1,076 bilhão já em 2023, a CAGR de 5,9% neste intervalo de tempo.

Ainda segundo Global Market Insights, Inc. (2019), a maior fatia desse mercado fica com a Ásia-Pacífico, com lucros na casa de USD 495 milhões até 2023. Já a americana TMR Research, (2019) aponta um pequeno problema de mercado sofrido tanto por China e Áustria, grandes exportadores do produto, que vem sofrendo com políticas anti-dumping, e desconfiança com a qualidade do produto entregue pelos fornecedores Chineses. No entanto, o mercado da Ásia-Pacífico ainda aposta na massiva demanda pelo produto na região. Neste cenário, a América do Norte se apresenta como um novo mercado promissor, com expectativas de se tornar um mercado mais maduro nos próximos anos (TMR RESEARCH, 2019).

O Brasil não produz goma xantana comercialmente, apenas para finalidade de pesquisa. Segundo os últimos dados sobre o produto disponibilizados pela plataforma online Comex Vis, fornecida pelos servidores do Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC) (MDIC, 2019), as importações da Goma Xantana, em seus estados primários, atingiram em 2018 um montante de 20,86 milhões de dólares, e até o mês de outubro de 2019, os valores para esse ano chegam

a US\$ 15,36 milhões. Os valores totais atingidos com importações, em US\$ FOB, ao longo dos últimos dez anos são apresentados na Figura 1.



*Variações em relação ao ano anterior.

Figura 1: Importações brasileiras de goma xantana em milhões de dólares (US\$ FOB) na última década. Devido à ausência de produção nacional e variada aplicabilidade na indústria, o Brasil importa grande quantidade do produto. O pico de importação ocorreu no ano de 2013, com mais de 33 milhões de dólares gastos, resultando na compra de mais de 6000 toneladas do composto. Com a desaceleração da atividade industrial no país, ocorreu uma redução nas importações, mas estas ainda assim superaram 13 milhões de dólares no ano de 2017, voltando então a crescer em 2018 (20,86), e mostrando em 2019 uma tendência a estabilização próxima aos anos anteriores a 2013. (Fonte: Figura retirada da plataforma Comex Vis (MDIC, 2019)).

Dentre os principais exportadores da goma para nosso país em 2019 (Figura 2) estão, em primeiro lugar a China com 60% do todo, seguida pela Áustria, França e Estados Unidos, com 18%, 11% e 8,6% respectivamente. Outros países figurantes nessa lista de exportadores são: Cingapura, Emirados Árabes Unidos, Hong Kong, Japão e Itália, citados por ordem de participação (MDIC, 2019).

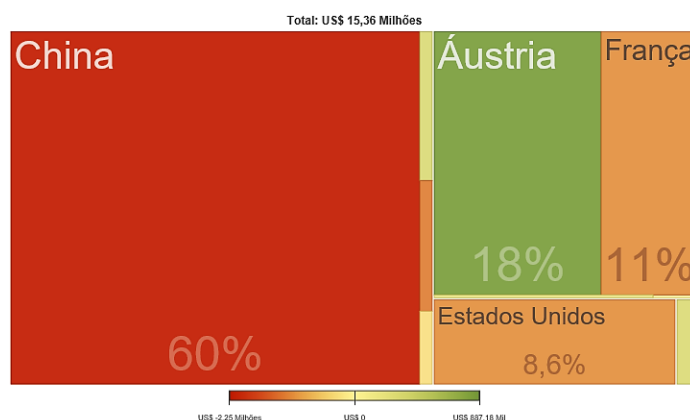


Figura 2: Percentual da goma xantana adquirida pelo Brasil em 2019, referente aos principais países de origem do bioproduto. Fonte: Figura retirada da plataforma Comex Vis (MDIC, 2019).

3.1.2. PRODUÇÃO NACIONAL DE PROPRIEDADE INTELECTUAL/INDUSTRIAL

De acordo com Machado et al. (2012), entre 1970 e 2009 o Brasil depositou apenas nove patentes envolvendo o produto no INPI. Destas, três são de titularidade da Universidade Federal da Bahia, duas da Universidade Estadual Paulista, uma do Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial da Bahia e três de inventores independentes.

Nos últimos doze anos, de 2009 em diante, esse quadro vem aos poucos se alterando. Foram depositadas outras 12 patentes no INPI, quatro pertencentes ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa BR/SE (IPT) e Universidade Tiradentes (UNIT) BR/SE, duas do Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – Departamento Regional da Bahia (SENAI DR/BA) BR/BA, duas da Universidade Federal da Bahia BR/BA, sendo uma dessas com parceria da UNIT, e por fim, a Universidade de Sergipe BR/SE, a Policam Campos de Biotecnologia Ltda BR/SP, a Associação Paraense de Cultura (APC) e a Dupont Nutrition Biosciences APS (DK), depositaram mais uma cada. Esses dados puderam ser acessados através da ferramenta de “Busca Web” fornecida pelo próprio instituto (INPI, 2021).

Das 21 patentes depositadas, doze são relacionadas a meios de cultivos, que vão desde resíduos agroindustriais a produtos orgânicos e reagentes comerciais, tendo sido utilizados o soro de leite, casca de maracujá, licor obtido do sabugo de milho, crustáceos, leite rejeitado (autoclavado, fervido ou coalhado), casca de abacaxi, açúcar demerara, extrato aquoso de vagem de algaroba, vagem de algaroba, levedura, carboidratos gerais de resíduos agroindustriais, mandioca, batata, glicerol, glicerina, sacarose e glicose. Duas patentes foram depositadas para produção integrada, uma com a goma de galactomanana e outra com polihidroxialcanoato. Uma patente para a produção de uma goma xantana-metal, incorporada com nanopartículas de metal (prata, ouro e cobre) com composição bactericida. E seis patentes voltadas ao processo de produção e recuperação da goma, envolvendo as partes de preparação, otimização da produção e secagem (ex.: spray dryer).

Sem produção nacional do composto e com baixa produção de propriedade intelectual de patentes para o processo, as indústrias brasileiras que necessitam de goma xantana foram sempre forçadas a recorrer à importação, resultando na balança comercial desfavorável apresentada anteriormente. No entanto, aumento de patentes produzidas envolvendo a produção da goma nos anos recentes, é um indicativo da

relevância do produto, que está em alta na década, em coerência com as boas previsões para o mercado no mundo, se caracterizando como uma grande oportunidade de a indústria nacional investir e reverter o quadro de déficit que apresenta.

3.1.3. PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DA GOMA

Diversos estudos delinham métodos de produção e extração de goma, percorrendo variados meios de cultura com suas composições mais ou menos ricas em nutrientes, condições de cultivo indo desde temperatura, agitação e aeração até modelos de agitadores e reatores, chegando em protocolos de extração e purificação do produto, partindo da lise e remoção celular até os métodos de precipitação do produto a partir do caldo de cultivo, comumente utilizando álcoois, e separação por centrifugação e/ou filtração.

Ao falarmos de cultivo de *Xanthomonas* é muito comum encontrarmos trabalhos que estudam diversos tipos de fontes de carbono nos meios de cultivo, como os mais comuns glicerol, sacarose e glicose, mas em sua maioria os complexos, podendo citar exemplos de meios alternativos de baixo custo como produtos e resíduos agroindustriais: cana-de-açúcar, mandioca, batata, suco de uva, palha de arroz, proteína Whey (derivado de laticínios), entre outros. No entanto, fontes de nitrogênio e demais sais importantes ao ciclo metabólico são também considerados, como magnésio, cálcio, potássio e ferro. Dentre as fontes de nitrogênio mais comuns provenientes de meios complexos que podemos citar temos extrato de levedura, extrato de malte, peptona, triptona. Alguns estudos como o realizado por GARCÍA-OCHOA et al. (2000), chegam a composições por eles consideradas ideais ao cultivo (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008; LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009).

Um exemplo desses estudos sobre composição do meio de cultivo é o estudo da substituição da fonte de carbono (sacarose) por melaço de cana-de-açúcar, que obteve os melhores resultados segundo conclusões obtidas por LUVIELMO; SCAMPARINI (2009), que alcançou concentrações de 70 g.L⁻¹, e BRANDÃO et al. (2008) que em seus estudos obteve dez vezes mais produção com caldo de cana (33,54 g.L⁻¹) em comparação com a sacarose (3,45 g.L⁻¹), valores que são superiores à média das produções encontradas na literatura que variam entre 10 e 30 g.L⁻¹

(LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Outro exemplo, foi o estudo de SAVVIDES et al. (2012) utilizando Whey como meio complexo de cultura alcançando o resultado de 28 g.L⁻¹ com o meio hidrolisado. Estudos como esses visam o reaproveitamento de resíduos através de uma destinação economicamente viável na produção de outros compostos.

Dentre as fontes de carbono mais comuns a sacarose se destaca, conseguindo maiores valores de produção de goma quando comparada à glicose e lactose, por exemplo (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008; LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). São relatados na literatura cultivos em biorreator de bancada em modo batelada simples com duração de 66 a 96 horas, quando a concentração de substrato passa a ser um gargalo na produção. Para AMANULLAH; SATTI; NIENOW (1998) a estratégia de produção em batelada alimentada é uma opção que se destaca pela possibilidade de adição intermitente de substrato (mais especificamente fonte de carbono, mantendo a concentração entre 30 e 40 g/L, com fluxo de alimentação com concentração de 10 g/L, prevenindo a inibição do crescimento e de produção da goma.

Segundo LUVIELMO; SCAMPARINI (2009) a temperatura ótima de crescimento de bactérias do gênero *Xanthomonas* fica entre 28 e 30°C, e o pH entre 6 e 8, tratando-se, portanto, de condições de cultivo facilmente controladas. Porém, um dos grandes percalços enfrentados por produtores de goma xantana é a alta viscosidade atingida pelo caldo de cultivo, e conseqüentemente a grande dificuldade de aeração. O estudo de AMANULLAH; TUTTIETT; NIENOW (1998) mostrou que a oxigenação está diretamente ligada à capacidade de produção de goma. Deste modo, estudos de agitação e aeração durante o cultivo em biorreatores é outra área de grande importância e interesse. Resultados de produção variam largamente de acordo com essas condições e parâmetros. Os autores geralmente tem como objetivo avaliar tipos de agitadores mecânicos, impelidores, taxas de oxigenação e aeração (0,2, 0,3, até 2 vvm), oxigênio dissolvido e velocidades de agitação (100, 200, até 800 rpm), sempre buscando condições ótimas de produção (AMANULLAH et al., 1998; AMANULLAH; TUTTIETT; NIENOW, 1998; SRIRAM et al., 1998). Para SRIRAM et al. (1998) a agitação deve chegar a valores próximos a 600 rpm no biorreator agitado com turbinas do tipo Rushton. Valores de aeração no biorreator devem chegar entre 1 a 1,5 vvm (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008; DAI et al., 2019), com 10 a 15% de saturação (AMANULLAH et al., 1996). Até estudos envolvendo a adição de oxigênio em fase

líquida foram testados, como no trabalho de RAO; SURESH; SURAIISKUMAR (2003) utilizando um pré-tratamento com hidroxila de HOCl seguindo o cultivo com pulsos de adição de H₂O₂, onde conseguiu-se alcançar uma correlação entre a suplementação e a produção da goma.

ALKHATEEB et al. (2018) apud SOUW & DEMAINE (1979); HARDING et. al. (1995); VOJNOV et al., (2001), apontou que o nitrogênio disponível no meio influencia a produção do exopolissacarídeo, como ocorre em espécies similares de bactérias e leveduras, sendo a maior taxa de produção de goma por células de *Xanthomonas campestris pv. campestris* atingida no momento de baixa desse nutriente, que vem acompanhada da fase estacionária de crescimento celular. ALKHATEEB et al. (2018) completa que não há na literatura, até a data do estudo, análises detalhadas do mecanismo genético regulatório por trás dessa diferença entre as fases de crescimento na biossíntese da goma. Com tudo, como foi descrito acima, a goma xantana possui utilidade na retenção de nutrientes (OTOBONI, 2007), sendo possível que esse seja um dos fatores a contribuir com esse efeito observado.

Com relação a extração de goma, os processos envolvem o uso de um solvente orgânico, e os mais comuns são o álcool etílico (etanol) ou álcool isopropílico (isopropanol). Existem variações muito grandes sobre o volume ideal de solvente, mas em geral variam de duas a oito vezes o volume de caldo. Em muitos processos ocorre a pasteurização anterior a exposição ao solvente, buscando a inativação celular, e enzimas líticas também podem ser utilizadas nesse processo. A separação das fases após a formação do precipitado é feita por centrifugação e/ou filtração. Os processos de centrifugação normalmente são realizados a altas taxas de rotação, acima de 20000xg, e para os processos de filtração já existem relatos do uso de ultrafiltração. Por fim segue-se para o processo de refino, que inclui moagem e a cristalização (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009).

Os trabalhos divergem com grande margem sobre métodos de extração. Como por exemplo: SAVVIDES et al. (2012) utiliza 88 mL de etanol com 4 mL de solução KCl 10% (m/v) para precipitar o polissacarídeo de 10 mL de amostra diluída de 2 a 5 vezes, enquanto que AMANULLAH et al. (1996) utiliza 2 volumes de isopropanol e 10% de solução KCl 2% (m/v) em amostra sem diluir. Diferentemente dos dois

anteriores, autores como ZHU et al. (2010) retiram primeiro as células por centrifugação, e extraem a goma do sobrenadante.

3.2. Via de biossíntese da Goma

A goma xantana é construída com base em nucleotídeos de açúcar citoplasmático, acetil-CoA e fosfoenolpiruvato através de uma membrana de poliisopropenol fosfato como acceptor (LELPI et al., 1983, p. 145 apud BECKER et al., 1998). A síntese dos açúcares precursores UDP-Glicose, UDP-Ácido Glicurônico e GDP-Manose ocorre a partir de uma via alternativa de metabolismo da Glicose-6-Fosfato através de reações catalisadas por cinco enzimas (Becker et al., 1998). Duas delas, XanA e XanB, apresentam atividade bifuncional e são transcritas conjuntamente (Koplin et al., 1992). A Figura 3 esquematiza os passos da via.

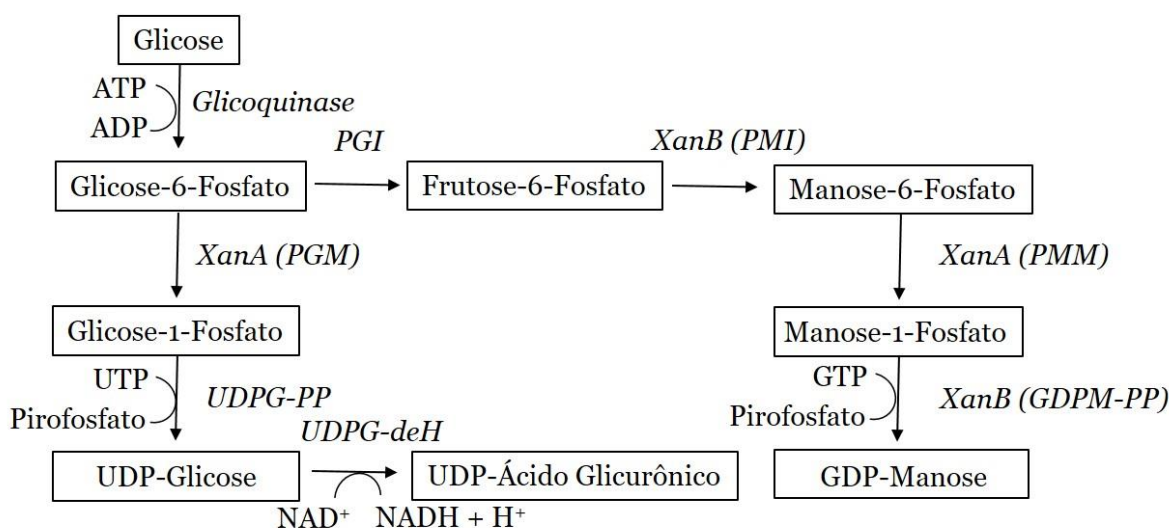


Figura 3: Representação esquemática da síntese dos açúcares precursores. PGI: Fosfoglicose isomerase; PMI: Fosfomanose isomerase; PMM: Fosfomanose mutase; PGM: Fosfoglicose mutase; UDPG-PP: UDP-Glicose pirofosforilase; UDPG-deH: UDP-Glicose desidrogenase; GDPM-PP: GDP-Manose pirofosforilase. Os três precursores são sintetizados a partir de Glicose-6-fosfato. Os cofatores UTP, GTP e NAD⁺ são necessários. Das sete reações enzimáticas, quatro são controladas pelas enzimas bifuncionais XanA e XanB (Fonte: Kundlatsch 2017).

A goma xantana possui uma estrutura pentassacarídica composta pelos açúcares precursores sintetizados na via anterior. É formada por uma cadeia de β-D-Glicose ligada a ramificações compostas de três moléculas, uma α-D-Manose, seguida de um β-D-Ácido Glicurônico, terminando em uma β-D-Manose, intermitentemente ligadas a um Grupo Acetil e um Ácido Pirúvico, como mostra a Figura 4 abaixo:

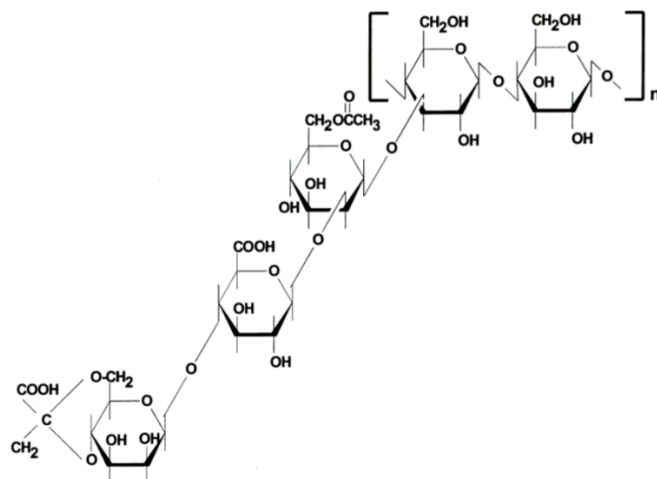


Figura 4: Unidade de repetição estrutural da goma xantana. Fonte: Jansson et al. (1975) & Becker et. al. (1998), p. 146.

A polimerização da estrutura da goma inicia-se com a transferência dos açúcares, primeiramente com a glicose-1-fosfato, para membrana interna de poliisopropenol fosfato, até completar a unidade de repetição. Acetil-CoA e fosfoenolpiruvato doam resíduos de acetil e piruvato que se unem a estrutura pentassacarídica (BECKER et. Al., 1998). São sete as enzimas responsáveis por todo processo de síntese e liberação da goma, pertencentes ao grupo de genes *gumBCDEFGHIJKLM*, localizados em um cluster de 12 kb expresso por um *operon* e um promotor (VORHÖLTER et al., 2008). Ao contrário de outros organismos que sintetizam polissacarídeos, as enzimas responsáveis pela produção dos precursores não são codificadas na mesma região dos genes *gum*: seus genes se encontram em um outro cluster com 16kb, sendo também transcritos em um único operon com doze fases de leitura aberta (ORFs) (HARDING et al., 1997).

Podemos ver na Figura 5 as reações sequenciais de adição de açúcares que formam a unidade de repetição do polímero. Acredita-se que a proteína GumJ transfere as unidades de repetição através da membrana interna e a proteína GumE realiza a polimerização com ajuda das proteínas GumD, M, H, K e I. Os resíduos ainda podem receber grupos piruvil e acetil em graus variáveis (Stankowski et al., 1987). A proteína GumL adiciona um grupo piruvil à última manose da ramificação, a GumF acetila a manose interna, e a GumG pode adicionar grupos acetil a manoses externas que não receberam grupos piruvil. Por fim, GumB e GumC realizam a formação de um poro e a secreção do composto (Vorhölter et al., 2008).

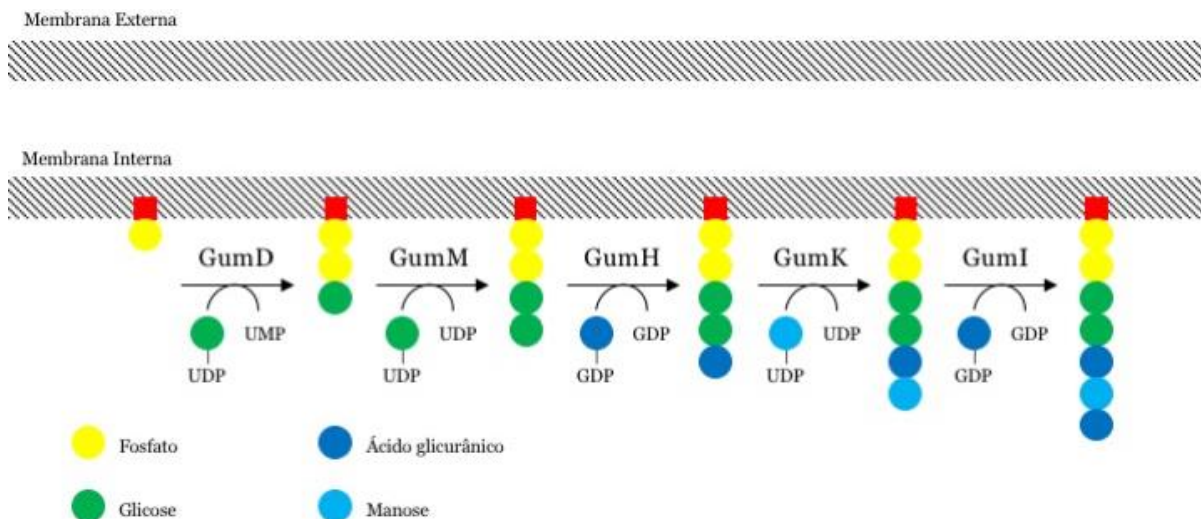


Figura 5: Representação esquemática da formação da estrutura de repetição de goma xantana. Das enzimas ilustradas, apenas GumD é uma proteína de membrana. A síntese se dá pela adição sucessiva dos precursores apresentados na Figura 3. As enzimas GumL, GumF e GumG, responsáveis pela adição de grupos piruvil e acetil, bem como as enzimas GumJ, GumE, GumB e GumC, responsáveis pela polimerização e secreção, não estão representadas (Fonte: Kundlatsch 2017).

3.3. Otimização do sistema

Existem ferramentas de Biologia Molecular e técnicas para manipulação de espécies do gênero *Xanthomonas*, com estudos sendo realizados há muitos anos (ARLAT et al., 1991; KAMOUN & KADO, 1990). No entanto, não existiam na literatura informações referentes ao desenvolvimento de linhagens otimizadas através de um processo lógico e estruturado.

Nesses dois últimos anos, surgiram alguns trabalhos voltados a identificação, compreensão e manipulação sobre genes específicos relacionados a patogenicidade das espécies, como os trabalhos de CHEN et al. (2018), GAWIN; VALLA; BRAUTASET (2017), JIANG et al. (2018), e SAMPAIO et al. (2017). SAMPAIO et al. (2017), em seu estudo voltado a redução da patogenicidade, encontrou correlação da proteína de ligação NrtT, relacionada a absorção de enxofre, com a produção da goma utilizando linhagens de *Xanthomonas citri*. A deleção desse gene na linhagem recombinante produzida diminuiu em 26% a produção de goma.

Com relação a estudos voltados para linhagens com foco na produção da goma, foram encontrados apenas dois trabalhos nesses dois anos. WU et al. (2019) alteraram as propriedades físico-químicas da goma através de linhagens recombinantes de *Xanthomonas campestris* CGMCC 15155, buscando uma goma

mais viscosa para utilização na indústria de alimentos. Para isso, as terminações das ramificações formadas na estrutura da goma passaram a ter ligações apenas com piruvato, através da deleção dos genes *gumF* e *gumG* e da superexpressão do gene *gumL*. Os resultados obtidos, segundo o autor, foram satisfatórios, com a nova goma apresentando melhores características que a goma natural. DAI et al. (2019) construíram uma linhagem de *Xanthomonas campestris* CGMCC 15155 deficiente em xanthomonadin (pigmento amarelo) capaz de produzir uma goma xantana branca que exige menor volume de álcool para sua extração, reduzindo a proporção de 7:1 para 3:1 (etanol:caldo fermentado). Para isso, o gene *vgb* (de *Vitreoscilla globin*), sob controle do promotor LacZ, foi inserido na região do gene *pigA*, inativando-o, e auxiliando, com a expressão da proteína VHb (que pode aumentar o metabolismo da *X. campestris*) a não haver perda na produção da goma pela inativação do gene *pigA*.

3.3.1. MODELO MATEMÁTICO DETERMINÍSTICO PARA PREVISÕES *IN SILICO*

Neste cenário, o primeiro passo no sentido do desenvolvimento de uma linhagem otimizada para a produção da goma xantana foi dado pelo trabalho de KUNDLATSCH (2017), com o desenvolvimento de um modelo determinístico (nenhuma aleatoriedade está envolvida na definição dos estados futuros do sistema) para a identificação das etapas limitantes na via de produção dos monômeros da goma.

Com a implementação do modelo em Python 2.6.6 e a partir da utilização de informações da literatura, foi possível sugerir que as etapas realizadas pelas enzimas UDPG-PP e UDPG-deH limitam o fluxo de produção dos monômeros. Os dados de atividade enzimática utilizados no modelo para as cinco enzimas responsáveis pela via de síntese dos monômeros da goma, foram obtidos a partir dos trabalhos de KÖPLIN et al. (1992), PAPOUTSOPOULOU & KYRIAKIDIS (1997), WEI et al. (1996), GOTO et al. (2016), BOSCO et al. (2009) e BLANCH et al. (2008). Os dados cinéticos para a enzima fosfoglicose isomerase (PGI) foram baseados na atividade em *E. coli* descrita por GAO et al. (2005).

Os demais parâmetros enzimáticos utilizados foram estimados algebricamente por KUNDLATSCH (2017) a partir dos dados recolhidos nos trabalhos consultados, utilizando da definição matemática da atividade de um extrato celular em fase estacionária para as reações da via, determinada no trabalho de KÖPLIN et al. (1992),

e realizando uma aproximação para a massa de proteína em uma célula de *Xanthomonas* através de correlações entre a massa seca de uma célula de *E. coli* (DELGADO et al., 2013) e a porcentagem proteica da massa seca de uma célula de *Xanthomonas* de acordo com SCHATSCHNEIDER et al. (2013), dada a ausência, até aquele momento, desse dado na literatura.

O modelo leva em consideração a multiplicação e divisão celular, distribuição e consumo de substrato nas células e as fases do crescimento celular, com uma entrada não abrupta na fase estacionária guiada pela concentração da fonte de carbono, assim como na ativação dos genes de virulência. Ele trabalha com condições ótimas de substrato na região de localização da enzima, utilizando os dados de velocidade máxima da reação, podendo inferir o acúmulo excessivo de intermediários e assim prever as reações que limitam a velocidade de operação do sistema, os *bottlenecks* da via de síntese (KUNDLATSCH, 2017).

O modelo também leva em consideração o mecanismo transcricional ativado por *quorum sensing*, através do fator de transcrição Clp (*Catabolite-repressor-like protein*) presente em bactérias do gênero *Xanthomonas*. Clp é um fator de transcrição que controla múltiplos fatores de virulência (TAO et al., 2009), e que é reprimido por c-di-GMP. Em altas concentrações celulares c-di-GMP é hidrolisado como resposta a mecanismos de *quorum sensing* (RYAN et al., 2006), desencadeado pela presença de DSF (*Diffusible signal factors* - fator sinalizador difusível), que é uma família de ácidos graxos sintetizados em uma série de patógenos vegetais e humanos (RYAN et al., 2015). Nessa condição, Clp fica livre de repressão, resultando em transcrição dos genes de virulência.

O modelo foi desenvolvido como uma plataforma modularizada que permite expansões conforme novos dados futuramente descritos na literatura sejam incorporados. No entanto, mesmo não sendo uma representação fidedigna da via intracelular, o modelo consegue indicar os *bottlenecks* da mesma e também propor formas de aumentar a produtividade do composto de interesse. Nesse sentido, o modelo também foi validado em comparação com dados experimentais de outros autores, sendo eles: SCHATSCHNEIDER et al. (2013), LETISSE et al. (2002), ROSEIRO et al. (1993) e JARMAN & PACE (1984).

O Quadro 1 apresenta todas as premissas utilizadas no desenvolvimento do modelo assim como os parâmetros que podem ainda ser incorporados, visando

resultados cada vez mais precisos na identificação de limitantes da via de produção da goma xantana. A construção de linhagens onde não exista tal limitação, ou seja, onde haja um maior fluxo nas reações aqui citadas, consiste na etapa seguinte, proposta neste projeto.

Quadro 1: Premissas e possíveis implementações futuras do modelo matemático desenvolvido em Python 2.6.6 por KUNDLATSCH (2017), com o intuito de elucidar o modelo e indicar pontos nos quais o código pode ser aprimorado e/ou expandido conforme novos dados de estudos enzimáticos e bioquímicos sejam publicados.

Premissas	Parâmetros a serem incorporados
Ausência de mecanismos de regulação alostéricos, influência de NADH sobre UDPG-deH desconsiderada e presença máxima de cofatores.	Mecanismos de regulação alostérica sobre a atividade enzimática.
Ausência de variação na composição proteica e na massa das células ao longo do ciclo celular	Descrição das reações de síntese de DSF*, desencadeando o mecanismo de <i>quorum sensing</i> .
Concentração de substrato tendendo ao infinito	Função correlacionando uptake de glicose e acúmulo de biomassa e goma.
Crescimento celular fixo	Novos parâmetros cinéticos enzimáticos**: k_{cat} , K_M , K_D
Meio limitado unicamente por glicose, desconsiderando limitações de nitrogênio.	Entrada na fase estacionária correlacionada ao esgotamento da fonte de nitrogênio
Modelagem apenas da via de síntese dos monômeros	Montagem e secreção do polímero
<i>Uptake</i> de glicose fixo	Modelagem das reações de <i>uptake</i> de glicose e de outros açúcares.

*DSF: *Diffusible signal factors*. **Constantes: k_{cat} - catalítica; K_M - Michaelis Menten; K_D - dissociação. Fonte: Adaptado de KUNDLATSCH (2017).

3.3.2. VETORES DE EXPRESSÃO UTILIZADOS NESTE TRABALHO

ePathBrick Vectors

Os plasmídeos *ePathBrick* constituem uma plataforma para montagem de vetores de expressão de vários genes de uma via ou geração combinatória de diversidades de uma via. Utilizando o conceito de BioBricks, os vetores utilizados contêm quatro sítios de restrição compatíveis (*AvrII*, *XbaI*, *SpeI* e *NheI*) alocados em posições estratégicas, de forma que os genes clonados podem ser facilmente organizados na forma de operons, pseudo-operons ou de forma monocistrônica, permitindo a criação de configurações diversas para expressão dos genes de uma ou mais vias. Cada um dos cinco plasmídeos *ePathBrick* apresenta uma origem de replicação diferente, mas todas pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade (Xu et al., 2012).

Esse conjunto de vetores foi originalmente desenvolvido para uso em *E. coli*, especificamente para linhagens capazes de expressar a RNA polimerase T7. Durante recente trabalho concluído (setembro de 2018) por um dos membros do grupo de pesquisa, foram desenvolvidas as versões dos plasmídeos onde o promotor T7 foi substituído pelo promotor *lacUV5* (da SILVA, et al., 2021), que é um derivado, por meio de mutação, do promotor do operon *lac*, natural de *E. coli* possibilitando sua utilização em qualquer linhagem desta bactéria.

O operon *lac* codifica enzimas responsáveis pela utilização do açúcar lactose, sendo este o indutor para expressão dos genes do operon. O promotor do operon *lac* é controlado por uma proteína de repressão expressa pelo gene *lacI*, que se liga na sequência do operador *lacO* próxima ao promotor, bloqueando a transcrição pela RNA polimerase quando não há a presença do indutor, lactose ou de seu substituto o IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo). Quando na presença do indutor, este se liga no repressor, modificando sua conformação, de forma que este não consegue mais se ligar na sequência do operador (SNYDER et al. 2013).

Este operon é também regulado, além de seu repressor natural, por repressão catabólica. Em poucas palavras, esse sistema de repressão impede a expressão de genes relacionados à utilização de lactose como fonte de carbono quando há outras melhores fontes disponíveis, como a glicose. Desta maneira, operons controlados por repressão catabólica necessitam de um fator de transcrição (*transcriptional activator*, em tradução direta, ativador transcricional), neste caso a proteína CAP (*catabolite repression protein*), regulada por mecanismos de *quorum-sensing*, e de uma pequena molécula efetora (responde a estímulos) chamada AMP cíclico (cAMP), com síntese regulada pela concentração das fontes de carbono. A ligação CAP-cAMP permite uma forte ligação da enzima RNA polimerase ao promotor *lac*, permitindo assim a transcrição dos genes. No caso da mutação do seu promotor *lac* para o promotor *lacUV5*, há a alteração de dois pares de base na região de reconhecimento *consensus* do promotor, aumentando sua afinidade pela RNA polimerase, reduzindo a dependência pela ativação por CAP-cAMP, permitindo assim a indução mesmo em meios mais ricos em outras fontes de carbono (SNYDER et al. 2013).

Destas versões de plasmídeos desenvolvidas com a presença do promotor *lacUV5*, temos os plasmídeos denominados pRSM4, pETM7 e pETM8. O plasmídeo pRSM4 se diferencia dos demais por sua origem de replicação (Ori), RSF 1030 (Alto

número de cópias – CONRAD; WOLD; CAMPBELL, 1978), enquanto os outros dois possuem a Ori pBR322/ColE1, e pelo seu marcador de resistência, o antibiótico canamicina, sendo ampicilina para os vetores pETM7/8. Ambas Ori's possuem o mecanismo de replicação Theta (SNYDER et al. 2013), o mais comum das formas de replicação de DNA, e de acordo com CONRAD et al. (1978) possuem muitas semelhanças entre si no que diz respeito as suas propriedades de replicação, sendo que a Ori RSF 1030 necessita de pelo menos oito proteínas sintetizadas pelo hospedeiro, uma característica de Ori de baixo espectro de hospedeiros, como também é o caso da Ori ColE1 (SNYDER et al. 2013). Desta forma, ambas são funcionais em células de *E. coli* e parentes próximos.

O plasmídeo pETM8 se diferencia do pETM7 pela presença de uma sequência consenso de reconhecimento da proteína CAP, de *E. coli*, sendo que a proteína CAP é análoga a proteína Clp de *Xanthomonas*. Soby e Daniels (1996), relataram que o promotor lac se mostrou funcional em *Xanthomonas*, sendo positivamente ativado pela proteína Clp. Esta sequência consenso de reconhecimento possui maior afinidade pela proteína CAP do que a sequência presente no operon *lac* já presente nos plasmídeos (EBRIGHT et al., 1989). Tendo em vista que as enzimas da via da goma xantana (operon gum) também são reguladas pela proteína Clp (He et al., 2007), sistemas baseados no promotor lac se mostram como uma possibilidade para permitir que a super-expressão das proteínas UDPG-PP e UDPG-deH siga o ciclo naturalmente encontrado nas células.

Os plasmídeos pETM7 e pETM8 contendo o gene que codifica a proteína fluorescente mCherry também foram construídos em trabalhos anteriores e usados aqui como molde para amplificação do gene da mCherry. Figuras ilustrativas das montagens dos plasmídeos aqui citados da série *ePathBrick vectors* estão disponíveis nos anexos (ANEXOS A, B & C).

pLAC2

Vetor de amplo espectro de hospedeiros, e com uso comprovado em *Xanthomonas citri subsp. citri*, o plasmídeo pLAC2 (LACERDA et al., 2017) foi construído pelo grupo do Prof. Henrique Ferreira do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Rio Claro), e gentilmente cedido pelo Prof. Ferreira através da Profa. Maria Teresa M. Novo-Mansur do Departamento de

Genética e Evolução da UFSCar para utilização neste trabalho. Apresenta-se como alternativa aos plasmídeos da plataforma *ePathBrick*.

Plasmídeos devem possuir a capacidade de se replicar de maneira independente, e para isso eles possuem uma região chamada de origem de replicação, local onde se inicia a replicação. No entanto, as células hospedeiras devem ser capazes de produzir a grande maioria das proteínas necessárias para que essa replicação aconteça. No caso de plasmídeos de amplo espectro de hospedeiros (*Broad host range*) como o pLAC2, todas as proteínas necessárias para iniciar o processo de replicação são codificadas pelo próprio plasmídeo, e desta maneira não dependem da célula hospedeira para nenhuma dessas funções (SNYDER et al., 2013). Segundo SNYDER et al. (2013), aparentemente as regiões de inicialização dos promotores e ribossomos para os genes de replicação desses plasmídeos são evoluídos a ponto de serem reconhecidos por uma larga variedade de bactérias.

A construção do plasmídeo pLAC2 teve como base o promotor induzido por arabinose oriundo da série *pBAD vectors* inserido no plasmídeo PBBR1-MCS5, da série de plasmídeos *pBBR-MCS* (LACERDA et al., 2017), de amplo espectro de hospedeiros, que de acordo com SNYDER et al. (2013) possui origem de replicação com mecanismo por círculo rolante (RC - *Rolling-circle*). O marcador de resistência desse plasmídeo é a gentamicina (LACERDA et al., 2017). O promotor pBAD faz parte do operon *ara* de *E. coli*, sendo este, responsável pela conversão e utilização do açúcar L-arabinose como fonte de carbono para outras vias metabólicas e como indutor para expressão dos genes em seu promotor. O pBAD é ativado pela proteína de ativação AraC, que se liga na região de ativação, *araI*, quando na presença do indutor, L-arabinose, e é reprimido quando a proteína se liga nos operadores *araO₁* e *araO₂* na ausência do indutor. O *ara* também é um operon controlado por repressão catabólica, possuindo uma região para ligação da proteína CAP para a devida regulação, como ocorre no operon *lac* (SNYDER et al. 2013).

Inicialmente os plasmídeos *ePathBricks* foram utilizados para clonagem dos genes selecionados para serem superexpressos em bactérias de *Xanthomonas*, e acreditava-se naquele momento na funcionalidade desses vetores nesse gênero de bactéria, dado que as células de *Xanthomonas* adquiriram a resistência ao antibiótico Canamicina provinda do vetor pRSM4 após a transformação. No entanto, as células não foram capazes de manter a presença do plasmídeo no seu interior, sendo

impossível detectá-lo posteriormente pelos métodos de *screening* utilizados, como será mostrado na seção de resultados. Por conta deste fator, o pLAC2 foi positivamente testado (item 5.4 – Seção 5. Resultados e Discussão), e então utilizado como base para as construções dos vetores de expressão dos genes de interesse para aumento da produção da goma xantana.

4. Material e Métodos

4.1. Microrganismos, meio de cultura e cultivos

Neste trabalho utilizou-se bactérias do gênero *Xanthomonas* objetivando seu aprimoramento na produção da goma xantana, e a bactéria *Escherichia coli* para construção dos vetores de expressão.

4.1.1. *Escherichia coli*

Para os procedimentos de clonagem foi utilizada a linhagem de *E. coli* DH5 α que possui mutações específicas para maximizar sua eficiência de transformação (CGSC, [s.d.]).

Os cultivos foram conduzidos utilizando meio Luria-Bertani (LB) para a cultura de células e placas de Petri contendo LB Ágar para o crescimento de colônias isoladas. A temperatura para os cultivos foi de 37°C com agitação de 200 a 230 rpm.

Meios de cultura

O meio Luria-Bertani é composto por triptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹ e NaCl 5 g.L⁻¹. Para LB Ágar, adiciona-se 15 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico. O meio utilizado para a recuperação das células de *E. coli* DH5 α competentes após o processo de transformação, é chamado SOC e é composto por triptona 20 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹, NaCl 5 g.L⁻¹, 20 mL de glicose 1M, 5 mL de MgCl₂ 2M e ajuste de pH em 7,0 por NaOH 5 M, com glicose e MgCl₂ sendo adicionados ao restante da solução após autoclavagem e resfriamento até aproximadamente 50°C, em condições estéreis. Ambos os meios são autoclavados a 121°C pelo tempo mínimo de 15 minutos.

4.1.2. *Xanthomonas* sp.

A linhagem de *Xanthomonas* ATCC® 33913™ (*X. campestris* pv. *campestris*) foi adquirida da Fundação André Tosello, código nº CCT 5268, e utilizada para a extração

do DNA genômico, expressão das proteínas recombinantes e produção da goma xantana.

Para o cultivo, realizou-se um estudo sobre quais condições de cultivo e componentes de meio de cultura eram mais utilizados de acordo com a literatura (AMANULLAH; SATTI; NIENOW, 1998; AMANULLAH et al., 1996; BORGES; VENDRUSCOLO, 2008; DAI et al., 2019; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009; RAO; SURESH; SURAIHKUMAR, 2003; SAVVIDES et al., 2012; SRIRAM et al., 1998; SUBHASH et al., 2015; ZHU et al., 2010). A partir das informações levantadas, foram avaliadas condições como, temperatura, pH, agitação e tempo de cultivo, e as fontes de carbono, nitrogênio e alguns outros sais essenciais para estabelecimento das condições de cultivo a serem empregadas neste trabalho.

A temperatura ótima de cultivo está situada entre 28 a 30°C. O tempo de cultivo em placa é de aproximadamente 48 horas, já o pré-inóculo é geralmente deixado em cultivo “overnight” de 8 a 12 horas. Para o inóculo, ou cultura em frascos, o tempo para alcance da fase exponencial varia entre 6 e 8 horas, quando pré-inoculado com 10% do volume, e, aproximadamente, 48 horas de cultivo para atingir todas as fases de crescimento e morte celular (tempos estimados para cultivos utilizando os meios SYMP descritos abaixo).

Para os procedimentos de biologia molecular os meios utilizados são os mesmos descritos para *E. coli*, com tempos entre 7 e 10 horas para atingir densidade ótica de 0,8 de absorvância à 600 nm, em volumes variando entre 4 e 10 mL com crescimento em tubos Falcon.

A fim de obter uma melhor aeração requerida pela alta viscosidade atingida pelo caldo de cultivo devido a presença da goma xantana, os frascos Erlenmeyer utilizados possuem aletas que aumentam a turbulência do meio melhorando assim a transferência de massa interna e com isso permitindo maior acesso ao oxigênio. Além disso, os volumes de caldo de cultivo dentro dos recipientes para culturas em Shaker, como tubos Falcon e frascos Erlenmeyer, não ultrapassaram 15% do volume total do recipiente.

Meios de cultura

O meio adaptado no qual se chegou após a avaliação e estudo dos componentes mais utilizados para o cultivo de *Xanthomonas sp.*, foi nomeado SYMP, e foi ajustado para as fases apresentadas na Tabela 1, abaixo:

Tabela 1: Composições das variantes do meio de cultura SYMP em g.L⁻¹.

Meios de cultura SYMP			
Componentes (g.L ⁻¹)	Placa	Pré-inóculo	Frasco
Agar	24	-	-
Sacarose	20	20	35
Extrato de levedura	5	3	4
Extrato de malte	3	3	4
Peptona	4	3	4
CaCO ₃	5	-	-
K ₂ HPO ₄	-	-	5,27
KH ₂ PO ₄	-	-	2,81
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	2
NaCl	-	-	1
Uréia	-	0,4	0,4
FeSO ₄	-	-	0,002

Fonte: Autor

Todos os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Os componentes dos meios de Pré-inóculo e Frasco foram autoclavados em duas soluções distintas, chamadas de parte A e parte B para evitar a formação de produtos insolúveis e indesejados: Parte A contendo as fontes de carbono e nitrogênio, magnésio e ureia, e Parte B contendo a solução tampão fosfato de potássio e demais sais. A Parte A compreende 65% do volume total da solução.

Os valores de pH para os meios foram ajustados para 7,0. Para o Pré-inóculo o ajuste foi realizado pela adição de NaOH 5 M. O pH do meio de Frasco foi ajustado e mantido através de solução tampão de fosfato de potássio. O ajuste de pH deste meio não foi realizado através de soluções básicas devido a reação da hidroxila OH⁻ com o sal de magnésio, produzindo hidróxido de magnésio, que por sua vez apresenta baixíssima solubilidade em água.

4.1.3. CONSERVAÇÃO DAS ESTIRPES / ESTOQUE

O meio para conservação é composto por solução glicerol 50% (v/v) e caldo de cultivo (na fase exponencial de crescimento celular) na proporção 3:2 (caldo:glicerol). Geralmente utilizou-se os volumes de 720 µL de caldo para 480 µL de glicerol.

Ao final, a conservação das células foi feita em ultrafreezer a -80°C e/ou submersas em nitrogênio líquido. E o estoque de placas com as cepas a serem trabalhadas foram mantidas a 4°C por no máximo 3 meses, segundo AMANULLAH et al. (1996).

Antibióticos foram adicionados ao meio contendo células transformadas de acordo com o marcador de resistência presente no vetor de expressão inserido (Ver Tabela 2). A exceção fica por conta da resistência natural das células de *Xanthomonas* para *Ampicilina*.

Tabela 2: Plasmídeos base utilizados e seus respectivos antibióticos marcadores de resistência

Plasmídeo	Resistência	Concentração antibiótico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
pETM7/pETM8	Ampicilina	80
pRSM4	Canamicina	50
pLAC2	Gentamicina	20*/10**

*Meio sólido. **Meio líquido

Fonte: Autor.

4.2. Construção dos vetores, clonagem das ORFs e expressão das proteínas

4.2.1. CÉLULAS COMPETENTES

E. coli DH5 α

Para o preparo das células utilizou-se o protocolo adaptado de Cloreto de Rubídio para células competentes. Duas soluções tampão chamadas de TFB1 e TFB2 foram preparadas com as seguintes composições:

- **TFB1:** RbCl 100 mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, Acetato de Potássio 30 mM, CaCl_2 10 mM e glicerol 15%;
- **TFB2:** CaCl_2 75 mM, RbCl 10 mM, MOPS 10 mM e glicerol 15%.

Após dissolução, as soluções foram esterilizadas por filtração em filtro $0,22 \mu\text{m}$, deixadas para descansar em gelo e armazenadas posteriormente a 4°C por algumas horas antes do uso. Essas soluções não são estáveis, por esse motivo não devem ser armazenadas por muito tempo, sendo aconselhável o uso quase imediato, podendo armazená-las por um período máximo de uma noite. Os volumes preparados das

soluções tampão eram o suficiente para a preparação de 250 alíquotas de 100 µL de meio com células competentes.

Para o início dos procedimentos foram inoculados 5 mL de meio LB com células *E. coli* DH5α (estoque) em tubo Falcon de 50 mL estéril, cultivadas *overnight* a 37°C e 200 rpm. Na sequência, 3,125 mL do volume de inóculo foram transferidos a 312,5 mL de LB, contendo 20 mM de MgSO₄, igualmente distribuídos em dois frascos Erlenmeyer estéreis de 1000 mL. O cultivo nos frascos seguiu a 37°C e 200 rpm até que a DO atingisse valores entre 0,4 e 0,6 a 600 nm. Após isso, os cultivos foram resfriados em gelo por 30 minutos e em seguida centrifugados a 10000xg por 10 minutos a 4°C, em dois tubos de centrífuga estéreis de 250 mL. O sobrenadante foi descartado e os pellets (precipitado) ressuspensos em 125 mL da mesma solução tampão TFB1, transferindo todas as células para o mesmo tubo de centrífuga. A solução foi então mantida em gelo por 5 minutos, e repetiu-se a centrifugação desta vez a 3000xg por 5 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspensado em 25 mL de solução tampão TFB2, sendo mantido em gelo por 1 hora. Finalmente todo volume foi alíquotado em alíquotas de 100 µL em eppendorfs estéreis, imediatamente transferidos para congelamento em gelo seco. As células foram então armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

Xanthomonas sp.

Para o preparo das células eletro-competentes de *Xanthomonas* utilizou-se como base o protocolo descrito por WANG et. al. (2016). Para o procedimento utilizou-se solução 250 mM de sacarose.

Inicialmente inoculou-se em 10 mL de LB uma única colônia e o cultivo foi conduzido a 28°C e 200 rpm por um período “overnight” em um tubo Falcon de 50 mL estéril. A cultura foi então distribuída igualmente em 4 tubos Falcon de 15 mL e centrifugada a 10000 xg por 5 minutos a temperatura ambiente. Os pellets foram ressuspensos em 1 mL da solução de sacarose e transferidos a eppendorfs de 1,5 mL estéreis. Centrifugações e ressuspensões em 1 mL da solução de sacarose foram repetidas três vezes a 12000xg por 2 minutos em temperatura ambiente. Finalmente os pellets contidos nos 4 eppendorfs foram ressuspensos nos mesmos 100 µL da solução de sacarose e transferidos para um único eppendorf contendo as células

concentradas. Por último o volume foi alíquotado em 50 µL em 2 eppendorfs e armazenado em ultrafreezer a -80°C.

4.2.2. TRATAMENTO DE PLASMÍDEOS/DNA

Extração

Para as extrações dos plasmídeos de suas células hospedeiras, foi utilizado o kit *Wizard® Plus SV minipreps DNA purification system (Promega®)* e seguido seu protocolo padrão para as etapas de lise celular, lavagem de toxinas e contaminantes e eluição dos plasmídeos em água para biologia molecular (*Sigma Aldrich®*) na temperatura aproximada de 50°C, através de colunas de filtração, sendo todas as etapas realizadas através do uso da centrifugação (Minicentrífuga *HERMLE® Z 216 MK®*).

Separação e purificação

As separações das moléculas de DNA foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose 1% por 30 a 45 minutos de 70 a 90 Volts e tendo como marcador de peso molecular o 1kb Plus DNA Ladder da empresa *Cellco®* ou o GeneRuler DNA Ladder Mix da empresa *ThermoFisher®*. A purificação se deu a partir do uso do kit *Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega®)*, que permitiu a obtenção do DNA de interesse a partir da excisão de sua banda do gel. O protocolo para purificação padrão presente no kit, assim como o protocolo de extração, utiliza-se de colunas de filtração para lavagem e eluição (H₂O Biomol *Sigma Aldrich®*, a 50°C) através de centrifugações.

Quantificação e armazenamento

As concentrações de DNA obtidas nos procedimentos foram quantificadas utilizando-se espectrofotômetro (*Nanodrop 2000, Thermo Scientific®*) e as soluções foram armazenadas a -20°C em freezer.

4.2.3. TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES

E. coli DH5α

A transformação seguiu o protocolo adaptado do livro de SAMBROOK & RUSSELL (2001).

O vial (ependorf) contendo 100 µL de células competentes, estocado a -80°C no ultrafreezer, foi colocado em gelo para o descongelamento das células. Foi adicionado então, em ambiente estéril (Capela de fluxo de ar laminado), pelo menos 50 ng de DNA plasmidial contidos em aproximadamente 1 a 10 µL de solução ou reação de ligação. As células + plasmídeos foram então incubadas em gelo por 30 minutos antes de receberem o choque térmico, realizado com incubação em banho-maria a 42°C por 45 segundos. Imediatamente após o choque foram adicionados 250 µL de meio SOC (tópico 4.1.1). A etapa seguinte se deu com a incubação em shaker agitado a 200 rpm e a temperatura de 37°C pelo tempo de 1 hora.

Do volume total de 360 µL contidos no vial, 50 µL foram plaqueados em LB Agar e o antibiótico específico ao gene de resistência do vetor inserido. Os 310 µL restantes foram centrifugados a 10000xg por 2 minutos, descartou-se 240 µL do sobrenadante, e as células foram então ressuspensas no meio restante. 50 µL do meio ressuspensado também foram plaqueados nas mesmas condições do primeiro volume plaqueado.

Xanthomonas sp.

A preparação das células competentes utilizadas nesse processo foi descrita anteriormente no tópico 4.2.1. O procedimento para a transformação das células de *Xanthomonas* foi baseado nos protocolos descritos por GOTO et al. (2016) e WANG et al. (2016).

A transformação para essa bactéria foi realizada por eletroporação. Os procedimentos de transformação foram conduzidos com 1 vial/ependorf contendo 50 µL de células competentes, descongeladas em gelo, e com 100 a 200 ng de DNA (mais comumente 200 ng), não ultrapassando o limite de 10 µL de solução. A eletrotransformação foi então conduzida em cubetas para eletroporação com gap de 0,1 cm (vão entre os eletrodos) incubadas em gelo, em eletroporador *BIO-RAD Gene-Pulser Xcell™*. Foi selecionada a função “*Exponential Protocol*” do eletroporador com um

pulso configurado para 15 KV/cm, capacitância de 25 μ F e resistência de 200 Ω . O pulso foi realizado com menos de 1 minuto após a mistura das células competentes com os plasmídeos. Após o pulso, imediatamente foi adicionado 1 mL de meio LB na cubeta, realizou-se gentilmente a mistura do meio e todo conteúdo foi transferido a um eppendorf de 1,5 mL estéril. As células eletro-transformadas foram então incubadas a 28°C em shaker agitado a 200 rpm por 2 horas.

Do volume total de meio com células transformadas, 100 μ L foram plaqueados em LB Agar com o antibiótico específico ao gene de resistência do vetor inserido.

4.2.5. CLONAGEM DOS GENES *Udg* (UDPG-deH) E *galU* (UDPG-PP)

Os experimentos realizados nesta etapa contaram com a participação do aluno Richard Daniel Cruz durante a pesquisa para seu trabalho de conclusão de curso (TCC).

O vetor inicialmente selecionado para as clonagens dos genes foi o pRSM4 da plataforma *ePathBrick vectors*. Os plasmídeos pETM7 e pETM8 não foram aproveitados para esse fim, pois seu marcador de resistência é o antibiótico Ampicilina, ao qual as células de *Xanthomonas* são naturalmente resistentes.

pRSM4 deH & pRSM4 PP

A clonagem dos genes foi realizada no plasmídeo pRSM4 pertencente a plataforma *ePathBrick vectors*. Inicialmente, os dois genes de interesse foram amplificados por PCR, a partir do DNA genômico da linhagem *Xanthomonas campestris pv. campestris* (ATCC® 33913™), extraído com o kit comercial *AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep kit* (Axygen®).

PCR (Polymerase Chain Reaction)

As reações de PCR foram realizadas utilizando protocolo adaptado do *Taq High Fidelity Pol Master Mix* (Cellco), com auxílio de um termociclador (*Px2 Thermal Cycler*, Thermo Electron Corporation®) nas condições descritas na Tabela 3, onde $T_{m_{for}}$ representa a temperatura de *melting* do primer *forward* e $T_{m_{rev}}$ representa a temperatura de *melting* do primer *reverse*.

Tabela 3: Parâmetros do termociclador para as reações de PCR. T_m = temperatura de *melting*, for = *forward*, rev = *reverse*.

nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Etapa
1	95	5'	Desnaturação
30	95	15"	Desnaturação
	$(T_{m_{for}} + T_{m_{rev}})/2 - 5$	30"	Anelamento
	72	(1'/Kb)	Extensão
1	72	5'	Extensão
1	4	∞	Resfriamento

Fonte: Autor.

A reação da PCR foi composta por 25 µL de *Taq High Fidelity Pol Master Mix 2X*® (*Cellco*®), 2,5 µL de solução *Mix Primer* (10 pmol/µL de cada primer), aproximadamente 50 ng de DNA genômico (molde), e \underline{X} µL de água (*Sigma Aldrich*®) suficientes para atingir o total de 50,0 µL de meio reacional.

Os primers necessários para ampliações de genes por PCR foram desenhados com o auxílio do software *SnapGene*®, através da ferramenta “*Add Primer*” (para clonagens por restrição/ligação). As sequências gênicas utilizadas foram extraídas de bancos de dados como NCBI e EcoCYC. Os primers desenhados foram avaliados com relação a formação de *hairpins*, homodímeros e heterodímeros através da plataforma *Oligo Analyzer* da *IDT* (Integrated DNA Technologies). Os primers foram sintetizados pela empresa *Exxtend Biotecnologia* (São Paulo – Brasil).

Os primers utilizados possuem sítios de restrição nas extremidades 5' à região de anelamento, de modo a criar regiões complementares entre vetor e inserto. As sequências de cada primer e seus sítios de restrição estão apresentadas na Figura 6 abaixo.

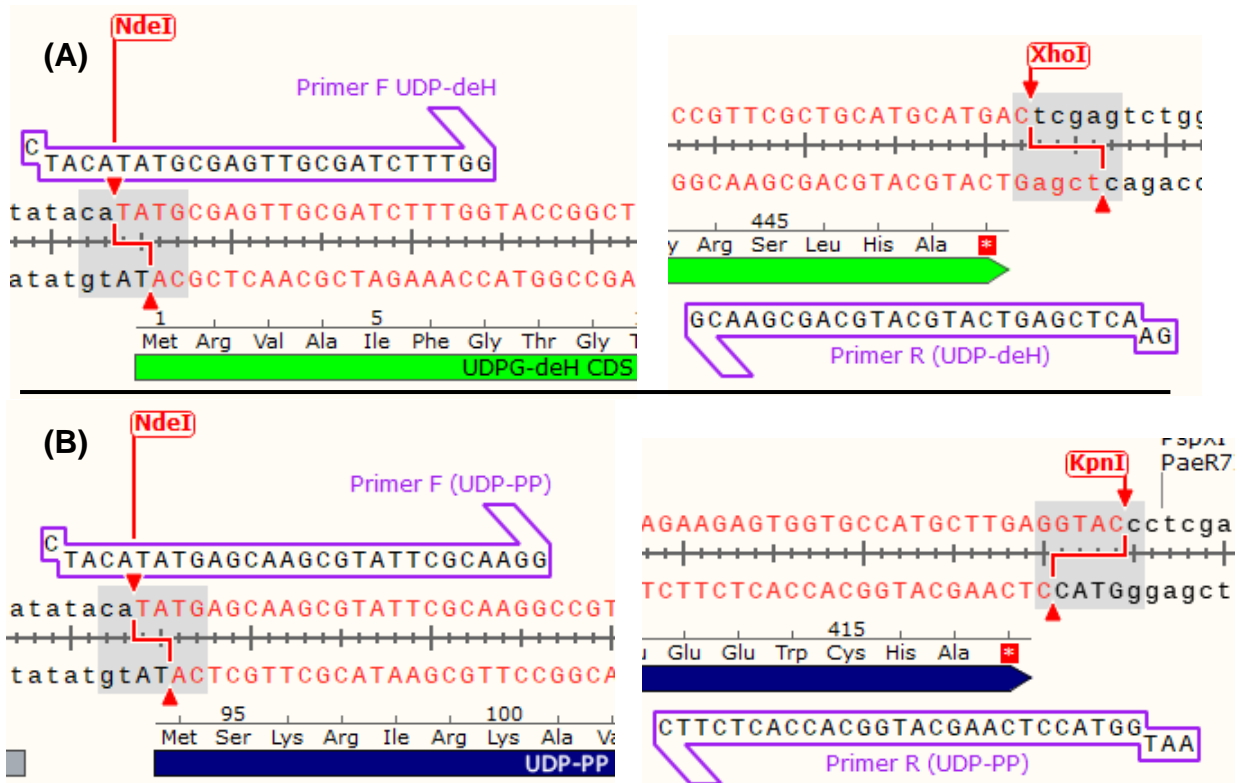


Figura 6: Primers para construção dos amplicons dos genes *Udg* e *galU*. Imagem A (*Udg*) – primers forward (esquerda) e reverse (direita). Imagem B (*galU*) – primers forward (esquerda) e reverse (direita). Imagem ilustrativa dos primers anelados às construções finais, pRSm4_deH (imagem A) e pRSm4_PP (imagem B). Fonte: Autor, criado com SnapGene®.

Depois de purificado a partir de gel de agarose (procedimento descrito no tópico 4.2.2), o DNA amplificado foi digerido com as enzimas de restrição adequadas (*NdeI* e *KpnI* para *galU*, e *NdeI* e *XhoI* para *Udg*) e ligado no vetor pRSM4 (Figuras 7 & 8).

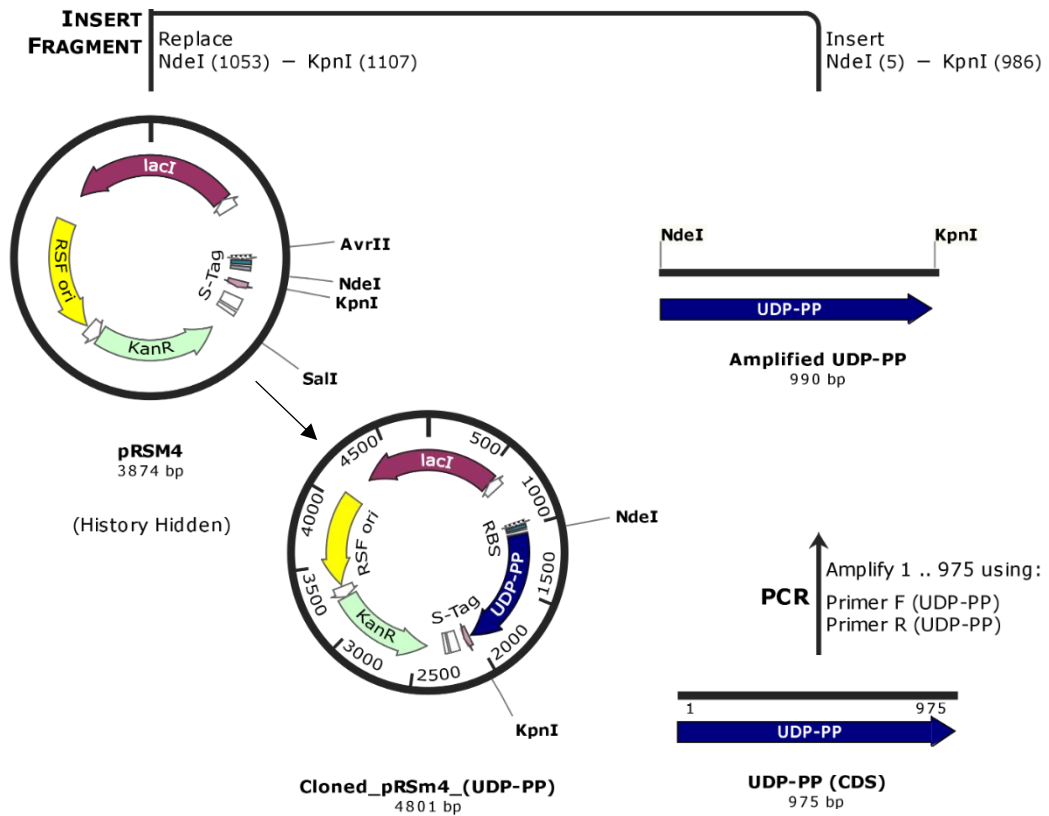


Figura 7: Imagem representativa da clonagem individual do gene *galU* (UDPG-PP) para montagem do plasmídeo pRSM4_PP. Gene (direita) PCR -> amplicon digestão (*NdeI* + *KpnI*) -> ligação no vetor (pRSM4) (esquerda) digerido (*NdeI* + *KpnI*) -> pRSM4_PP. Fonte: Autor, criado com *SnapGene*®.

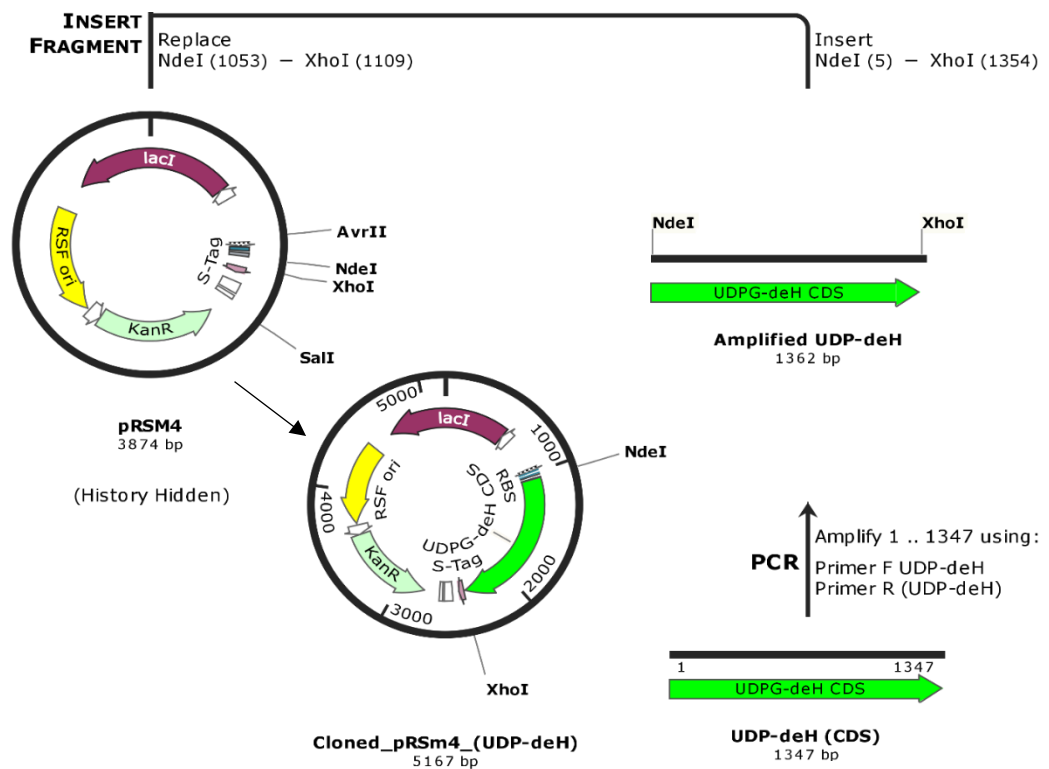


Figura 8: Imagem representativa da clonagem individual do gene *Udg* (UDPG-deH) para montagem do plasmídeo pRSM4_deH. Gene (direita) PCR -> amplicon digestão (*NdeI* + *XhoI*) -> ligação no vetor (pRSM4) (esquerda) digerido (*NdeI* + *XhoI*) -> pRSM4_deH. Fonte: Autor, criado com *SnapGene*®.

Digestão e ligação enzimática

As digestões foram conduzidas utilizando as enzimas de restrição dos sistemas Fast Digest (*Thermo Scientific*®) e Anza (*Thermo Scientific*®, *Invitrogen*®). Inseto e vetor passaram por dupla digestão, e as reações continham 3 µL de Fast Digest Green Buffer (tampão) ou 2 µL Anza Red Buffer (tampão), 1 µL de cada enzima de restrição, 500 ng a 1 µg de DNA, e eram completadas até um volume final de 30 µL com água. Os recipientes com as reações foram incubados a 37°C pelo período de 2 a 4 horas e então adicionou-se 5 µL de fosfatase alcalina (*Thermo Scientific*®) nas reações de digestão dos vetores, mantendo a incubação por 1 hora adicional, e realizando a inativação, a 65°C por 15 minutos, após esse período. Os produtos de digestão foram purificados a partir de gel de agarose como descrito no tópico 4.2.2.

As ligações foram então realizadas obedecendo a proporção molar de 3:1 de inserto para vetor, proporção essa calculada para a quantidade de 75 ng de vetor. O cálculo leva em consideração o tamanho de cada molécula de DNA e é realizado com o auxílio da calculadora online disponível em: <<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>>. As reações então foram montadas contendo 4 µL de Fast Ligase Buffer (tampão) (*Thermo Scientific*®), 1 µL da enzima Fast Ligase (*Thermo Scientific*®), 75 ng de vetor, uma quantidade X de inserto (de acordo com o calculado), e completadas para 20 µL com água (*Sigma Aldrich*®). A incubação das reações foi a temperatura ambiente por um período “overnight”. Por fim, alíquotas de 10 µL das reações eram utilizados para a transformação, processo descrito no tópico 4.2.3.

Por fim, para as confirmações por PCR de colônia das construções pRSm4_deH e pRSm4_PP, foram desenhados primers (Figura 9) que se anelavam nas construções com o vetor, e não apenas no gene.

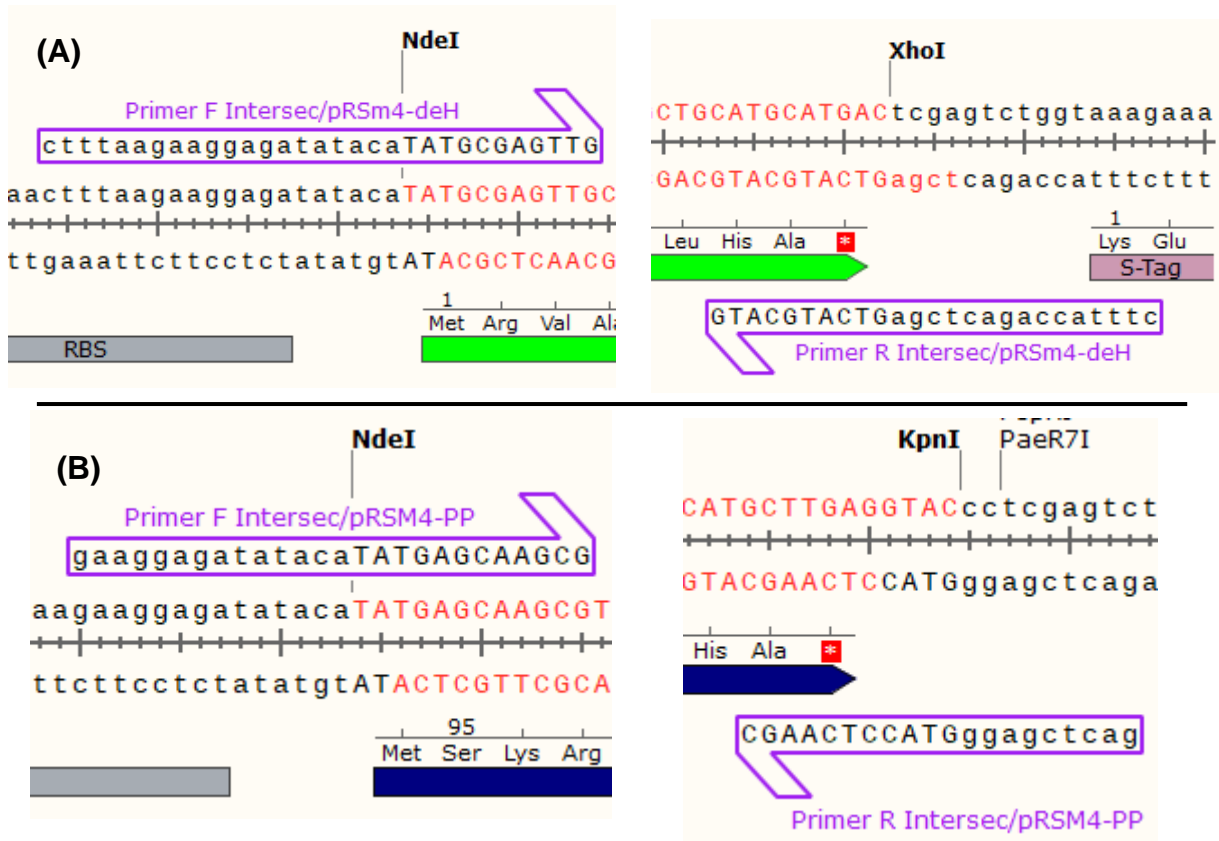


Figura 9: Primers para confirmação por PCR de colônia dos genes *Udg* e *galU* nos plasmídeos pRSm4_deH (imagem A) e pRSm4_PP (imagem B). Imagem A (*Udg*) – primers forward (esquerda) e reverse (direita). Imagem B (*galU*) – primers forward (esquerda) e reverse (direita). Fonte: Autor, criado com SnapGene®.

pRSm4 Operon

Após a clonagem individual dos dois genes, os mesmos foram combinados em um único plasmídeo na configuração *operon* (Figura 10), onde a dupla de genes é precedida pela sequência do promotor e seguida por um terminador. Nessa configuração o primeiro gene na ordem tende a ser transcrito em maior número de cópias do que o gene subsequente devido à eventos de transcrição incompleta do *operon* pela RNA polimerase. Por esse motivo, foi escolhido o plasmídeo contendo o gene *galU* para ser o vetor a receber o inserto com o gene *Udg*, colocando a expressão da enzima UDPG-PP à frente da enzima UDPG-deH. Essa escolha foi baseada na ordem de necessidade de cada proteína na via de biossíntese dos monômeros da goma (tópico 3.2).

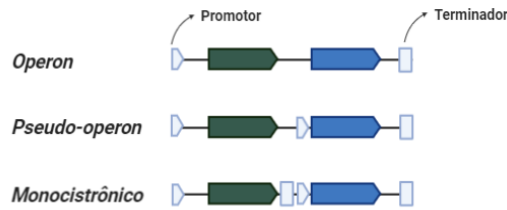


Figura 10: Diferentes configurações possíveis para os genes de interesse na construção do vetor de expressão. Operon: promotor -> gene 1 -> gene 2 -> terminador; Pseudo-operon: promotor -> gene 1 -> promotor -> gene 2 -> terminador; Monocistrônico: promotor -> gene 1 -> terminador -> promotor -> gene 2 -> terminador. Fonte: Autor, criado com BioRender.com

Para a montagem dessa configuração (Figura 11), o plasmídeo doador foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *SalI* e o fragmento excisado foi purificado a partir do gel de agarose e ligado no plasmídeo receptor previamente digerido com as enzimas de restrição *SpeI* (*BcuI*) e *SalI*. Foi então realizada a transformação como descrita no tópico 4.2.3 para células de *E. coli* DH5 α competentes. Para realização dessa clonagem necessitou-se eliminar previamente o segundo sítio de *XbaI* presente no pRSM4, e para isso realizou-se uma mutagênese sítio-dirigida, descrita no próximo tópico.

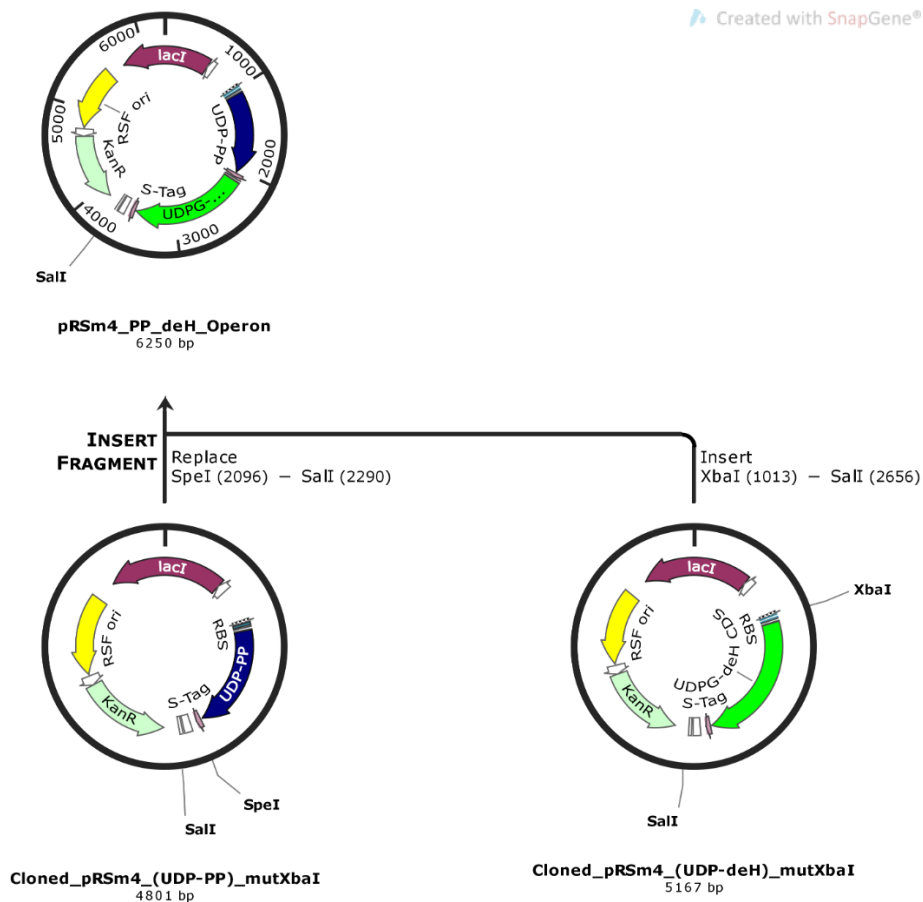


Figura 11: Imagem representativa da construção do plasmídeo pRSm4_Operon. Plasmídeo doador (pRSm4_deH) digestão (*SalI* + *XbaI*) -> inserto *Udg* -> ligação do inserto no vetor (pRSm4_PP) digerido (*SalI* + *SpeI*) (esquerda) -> pRSm4_Operon. Fonte: Autor, criado com SnapGene®.

4.2.6. MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA

A mutação de um par de bases dentro de um dos dois sítios de restrição de *XbaI* (Figura 12) presentes no plasmídeo pRSM4_deH se fez necessária para a utilização do sítio remanescente como ponto único de clivagem para retirada do gene *Udg* (UDPG-deH), quando este já estava clonado no vetor (pRSM4_UDPG-deH), permitindo assim uma fácil purificação do DNA a partir do gel de eletroforese, que passou então a apresentar apenas duas bandas distantes ao invés de três bandas próximas.

Esta modificação realizada por mutagênese dirigida utiliza primers referentes a esse procedimento para amplificar o plasmídeo por meio de PCR. Os primers usados carregam consigo a alteração de apenas um par de bases comparado à sequência de DNA original. Essa mutação visava a alteração da sequência do sítio de restrição da enzima *XbaI*, **TCTAGA**, trocando a base timina (**T**) central por uma citosina (**C**) no primer *reverse* e a base adenina (**A**) central por uma guanina (**G**) no primer *forward*. O desenho dos primers, utilizando a ferramenta “Add Primer”, levou em consideração o protocolo proposto no QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (*Agilent Technologies*). A Figura 13 mostra os primers desenhados, suas sequências e a maneira como se anelam no plasmídeo.

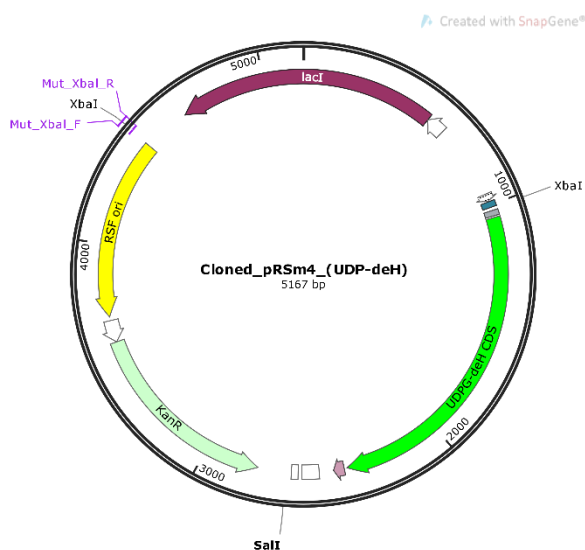


Figura 12: Mapa do plasmídeo pRSM4_PP indicando pelos primers a região que sofreu mutação. A eliminação de um dos sítios de *XbaI* impede a formação de três bandas com tamanhos próximos ao plasmídeo ser digerido com as enzimas *XbaI* e *SalI*. Fonte: autor, criado com SnapGene®.

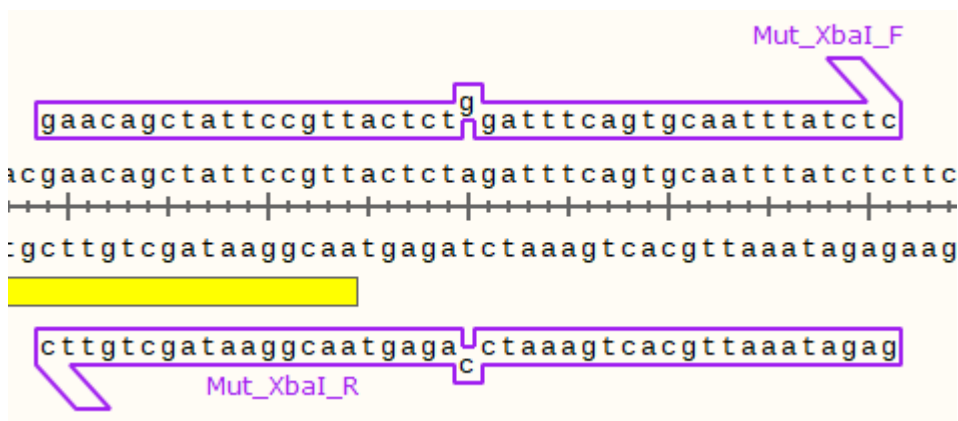


Figura 13: Primers para mutagênese sítio-dirigida de um par de bases no plasmídeo pRSm4_deH (*Udg*). Primer forward (Mut_XbaI_F) e reverse (Mut_XbaI_R). A base não-anelada na imagem dos primers irá substituir a base original após a amplificação do plasmídeo com os primers. Fonte: Autor, criado com *SnapGene*®.

Para determinação da composição da reação e dos parâmetros da PCR foram usados como base os protocolos descritos no *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)* e no *Invitrogen™ Platinum™ Superfi™ II PCR Master Mix - USER GUIDE*. O meio reacional foi constituído de 10 µL de *Platinum™ Superfi™ II PCR Master Mix (ThermoFisher Invitrogen®)*, 8 µL de H₂O (*Sigma Aldrich®*), 1 µL de solução *Mix Primer* e 1 µL de DNA plasmidial na concentração de 10 ng/µL, totalizando 20 µL de reação.

A temperatura de anelamento quando utilizando a *Platinum™ Superfi™ II DNA Polymerase* é de 60°C. O tampão de reação contido no *PCR Master Mix* da enzima polimerase contém aditivos próprios que estabilizam os primers e auxiliam no anelamento a esta temperatura, não necessitando ajuste desta temperatura para cada par de primers. Desta forma, os ciclos de temperatura para o termociclador estão listados, com respectivos tempos, na tabela 4 abaixo:

Tabela 4: Parâmetros de PCR para mutação sítio-dirigida. Menor número de ciclos na segunda etapa e temperatura de anelamento fixada pelo tampão da polimerase.

nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Etapa
1	95	30"	Desnaturação
18	95	30"	Desnaturação
	60	1'	Anelamento
	72	3' (30"/Kb)	Extensão
1	72	5'	Extensão
1	4	∞	Resfriamento

Fonte: Autor.

Após o término da PCR, foi realizada digestão com a enzima de restrição *DpnI* Fast Digest (*ThermoFisher Scientific*®) com o intuito de clivar e eliminar o DNA molde metilado pela célula hospedeira, pelo período de 1 hora a temperatura de 37°C, seguido de inativação por 15 minutos a 65°C. Realizou-se então a transformação segundo descrito no tópico 4.2.3 em células de *E. coli* DH5α competentes.

4.2.7. CPEC (*Circular Polymerase Extension Cloning*): CONSTRUÇÃO DE VETORES BASEADOS NO PLASMÍDEO pLAC2

Após ser verificado que o plasmídeo pRSM4 não se mostrou funcional em XCC (conforme discutido adiante na seção de resultados), decidiu-se avaliar o uso do plasmídeo pLAC2 (Lacerda et al., 2017) que foi descrito como funcional em *X. citri*. Entretanto, para confirmar se o pLAC2 seria funcional também em XCC, foi realizada a clonagem de um gene repórter que codifica uma proteína rosa fluorescente (mCherry) neste plasmídeo, sendo possível assim, avaliar sua expressão em XCC.

Após a confirmação de seu funcionamento em XCC, foi testada também a substituição do promotor induzido por arabinose presente no pLAC2 pelo promotor lacUV5 precedido ou não por uma sequência consenso de reconhecimento da proteína CAP de *E. coli* (EBRIGHT et al., 1989). As sequências do promotor lacUV5, da sequência CAP e da proteína mCherry foram amplificadas a partir dos plasmídeos pETM7_mCherry e pETM8_mCherry disponíveis no laboratório (dados não publicados), cujos mapas são apresentados na Figura 14.

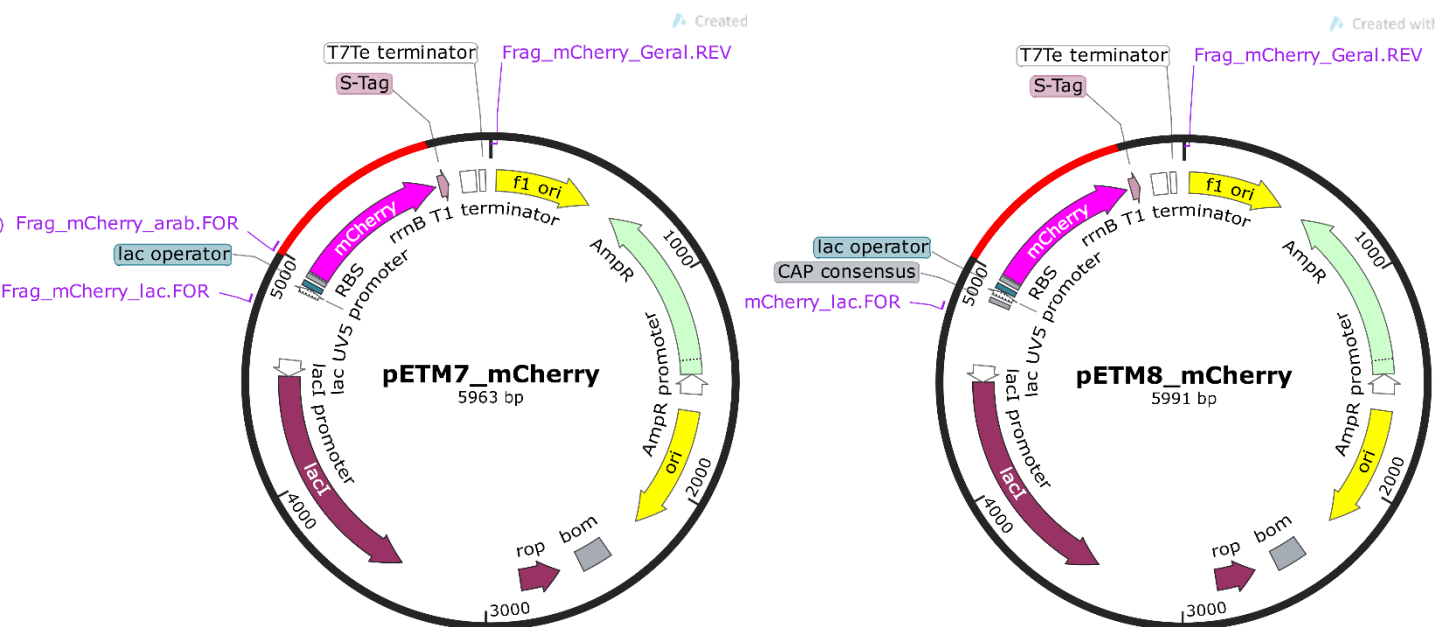


Figura 14: Mapa dos plasmídeos pETM7_mCherry (A) e pETM8_mCherry (B) indicando as regiões para anelamento dos primers utilizados na reação de CPEC. Amplificadas duas regiões a partir do pETM7_mCherry (LacUV5 + RBS + mCherry + terminador & RBS + mCherry + terminador) e uma região a partir do pETM8_mCherry (CAP consensus + LacUV5 + RBS + mCherry + terminador) para três construções com base no plasmídeo pLAC2.

Os procedimentos e parâmetros para realização da CPEC seguiram como base o protocolo padrão do método, dado por QUAN & TIAN (2011), com algumas adaptações referentes ao protocolo de uso da enzima polimerase *Invitrogen™ Platinum™ Superfi™ II PCR Master Mix - USER GUIDE*.

O método foi então dividido em duas etapas, onde a primeira compreendeu o desenho dos primers e a reação de PCR para amplificação dos vetores e insertos. E a segunda etapa tratou da purificação dos moldes de DNA plasmidial a partir do gel de agarose, realizada como descrito no tópico 4.2.2, e a reação de PCR responsável por unir os moldes de DNA e amplificar o plasmídeo completo.

Os primers empregados nesse procedimento possuem regiões de complementariedade entre as orientações *reverse* do vetor e *forward* do molde e *vice-versa*. A utilidade desses primers foi a criação de regiões coesivas nas extremidades do vetor e do inserto, de forma a tornar possível o seu anelamento durante o processo de PCR. Os desenhos dos primers realizados com ajuda da ferramenta “*Gibson Assembly*”, levaram em consideração os parâmetros presentes no protocolo descrito por QUAN & TIAN (2011).

Nessa primeira etapa, as reações para PCR foram montadas contendo 25 μL de *Platinum™ Superfi™ II PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific®), 2,5 μL de solução *Mix Primer*, 1 μL de DNA plasmidial (molde) na concentração de 10 ng/ μL e 21,5 μL de H_2O (Sigma Aldrich®), totalizando 50 μL de reação. Os parâmetros para o termociclador estão descritos na Tabela 5 abaixo. Para esta etapa seguiu-se o protocolo “2-Step” da polimerase para primers com tamanhos maiores de 30 nucleotídeos, evitando formação de estruturas secundárias e otimizando a reação.

Tabela 5: Parâmetros da reação de PCR para amplificação dos fragmentos para CPEC. Primers com temperaturas de anelamento próximas as temperaturas de extensão, utilização do protocolo “2-step” da polimerase.

nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Etapa
1	98	30"	Desnaturação
30	98	10"	Desnaturação
	72	(30"/Kb)	Anela. & Extensão
1	72	5'	Extensão
1	4	∞	Resfriamento

Fonte: Autor.

Após a amplificação dos moldes de DNA (Vetores e Insetos), os mesmos passaram por digestão enzimática com a enzima de restrição *DpnI* Fast Digest (ThermoFisher Scientific®), incubados por 1 hora a 37°C, seguido de inativação a 65°C por 15 minutos.

Entrando na segunda etapa, os *amplicons* passaram por eletroforese para separação em gel, foram extraídos e purificados, seguindo o protocolo do tópico 4.2.2 como anteriormente citado. A reação de PCR para a junção das partes e montagem dos plasmídeos foi conduzida para 200 ng de vetor, e quantidade de inserto na proporção molar de 2:1 de inserto para vetor, calculada através da calculadora online disponível em <<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>>.

A reação de CPEC foi então montada contendo em um volume total de 20 μL , 10 μL de *Platinum™ Superfi™ II PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific®), 200 ng de vetor, quantidade X de inserto calculada, e uma quantidade Y de H_2O (Sigma Aldrich®) suficiente para completar o volume total da reação.

Os parâmetros para o termociclador levaram em conta a temperatura de anelamento pedida pela *Platinum™ Superfi™ II DNA Polymerase*, assim como descrito no tópico anterior (4.2.6) para mutagênese sítio-dirigida, e estão listados na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6: Parâmetros da reação de CPEC para reação de clonagem.

nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Etapa
1	98	30"	Desnaturação
15	98	10"	Desnaturação
	60	30"	Anelamento
	72	(30"/Kb)	Extensão
	72	5'	Extensão
1	4	∞	Resfriamento

Fonte: Autor.

Finalizada a reação de montagem e amplificação, foi realizado o processo de transformação como descrito no tópico 4.2.3 em células *E. coli* DH5α competentes.

pLACR1_mCherry(P_{BAD}), *pLLUR1_mCherry(P_{LAC})* e *pLLUR2_mCherry(P_{LAC}+CAP)*

A reação da CPEC foi utilizada com o intuito de realizar a subclonagem dos genes contidos nos plasmídeos da plataforma *ePathBrick vectors* (pETM-mCherry e pETM8_mCherry) para o plasmídeo de amplo espectro de hospedeiros pLAC2.

O primeiro passo nesse sentido foi dado realizando a transferência das sequências relacionadas ao promotor *LacUV5* e a sequência consenso de reconhecimento da proteína CAP para o pLAC2, substituindo o seu promotor, P_{BAD}, produzindo assim os plasmídeos chamados pLLUR1 e pLLUR2, onde o plasmídeo pLLUR1 contém apenas a sequência do promotor *LacUV5* e o plasmídeo pLLUR2 recebeu além do promotor a sequência para a CAP. Essas sequências foram subclonadas em concomitante com a proteína fluorescente mCherry, que foi também subclonada para o plasmídeo pLAC2. O objetivo da clonagem do gene dessa proteína foi de possuir um marcador quantitativo de força de expressão para cada um dos três sistemas de expressão gênica, para fins comparativos.

Para a realização das construções foram sintetizados seis primers, dos quais, dois (chamados "gerais") puderam ser aproveitados nas três construções. Seriam eles, o primer *forward* do vetor (*Vector_mCherry_Geral.FOR*) pLAC2 e o primer *reverse* do fragmento/inserto (*Frag_mCherry_Geral.REV*) mostrados na Figura 15.

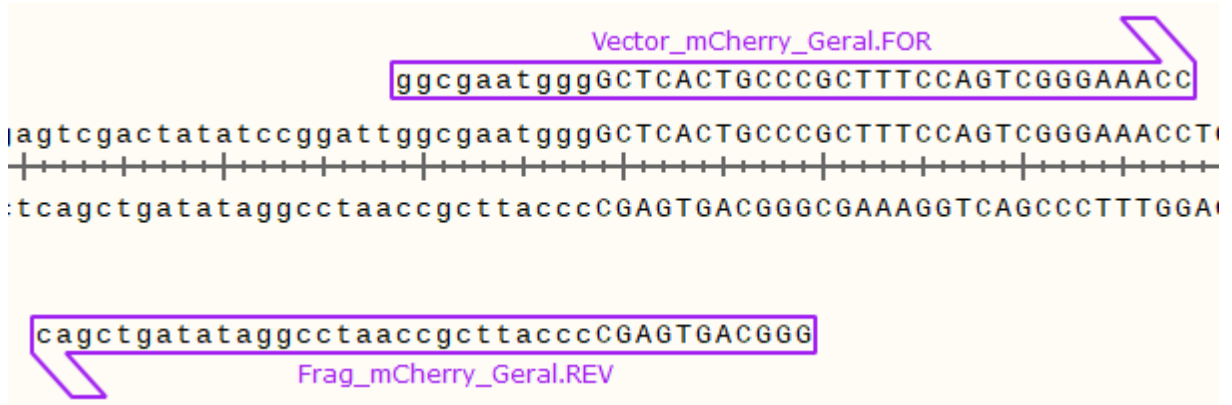


Figura 15: Primers para CPEC de uso geral para as construções pLACR1_mCherry, pLLUR1_mCherry, pLLUR2_mCherry. Primer forward para vetor (Vector_mCherry_Geral.FOR) e reverse para inserto (Frag_mCherry_Geral.REV), ambos possuem regiões complementares que se anelam na construção final (representada na imagem). Fonte: Autor, criado com SnapGene®.

A Figura 16 ilustra as regiões amplificadas dos moldes de DNA do vetor e inserto para a construção do pLACR1_mCherry, e as regiões aneladas formando o plasmídeo final. Para este caso, os primers *forward* para o fragmento (*Frag_mCherry_arab.FOR*) e *reverse* para o vetor (*Vector_mCherry_arab.REV*) são específicos para esta construção e estão apresentados na Figura 17, pLACR1_mCherry. A nomenclatura “arab” em seus nomes é em referência ao promotor P_{BAD}, induzível por arabinose, presente no vetor de destino.

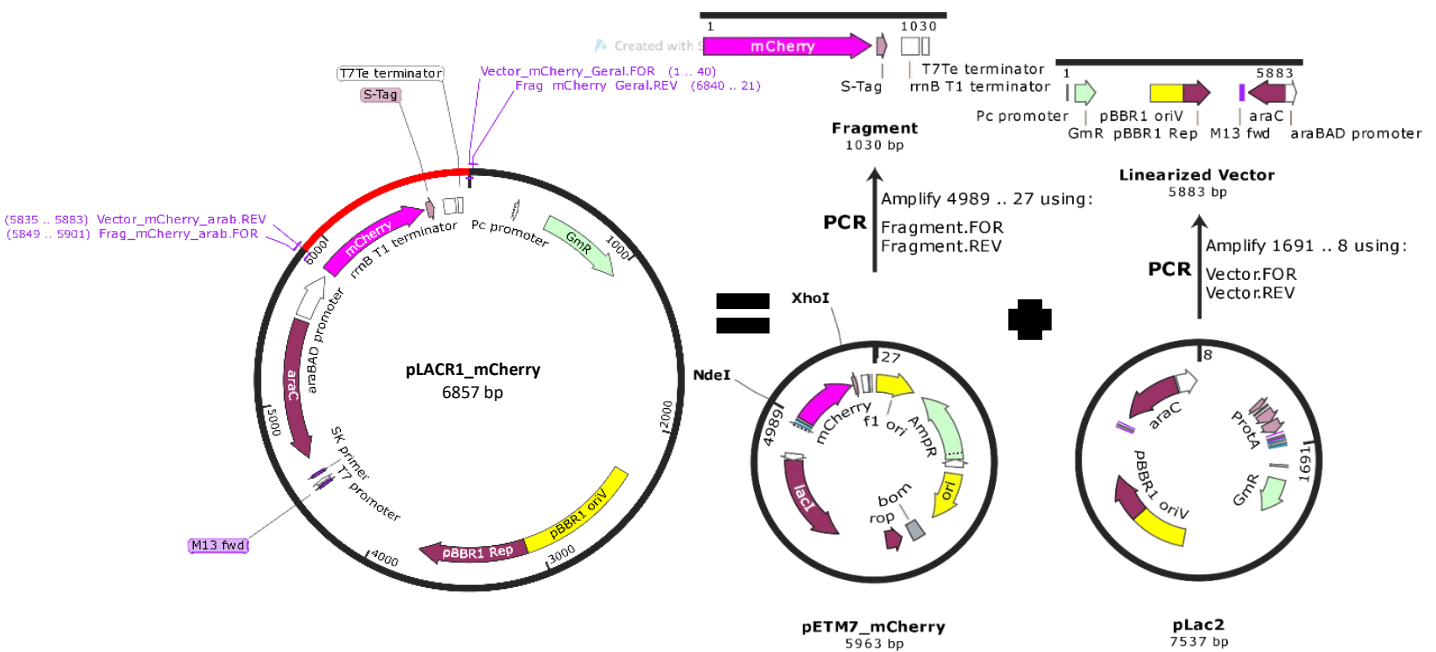


Figura 16: Imagem representativa das regiões amplificadas de vetor e inserto para construção via CPEC do plasmídeo pLACR1_mCherry. Amplificação por PCR dos fragmentos de vetor e inserto (direita) -> purificação + CPEC -> pLACR1_mCherry. Fonte: Autor, criado com SnapGene®.

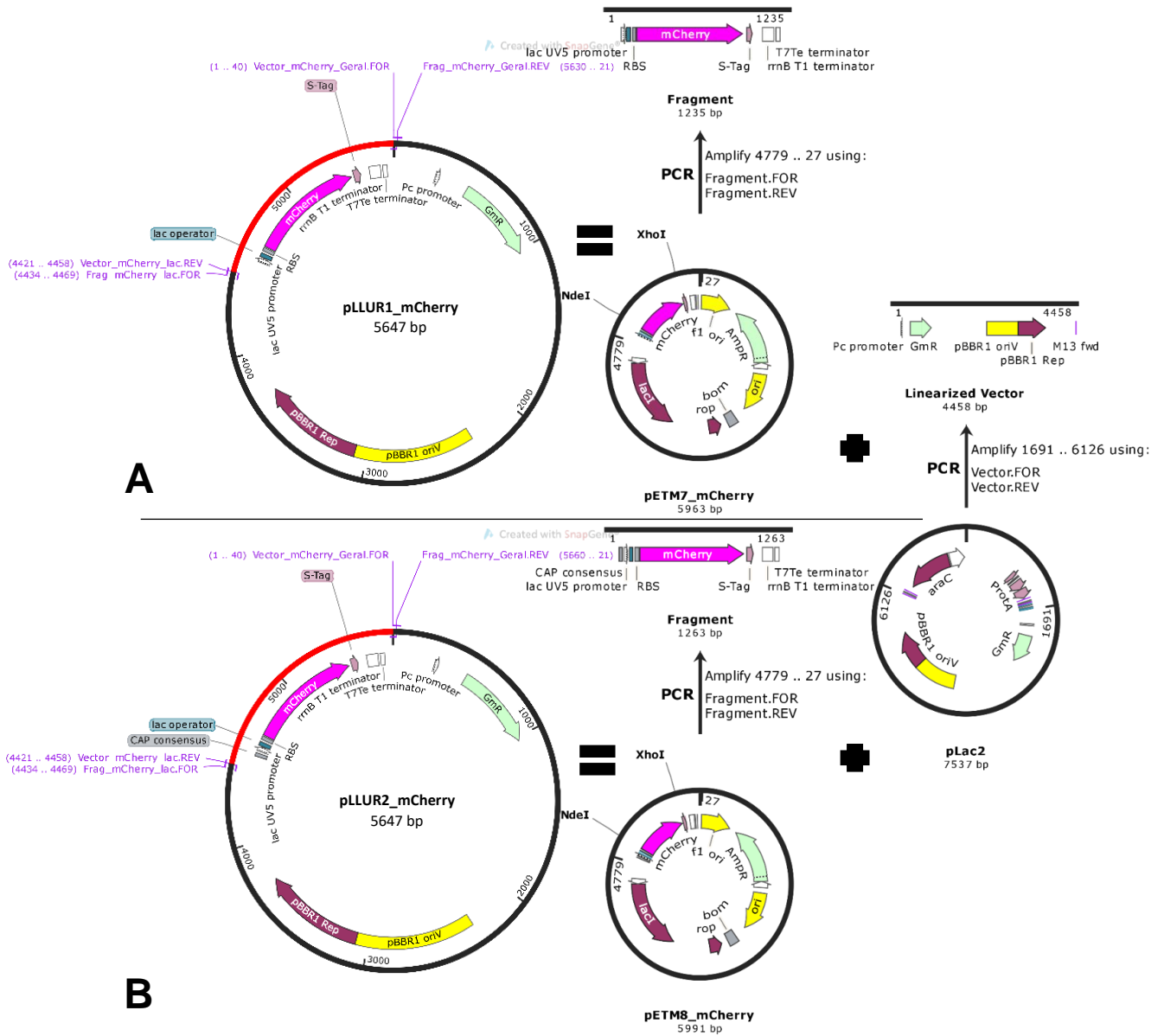


Figura 18: Imagem representativa das regiões amplificadas de vetor e inserto para as construções via CPEC dos plasmídeos pLLUR1_mCherry(A) e pLLUR2_mCherry(B). Amplificação por PCR dos fragmentos de vetor (vetor compartilhado) e inserto (direita) -> purificação + CPEC -> pLLUR1_mCherry + pLLUR2_mCherry. Fonte: Autor, criado com SnapGene®.



Figura 19: Primers para CPEC de uso nas construções pLLUR1_mCherry e pLLUR2_mCherry. Primer forward para inserto (Frag_mCherry_lac.FOR) e reverse para vetor (Vetor_mCherry_lac.REV), ambos possuem regiões complementares que se anelam na construção final (representada na imagem). Fonte: Autor, criado com *SnapGene*®.

Uma observação importante a se fazer foi a não inclusão do gene *LacI*, responsável pela expressão da proteína *Lac repressor* que inibi o promotor *LacUV5*, nas construções dos vetores com base no plasmídeo pLAC2, ou seja, dispensando o uso de IPTG como indutor.

pLACR1_OP

A CPEC foi novamente empregada para a subclonagem dos genes de UDPG-PP (*galU*) e UDPG-deH (*Udg*) previamente combinados na configuração de operon no vetor pRSM4, para o plasmídeo pLACR1_mCherry, substituindo o gene de expressão da proteína mCherry, e aproveitando o fato de que esse vetor já não possui algumas sequências do plasmídeo original pLAC2 que não são necessárias para a aplicação de interesse neste trabalho (conforme descrito no item anterior). A Figura 20 ilustra a construção em seu estado final, e a região de anelamento dos primers. O objetivo dessa clonagem está relacionado com os resultados descritos no tópico 5.

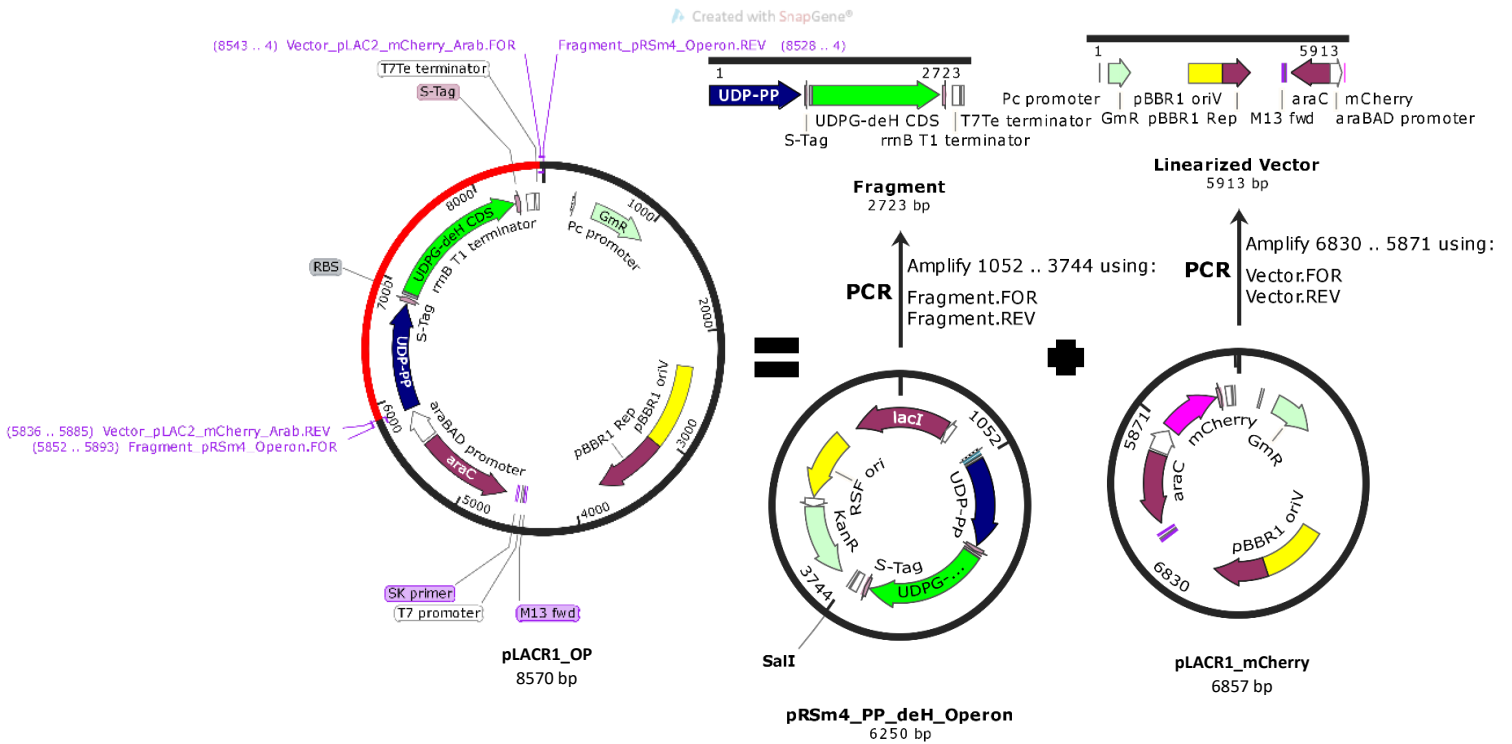


Figura 20: Mapa do plasmídeo pLACR1_OP, e das regiões amplificadas de vetor e inserto. Amplificação por PCR dos fragmentos de vetor e inserto (direita) -> purificação + CPEC -> pLACR1_OP (pLAC2_Operon_Arabnose). Fonte: autor criado com SnapGene®.

Foi necessário o desenho de quatro primers para essa construção: os primers *forward* (*Fragment_pRSm4_Operon.FOR*) e *reverse* (*Fragment_pRSm4_Operon.REV*) para o fragmento, e os primers *forward* (*Vector_pLAC2_Arab.FOR*) e *reverse* (*Vector_pLAC2_Arab.REV*) para o vetor, cujas seqüências podem ser conferidas na figura 21.

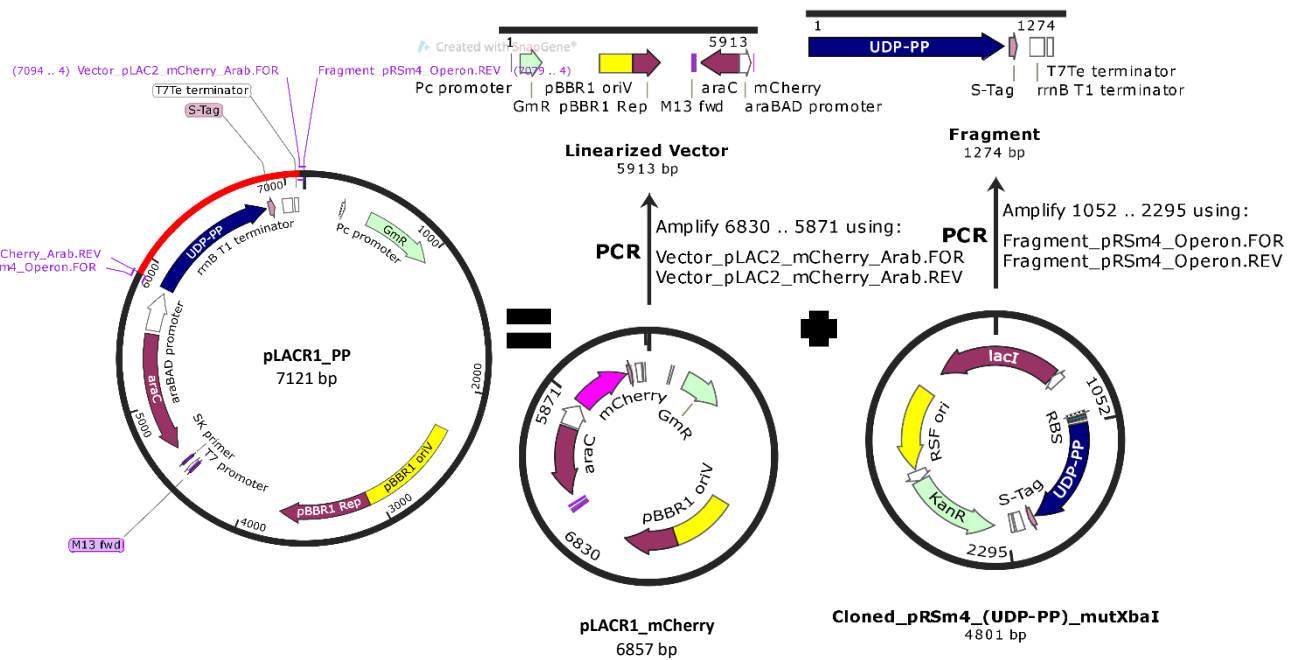


Figura 22: Mapa do plasmídeo pLACR1_PP, e das regiões amplificadas de vetor e inserto. Amplificação por PCR dos fragmentos de vetor e inserto (direita) -> purificação + CPEC -> pLACR1_PP (pLAC2_PP). Fonte: autor, criado com SnapGene®.

pLACR1_deH

Para construção desse vetor via CEPEC, pôde-se aproveitar os primers *reverse* do fragmento *Fragment_pRSm4_Operon.REV* e *forward* do vetor *Vector_pLAC2_mCherry_Arab.FOR*. Ambos são complementares e montam a extremidade terminal do fragmento clonado, fora da região do gene *Udg*. Os primers para o anelamento da extremidade inicial do fragmento no vetor foram construídos com base no início da região do gene *Udg*. Esses primers precisam ser desenhados de acordo com o início do gene a ser inserido devido à proximidade com o promotor P_{BAD}, de modo a respeitar a distância entre promotor e gene. Os primers construídos foram: *Reverse* do vetor (*Vector_pLAC2_Mc_Arab_deH.REV*) e *forward* do fragmento (*Fragment_pRSm4_deH_pLAC2.FOR*) (Figura 23).

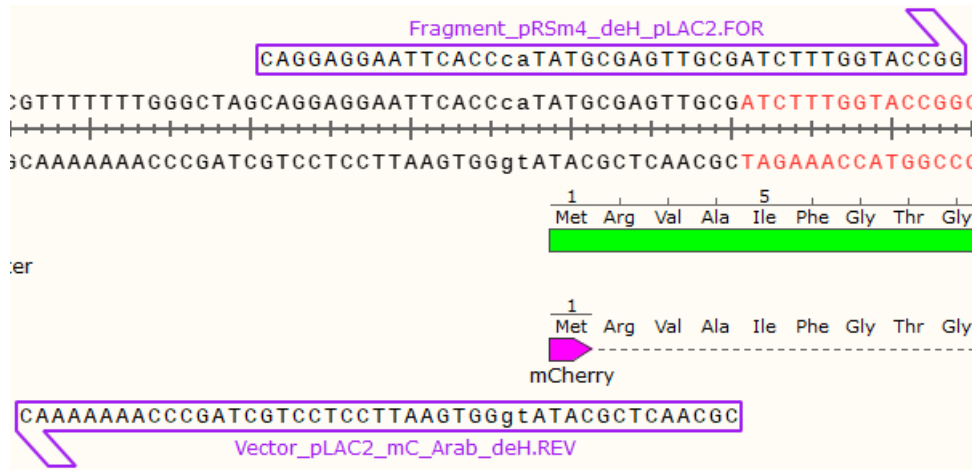


Figura 23: Primers para CPEC usados na construção pLACR1_deH. Primer forward para inserto (Fragment_pRSm4_deH_pLAC2.FOR) e reverse para vetor (Vetor_pLAC2_mC_Arab.REV), ambos possuem regiões complementares que se anelam na construção final (representada na imagem). Fonte: Autor, criado com SnapGene®.

Abaixo na Figura 24 temos a imagem esquemática da construção do plasmídeo pLACR1_deH:

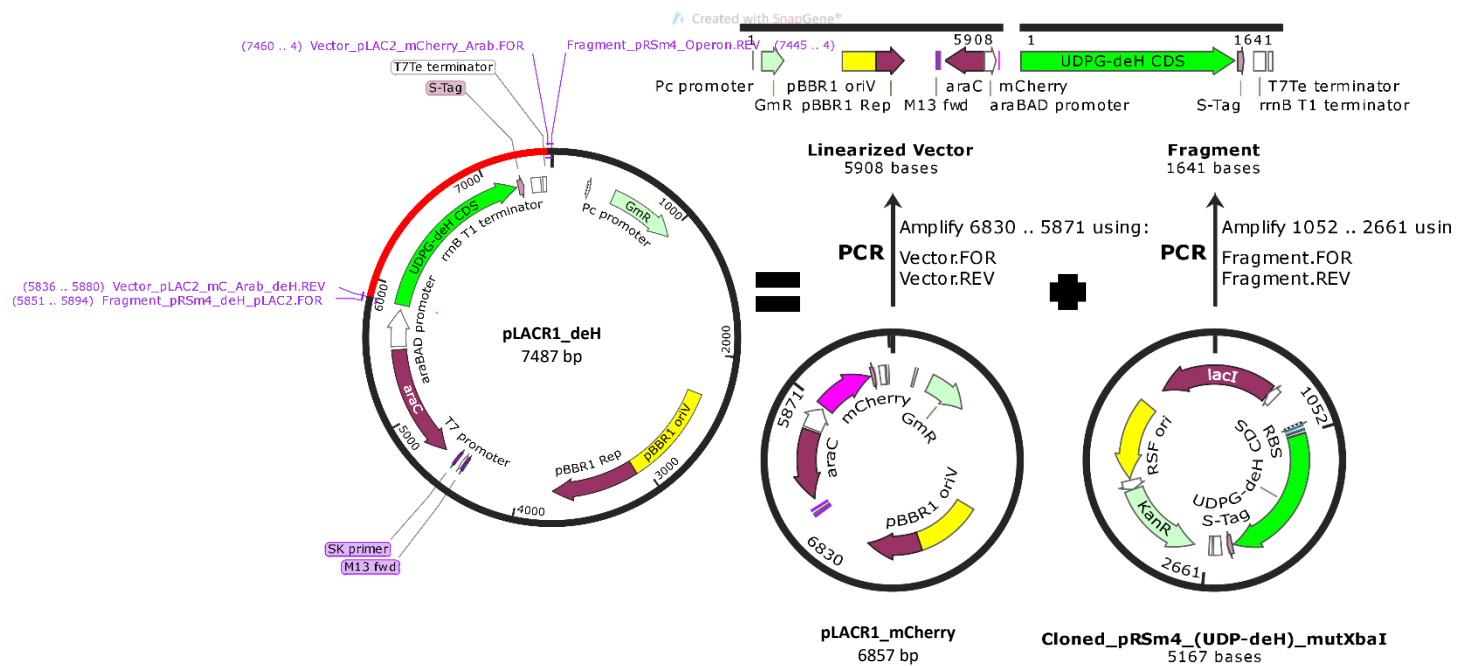


Figura 24: Mapa do plasmídeo pLACR1_deH, e das regiões amplificadas de vetor e inserto. Amplificação por PCR dos fragmentos de vetor e inserto (direita) -> purificação + CPEC -> pLACR1_deH (pLAC2_deH). Fonte: autor criado com SnapGene®.

4.2.8. RESUMO DAS CONSTRUÇÕES

A Tabela 7 a seguir apresenta todas os vetores e construções de vetores utilizados nesse trabalho, detalhando suas principais características para melhor visualização e comparação entre eles.

Tabela 7: Vetores de expressão e suas principais características, utilizados nesse trabalho na busca do melhor vetor para expressão dos genes *Udg* e *galU* em bactérias de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Plasmídeo	Grupo de origem	Tamanho (bp)	Origem de replicação	Promotor	Marcador de Resistência	Gene inserido
pETM7_MC	ePathBrick	5963	ColE1	P _{LAC UV5}	Ampicilina	mCherry
pETM8_MC		5991				
pRSM4	pBAD/pBBR-MCS	3874	RSF 1030	P _{BAD}	Canamicina	-
pLAC2		7537	pBBR1		Gentamicina	
pRSM4_PP	ePathBrick	4801	RSF 1030	P _{LAC UV5}	Canamicina	galU
pRSM4_deH		5167				Udg
pRSM4_OP		6250				Udg+galU
pLLUR1_MC	pBAD/pBBR-MCS/ ePathBrick	5647		P _{LAC UV5+CAP}		mCherry
pLLUR2_MC		5675				
pLACR1_MC	pBAD/pBBR-MCS	6857	pBBR1	P _{BAD}	Gentamicina	Udg+galU
pLACR1_OP		8570				
pLACR1_PP		7121				
pLACR1_deH		7487				

Fonte: Autor.

Em resumo, os plasmídeos pETM7, pETM8, pRSM4 e pLAC2 foram utilizados como base para a construções dos vetores pLLUR1, pLLUR2 e pLACR1 com ou sem a presença dos genes *mCherry*, *galU* e *Udg*. O plasmídeo pRSM4 foi utilizado na clonagem inicial dos genes *Udg* e *galU* a partir do genoma de XCC, individualmente e em conjunto.

As construções pLLUR1_MC, pLLUR2_MC e pLACR1_MC foram montadas para avaliação e comparação do nível de expressão gênica com os promotores P_{LAC UV5}, P_{LAC UV5+CAP} e P_{BAD}, respectivamente, através de medida de fluorescência, como previamente mencionado no item 4.2.7 e descrito detalhadamente logo a frente no item 4.3.1. Por fim, como será demonstrado na seção de Resultados e Discussão, no item 5.4, o vetor pLACR1 apresentou melhores resultados de expressão, e foi utilizado como base dos vetores de expressão dos genes *Udg* e *galU* nas células de XCC, pLACR1_deH, pLACR1_PP e pLACR1_OP.

4.2.9. SCREENING DE TRANSFORMANTES

Para a confirmação de colônias positivas, ou seja, que receberam o vetor de expressão desejado, foram realizados alguns procedimentos. Nos casos onde a transformação era realizada com vetores contendo a proteína mCherry, era necessário somente a indução da expressão da mesma com a adição do reagente indutor, IPTG 1 mM ou arabinose 3,33 mM, de acordo com o promotor presente no plasmídeo, no meio ágar na placa Petri, como descrito no tópico 4.3.1. As colônias positivas apresentavam coloração rosa. Em casos de dúvida, outros procedimentos de *screening* eram tomados, como descritos na sequência.

Screening por restrição

Após extração plasmidial, foi possível por meio da digestão do DNA extraído (tópico 4.2.5), com enzimas convenientemente selecionadas, verificar o tamanho das bandas apresentadas no gel de agarose durante o processo de eletroforese (tópico 4.2.2). As colônias foram consideradas positivas quando o tamanho das bandas no gel, visualizadas em um transiluminador, correspondiam ao tamanho esperado para o plasmídeo de interesse. Para esse processo de *screening*, a quantidade de DNA plasmidial digerida foi de 300 ng.

Screening por PCR de colônia

Nesse procedimento o *screening* foi realizado através da reação de PCR de colônia. A reação foi realizada com 5 µL de *GoTaq G2 Green Master Mix®* (*Promega®*), 3,5 µL de água (*Sigma Aldrich®*), 0,5 µL de solução *Mix Primer* e 1,0 µL de colônia ressuspensa em 10 µL de água (molde).

Os parâmetros para o termociclador seguiram os descritos no tópico 4.2.5, de acordo com os primers específicos e o tamanho da região de amplificação desejada. Após o processo, o conteúdo da reação foi corrido em gel de eletroforese (tópico 4.2.2). As colônias eram consideradas positivas quando possível a visualização da banda de DNA amplificado desejado com auxílio de um transiluminador.

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. AVALIAÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO

A avaliação da funcionalidade dos plasmídeos em XCC foi realizada por meio da expressão da proteína mCherry clonada nos plasmídeos testados. A presença de coloração rosa ou rosada nas colônias indicou a inserção do plasmídeo no hospedeiro e a expressão da proteína recombinante, e a intensidade de fluorescência, medida pela excitação a 588 nm e emissão a 618 nm, conforme descrito por Jones et al., (2015), indicou a força da expressão proporcionada pelo promotor contido no vetor para transcrição genética.

Foram testadas neste experimento as construções pLACR1_mCherry, pLLUR1_mCherry e pLLUR2_mCherry. O experimento foi conduzido de acordo com JONES et al. (2015), com o cultivo de colônias isoladas inoculadas em 1 mL de meio LB, com adição do antibiótico gentamicina na concentração de 10 µg/mL, por um período “overnight” de aproximadamente 14 horas, a 30°C e 220 rpm. Após este período, 100 µL da cultura foram inoculados em 2 mL (diluição na proporção 1:40) com antibiótico na mesma concentração, e as células foram cultivadas por 3 horas a 30°C e 220 rpm em placas de 48 poços. Após isso, foi realizada a indução para as culturas com pLACR1_mCherry com arabinose 3,33 mM (LACERDA et al., 2017), e para as demais culturas a indução foi realizada com IPTG 1 mM. Após indução, as culturas foram cultivadas por 4 horas, momento da primeira amostragem para leitura de fluorescência, e mantidas em cultivo por mais 16 horas até a segunda amostragem. Para a amostragem foram retiradas amostras de 200 µL de cada cultura, transferidas diretamente para placa de 96 poços (preta com fundo transparente) própria para realização das medidas de fluorescência.

Para os cultivos e medidas de fluorescência, foram selecionadas 5 colônias isoladas (numeradas de 1 a 5) para cada plasmídeo testado. Para os cultivos utilizou-se uma placa de 48 poços com capacidade para 4 mL de cultura por poço. Os cultivos foram realizados em triplicata para as 3 primeiras colônias de cada transformação, e duplicata para as colônias 4 e 5. As colônias 4 e 5 foram utilizadas apenas para verificar se a adição de IPTG nas células com as construções pLLUR1_mCherry e pLLUR2_mCherry contendo o promotor *LacUV5*, mas não o gene para repressão

LacI, teria algum efeito no nível de expressão. Os cultivos das demais colônias contendo esse promotor não sofreram indução por IPTG, pois a expressão da proteína deveria ser constitutiva devido à ausência do gene *lacI* tanto nos plasmídeos quanto no cromossomo das células de XCC. Para a transformação com o promotor *BAD*, apesar de seguir o mesmo padrão de triplicatas e duplicatas, todos os cultivos foram igualmente induzidos com arabinose.

Também foram adicionadas à placa culturas de colônias selvagens de XCC não transformadas, tendo papel de negativo. Para o branco foi utilizado o meio de cultura não inoculado. A Figura 25 abaixo mostra a organização dos cultivos das amostras na placa.

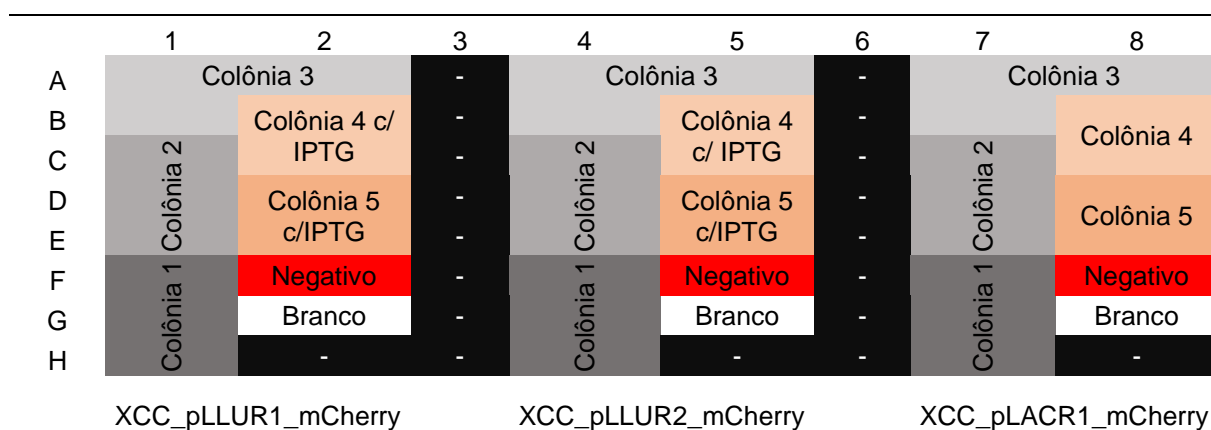


Figura 25: Representação esquemática das posições das colônias na placa de cultivo. Em preto não há células, em vermelho células não transformadas, em branco apenas meio de cultura. Fonte: Autor.

As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando o equipamento *SpectraMax i3® MiniMax™ Imaging Cytometer (Molecular Devices)* com o auxílio do software *SoftMax Pro®* no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, sob coordenação da Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.

4.3.2. CRESCIMENTO CELULAR

A quantificação da biomassa da linhagem natural de XCC e das células recombinantes seguiu um procedimento adaptado ao descrito por SAVVIDES et al. (2012), que visa separar as células da goma xantana para correta medição da formação de biomassa. Para isso, uma amostra de 5 mL de caldo de cultivo foi diluída 8 vezes em solução salina 0,9% (m/v), e em seguida, as células foram coletadas por meio de centrifugação a 16000xg por 20 minutos a 4°C (Centrífuga *ependorf 5810*

R). As células foram então lavadas outras duas vezes novamente em solução salina 0,9%. Após a última lavagem as células foram ressuspensas na solução e a leitura da densidade ótica (DO), realizada no comprimento de onda (λ) de 600 nm, foi conduzida em espectrofotômetro *Genesys 10S UV-VIS (Thermo Scientific)*.

Por fim, depois de lavadas, as células foram separadas novamente por centrifugação, e a biomassa teve sua concentração determinada pelo método da massa seca (SUBHASH et al., 2015), submetida a secagem em estufa a 60°C por 72 horas, e pesagem em balança analítica (*BEL Engineering*). Os recipientes contendo a biomassa passaram previamente por secagem e pesagem. A diferença entre as massas dos tubos com e sem biomassa nos fornece a massa de biomassa extraída.

Uma curva de calibração foi construída para a cepa de *Xanthomonas campestris pv. campestris* correlacionando os dois métodos analíticos, densidade ótica e massa seca. O experimento contou com dois frascos Erlenmeyer de 1 L com 100 mL de meio *SYMP-Frasco* (tópico 4.1.2) inoculados com 5 mL de cultivo “overnight” em meio *SYMP-Pré-Inóculo* preparado a partir da inoculação de uma colônia isolada. A cada amostragem eram retiradas duas amostras de cada frasco, configurando um experimento em quadruplicata. O cultivo foi conduzido a 28°C e 230 rpm, por 27 horas, com 8 pontos de amostragem distribuídos de forma homogênea.

4.3.4. PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

Cultivos

Para cada uma das diferentes células de XCC, não-transformante e transformantes, foram conduzidos cultivos em triplicata em frascos Erlenmeyer de 1 L. O volume de 150 mL de meio *SYMP-Frasco* (tópico 4.1.2) foi inoculado, em cada frasco, com 10 mL de cultivo em meio *SYMP-Pré-Inóculo* na fase exponencial de crescimento, DO_{600} entre 1,1 e 1,3, preparado a partir da inoculação de uma colônia isolada provinda de uma placa com *SYMP-Agar*. Para o cultivo das linhagens transformantes, os meios sólido e líquido contaram com a presença de antibiótico adicionado no momento da inoculação.

Para as linhagens transformantes, as induções com L-arabinose foram realizadas com 12 horas de cultivo, quando a DO_{600} das células estavam em torno de 5,0. Duas condições de concentração de indutor foram testadas em cada uma das

três linhagens transformantes, 0,005% e 0,05% (m/v) (LACERDA et al., 2017). Para isso foram realizadas duas rodadas de cultivos, passando então os dados a serem diferenciados pela ordem do cultivo, 1^o (indutor 0,005%) ou 2^o (indutor 0,05%) cultivos. A condição dos cultivos foi a 28°C e 230 rpm, com duração de 45 a 48 horas. Onze pontos de amostragem foram realizados distribuídos durante todo período de cultivo.

Extração da Goma

A concentração de goma xantana produzida ao longo dos cultivos foi medida pelo método gravimétrico, adaptado dos procedimentos descritos por (SUBHASH et al. 2015; SAVVIDES et al., 2012). O apêndice **A** descreve um problema identificado em uma das etapas do procedimento obtido a partir da literatura consultada, sendo esta etapa modificada nos procedimentos que seguem abaixo.

O sobrenadante obtido a partir da centrifugação para remoção das células – descrito no item anterior – recebeu um volume de isopropanol P.A. 99% nas proporções 2:1 e 5:1 (Isopropanol:Sobrenadante), para a precipitação da goma. A proporção foi alterada de acordo com o avanço da concentração de goma presente no meio. Para esta variação, o volume de amostra retirado passou de 5 mL para 2 mL, respectivamente.

A mistura foi levada a -20°C em freezer por 20 minutos, e a separação da goma xantana foi realizada após esse período por centrifugação à 31000xg por 10 minutos a 0°C (Centrífuga *Avanti® J-E Beckman Coulter*). O sobrenadante foi descartado e a goma precipitada foi seca a 55°C por 72 horas. Sua massa foi então calculada pela subtração da massa seca do recipiente (Figura 26) a partir da massa total final (goma + recipiente) pesada em balança analítica (*BEL Engineering*).

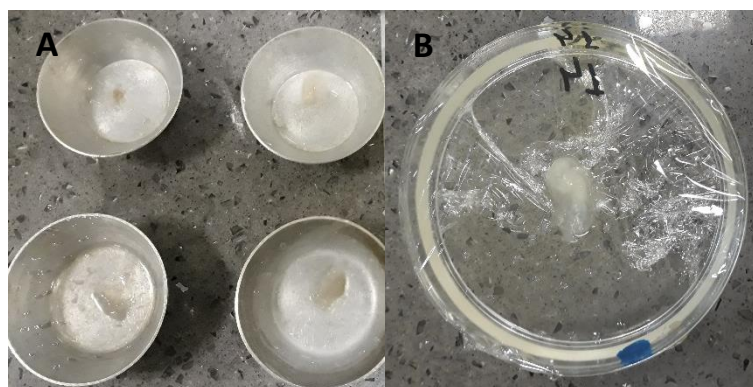


Figura 26: Recipientes para medida de massa seca de goma xantana. Imagem A – Recipientes de metal. Imagem B – Placa petri. A goma era protegida dentro do recipiente por parafilme transparente perfurado. Fonte: Autor.

5. Resultados e Discussão

5.1. Clonagem dos genes *Udg* e *galU*

A clonagem dos genes *Udg* e *galU*, identificados *in silico* como de interesse por se apresentarem como gargalos da via de biossíntese dos monômeros da goma xantana, foi realizada com êxito a partir da cepa de *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

O processo de amplificação das regiões por PCR foi bem-sucedido como se pode ver na Figura 27. Os genes *Udg* e *galU* possuem os tamanhos de 1347 bp e 975 bp respectivamente, e as bandas apresentadas corresponderam a esses valores de acordo com o marcador de peso molecular.

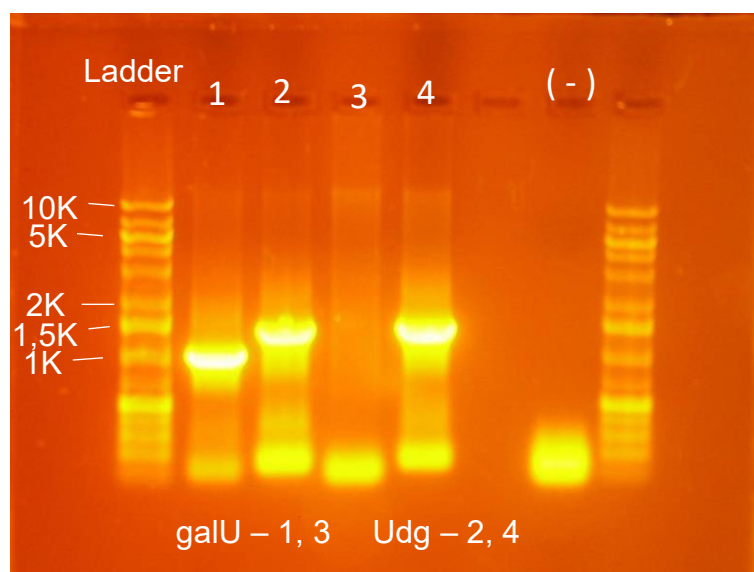


Figura 27: Bandas em gel de agarose após reação de PCR para amplificação dos genes *galU* e *Udg* de *XCC*. Poços 1 e 3 – DNA amplificado do gene *galU* (tamanho esperado: 975 bp) (Poço 3 com falha na amplificação), poços 2 e 4 – DNA amplificado do gene *Udg* (tamanho esperado: 1347 bp). Poço (-) – negativo. Fonte: Autor

A Figura 28 é referente ao passo subsequente do procedimento de clonagem dos genes *Udg* e *galU*, e apresenta a imagem do gel de digestão dos *amplicons* (fragmentos amplificados por PCR) e vetores (plasmídeos), ambos digeridos com o mesmo par de enzimas (Fast Digest, *Thermo Scientific*®), *NdeI* e *KpnI* para *galU*, *NdeI* e *XhoI* para *Udg*. É possível visualizar com clareza as bandas amplificadas nas alturas proporcionais ao tamanho de cada fragmento.

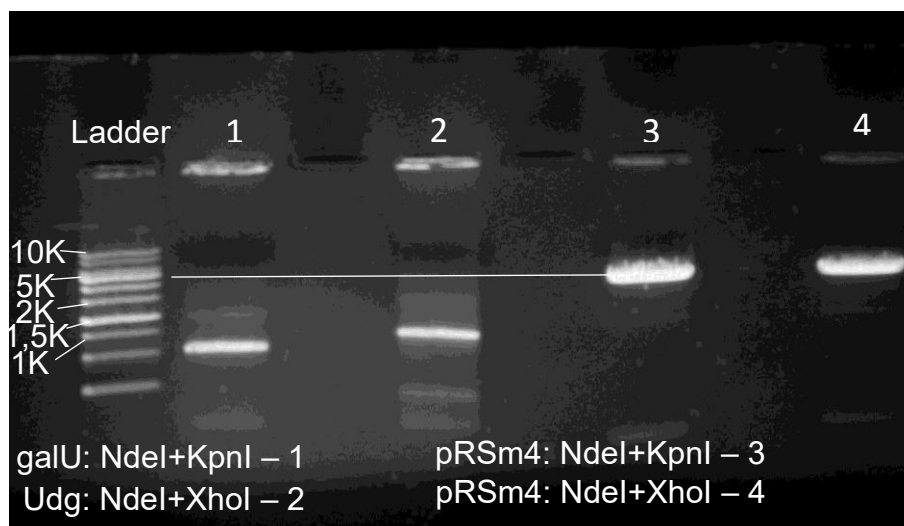


Figura 28: Bandas em gel de agarose após digestão dos genes *galU* (enzimas *NdeI* e *KpnI*) e *Udg* (enzimas *NdeI* e *XhoI*), nos poços 1 e 2, respectivamente, e do vetor pRSM4, poços 3 (enzimas *NdeI* e *KpnI*) e 4 (enzimas *NdeI* e *XhoI*). Fonte: Autor

Após a etapa de purificação das moléculas de DNA a partir do gel, o procedimento de clonagem se encaminhou para a etapa de ligação, seguida de transformação em células de *E. coli* DH5 α competentes. Deste modo, a confirmação da transformação veio por meio de *screening* por PCR de colônia, com a imagem do gel das reações estando apresentada nas Figuras 29-A e 29-B.

Na primeira imagem (Figura 29-A) foi possível confirmar a clonagem do gene *galU* na amostra 1. Para as amostras do gene *Udg* foi observada amplificação inespecífica de algumas bandas além da banda esperada. A reação foi repetida e o resultado positivo foi confirmado para as três amostras do gene *Udg* no gel apresentado na Figura 29-B.

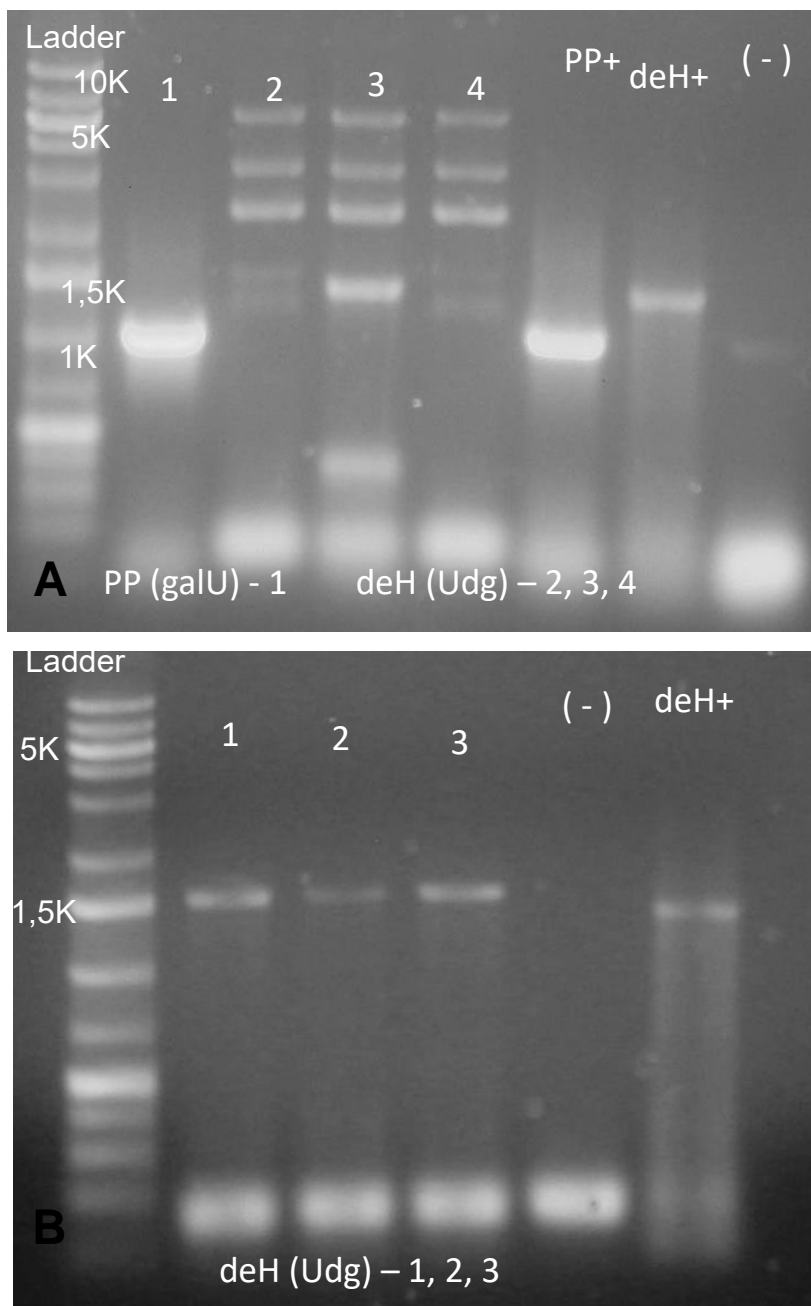


Figura 29: Bandas em gel de agarose após amplificação por PCR de colônia dos genes *galU* (A) e *Udg* (B) como método de *screening* da clonagem individual de cada gene no plasmídeo pRSM4. Imagem A – poço 1: *E. coli_pRSM4_PP*, banda observada (tamanho esperado: 1004 bp), poços 2, 3 e 4: *E. coli_pRSM4_deH*, bandas inespecíficas não confirmam amplificação do gene, poço PP+: positivo *galU*, poço deH+: positivo *Udg*, poço (-): negativo. Imagem B – poços 1,2 e 3: *E. coli_pRSM4_deH*, banda observada (tamanho esperado: 1384 bp), poço (-): negativo, poço deH+: positivo *Udg*. Fonte: Autor

Esses resultados demonstraram o êxito da clonagem dos genes *Udg* e *galU* na construção dos plasmídeos pRSM4_PP e pRSM4_deH.

5.2. Mutação Sítio-Dirigida: eliminação de um sítio de *Xba*I do plasmídeo pRSM4

Após a clonagem individual dos genes que codificam as proteínas UDPG-PP e UDPG-deH, o próximo passo consistia em uma construção conjunta de ambos. Para isto, existem três tipos base de configuração, *Operon*, *Pseudo-operon* e *Monocistrônico*, como já citado anteriormente no trabalho. Para o primeiro momento, onde o principal objetivo não era a comparação entre as diferentes configurações, mas sim a expressão de ambos genes em XCC, optou-se pela configuração *Operon*, a qual se utiliza de apenas um promotor e um terminador cercado os dois genes, a cargo da praticidade na montagem.

Considerando o modelo *Operon* de configuração escolhido, decidiu-se pela ordem *galU* em primeiro e *Udg* em segundo, pois a proteína UDPG-PP é utilizada primeiro na via de biossíntese. Nesse sentido, com o intuito de realizar a subclonagem do gene *Udg* no plasmídeo pRSM4_PP, o plasmídeo doador, pRSM4_deH, precisou passar por uma mutação de um dos sítios de restrição da enzima *Xba*I. Mais especificamente, o sítio anterior a origem de replicação, que em ordem de importância para esse trabalho, é um sítio dispensável. Isso porque, para realizar a excisão do fragmento contendo o gene, o par de enzimas ideal para esse caso é *Xba*I e *Sal*I, de modo a complementar com o vetor a ser cortado com *Bcu*I e *Sal*I, segundo orientações presentes em XU et al. (2012). No entanto, como é perceptível na imagem do plasmídeo na Figura 30, com dois sítios de clivagem de *Xba*I, o plasmídeo é praticamente recortado em tamanhos iguais, com diferença de 100 bp aproximadamente entre os fragmentos, tornando muito complicada a separação dos mesmos no gel de agarose.

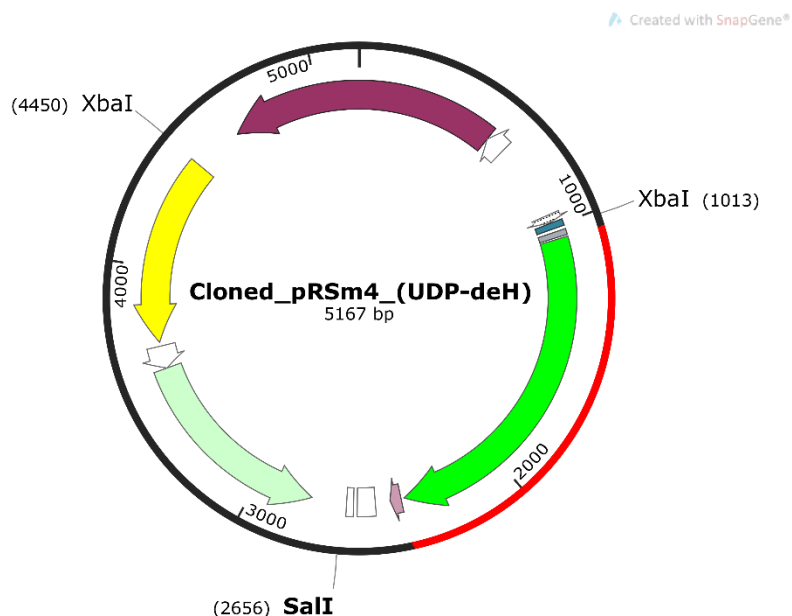


Figura 30: Mapa do plasmídeo pRSM4_deH + sítios de restrição. Dois sítios da enzima *XbaI* são visíveis a uma distância de aproximadamente um terço do comprimento total do plasmídeo. Fonte: autor. Criado com SnapGene®.

Com base no interesse na montagem de diferentes configurações no futuro próximo, com alteração da ordem dos genes, como, por exemplo, a montagem em configuração *Operon* de modo invertido, inserindo o gene *galU* no pRSm4-deH, decidiu-se por realizar a mutagênese nos dois plasmídeos contendo os genes individuais.

Realizado o processo de mutagênese sítio-dirigida, segundo descrito no tópico 4.2.6, o resultado foi confirmado por *screening* através de digestão enzimática (tópico 4.2.8), com a própria enzima *XbaI* (Anza, *Thermo Scientific*®, *Invitrogen*), após a extração do DNA plasmidial das colônias transformantes (tópico 4.2.2). Quatro colônias de cada placa de transformação foram selecionadas para realização do *screening*. O resultado esperado de apenas uma banda apresentada na altura de 5Kb, um pouco acima para o pRSm4_deH e um pouco abaixo para o pRSm4_PP, foi confirmado através da visualização do gel de eletroforese, apresentado na Figura 31. É observado claramente que não houve formação de nenhuma banda extra em nenhuma das oito amostras analisadas, indicando resultado positivo para a mutação sítio-dirigida no sítio de restrição para *XbaI*.

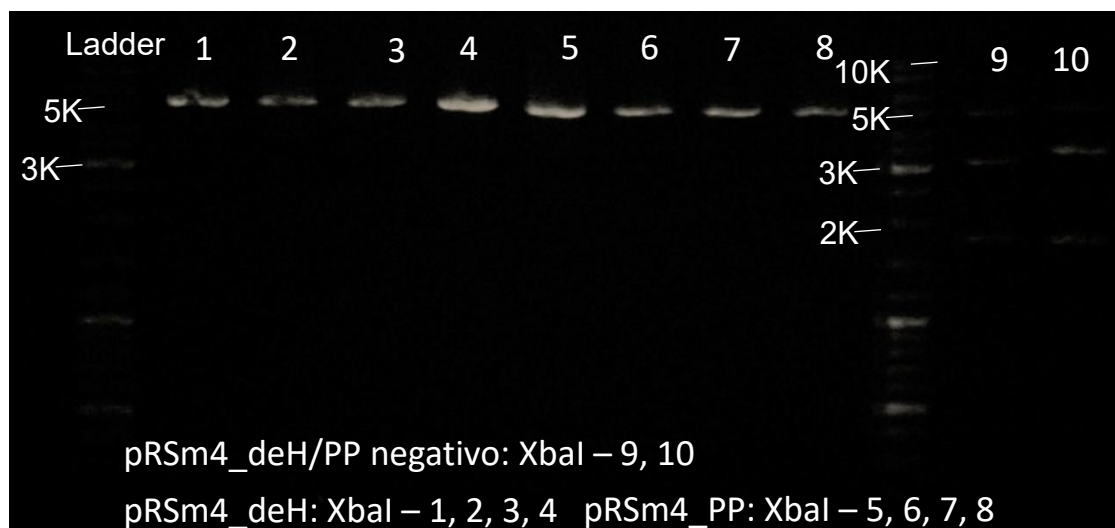


Figura 31: Bandas em gel de agarose pós-digestão dos plasmídeos pRSM4_deH / PP (enzima *Xba*I). Poços 1 a 4 - pRSM4_deH, banda observada (tamanho esperado: 5167bp), poços 5 a 8 – pRSM4_PP, banda observada (tamanho esperado: 4801bp). Poço 9: negativo pRSM4_PP, mais de uma banda observada, poço 10: negativo pRSM4_deH, mais de uma banda observada. Fonte: Autor.

5.3. Subclonagem: montagem da configuração *Operon*

Com a confirmação da clonagem individual dos genes e a mutagênese do vetor pRSM4, foi possível partir para a etapa de montagem do vetor de expressão contendo ambos os genes na configuração *Operon*.

Na primeira etapa de digestão do inserto e vetor esperava-se a extração de um fragmento/inserto do plasmídeo doador, pRSM4_deH, contendo o gene para a proteína UDPG-deH mais a região contendo o terminador, o que resulta em um tamanho de 1643 bp, enquanto que para o vetor, pRSM4_PP, a banda esperada era de 4607 bp. A imagem do gel para extração (Figura 32) dos fragmentos de DNA digeridos confirmaram a obtenção das bandas com tamanhos esperados. Deste modo, após a purificação dos fragmentos segundo o método descrito no tópico 4.2.2, foram realizadas as etapas de ligação e transformação.

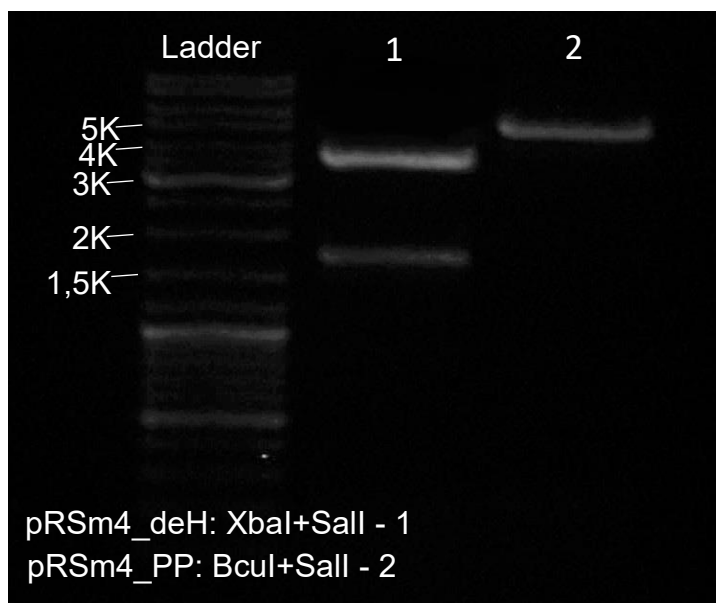


Figura 32: Bandas em gel de agarose pós-digestão dos plasmídeos pRSM4_deH (enzimas *XbaI* e *Sall*) e pRSM4_PP (enzimas *BclI* e *Sall*) para obtenção de vetor e inserto para montagem do plasmídeo pRSM4_Operon. Poço 1 – Fragmento para inserto, observado na banda inferior (tamanho esperado: 1643 bp), poço 2 – Fragmento para vetor, banda observada (tamanho esperado: 4607 bp). Fonte: Autor.

O *screening* de clones positivos, após a transformação das células competentes com o conteúdo da reação de ligação (tópico 4.2.5), se deu por digestão enzimática (tópico 4.2.8) após a extração do DNA plasmidial de quatro colônias isoladas crescidas nas placas de transformação. As enzimas utilizadas para digestão foram *XbaI* e *BclI* (*SpeI*) (Anza, *Thermo Scientific*®). Esperavam-se duas bandas de tamanhos 3718 bp e 2532 bp. No gel de digestão (Figura 33) formaram-se duas bandas, como esperado, para os 4 poços, todas nas mesmas alturas, confirmando a construção do vetor de expressão contendo os dois genes que codificam as proteínas de interesse desse trabalho.



Figura 33: Bandas em gel de agarose pós-digestão do plasmídeo pRSm4_Operon (enzimas *XbaI* e *BclI*) para *screening* de confirmação. Duas bandas observadas com alturas esperadas de 3718 bp e 2532 bp. Fonte: Autor.

5.4. Teste de vetores de expressão em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Após a transformação das células de XCC com os plasmídeos pRSM4 com clonagem individual dos genes *galU* e *Udg*, o *screening* foi realizado através de PCR de colônia (tópico 4.2.8). Os primers utilizados amplificavam a região contendo o gene de interesse anelando-se no plasmídeo. Esperavam-se bandas próximas aos tamanhos dos genes, 1347bp para *Udg* e 975 bp para *galU*. Entretanto, não foi possível observar nenhuma banda no gel (Figura 34), apesar do experimento de transformação e *screening* ter sido repetido algumas vezes. A partir desse resultado, observou-se a impossibilidade da célula hospedeira de manter este vetor de expressão, mesmo este plasmídeo tendo a origem de replicação RSF1030 de alto número de cópias (CONRAD; WOLD; CAMPBELL, 1979).

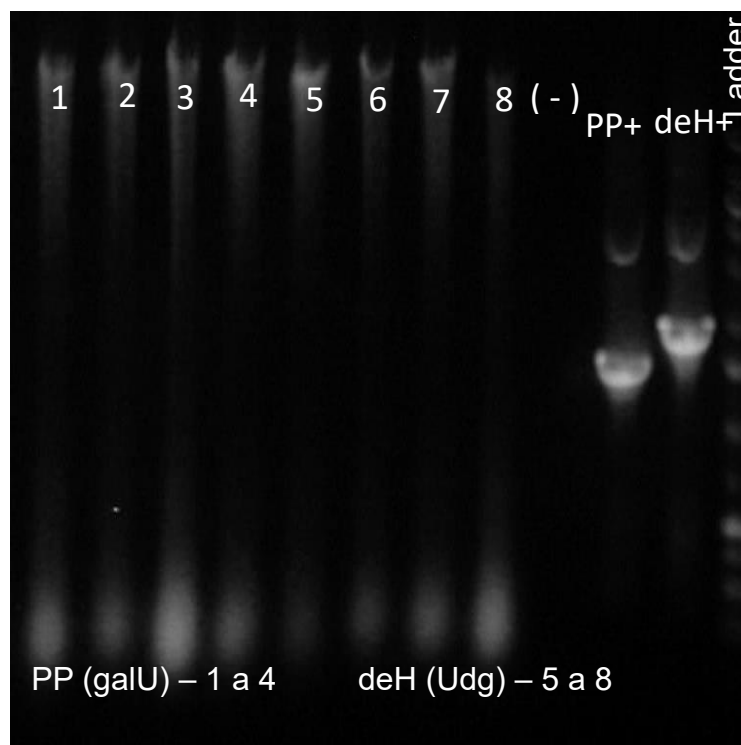


Figura 34: Imagem do gel de agarose utilizado na amplificação falha dos genes *galU* e *Udg*, como método de *screening* por PCR de colônia, da transformação dos vetores pRSM4_PP e pRSM4_deH em células de *Xanthomonas*. Poços de 1 a 4 - XCC_pRSM4_PP, nenhuma banda observada, poços de 5 a 8 - XCC_pRSM4_deH, nenhuma banda observada, poço (-) – negativo, poço PP+ - positivo *galU*, poço deH+ - positivo *Udg*. Fonte: Autor.

O problema, no entanto, não está no método de transformação utilizado, como foi provado pelo *screening*, positivo, por digestão (tópico 4.2.8) da transformação do plasmídeo de amplo espectro de hospedeiros pLAC2, o qual possui uma origem de replicação reconhecida pela bactéria *Xanthomonas citri* (Lacerda et al., 2017), e mecanismos para se manter no hospedeiro. O resultado apresentado na Figura 35 mostra as bandas esperadas de 6064 bp e 1473 bp após a digestão do plasmídeo com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*.

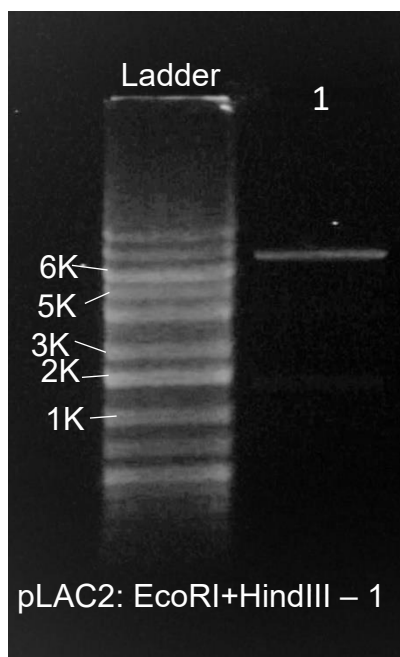


Figura 35: Bandas em gel de agarose pós-digestão de confirmação do plasmídeo pLAC2 (enzimas *EcoRI* e *HindIII*) extraído de células de XCC transformadas. Duas bandas são observadas nos tamanhos próximos aos esperados de 6064 bp e 1473 bp. Fonte: Autor.

5.5. Montagem por CPEC de vetores de expressão com base no pLAC2

Possuindo um resultado prévio da funcionalidade do plasmídeo pLAC2 nas células de *Xanthomonas*, os trabalhos se direcionaram à avaliação quantitativa da funcionalidade desse vetor de expressão baseado no seu sistema de promoção da transcrição gênica. Desse modo, objetivou-se a construção de outros dois vetores de expressão para fins comparativos, baseados no plasmídeo pLAC2, além da nova formatação do plasmídeo original com menor tamanho, que foi chamada de pLACR1. Seriam esses os vetores contendo o promotor *LacUV5* provindos dos plasmídeos *ePathBrick* com e sem a sequência consenso de reconhecimento da proteína CAP, cujo efeito na expressão gênica em *Xanthomonas* também é motivo de interesse, conforme descrito no tópico 4.2.7. O plasmídeo com o promotor *lacUV5* foi chamado de pLLUR1, e o plasmídeo com a sequência CAP + promotor *lacUV5* foi chamado de pLLUR2.

Como mencionado, os plasmídeos doadores das sequências genéticas são plasmídeos da série *ePathBrick vectors*, que por sua vez são oriundos de construções diferentes das de origem do plasmídeo pLAC2, ou seja, encontrar regiões com sítios de restrição enzimáticos compatíveis nem sempre é possível sem prévias modificações. Mas em contrapartida, existem técnicas reacionais baseadas na DNA

polimerase que permitem através de regiões complementares convenientemente criadas (primers), inserir e clonar um ou mais fragmentos de DNA em qualquer região do vetor, como a técnica denominada CPEC, descrita no tópico 4.2.7.

A avaliação da expressão gênica a partir dos sistemas de promoção (promotores), foi realizada a partir de um gene repórter que codifica uma proteína fluorescente rosa conhecida como mCherry. O gene dessa proteína, assim como o promotor *LacUV5* e a sequência CAP já estavam previamente clonados nos plasmídeos pETM7 e pETM8, os quais foram utilizados como plasmídeos doadores para esse processo.

Os resultados apresentados a seguir são referentes às montagens por CPEC dos vetores baseados no pLAC2: pLLUR1_mCherry, pLLUR2_mCherry e pLACR1_mCherry (tópico 4.2.7).

Essa primeira imagem de gel de eletroforese (Figura 36) mostra as bandas amplificadas por PCR dos fragmentos utilizados como insertos para os vetores pLAC2, a partir dos primers específicos das regiões que foram clonadas. No primeiro e terceiro poços temos os fragmentos contendo além da proteína mCherry, o promotor *LacUV5*, e no poço 1 apenas, está presente também a sequência CAP. No poço 2 temos apenas o gene da mCherry. Desta forma o tamanho esperado dos fragmentos era 1240 bp para o poço 1, 1002 bp no poço 2, e 1212 bp no poço 3. Visivelmente, as bandas dos poços 1 e 3 estão na mesma altura da banda correspondente a 1,2Kb do marcador, e a banda proveniente do poço 2 na altura do marcador de 1000 bp.

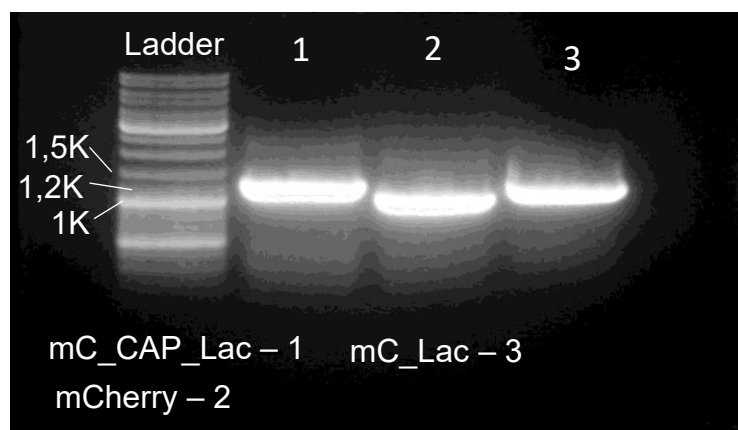


Figura 36: Bandas em gel de agarose após PCR para amplificação dos fragmentos de inserto para reação de CPEC das construções pLLUR2_mCherry, pLACR1_mCherry e pLLUR1_mCherry, poços 1, 2 e 3, respectivamente. Bandas observadas com tamanhos esperados de 1- 1240 bp; 2- 1002 bp; 3- 1212 bp. Fonte: Autor.

Agora com relação aos vetores (Figura 37), o pLAC2 foi amplificado de duas maneiras diferentes apenas, já que as construções pLLUR1 e pLLUR2 utilizam a mesma base de vetor. No primeiro poço, está presente o vetor molde para as construções que utilizarão o promotor *LacUV5* e no segundo está o vetor molde ainda com promotor *BAD* para receber apenas a proteína mCherry. O primeiro possui tamanho de 4436 bp, e o segundo 5855 bp. No gel é possível visualizar que a banda proveniente do segundo poço está acima da banda do primeiro, e ambos estão nas mesmas alturas correspondentes do marcador Ladder.

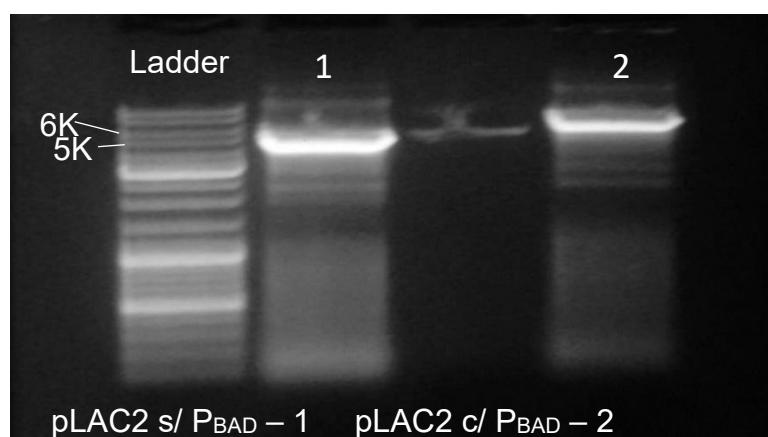


Figura 37: Bandas em gel de agarose após PCR para amplificação dos fragmentos de vetor para reação de CPEC da construção pLLUR2_mCherry; pLACR1_mCherry e pLLUR1_mCherry. Poço 1 – Vetor pLLUR, tamanho esperado da banda observada: 4436bp, poço 2 – Vetor pLACR1, tamanho esperado da banda observada: 5855bp. Fonte: Autor.

Com os vetores e insertos devidamente amplificados, os resultados da reação da CPEC e da subsequente transformação foram verificados pelo *screening* baseado na coloração proporcionada pela proteína mCherry, sob devida indução dos promotores, como indicado nos tópicos 4.2.8 ou 4.3.1.

As imagens abaixo (Figura 38) mostram a tonalidade levemente rosa adquirida pelas células de *E. coli* DH5 α transformadas com as construções pLACR1_mCherry, pLLUR1_mCherry e pLLUR2_mCherry, repicadas em meio com a presença de arabinose, placa da imagem à esquerda, e IPTG, placa da imagem à direita, confirmando como positivas para presença do plasmídeo.

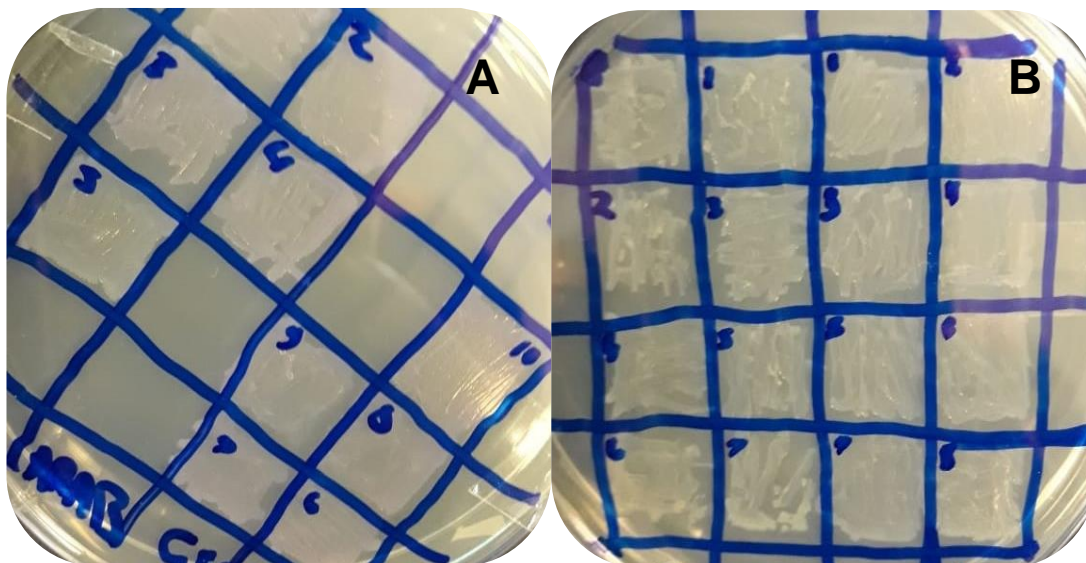


Figura 38: Imagens das placas de transformação de *E. coli* DH5 α . (A) placa com arabinose e plasmídeo pLACR1_mCherry, (B) placa com IPTG e plasmídeos pLLUR1_mCherry e pLLUR2_mCherry. Tonalidade rosa confirma transformação positiva com vetores contendo gene da proteína mCherry. Fonte: Autor.

5.5.1. AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS VETORES pLLUR1, pLLUR2 e pLACR1 EM *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Os dados experimentais do teste de fluorescência realizado para as células de XCC transformadas com os vetores de expressão contendo mCherry estão apresentados na Figura 39. Nela podemos ver as médias de expressão das triplicatas e duplicatas de cada colônia (imagens A e B), enumeradas de 1 a 5 e representadas por uma cor específica, assim como a média geral (imagens C e D), em preto.

Comparando os valores de média de fluorescência entre os vetores, fica clara a grande vantagem apresentada pelo pLACR1_mCherry com promotor *BAD* induzido por arabinose, que apresentou dez vezes mais expressão do que o segundo melhor vetor, no caso, pLLUR1_mCherry. Em contrapartida o vetor pLLUR2_mCherry apresentou no primeiro momento cerca de sessenta vezes menos expressão de fluorescência do que o pLLUR1_mCherry, passando para mais de 120 vezes menos na segunda leitura.

O tempo de diferença entre os dados das imagens A e C (1ª leitura) para as imagens B e D (2ª leitura) é de 16 horas, e podemos perceber que a construção pLLUR2 obteve um aumento leve na expressão da proteína entre as duas leituras,

enquanto que as demais construções, pLLUR1 e pLACR1, tiveram um aumento de duas vezes na quantidade expressa nesse período.

É também interessante observar que apesar das variações apresentadas por cada uma das colônias, os valores obtidos permaneceram sempre próximos para as mesmas condições, o que revela confiabilidade dos dados obtidos.

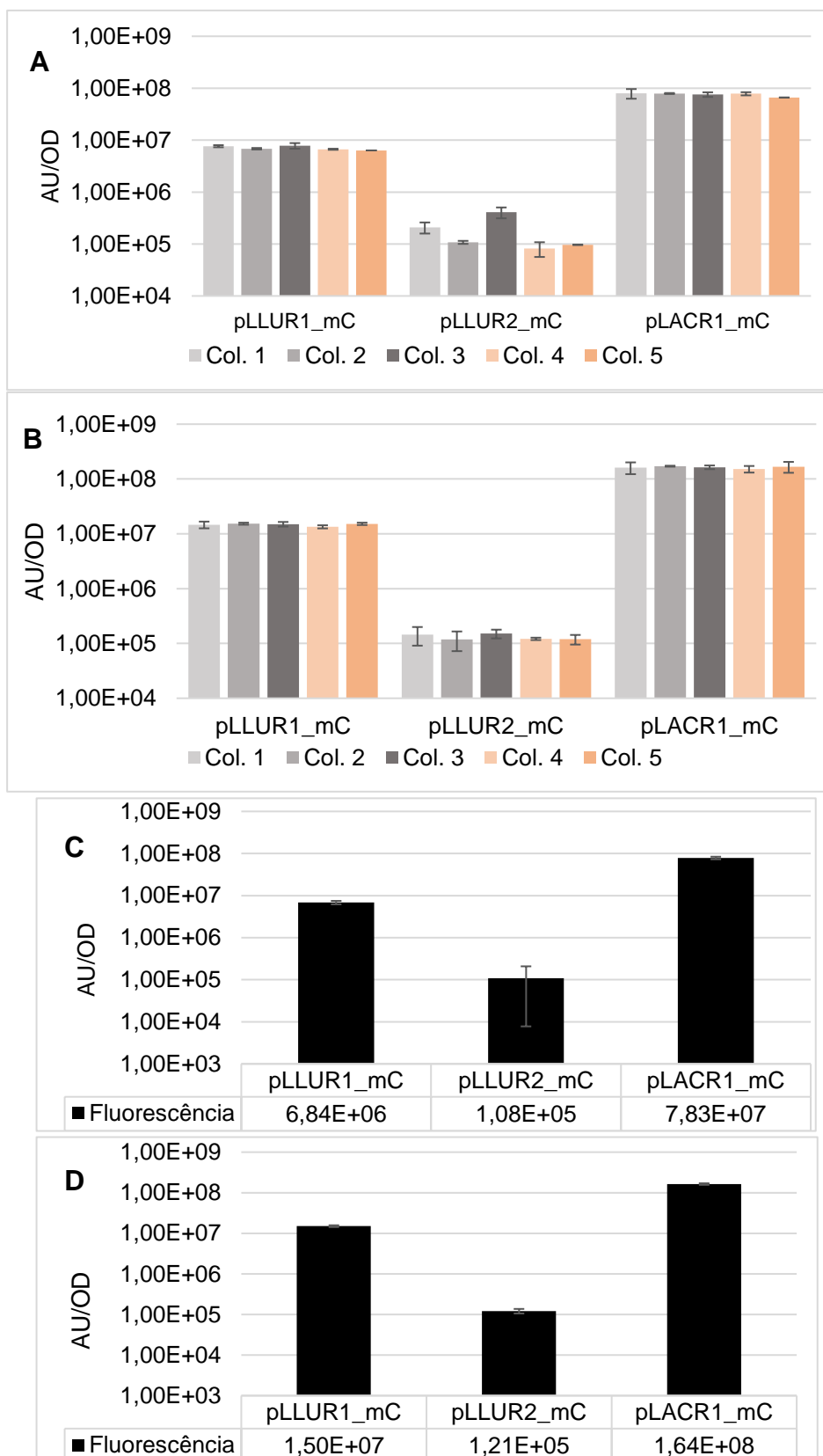


Figura 39: Gráficos de coluna mostrando dados médios de fluorescência normalizados pela concentração celular (OD_{600}) para os plasmídeos testados. (A) Médias por colônia em $t = 7h$; (B) Médias por colônia em $t = 23h$; (C) Média total em $t = 7h$; (D) Média total em $t = 23h$. Diferença na casa de 10^1 vezes entre o melhor resultado de indução e o segundo melhor. Fonte: Autor.

Os resultados são intrigantes com relação ao desempenho muito inferior apresentado pela construção pLLUR2_mCherry quando comparado com os outros dois vetores. Uma possibilidade para explicar essa observação poderia ser a presença de algum processo regulatório de repressão forte à expressão, causado pela proteína *Clp* ou por outra proteína desconhecida presente nas células, que pode ter reconhecido a sequência consenso adicionada antes do promotor.

Outra conclusão positiva que podemos retirar desse experimento está na reconfirmação da funcionalidade desse vetor, e efetividade da sua origem de replicação nas células de *Xanthomonas*, desta vez demonstradas através da expressão de um gene repórter em XCC. Além disso, observou-se que a expressão nos plasmídeos pLLUR ocorreu de forma semelhante com ou sem IPTG, conforme esperado.

5.6. Montagem dos vetores de expressão pLACR1_OP, pLACR1_PP e pLACR1_deH

Uma vez sabendo da funcionalidade do vetor, e conhecendo qual sistema de promoção gênica melhor funciona para a XCC, pôde-se então realizar a clonagem dos genes de interesse, *galU* (UDPG-PP) e *Udg* (UDPG-deH), no vetor de expressão pLACR1_mCherry, selecionado a partir dos seus resultados para ser o vetor base para expressão de proteínas nessa bactéria.

5.6.1. CONSTRUÇÃO pLACR1_OP

Novamente utilizando a CPEC (tópico 4.2.7) para realizar a subclonagem de genes oriundos de plasmídeos da plataforma *ePathBricks*, obteve-se as bandas no gel de eletroforese, provenientes da amplificação via PCR do inserto e do vetor. Os tamanhos esperados eram para o fragmento de inserto, 2723 bp, e 5913 bp para o fragmento do vetor (Figura 40).

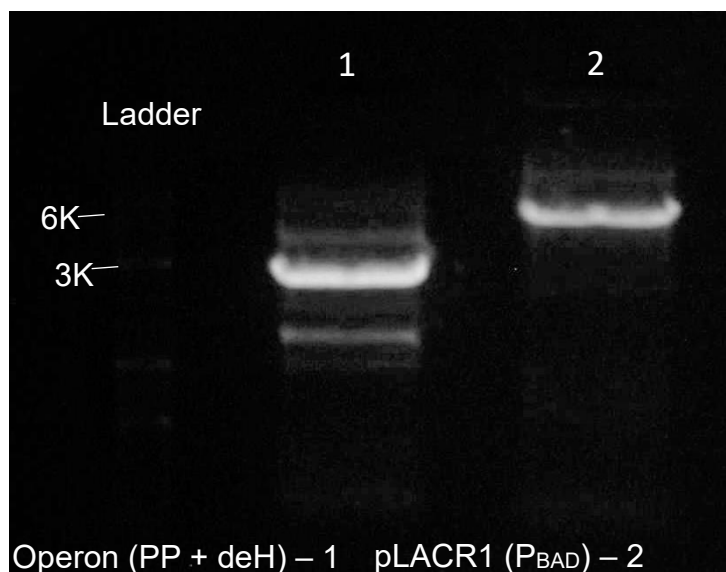


Figura 40: Bandas em gel de agarose após PCR para amplificação dos fragmentos de inserto e vetor para reação de CPEC da construção pLACR1_OP. Poço 1 – Fragmento inserto Operon, tamanho esperado da banda observada: 2723bp, poço 2 – Fragmento vetor pLACR1, tamanho esperado da banda observada: 5913bp. Fonte: Autor.

Após a amplificação dos fragmentos, foram realizados os procedimentos de purificação de DNA a partir do gel, reação de CPEC, transformação em células de *E. coli* DH5 α , aparecimento de colônias nas placas de transformação com antibiótico específico, e então extração do plasmídeo. Duas amostras extraídas passaram por *screening* por digestão enzimática utilizando as enzimas *Sall* e *EcoRI*. Os tamanhos de bandas esperados eram de 5874 bp e 2696 bp. Pela imagem disposta na Figura 41 é possível visualizar as bandas esperadas, confirmando a construção do plasmídeo chamado então pLACR1_OP.

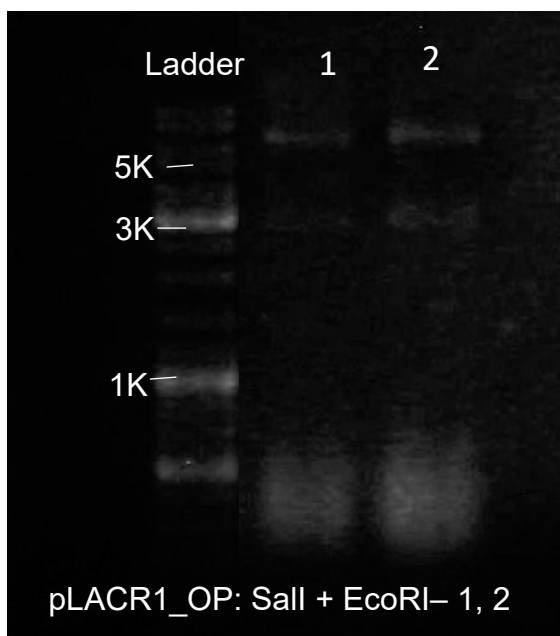


Figura 41: Bandas em gel de agarose pós-digestão (enzimas *SalI* e *EcoRI*) de confirmação da construção pLACR1_OP após transformação em *E.coli*. Conteúdo dos poços – pLACR1_OP (duplicata). Tamanhos esperados das bandas observadas: 5874bp e 2696bp. Fonte: Autor

O plasmídeo contendo os dois genes foi transformado em células de XCC, e o *screening* foi realizado por PCR, utilizando os mesmos primers de amplificação do inserto. Quatro clones foram analisados por PCR de colônia, imagem **A** (Figura 42), e PCR a partir do plasmídeo purificado, imagem **B**. O tamanho esperado do fragmento de DNA é o mesmo de quando foi extraído do pRSM4, 2723 bp. Para todas reações de PCR, das quatro colônias, foram observadas bandas amplificadas próximas, um pouco abaixo, das bandas de 3 Kb do marcador Ladder, demonstrando então o resultado positivo da construção do plasmídeo pLACR1_OP.

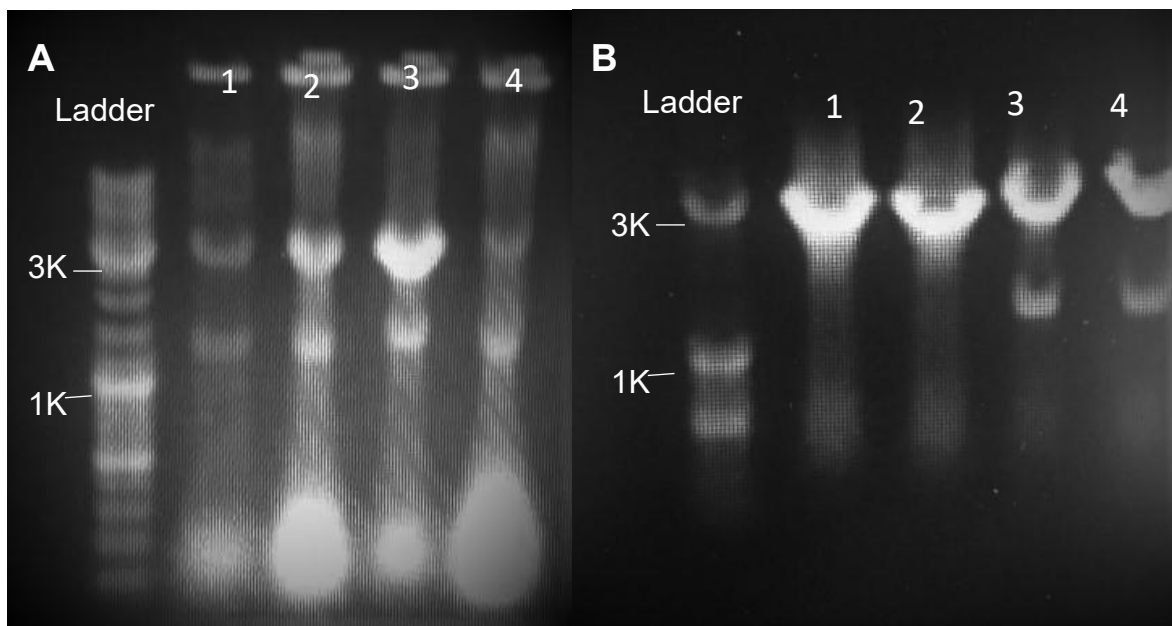


Figura 42: Bandas em gel de agarose após PCR para confirmação de transformação da construção pLACR1_OP em *Xanthomonas*. (A) PCR de colônia. Poços 1, 2, 3 e 4 – XCC_pLACR1_OP, tamanho esperado da banda observada: 2723bp; (B) PCR a partir do plasmídeo extraído. Poços 1, 2, 3 e 4 – pLACR1_OP, tamanho esperado da banda observada: 2723bp. Fonte: Autor.

5.6.2. CONSTRUÇÃO PLACR1_PP E PLACR1_DEH

A partir desta etapa o aluno de Iniciação Científica (FAPESP- Processo 2020/00432-92) Bruno Batista contribuiu com as atividades e obtenção dos resultados.

Após a construção bem-sucedida do vetor pLACR1_OP as próximas etapas foram voltadas às construções dos vetores contendo apenas os genes *galU* e *Udg* individualmente no plasmídeo pLACR1. Os tamanhos esperados para as bandas dos fragmentos de inserto e vetor eram de 1274 bp e 5913 bp, respectivamente, para a construção pLACR1_PP e de 1641 bp e 5908 bp, respectivamente, para a construção pLACR1_deH.

As imagens da Figura 43 abaixo mostram as bandas das regiões amplificadas. Os tamanhos esperados foram confirmados por eletroforese, para as duas construções, pLACR1_PP, imagem **A**, e pLACR1_deH, imagem **B**.

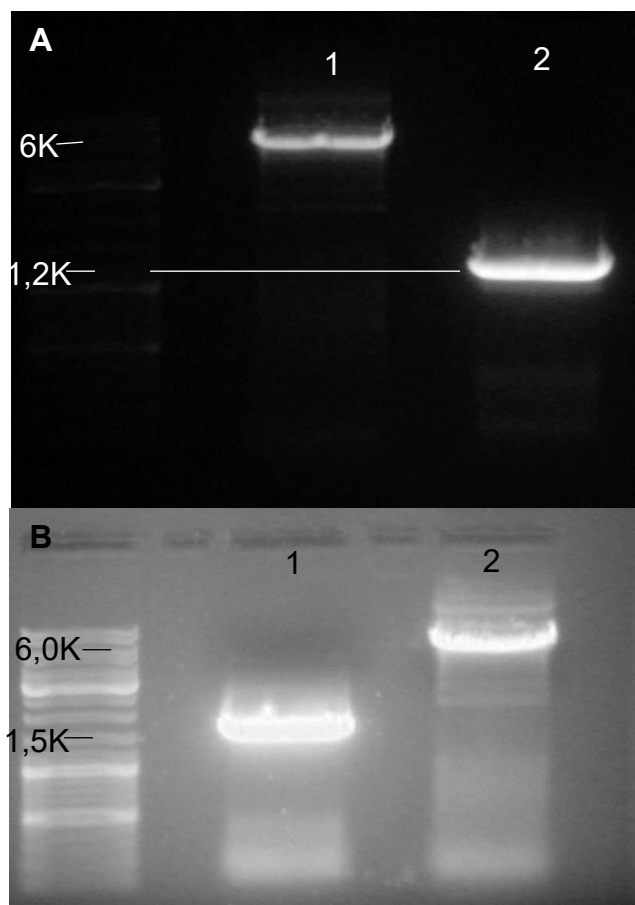


Figura 43: Bandas em gel de agarose após PCR para amplificação dos fragmentos de inserto e vetor para reação de CPEC das construções pLACR1_PP e pLACR1_deH. Imagem (A): Poço 1 – Fragmento vetor pLACR1, tamanho esperado da banda observada: 5913bp, poço 2 – Fragmento inserto *galU*, tamanho esperado da banda observada: 1274bp; Imagem (B): Poço 1 – Fragmento inserto *Udg*, tamanho esperado da banda observada: 1641bp, poço 2 – Fragmento vetor pLACR1, tamanho esperado da banda observada: 5908bp. Fonte: Autor.

Após a reação de CPEC, purificação e transformação em células de *E. coli* *DH5 α* , o *screening* foi realizado por PCR dos plasmídeos extraídos das colônias recém transformadas, utilizando os mesmos primers para amplificação do fragmento do inserto utilizados nas suas construções e, desta forma, as bandas esperadas possuem os mesmos tamanhos dos fragmentos. As imagens da Figura 44 abaixo apresentam as bandas pós eletroforese (pLACR1_PP, imagem **A**, e pLACR1_deH, imagem **B**), onde fica claro o resultado de colônias positivas, ou seja, resultado de as construções terem sido bem-sucedidas. O tamanho esperado dos fragmentos de DNA é o mesmo de quando foram extraídos do pRSM4, 1274 bp e 1641 bp, respectivamente.

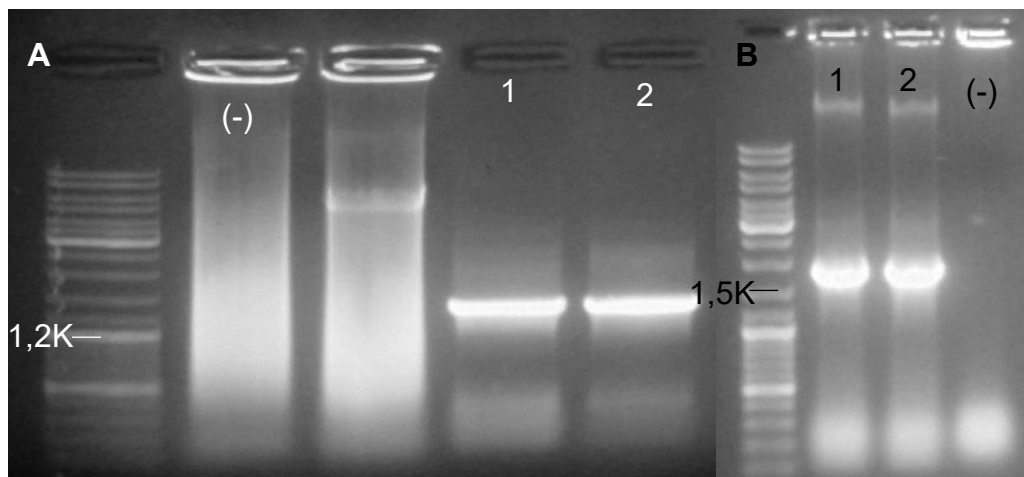


Figura 44: Bandas em gel de agarose após PCR de DNA extraído para confirmação de transformação em *E.coli*. Imagem (A): Poços 1 e 2 - pLACR1_PP, tamanho esperado da banda observada: 1274bp; Imagem (B): Poços 1, 2 - pLACR1_deH, tamanho esperado da banda observada: 1641bp. Poços (-) - negativos. Fonte: Autor.

Por fim, o último passo foi a transformação das células de XCC, por eletroporação, com as construções pLACR1_PP e pLACR1_deH. A imagem da Figura 45 abaixo mostra as bandas que confirmam as transformações após a PCR de colônia das XCC transformantes, não apenas dessas duas construções, mas também da construção do pLACR1_OP. Os primers utilizados foram os mesmos dos fragmentos do inserto das construções, logo o tamanho das bandas esperadas é o mesmo do tamanho dos insertos, 1274 bp, 2723bp e 1641 bp para pLACR1_PP, pLACR1_OP e pLACR1_deH, respectivamente.

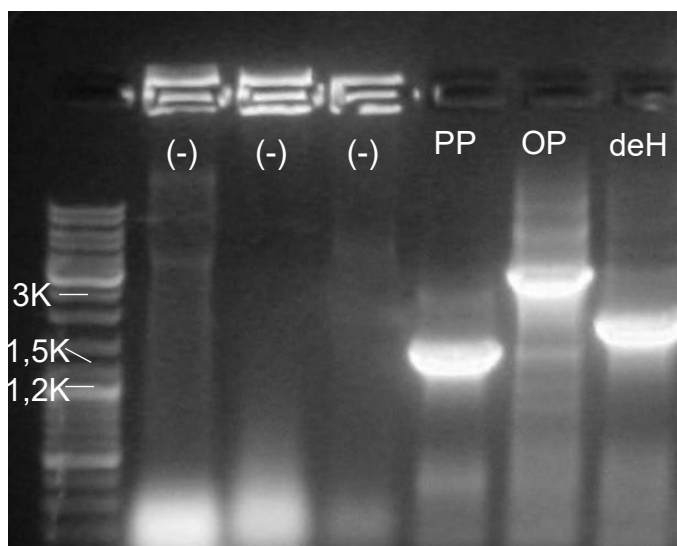


Figura 45: Bandas em gel de agarose após PCR de colônia para confirmação de transformação em *Xanthomonas* com as construções pLACR1_PP, pLACR1_OP e pLACR1_deH, nos poços 1, 2 e 3, respectivamente. Tamanhos esperados para as bandas observadas 1247bp, 2723bp e 1641bp, respectivamente. Poços (-) - negativos. Fonte: Autor.

5.7. Curva de calibração DO vs Massa Seca para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Foram realizados experimentos para o acompanhamento da formação de biomassa pelos métodos da massa seca e de absorbância do cultivo em frascos Erlenmeyer aletados de 1L, em 100 mL de meio SYMP, por um período de aproximadamente 30 horas, para células de XCC, como descrito mais detalhadamente no tópico 4.3.2. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8 e ilustrados na Figura 33.

Tabela 8: Valores de absorbância (600nm) e massa seca coletados do experimento de crescimento celular de XCC em frascos Erlenmeyer para preparação da curva de calibração entre os métodos de quantificação celular.

Pontos (horas)	Média M. Seca g/L	Desvio Pad. (g/L)	Média DO	Desvio Padrão
0	0,000	0,000	0,062	0,002
3	0,120	0,074	0,457	0,059
5	0,270	0,0985	0,856	0,112
7	0,520	0,0383	1,848	0,096
9	1,130	0,249	4,036	0,056
12	3,50	0,826	7,580	0,155
15	4,360	0,572	8,992	0,255
24	5,030	1,080	10,288	0,984
27	5,110	0,678	10,748	0,081

Fonte: Autor

A Figura 46 ilustra bem a curva de crescimento da biomassa em cultivo em frascos, assim como a correlação entre os valores medidos de absorbância e obtidos de massa seca.

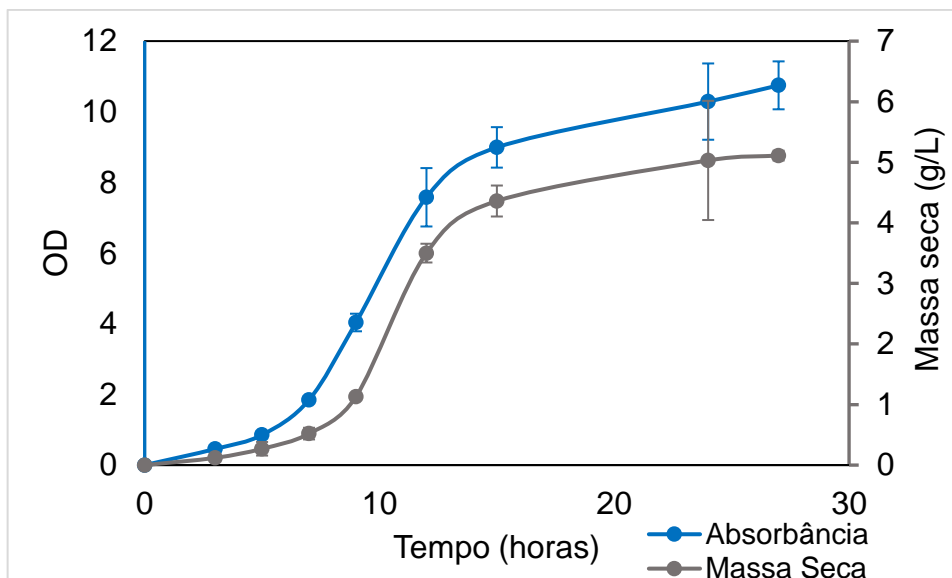


Figura 46: Curvas de crescimento de Biomassa de XCC pelos métodos de densidade ótica e Massa Seca. Em azul a curva de densidade ótica e em cinza a curva de massa seca, apresentando boa correlação. Fonte: Autor.

Os dados obtidos serviram para a construção da curva de calibração relacionando os valores de massa seca e densidade ótica apresentada na Figura 47 abaixo.

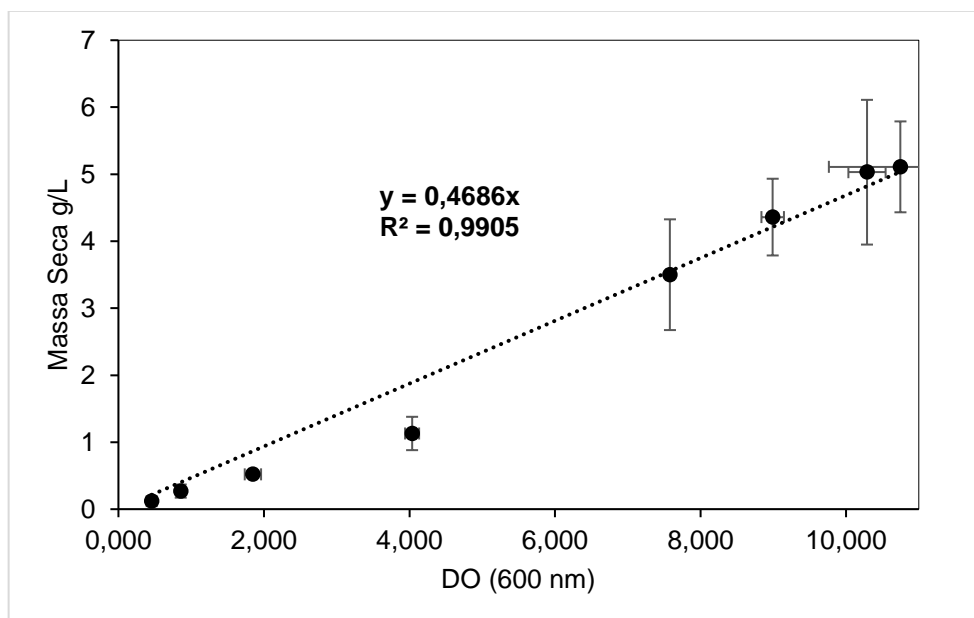


Figura 47: Curva de calibração Massa Seca versus Densidade ótica para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, e ajuste linear, apresentando bom coeficiente $R^2 = 0,9905$. Fonte: Autor.

A correlação dos dados é visível e segue a tendência linear, com um bom coeficiente R^2 em torno de 0,9905. Com a equação da reta obtida por essa correlação, **Massa seca = 0,4686*Abs**, é possível estimar os valores correspondentes em qualquer ponto da curva apenas com a entrada de uma das duas informações.

5.8. Cultivos de avaliação: Produção de goma xantana

Neste tópico serão apresentados os dados obtidos através dos cultivos voltados a produção da goma xantana pelas células de *Xanthomonas campestris pv. campestris* (XCC) “naturais” (*wild type* – WT) e transformadas com os vetores de expressão construídos nesse trabalho. O intuito é compará-los entre si, e com os dados das células não transformadas, a fim de avaliar o efeito da superexpressão de cada gene (*Udg* e *galU*) individualmente (XCC_pLACR1_deH e XCC_pLACR1_PP) e em concomitância (XCC_pLACR1_OP), na produção de goma, e se haveria algum ganho significativo que justifique a manutenção dessa expressão extra.

5.8.1. CRESCIMENTO CELULAR

Os dados obtidos de crescimento da biomassa estão representados pelas curvas de crescimento na Figura 48, abaixo, de massa seca (g/L) por tempo de cultivo dado em horas. Na imagem pode-se ver a indicação do momento da indução com L-arabinose. As linhagens com a numeração “1º” são referentes aos primeiros cultivos, os quais tiveram a indução realizada com 0,005% (m/v) de L-arabinose, e as linhagens com a numeração “2º” são referentes aos cultivos realizados com indução de 0,05% (m/v). Para a linhagem não-transformante, não foram realizadas adições de L-arabinose.

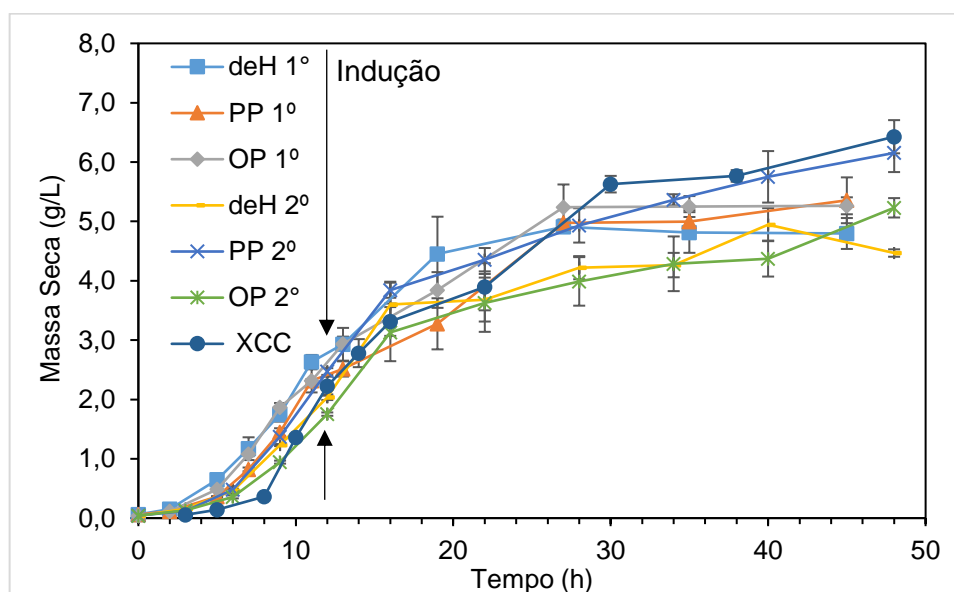


Figura 48: Curvas de crescimento da biomassa pelo tempo. Estão representadas as curvas das linhagens transformantes XCC_deH, XCC_PP e XCC_OP, com as duas concentrações de indutor (1º-

0,005%; 2^o-0,05%), e a linhagem de XCC natural não-transformante. Indicando por setas o momento da indução. Fonte: Autor.

As curvas se entrelaçam ao início dos cultivos, aparentando apenas um crescimento um pouco mais lento da linhagem parental, mas demonstrando que não há diferença considerável entre as linhagens nessa etapa. Após o momento da indução, observa-se uma leve tendência à estabilização do crescimento celular pelas linhagens transformantes deH e OP do 2^o cultivo (maior quantidade de indutor), e um comportamento, ainda que discreto, de crescimento celular constante pela linhagem não-transformante, XCC, e linhagem transformante PP do 2^o cultivo. Apesar das observações, a conclusão obtida é que a expressão das proteínas afetou pouco o crescimento celular como um todo.

O valor máximo de biomassa foi obtido com as células não transformadas (XCC), apresentando uma concentração de $6,427 \pm 0,28 \text{ gX.L}^{-1}$, e com as células da linhagem XCC_pLACR1_PP do 2^o cultivo, com $6,154 \pm 0,32 \text{ gX.L}^{-1}$ alcançados, sendo ambos equivalentes quando considerada a margem de erro. Já o valor mínimo foi anotado pelas células do 2^o cultivo da linhagem XCC_pLACR1_deH, atingindo uma concentração de $4,467 \pm 0,06 \text{ gX.L}^{-1}$. Os valores máximos de biomassa em cada cultivo estão dispostos na Tabela 9 abaixo.

Tabela 9: Valores máximos de biomassa, $X_{m\acute{a}x}$, obtidos com as linhagens transformantes nas duas concentrações de indutor (1^o - 0,005%; 2^o - 0,05%) e para a linhagem de XCC natural.

$X_{m\acute{a}x} \text{ (gX.L}^{-1}\text{)}$						
deH 1 ^o	PP 1 ^o	OP 1 ^o	deH 2 ^o	PP 2 ^o	OP 2 ^o	XCC
4,909±0,26	5,356±0,38	5,263±0,14	4,467±0,06	6,154±0,32	5,230±0,16	6,427±0,28

Fonte: Autor

As concentrações finais de biomassa ficaram próximas para as mesmas linhagens, independentemente da indução. E em geral todas os cultivos geraram altas quantidades de biomassa, quando comparado a literatura (tópico 5.8.4).

Velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{m\acute{a}x}$

Realizando a linearização através do logarítmico natural da concentração de biomassa, $\ln(Cx)$, fica evidente a fase exponencial de crescimento celular das linhagens, como indicado na Figura 49 abaixo.

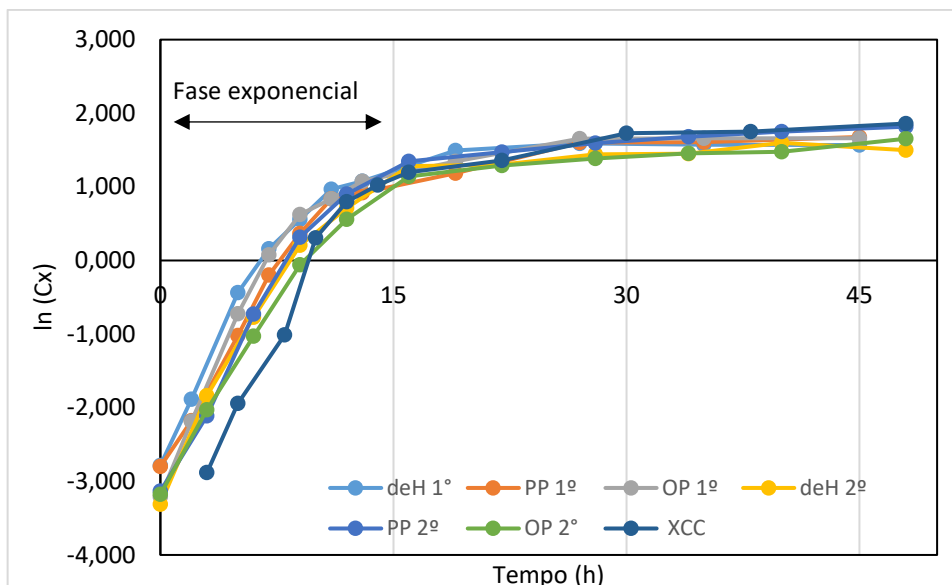


Figura 49: Curvas $\ln(C_x)$ versus tempo. Estão representadas as curvas das linhagens transformantes XCC_deH, XCC_PP e XCC_OP, com as duas concentrações de indutor (1º-0,005%;2º-0,05%), e a linhagem de XCC natural não-transformante. Indicando por setas a região da fase exponencial de crescimento celular. Fonte: Autor.

A inclinação da curva da fase exponencial nos dá, segundo a equação linearizada 1, o valor da velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{m\acute{a}x}$. Desta forma, traçando as retas de ajuste linear de cada uma das curvas, temos então os dados de $\mu_{m\acute{a}x}$ para todas as linhagens, e assim, é possível avaliar o seu crescimento celular livre e observar o efeito da presença do plasmídeo nas células mesmo antes do momento da indução.

$$\ln\left(\frac{C_x}{C_{x0}}\right) = \mu_{m\acute{a}x}(t - t_0) \quad (1)$$

Abaixo temos a Figura 50 apresentando os gráficos de $\ln\left(\frac{C_x}{C_{x0}}\right)$ versus Δt , para as linhagens transformantes e para linhagem não-transformante, assim como o ajuste da reta e a devida equação correspondente.

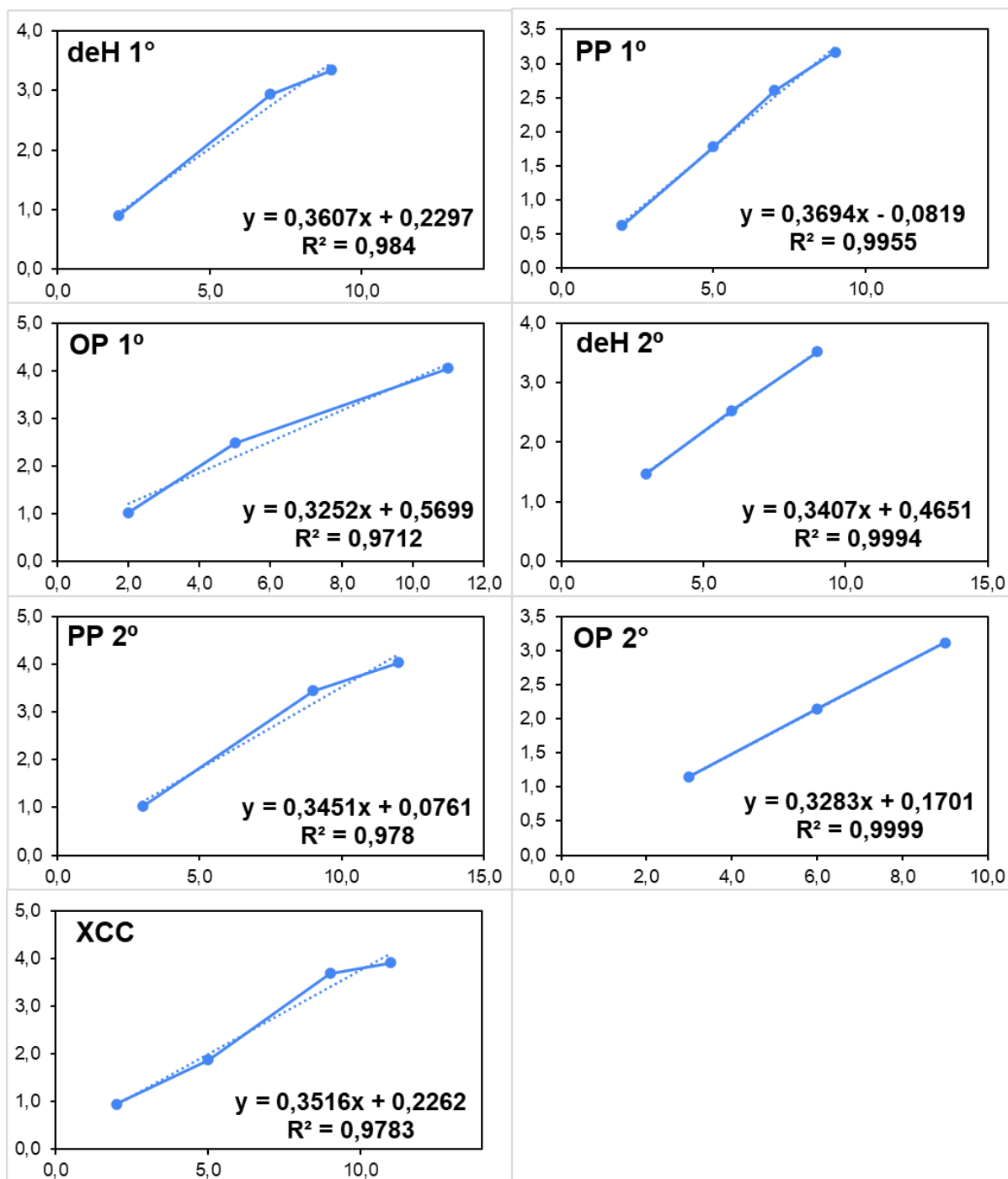


Figura 50: Curvas de $\ln(C_x/C_{x_0})$ (eixo Y) versus $(t - t_0)$ (eixo X), para ajuste linear e obtenção de $\mu_{m\acute{a}x}$ das linhagens avaliadas nesse estudo. Fonte: Autor.

A Tabela 10 abaixo resume os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ obtidos dos ajustes lineares apresentados na Figura 51 acima.

Tabela 10: Valores de velocidade máxima específica, $\mu_{m\acute{a}x}$, para as linhagens transformantes de XCC nas duas concentrações de indutor (1° - 0,005%; 2° - 0,05%) e para a linhagem de XCC natural.

$\mu_{m\acute{a}x} (h^{-1})$						
deH 1°	PP 1°	OP 1°	deH 2°	PP 2°	OP 2°	XCC
0,361	0,369	0,325	0,341	0,345	0,328	0,352

Fonte: Autor

Os valores obtidos de $\mu_{m\acute{a}x}$ para as linhagens transformantes giram em torno do valor obtido para a linhagem n\~{a}o-transformante ($0,352\text{ h}^{-1}$). Os dados da fase exponencial ainda s\~{a}o referentes ao crescimento celular pr\~{e}vio ao momento de indu\~{c}\~{a}o, ou seja, a manuten\~{c}\~{a}o do plasm\~{i}deo na c\~{e}lula e a necessidade da presen\~{c}a do antibi\~{o}tico no meio dos cultivos das linhagens transformantes n\~{a}o afetaram significativamente esse par\~{a}metro de crescimento das linhagens constru\~{i}das nos cultivos realizados. Essa conclus\~{a}o \u00e9 justificada pela baixa varia\~{c}\~{a}o geral dos dados nesse par\~{a}metro, que variam na faixa de $0,325\text{ h}^{-1}$ (OP 1\~{o}, valor m\~{i}nimo) a $0,369$ (PP 1\~{o}, valor m\~{a}ximo).

5.8.2. PRODU\~{C}\~{A}O DE GOMA

C_P versus tempo

A seguir, na Figura 51, encontra-se a curva de concentra\~{c}\~{a}o de goma xantana *versus* o tempo. Assim como nas curvas de crescimento, o tempo de indu\~{c}\~{a}o est\~{a} indicado por setas, e as concentra\~{c}\~{a}o de indutor s\~{a}o de acordo com a ordem dos cultivos, 0,005% de L-arabinose para os primeiros cultivos (assinalado como 1\~{o}), e 0,05% para os segundos (assinalado como 2\~{o}).

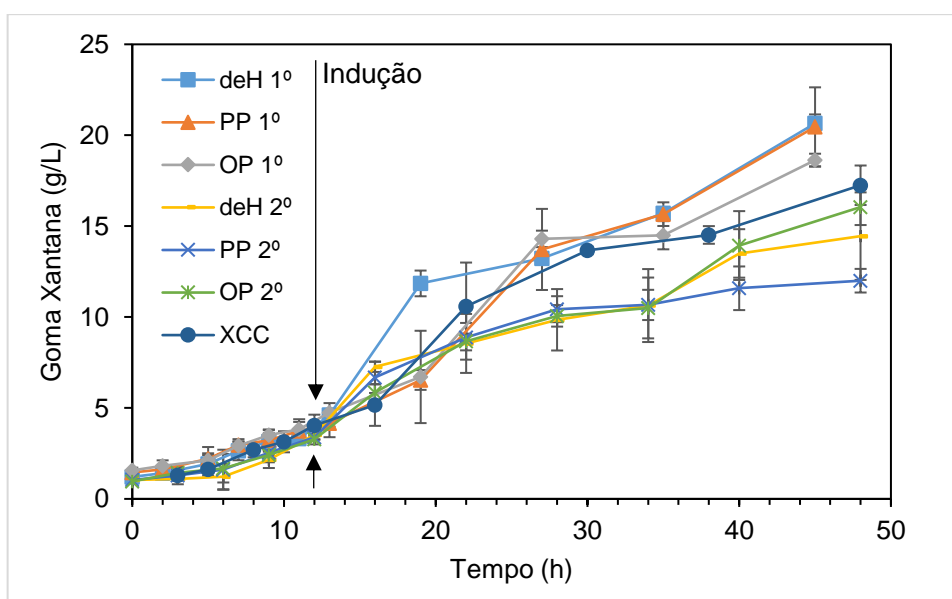


Figura 51: Curvas de produ\~{c}\~{a}o de goma xantana por tempo. Est\~{a}o representadas as curvas das linhagens transformantes com as duas concentra\~{c}\~{a}o de indutor (1\~{o}-0,005%;2\~{o}-0,05%), e a linhagem de XCC natural n\~{a}o-transformante. Indicando por setas o momento da indu\~{c}\~{a}o. Fonte: Autor.

Observa-se já inicialmente que a curva de concentração da goma da linhagem XCC passa entre as curvas das linhagens transformantes da indução do 1º cultivo (acima) e as curvas da indução do 2º cultivo (abaixo), separando-as visualmente, o que já indica à primeira vista que houve uma diferença evidente entre as duas induções, diferenciação esta que teve início após o momento da indução. Com relação as quantidades, a maior produção de goma foi obtida pelas células XCC_pLACR1_deH do 1º cultivo, atingindo $20,65 \pm 0,49 \text{ gP.L}^{-1}$ em 45 horas de cultivo, e a menor pelas células XCC_pLACR1_PP do 2º cultivo, chegando a somente $12,00 \pm 0,65 \text{ gP.L}^{-1}$ em 48 horas de cultivo. Em comparação, as células XCC produziram $17,25 \pm 1,08 \text{ gP.L}^{-1}$.

Os dados finais de produção de goma fornecidos pelo gráfico de concentração de goma por tempo dispostos na Tabela 11, mostram que mesmo levando em consideração os desvios padrões de erro, as concentrações de produto obtidas quando a indução foi de 0,05% de indutor ficam significativamente abaixo das concentrações de produto obtidas quando a indução foi de 0,005% de indutor. Uma possível explicação para esse efeito pode estar relacionada a uma regulação celular sobre a expressão das proteínas, induzida pela expressão excessiva das proteínas recombinantes logo no início da indução, que seria prejudicial ao funcionamento normal das células. Os níveis de expressão das proteínas UDP-PP e UDP-deH serão avaliados em trabalhos futuros por meio da medida de suas atividades enzimáticas para avaliação dessa hipótese.

Tabela 11: Valores de produção final, P_F , para as linhagens transformantes nas duas concentrações de indutor (1º - 0,005%; 2º - 0,05%) e para a linhagem de XCC natural. Obs.: Dados referentes a concentração de indutor 0,005% (m/v), tiveram 3 horas a menos de cultivo.

$P_{m\acute{a}x}(\text{gP.L}^{-1})$						
deH 1º*	PP 1º*	OP 1º*	deH 2º**	PP 2º**	OP 2º**	XCC**
20,65±0,49	20,46±2,17	18,63±0,35	14,45±2,41	12,00±0,65	16,05±0,99	17,25 ±1,08

* cultivo de 45 horas ** cultivo de 48 horas

Fonte: Autor

Produtividade volumétrica (P_r)

Talvez o parâmetro de maior importância na avaliação das células transformantes seja a produtividade (P_r), pois nos dá a quantidade de produto produzida por hora de cultivo refletindo a eficiência de todo o processo. A produtividade é calculada pela seguinte Equação 2:

$$P_r = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P - P_0}{t - t_0} \quad (2)$$

Abaixo então, temos apresentado na Figura 2 o gráfico das produtividades finais de cada uma das linhagens de XCC, transformantes e não-transformante, estudadas neste trabalho.

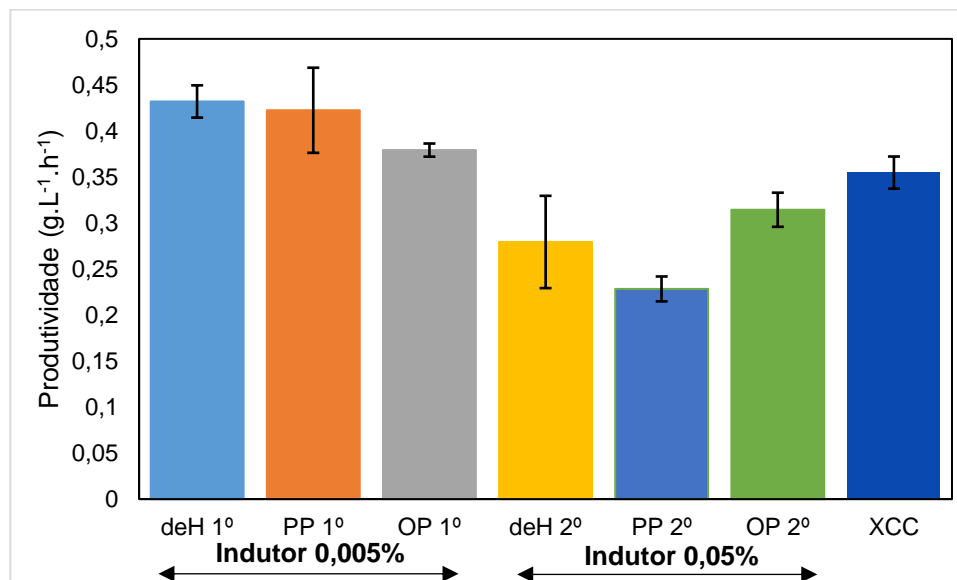


Figura 52: Representação gráfica dos dados de produtividade (P_r). Ao lado esquerdo, indicado no gráfico com um intervalo de setas, colunas referentes aos dados das linhagens transformantes com indução 0,005%, ao lado direito, também indicado por um intervalo de setas, colunas referentes aos dados com indução 0,05%, e por fim, na extremidade direita, coluna referente a linhagem não-transformante. Fonte: Autor.

A Tabela 12 abaixo apresenta os valores numéricos de P_r .

Tabela 12: Valores de produtividade, P_r , para as linhagens transformantes nas duas concentrações de indutor (1º - 0,005%; 2º - 0,05%) e para a linhagem de XCC natural.

P_r (gP.L ⁻¹ .h ⁻¹)						
deH 1º	PP 1º	OP 1º	deH 2º	PP 2º	OP 2º	XCC
0,432±0,02	0,422±0,05	0,379±0,01	0,279±0,05	0,228±0,01	0,314±0,02	0,355±0,02

Fonte: Autor

A maior P_r apresentada foi pelas células XCC_pLACR1_deH 1º (deH 1º), e XCC_pLACR1_PP 1º (PP1º), com uma diferença de 0,01 aproximadamente entre elas, e considerando os desvios padrões, os valores das duas linhagens são equivalentes. Com relação às demais linhagens, suas P_r ficam de fora da faixa de erro de desvio padrão dos dados da linhagem deH 1º, mas o mesmo não acontece para a linhagem PP 1º, que possui uma faixa de desvio padrão maior, ou seja, apesar das duas linhagens apresentarem estatisticamente valores de produtividade iguais, o dado obtido através da linhagem deH 1º é mais consistente. Mas ainda assim, não podemos afirmar nenhuma linhagem como tendo a melhor eficiência com base nessas informações e, por isso, é necessário a utilização de métodos estatísticos com maior confiabilidade e intervalo de confiança definido.

O método utilizado foi a análise de variância (ANOVA), de fator duplo com repetição (avalia as linhagens e induções, com dados em triplicata) e de fator único (avalia as linhagens, com dados em triplicata). A ANOVA dá com um intervalo de confiança, previamente definido em 95%, a resposta se há diferença estatisticamente significativa entre os itens comparados. Segue então a Tabela 13 abaixo com os parâmetros.

Tabela 13: Dados obtidos a partir da Análise de Variância (ANOVA) para os dados obtidos de produtividade. Comparativo entre linhagens e concentração de indutor.

ANOVA – $\alpha = 0,05$			
(Fator duplo com repetição) Comparativo P_r: Linhagens transformantes e Induções			
Fonte da variação	F	Valor-P	F-crítico
Induções	101,2097	3,36E-07	4,747225
deH, PP e OP	0,971465	0,406409	3,885294
Interações	6,786484	0,010676	3,885294
(Fator único) Comparativo P_r			
Fonte da variação	F	Valor-P	F-crítico
deH 1 ^o , PP 1 ^o , OP 1 ^o e XCC	6,193222	0,017588	4,066181
deH 1 ^o e OP 1 ^o	18,12096	0,013086	7,708647
deH 1 ^o e PP 1 ^o	0,008584	0,930635	7,708647
PP 1 ^o e OP 1 ^o	3,319014	0,142576	7,708647
OP e XCC	7,212	0,054913	7,708647
PP e XCC	7,557914	0,051418	7,708647
deH e XCC	28,12191	0,006075	7,708647

Fonte: Autor

Para que exista diferença estatística entre os valores, ou seja, que esteja dentro do intervalo de 95%, o Valor-P apresentado pela análise deve estar abaixo do valor de α de 0,05 e os valores de F devem ser maiores que o valor de F-crítico, para demonstrar significância estatística.

Analisando os dados, confirmamos com uma confiança ainda maior, de 99,9%, que a indução influenciou decisivamente na produtividade. No que tange as linhagens transformantes, quando considerado o todo, a análise não identificou diferença significativa, mas identificou diferença quando analisada a interação entre linhagem e indução. Isso significa que há diferença sim entre as linhagens, mas apenas quando comparadas dentro da mesma condição de indução.

Sabendo então que existe diferença estatística entre as linhagens transformantes, aplicou-se a ANOVA novamente para comparação com a linhagem não-transformante, XCC, e novamente se observou, com um intervalo de confiança de 98%, que há diferença entre elas, ou seja, isso nos dá o resultado definitivo de que

houve uma melhora estatisticamente significativa na produção de goma xantana com a superexpressão das enzimas gargalos da via de biossíntese.

Agora na tentativa de encontrar qual a linhagem transformante possui melhor produtividade de goma xantana, foram realizadas novamente a ANOVA entre as três novas linhagens, e a análise individualmente de cada uma com a XCC. Os resultados mostraram que há diferença estatística significativa entre a linhagem XCC_pLACR1_deH 1^o com relação a XCC_pLACR1_OP 1^o, ou seja, esse resultado já descarta a linhagem XCC_pLACR1_OP 1^o da avaliação pelo 1^o lugar em termos de produção de goma. Com relação a linhagem XCC_pLACR1_PP 1^o, não houve diferenças estatísticas significativas em suas análises com nenhuma das outras duas linhagens, logo, sua produtividade pode se encontrar tanto sendo a maior como sendo a menor entre as três, o que já era perceptível pelo desvio padrão elevado.

Deste modo, as comparações individuais entre as linhagens transformantes e a XCC mostrou que a linhagem transformada com pLACR1_deH e a indução de 0,005% apresentou um resultado superior de produção de goma xantana em comparação com a linhagem natural com um nível de confiança de 99%, enquanto que as outras duas linhagens transformantes ficaram levemente abaixo do nível de confiança de 95%, com níveis de confiança de 94,8 e 94,5% para as linhagens transformadas com pLACR1_PP e pLACR1_OP, respectivamente, com a indução de 0,005%.

Porcentagem de ganho na produção e produtividade

A Tabela 14 abaixo faz uma comparação do aumento percentual na produção final e na produtividade de goma xantana que cada linhagem transformante obteve em relação a linhagem não-transformante. Previamente, os dados de produção final dos cultivos de 45 horas foram estimados para 48 horas utilizando os dados de produtividade. Só foram analisadas as linhagens com indução de 0,005%. Os cálculos das porcentagens seguiram as Equações 3 e 4 abaixo, onde P_F é a produção final.

$$\%P_F = \frac{P_F - P_{FXCC}}{P_{FXCC}} * 100; \quad (3)$$

$$\%P_r = \frac{P_r - P_{rXCC}}{P_{rXCC}} * 100 \quad (4)$$

Tabela 14: Valores de percentual de acréscimo na produção final, P_F , e produtividade, P_r , para as linhagens transformantes na concentração de indutor de 0,005% em comparação com a linhagem de XCC natural (P_{FXCC} / P_{rXCC}).

(%)			
	deH	PP	OP
P_F	27,2%	25,9%	14,6%
P_r	21,7%	18,9%	6,7%

P_{FXCC} : 17,25 gP.L⁻¹ P_{rXCC} : 0,355 gP/h Fonte: Autor

Dados de ganho em porcentagem são importantes para nos dar uma noção quantitativa e qualitativa da diferença obtida com as modificações realizadas. As linhagens transformadas com pLACR1_deH e pLACR1_PP conseguiram produções finais em torno de um quarto maiores do que a linhagem não transformada, e esse é um resultado expressivo que irá contribuir positivamente no balanço econômico final.

5.8.3. RELAÇÕES DE BIOMASSA E PRODUTO

Fator de rendimento de produto por biomassa, $Y_{P/X}$ [gP(gX)⁻¹]

A começar pelo parâmetro cinético $Y_{P/X}$, tentou-se aqui observar com mais clareza a relação entre a produção do metabólito e o crescimento celular. Esse fator deve ser calculado na fase exponencial de crescimento, assim como o $\mu_{máx}$, pois depende do ΔX . Abaixo temos a Figura 53 com os gráficos das curvas de variação de biomassa pela variação do tempo entre pontos na fase de crescimento exponencial, junto dos ajustes de reta e as respectivas equações. O $Y_{P/X}$ é dado por (Equação 4):

$$Y_{\frac{P}{X}} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (4)$$

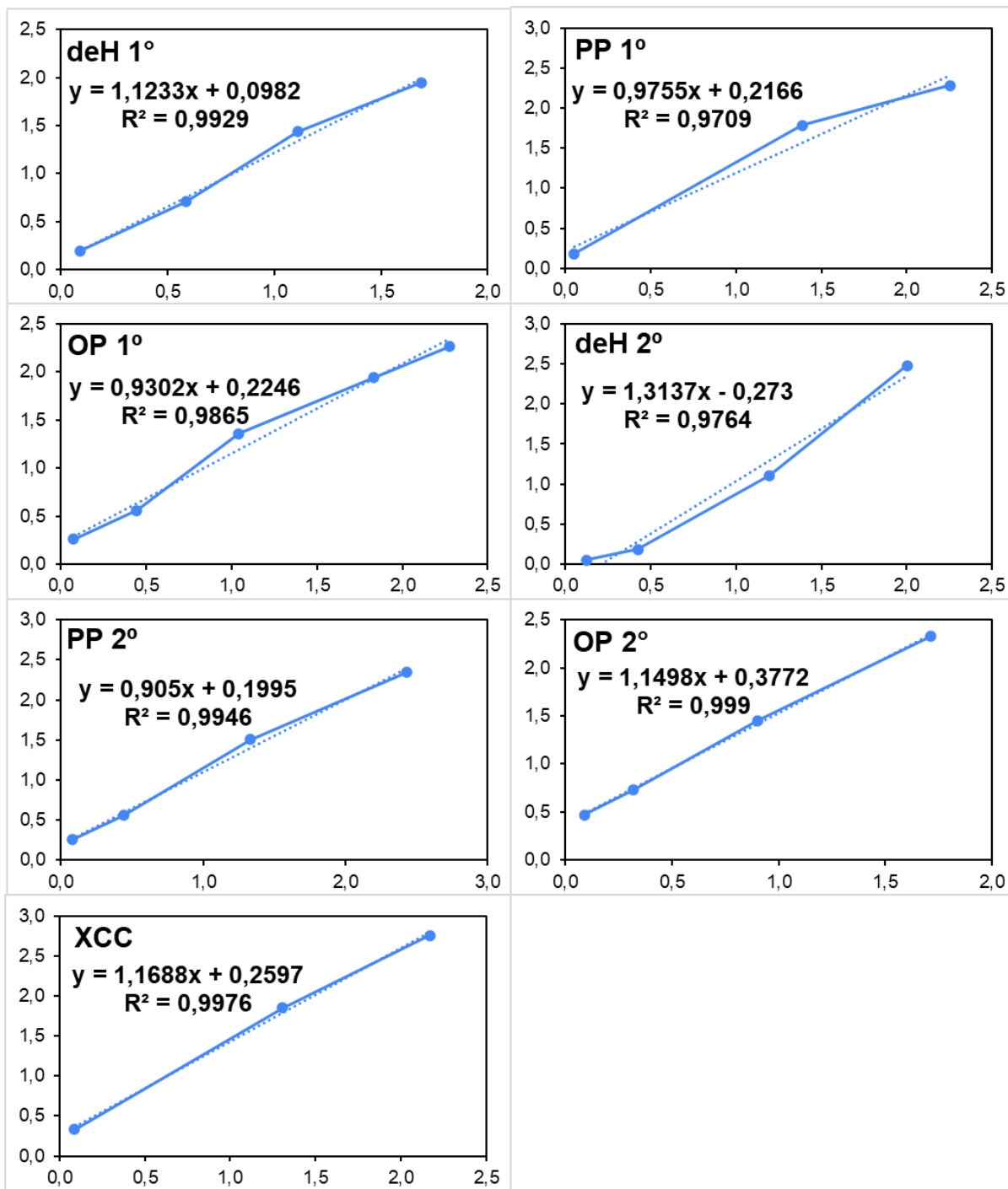


Figura 53: Curvas de ΔP (eixo Y) versus ΔX (eixo X), para ajuste linear e obtenção do fator de conversão Y_{PX} (coeficiente angular), das linhagens avaliadas nesse estudo. Fonte: Autor.

Os valores de $Y_{X/P}$ estão listados na Tabela 15 abaixo.

Tabela 15: Valores do fator de rendimento de produto e biomassa, Y_{PX} , para as linhagens transformantes nas duas concentrações de indutor (1° - 0,005%; 2° - 0,05%) e para a linhagem de XCC natural.

$Y_{PX} [gP(gX)^{-1}]$						
deH 1°	PP 1°	OP 1°	deH 2°	PP 2°	OP 2°	XCC
1,123	0,975	0,930	1,314	0,905	1,150	1,169

Fonte: Autor

Analisando o fator de rendimento de produto por biomassa obtido com os dados antes do momento de indução (fase exponencial de crescimento), da mesma maneira como feito para o parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$, (dados avaliados anteriores a indução) foi possível avaliar o efeito das transformações nas linhagens, mas, agora no que diz respeito a produção de goma por biomassa de *Xanthomonas*. Observamos que os dados obtidos das linhagens para este parâmetro giraram em torno do encontrado para linhagem parental ($Y_{P/X_XCC} = 1,169$), variando entre 0,905 (PP 2^o) de mínimo e 1,314 (deH 2^o) de máximo, concluindo que as transformações não aparentaram surtir efeito considerável na relação entre produção de goma e crescimento celular.

Produtividade específica, δp (gP/gX/h)

Parâmetro de produção de goma xantana por biomassa de células por hora (Equação 5), ou produtividade específica. Esse parâmetro auxilia a avaliar a produção de metabólito por grama de biomassa com relação ao tempo, facilitando observar a efetividade da produção celular, e identificar linhagens que possam não ter a maior produtividade geral, mas tem alta eficiência de produção por células, apresentando assim alto potencial de desenvolvimento. Além disso, avaliar esse parâmetro permite verificar se os valores mais altos de produtividade geral também correspondem às células mais produtivas entre as linhagens. O gráfico na Figura 54 abaixo apresenta os valores de δp para cada uma das células transformantes e para a não-transformante.

$$\delta p = \frac{P_r}{\Delta X} \quad (5)$$

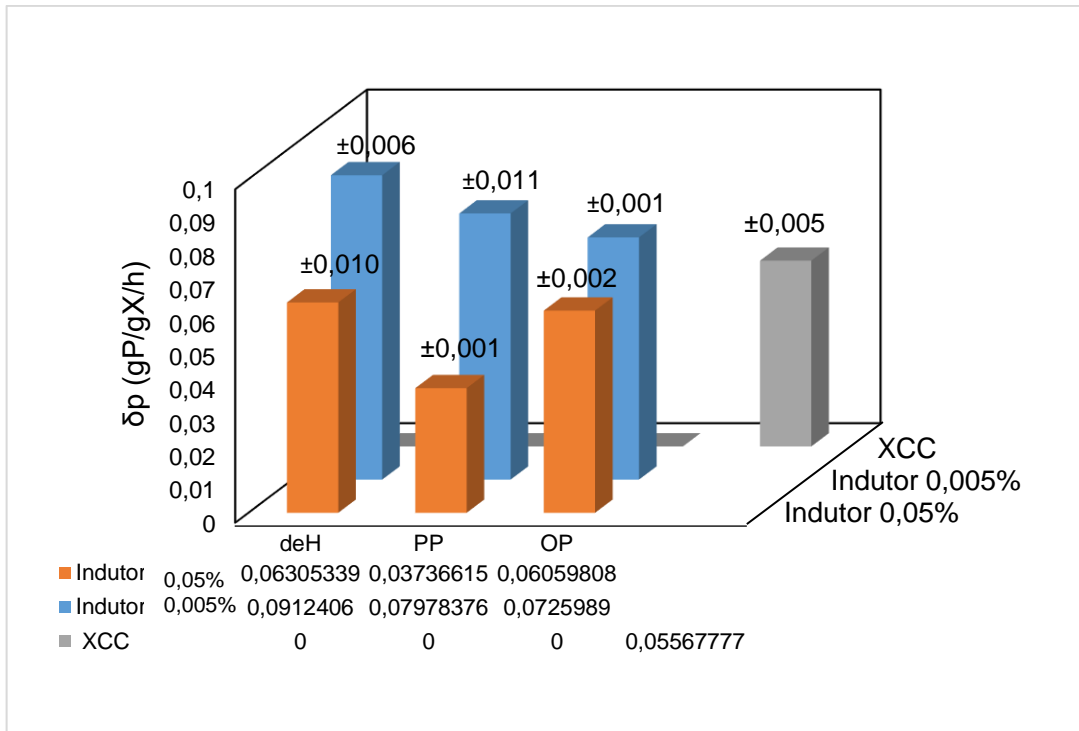


Figura 54: Representação gráfica dos dados de produtividade por biomassa (δ_P). Primeira fila (da frente ao fundo) de colunas referente aos dados das linhagens transformantes com indução 0,05%, segunda linha referente aos dados com indução 0,005%, e terceira linha à direita, dados referentes a linhagem não-transformante. Fonte: Autor.

Os dados da Figura 55 mostram que houve uma correlação direta entre a produtividade específica (δ_P) e a produtividade volumétrica (P_V), apontando novamente a linhagem XCC_pLACR1_deH como a de melhor desempenho também a partir da avaliação de δ_P . A seguir, na Tabela 16, são apresentados os dados de ANOVA para esse parâmetro de produtividade.

Tabela 16: Dados obtidos a partir da Análise de Variância (ANOVA) para os dados obtidos de produtividade por biomassa. Comparativo entre linhagens.

ANOVA – $\alpha = 0,05$		
(Fator único) Comparativo δ_P :		
F	Valor-P	F crítico
	deH 1º, PP 1º, OP 1º e XCC	
5,246579	0,030876	4,256495
	deH 1º e PP 1º	
2,787802	0,146024	5,987378
	deH 1º e XCC	
55,45074	0,001737	7,708647
	PP 1º e XCC	
7,828748	0,048912	7,708647

Fonte: Autor

A diferença entre as linhagens foi confirmada pela análise estatística, mas novamente não foi possível diferenciar as linhagens XCC_pLACR1_deH e XCC_pLACR1_PP. No entanto, nesse parâmetro, a linhagem com o gene *galU*

ultrapassou o nível de confiança de 95% em relação a linhagem não transformante. Além disso, ficou novamente evidenciada a diferença estatisticamente significativa entre a linhagem XCC_pLACR1_deH e a linhagem XCC.

5.8.4. COMPARAÇÃO DOS DADOS COM A LITERATURA

Não foram encontrados na literatura estudos que utilizassem a linhagem *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC® 33913™ para estudos de produção de goma e, deste modo, a comparação será realizada frente a outras subespécies de *Xanthomonas campestris*. Foram comparados, na Tabela 17, valores de $\mu_{m\acute{a}x}$, P_r , $Y_{X/P}$, $X_{m\acute{a}x}$, $P_{m\acute{a}x}$, e tempo de cultivo. Foram selecionadas as linhagens não-transformante XCC e transformante XCC_pLACR1_deH como bases comparativas.

Tabela 17: Comparativo de parâmetros de crescimento celular e produção de goma xantana entre dados de cultivos provenientes de estudos na literatura e dados provenientes de cultivos selecionados deste trabalho.

Parâmetros	Este Estudo		Faria et al. (2010)	García-Ochoa et al. (1995)	Serrano-Carreón et al. (1998)	Letisse et al. (2003)	Zabot et al. (2011)	Amanullah et al. (1998)
	XCC deH	XCC	(2010)	(1995)	(1998)	(2003)	(2011)	(1998)
Linhagem de <i>Xanthomonas campestris</i>	ATCC 33913	ATCC 33913	NRRL B-1459	NRRL B-1459	NRRL B-1459	ATCC 13951	pv. <i>mangifera</i> <i>eindicae</i> 1230	NRRL B-1459
$\mu_{m\acute{a}x}$ [h ⁻¹]	0,311	0,354	0,485	0,670	0,250	0,380	0,290	0,07
$Y_{P/X}$ [gX(gP) ⁻¹]	1,123	1,169	7,692	-	2,000	0,500	-	-
P_r [gPL ⁻¹ h ⁻¹]	0,432	0,356	0,630	0,343	0,799	0,540	0,368	0,44
$X_{m\acute{a}x}$ [gL ⁻¹]	4,90	6,43	2,313	1,580	4,420	3,300	4,900	3,86
$P_{m\acute{a}x}$ [gL ⁻¹]	20,65	17,25	~15,5	~24,0	33,00	~26,0	35,30	33,10
Tempo [h]	45	48	24	70	42	50	96	75
Subst.* [gL ⁻¹]	35 (S)	35 (S)	35 (S)	40 (S)	40 (S)	42 (S)	(M.C.)	50 (G)
Plataforma	Shaker	Shaker	Biorreator	Biorreator	Biorreator	Biorreator	Biorreator	Biorreator

*Substrato: (S) – Sacarose; (G) – Glicose; (M.C.) – Meio complexo (soro do queijo muçarela). Fonte: Autor

As condições de fermentação de cada autor influenciam nas produções e nos dados cinéticos e, desta forma, são descritas aqui as informações mais relevantes dos trabalhos citados. FARIA et al. (2010) conduziram suas fermentações em biorreator de 4,0 litros à 28°C e pH 7,5, com meio composto por sacarose (a partir do caldo de cana, 35 g.L⁻¹), extrato de levedura (3,0 g.L⁻¹), NH₄NO₃ (0,86 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (2,5 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (2,5 g.L⁻¹), e antiespumante (0,5 mL.L⁻¹). GARCÍA-OCHOA; SANTOS; ALCÓN (1995), utilizou um biorreator de 1,5 L à 28°C e pH 7,0 (não controlado), aeração de 1 vvm, e meio de cultura composto principalmente por sacarose (40 g.L⁻¹), ácido cítrico (2,1 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (2.866 g.L⁻¹), MgCl₂ (0.507 g.L⁻¹), e NH₄NO₃ (1.144 g.L⁻¹).

Também utilizando 40 gL^{-1} de sacarose, SERRANO-CARREÓN et al. (1998) conduziram o experimento em biorreator de 1,4 L a 29°C , pH 7,2 e 0,5 vvm, contanto também, principalmente, com ácido cítrico ($2,3 \text{ gL}^{-1}$), KH_2PO_4 (5 gL^{-1}), MgCl_2 (0.163 gL^{-1}), e NH_4Cl (2 gL^{-1}). LETISSE; LINDLEY; ROUX, (2003) utilizou em seu meio, principalmente, 42 gL^{-1} de sacarose, NH_4NO_3 (1.125 gL^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.25 gL^{-1}), e 15 mL de hidrolisado de farinha de soja, e para a fermentação foi empregado um biorreator de 20 L e condições de temperatura de 28°C , pH 7,0 e 20% de oxigênio dissolvido.

Também utilizando um biorreator de 20 L, mas 14 L de volume de trabalho, AMANULLAH; SATTI; NIENOW, (1998), conduziram sua fermentação mantendo temperatura a 28°C , pH 7,0 e 15% de saturação de ar, e seu meio composto principalmente por glicose (50 gL^{-1}), ácido cítrico ($2,3 \text{ gL}^{-1}$), KH_2PO_4 (5 gL^{-1}), MgCl_2 (0.163 gL^{-1}), NH_4Cl (2 gL^{-1}), e antiespumante ($0,5 \text{ mL.L}^{-1}$). Por fim, ZABOT et al. (2011) utilizou um biorreator de 2,5 L, com 900 mL de volume de trabalho, e um meio com base em soro de queijo muçarela com adição de MgSO_4 1% (m/m) e KH_2PO_4 2% (m/m), a temperatura foi mantida a 28°C e pH ajustado inicialmente para 7,2, não havendo informações sobre a aeração.

Na comparação dos dados obtidos neste trabalho com os da literatura apresentados na tabela 17, é perceptível que eles se mantêm na faixa de valores condizentes com o esperado para bactérias de sua espécie. Iniciando pelos valores de $\mu_{m\acute{a}x}$, ambas linhagens transformante e não-transformante estão próximas da média dos valores da literatura, e valores intermediários também foram obtidos para o fator de conversão $Y_{P/X}$. Uma observação, também dentro desse mesmo parâmetro, é que a linhagem *NRRL B-1459* parece possuir uma maior preferência pela produção de goma na fase exponencial, em comparação com as outras subespécies, já que apresentou maiores valores de $Y_{P/X}$.

O fato abordado sobre a linhagem *NRRL B-1459* no parágrafo anterior, pode ajudar a explicar as menores concentrações de biomassa máxima apresentadas por essa subespécie em comparação com o apresentado pelas outras subespécies, principalmente pelas utilizadas nesse trabalho. No entanto, as concentrações de biomassa máxima apresentadas pelas linhagens nesse trabalho estão altas, quando considerando que os cultivos foram realizados em frascos agitados, diferentemente dos cultivos que deram origem aos dados extraídos da literatura, e isso pode estar

relacionado ao $Y_{P/X}$ apresentado pela linhagem ATCC 33913, que tende um pouco mais à replicação de células nessa fase exponencial quando em comparação a NRRL B-1459. Entretanto, a linhagem ATCC 13951 apresentou um menor $Y_{P/X}$, mas menor valor de $X_{máx}$. Dessa forma, a maior formação de biomassa observada aqui pode estar relacionada também com o meio de cultura, que possui maiores quantidades de fontes de nitrogênio, fósforo e magnésio do que os demais cultivos avaliados. GARCÍA-OCHOA; SANTOS; FRITSCH, (1992) realizaram um estudo nutricional para *Xanthomonas campestris* voltado à produção de goma, e chegaram à conclusão que os nutrientes nitrogênio, fósforo e magnésio influenciam na produção e no crescimento das células, com o magnésio influenciando positivamente no crescimento celular, enquanto que concentrações limitantes dos outros favorecem a produção da goma xantana.

Mesmo com uma alta taxa de crescimento celular, a produtividade (P_r) de goma atingiu valores significativos neste trabalho. Os valores obtidos aqui mesmo em cultivos em frasco, estão condizentes com as produtividades obtidas em cultivos em reator apresentados na literatura consultada. No caso da linhagem transformante XCC_pLACR1_deH, o valor da produtividade superou dois cultivos em biorreator da literatura de duas subespécies diferentes, incluindo a NRRL B-1459, no trabalho de GARCÍA-OCHOA; SANTOS; ALCÓN (1995), evidenciando que as condições dos cultivos realizados nesse trabalho também permitem uma alta produção do polissacarídeo. Cabe agora avaliar se uma redução nas concentrações de fósforo e nitrogênio do meio de cultura utilizado podem melhorar ainda mais os resultados de produção, ou se a alta biomassa para essa subespécie pode ser um fator favorável nesse sentido. Por fim, os resultados de produtividade foram considerados satisfatórios em comparação com a literatura.

6. Conclusões

Os vetores da série *ePathBrick vectors* apesar das suas diversas vantagens, com destaque para facilidade de manipulação e compatibilidade entre plasmídeos da mesma família - facilitando assim subclonagens entre eles - não se mostraram úteis para a expressão gênica em bactérias do gênero *Xanthomonas* já que parece não terem sido capazes de se replicar nestas células.

Nesse sentido verificou-se que o vetor de amplo espectro de hospedeiros pLAC2, com já reconhecido uso em *Xanthomonas citri subsp. citri*, se mostrou funcional também em XCC viabilizando, portanto, o estudo da super-expressão dos genes de interesse da via de biossíntese dos monômeros da goma xantana. A origem de replicação presente nesse plasmídeo, com o sistema particional de auto replicação, parece ter sido neste caso determinante. Também, a avaliação dos sistemas de expressão baseados no plasmídeo pLAC2 com P_{BAD}, P_{LacUV5} e P_{LacUV5+CAP} indicou que o promotor induzido por arabinose permitiu maiores níveis de expressão a partir de experimentos com o gene repórter da proteína mCherry. Dessa forma, o plasmídeo pLACR1 com P_{BAD} foi o utilizado na sequência do trabalho para expressão dos genes *galU* e *Udg* de XCC.

Concluiu-se também, a partir dos dados obtidos através das técnicas de *screening*, que as clonagens dos genes *galU* e *Udg* de XCC foram bem-sucedidas, tanto com os genes sendo clonados em conjunto na configuração de *Operon*, como nas clonagens individuais de cada um. As clonagens tiveram êxitos em ambas construções utilizando o plasmídeo pRSM4 e o plasmídeo pLACR1. Também houve êxito na transformação das construções pLACR1_PP, pLACR1_deH e pLACR1_OPn em XCC, para a superexpressão de seus genes mediante o uso de indutor.

O efeito da superexpressão foi avaliado e o resultado demonstrou um ganho em produtividade do exopolissacarídeo com relação a linhagem não-transformante. A análise estatística de variância (ANOVA) demonstrou um nível de confiança de 98% de que a superexpressão dos genes surtiu efeito nos resultados de produtividade. Uma das linhagens, transformada com pLACR1_deH, se destacou apresentando um nível de confiança de 99,9%, descartando a hipótese nula (não há diferença entre as linhagens), quando comparada diretamente com a XCC. As outras duas linhagens conseguiram níveis de confiança muito próximos de atingir o nível de significância 5%

máximo estabelecido, 94,8% e 94,5% para as linhagens transformadas com pLACR1_PP e pLACR1_deH, respectivamente. No entanto, a linhagem com o plasmídeo pLACR1_PP alcançou o nível de confiança de 95,1%, quando avaliada a produtividade específica de *Xanthomonas* (δp).

Os ganhos na produtividade e na produção final de goma alcançaram aumentos superiores a 20%, quando comparados com a linhagem natural não transformada. As maiores porcentagens ficaram por conta da linhagem transformada com o pLACR1_deH, de 21,7% de aumento na produtividade volumétrica e 27,2% de aumento na produção final de goma xantana, seguida pela linhagem com o pLACR1_PP, com aumentos percentuais de P_r e P_F de 18,9% e 25,9%, respectivamente.

Apesar da XCC transformada com o plasmídeo pLACR1_deH ter demonstrado dados mais consistentes de produção e produtividade de goma, ela ainda não pode ser considerada a melhor linhagem para produção de goma xantana entre as linhagens recombinantes estudadas. Isso porque ela ainda não demonstrou diferença estatística significativa quando comparada à linhagem transformada com o plasmídeo pLACR1_PP, que por sua vez, apresentou dados com um desvio padrão alto. No entanto, isso não impede a conclusão de que essa linhagem está um passo à frente das demais, nesse momento. Outros estudos futuros, levando em conta mais variáveis, poderão trazer resultados mais conclusivos sobre essa questão.

Dados do efeito da indução também trouxeram com um nível de confiança de 99,9%, que a concentração de indutor interfere na produção da goma. Elevadas concentrações de 0,05% (m/v) apresentaram produtividades muito inferiores quando comparadas com a indução a (0,005%). Outro fator observado foi que a concentração mais alta de indutor não apenas não apresentou melhoras, como piorou a produtividade natural da XCC, o que indica uma provável inibição da produção de goma na condição de indução com 0,05% de arabinose.

Todos esses dados mostram que os genes superexpressos de forma individual trouxeram melhores resultados do que quando expressos em conjunto, mas existe uma melhora evidente na produção da goma quando há a superexpressão das proteínas UDP-PP e UDP-deH, encontradas como gargalos da via de biossíntese da goma por KUNDLATSCH (2017).

Por fim, a conclusão final é que o objetivo principal colocado por esse trabalho, de estudar experimentalmente a hipótese levantada por KUNDLATSCH (2017), superexpressando em *Xanthomonas* as proteínas indicadas como gargalos da via de biossíntese da goma xantana e avaliar a nova produtividade desse polissacarídeo adquirida pela bactéria, foi concluído com êxito. Além disso, os resultados obtidos validam a hipótese de que a superexpressão dos genes *galU* e *UdG* favorecem a produção da goma xantana em determinadas condições, permitindo a obtenção de linhagens superiores à parental para produção da goma.

7. Trabalhos futuros

Cultivo, produção e caracterização

- a. Medida da atividade enzimática e avaliação do aumento da expressão, utilizando a linhagem não transformada de XCC como controle;
- b. Avaliação das características reológicas da goma produzida;
- c. Estudo de otimização das condições ótimas de cultivo visando a produção de goma xantana;
- d. Estudo cinético detalhado das linhagens transformantes construídas;
- e. Aplicação de cultivos em batelada alimentada;
- f. Realizar sequenciamento das construções pLACR1_deH/PP/OP.

Otimização das Cepas

- a. Construção de vetores com as configurações posicionais dos genes *Pseudo-Operon* e *Monocistrônica*, para novas avaliações;
- b. Estudos dos demais genes e proteínas que compõem a via de biossíntese da goma, buscando modificações pontuais para controle das características físico-químicas da goma produzida.

Referências

ALLIED MARKET RESEARCH. **Xanthan Gum Market Size, Share | Industry Analysis**, 2023. 2017. Disponível em:

<<https://www.alliedmarketresearch.com/xanthan-gum-market>>. Acesso em: nov/2019.

ALKHATEEB, R. S. et al. Comparative transcription profiling of two fermentation cultures of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 sampled in the growth and in the stationary phase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6613–6625, 2018.

AMANULLAH, A. et al. Reproducibility of pilot scale Xanthan fermentations. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 4, p. 466–473, 1996.

AMANULLAH, A. et al. The influence of impeller type in pilot scale Xanthan fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 1, p. 95–108, 1998.

AMANULLAH, A.; SATTI, S.; NIENOW, A. W. Enhancing Xanthan fermentations by different modes of glucose feeding. **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 2, p. 265–269, 1998.

AMANULLAH, A.; TUTTIETT, B.; NIENOW, A. W. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 2, p. 198–210, 1998.

ARLAT, M., GOUGH, C. L., BARBER, C. E., BOUCHER, C. & DANIELS, M. J. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact* **4**, 593–601 (1991).

BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 582–587, 1999.

BECKER, A. et al. Xanthan gum biosynthesis and application: A biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 145–152, 1998.

BLANCH, M.; LEGAZ, M.-E.; VICENTE, C. Purification and properties of an unusual UDP-glucose dehydrogenase, NADPH-dependent, from *Xanthomonas albilineans*. **Microbiological research**, v. 163, n. 3, p. 362–371, 2008.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 171, 2008.

BOSCO, M. B.; MACHTEY, M.; IGLESIAS, A. A.; ALEANZI, M. UDP glucose pyrophosphorylase from *Xanthomonas spp.* Characterization of the enzyme kinetics, structure and inactivation related to oligomeric dissociation. **Biochimie**, v. 91, n. 2, p. 204–213, 2009.

BRANDÃO, L. V. et al. Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 28, n. SUPPL., p. 217–222, 2008.

CGSC. **Strain - DH5 α** . Disponível em:

<<https://cgsc2.biology.yale.edu/Strain.php?ID=150015>>. Acesso em: 9 out. 2020.

CONRAD, S. E.; WOLD, M.; CAMPBELL, J. D. Origin and direction of DNA

replication of plasmid RSF1030. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 2, p. 736–740, 1979.

CHEN, N. W. G. et al. Horizontal gene transfer plays a major role in the pathological convergence of *Xanthomonas* lineages on common bean. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–20, 2018.

CONRAD, S. E.; WOLD, M.; CAMPBELL, J. D. Origin and direction of DNA replication of plasmid RSF1030. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 2, p. 736–740, 1979.

DAI, X. et al. Construction and application of a *Xanthomonas campestris* CGMCC15155 strain that produces white xanthan gum. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 2, p. 1–9, 2019.

DANTAS, G. C. et al. A protein expression system for tandem affinity purification in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Braz J Microbiol.** **47**, 518-526 (2016).

DELGADO, F. F.; CERMAK, N.; HECHT, V. C.; SON, S.; LI, Y.; KNUDSEN, S. M.; OLCUM, S.; HIGGINS, J. M.; CHEN, J.; GROVER, W. H. Intracellular water exchange for measuring the dry mass, water mass and changes in chemical composition of living cells. **PloS one**, v. 8, n. 7, 2013.

EBRIGHT, R. H., EBRIGHT, Y. W., GUNASEKERA, A. Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli* lac DNA site. **Nucleic Acid Research**, **17**, 10295-10305 (1989).

ELSHAFEI, G. M. S., EL-SAID, M. M., ATTIA, H. A. E. & MOHAMMED, T. G. M. Environmentally friendly pesticides: Essential oil-based w/o/w multiple emulsions for anti-fungal formulations. **Ind. Crops Prod.** **31**, 99–106 (2010).

FARIA, S. et al. Application of a model using the phenomenological approach for prediction of growth and xanthan gum production with sugar cane broth in a batch process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 498–506, 2010.

GAO, H.; CHEN, Y.; LEARY, J. A. Kinetic measurements of phosphoglucose isomerase and phosphomannose isomerase by direct analysis of phosphorylated aldose–ketose isomers using tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass spectrometry**, v. 240, n. 3, p. 291–299, 2005.

GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549–579, 2000.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. Xanthan gum production: An unstructured kinetic model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 3, p. 206–217, 1995.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; FRITSCH, A. P. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 12, p. 991–996, 1992.

GAWIN, A.; VALLA, S.; BRAUTASET, T.. The XylS/Pm regulator/promoter system and its use in fundamental studies of bacterial gene expression, recombinant protein production and metabolic engineering. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 702–718, 2017.

GHOUMRASSI-BARR, S. & ALIOUCHE, D. A Rheological Study of Xanthan Polymer for Enhanced Oil Recovery. *J. Macromol. Sci. Part B* 55, 793–809 (2016).

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Xanthan Gum Market to register substantial gains at around 6% to 2023: Global Market Insights, Inc.** 2019. Disponível em: <<https://www.globenewswire.com/news-release/2019/10/01/1923170/0/en/Xanthan-Gum-Market-to-register-substantial-gains-at-around-6-to-2023-Global-Market-Insights-Inc.html>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

GLOBENEWSWIRE. **The Global Xanthan Gum Market is expected to grow from USD 798.12 Million in 2018 to USD 1,305.12 Million by the end of 2025 at a Compound Annual Growth Rate (CAGR) of 7.27%.** 2020. Disponível em: <<https://www.globenewswire.com/>>. Acesso em: 04/2020

GOTO, L. S. et al. Structural and functional characterization of the phosphoglucomutase from *Xanthomonas citri subsp. citri*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 12, p. 1658–1666, 2016.

GRAND VIEW RESEARCH. **Xanthan Gum Market Size Worth \$987.7 Million By 2020 | CAGR: 5.1%.** 2015. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-xanthan-gum-market>>. Acesso em: 05/2019

HARDING, N. E., CLEARY, J. M., CABANAS, D. K., ROSEN, I. G. & KANG, K. S. Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* 169, 2854–2861 (1987).

HE, Y. et al. *Xanthomonas campestris* cell–cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol. Microbiol.* 64, 281–292 (2007).

HORTA, A. C., SILVA, A. J., SARGO, C. R., VÉLEZ, A. M., GONZAGA, M., GIORDANO, R. C., et al. A supervision and control tool based on artificial intelligence for high cell density cultivations, *Brazilian J. Chem. Eng.* 31, 457–468 (2013).

INDUSTRY EXPERTS. **Xanthan Gum – A Global Market Overview.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://industry-experts.com/>> . Acesso em: 26 nov. 2019.

INPI. **Base de dados.** 2021. Disponível em: <<https://gru.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp>>. Acesso em: 24 mar. 2021.

JANA, A. K.; GHOSH, P. Stimulation of xanthan production by *Xanthomonas campestris* using citric acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 261–264, 1997.

JANI, G. K., SHAH, D. P., PRAJAPATI, V. D. & JAIN, V. C. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Asian J Pharm Sci* 4, 309–323 (2009).

JARMAN, T. R.; PACE, G. W. Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis. **Archives of microbiology**, v. 137, n. 3, p. 231–235, 1984.

JIANG, Bo Le et al. RpfC regulates the expression of the key regulator hrpX of the hrp/T3SS system in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–16, 2018.

JONES, J. A. et al. EPathOptimize: A combinatorial approach for transcriptional

- balancing of metabolic pathways. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015.
- KAMOUN, S. & KADO, C. I. A plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an exocellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts. *J. Bacteriol.* **172**, 5165–5172 (1990).
- KÖPLIN, R. et al. Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *J. Bacteriol.* **174**, 191–199 (1992).
- KUNDLATSCH, G. E. Universidade Federal de São Carlos Universidade Federal de São Carlos. 2006.
- LACERDA, L. A. et al. Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plasmid**, v. 90, n. February, p. 44–52, 2017.
- LETISSE, F.; CHEVALLEREAU, P.; SIMON, J.-L.; LINDLEY, N. The influence of metabolic network structures and energy requirements on xanthan gum yields. **Journal of biotechnology**, v. 99, n.3, p. 307–317, 2002.
- LETISSE, F.; LINDLEY, N. D.; ROUX, G. Development of a phenomenological modeling approach for prediction of growth and xanthan gum production using *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 3, p. 822–827, 2003.
- LUVIELMO, M.; SCAMPARINI, A. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 5, n. 1, p. 50–67, 2009.
- MACHADO, B. A. S., REIS, J. H. DE O., FIGUEIREDO, T. V. B. & DRUZIAN, J. L. Mapeamento tecnológico da goma xantana sob o enfoque em pedidos de patentes depositados no mundo entre 1970 a 2009. *GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnol.* **2**, 154–165 (2012).
- MARKET INSIGHTS REPORTS. **Xanthan Gum Market Global Demand, Size, Shares, Supply and Key Players 2019 to 2025 – Market Research Journals**. 2019. Disponível em: <<https://marketresearchjournals.com/2019/10/14/xanthan-gum-market-global-demand-size-shares-supply-and-key-players-2019-to-2025/>>. Acesso em: 26 nov. 2019.
- MDIC. **Comex Vis: Principais Produtos Importados PPI**. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/produtividade-e-comercio-externo/pt-br?ppi=3164>>. Acesso em: 23 nov. 2019.
- OTOBONI, A. M. M. B. Estudo De Exopolissacarídeos De Bactérias Fitopatogênicas. **Revista Científica Eletrônica de Bactérias Fitopatogênicas**, v. 11, n. 1, 2007.
- PALANIRAJ, A. & JAYARAMAN, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *J. Food Eng.* **106**, 1–12 (2011).
- PAPOUTSOPOULOU, S. V; KYRIAKIDIS, D. A. Phosphomannose isomerase of *Xanthomonas campestris*: a zinc activated enzyme. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 177, n. 1, p. 183–191, 1997.
- PAUL, F., MORIN, A. & MONSAN, P. Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* **4**, 245–259 (1986).
- QUAN, J.; TIAN, J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nature Protocols**, v. 6, n. 2, p. 242–251, 2011.

- RAO, Y. M.; SURESH, A. K.; SURAIISKUMAR, G. K. Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1301–1310, 2003.
- ROSALAM, S. & ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestis* sp. **Enzyme Microb. Technol.** **39**, 197–207 (2006).
- ROSEIRO, J. C.; GÍRIO, F. M.; KARÁ, A.; COLLAÇO, M. T. Kinetic and metabolic effects of nitrogen, magnesium and sulphur restriction in *Xanthomonas campestris* batch cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 381–386, 1993.
- RYAN, R. P. et al. Cell–cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HDGYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **103**, 6712–6717 (2006).
- RYAN, R. P.; AN, S.; ALLAN, J. H.; MCCARTHY, Y.; DOW, J. M. The DSF family of cell–cell signals: an expanding class of bacterial virulence regulators. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 7, 2015.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 3rd. ed. Nova Iorque: CSH Press, 2001, Vol. 1, 2 e 3.
- SAMPAIO, A. et al. The periplasmic binding protein NrtT affects xanthan gum production and pathogenesis in *Xanthomonas citri*. **FEBS Open Bio**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 1499–1514, 2017.
- SAVVIDES, A. L. et al. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 2759–2764, 2012.
- SCHATTSCHNEIDER, S.; PERSICKE, M.; WATT, S. A.; HUBLIK, G.; PÜHLER, A.; NIEHAUS, K.; VORHÖLTER, F.-J. Establishment, in silico analysis, and experimental verification of a large-scale metabolic network of the xanthan producing *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain B100. **Journal of biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 123–134, 2013.
- SERRANO-CARREÓN, L. et al. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 133–146, 1998.
- SILVA, A. J. et al. Metabolic engineering of *E. coli* for pyocyanin production. **Metabolic Engineering**, v. 64, p. 15-25, 2021.
- SNYDER, L. et al. **Molecular Genetics of Bacteria**. 4th. ed. Washington: ASM PRESS, 2013.
- SOBY, S. D., DANIELS M. J. Catabolite-repressor-like protein regulates the expression of a gene under the control of the *Escherichia coli* lac promoter in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Appl Microbiol Biotechnol**, **46**, 559–561 (1996).
- SRIRAM, G. et al. Oxygen supply without gas-liquid film resistance to *Xanthomonas campestris* cultivation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 6, p. 714–723, 1998.
- STANKOWSKI, J. D., MUELLER, B. E. & ZELLER, S. G. Location of a second Oacetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydr. Res.**

241, 321–326 (1993).

SUBHASH, Magar et al. Microbial production of Green polymer Xanthan Gum from *Xanthomonas Campestris*. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 1045–1052, 2015. Disponível em:

TAO, F., HE, Y.-W., WU, D.-H., Swarup, S. & Zhang, L.-H. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J. Bacteriol.* **192**, 1020–1029 (2010).

TMR RESEARCH. **Xanthan Gum Market: Strategic Analysis to Understand the Competitive Outlook of the Industry, 2017 – 2025 – Space Market Research**. 2019. Disponível em: <<https://spacemarketnow.com/312379/xanthan-gum-market-strategic-analysis-to-understand-the-competitive-outlook-of-the-industry-2017-2025>>. Acesso em: nov.2019.

USER GUIDE. Invitrogen™Platinum™Superfi™II PCR Master Mix. **ThermoFisher Scientific**, v. MAN0018860, p. 0–2, [s.d.].

VORHÖLTER, F.-J. et al. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J. Biotechnol.* **134**, 33–45 (2008).

WANG, X.; ZHENG, D.; LIANG, R. An Efficient Electro-Competent Cells Generation Method of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Its Application for Plasmid Transformation and Gene Replacement. **Advances in Microbiology**, v. 06, n. 02, p. 79–87, 2016.

WEI, C.-L.; LIN, N.-T.; WENG, S.-F.; TSENG, Y.-H. The Gene Encoding UDP-Glucose Pyrophosphorylase Is Required for the Synthesis of Xanthan Gum in *Xanthomonas campestris*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 226, n. 3, p. 607–612, 1996.

WU, M. et al. Gel properties of xanthan containing a single repeating unit with saturated pyruvate produced by an engineered *Xanthomonas campestris* CGMCC 15155. *Food Hydrocolloids*, [s. l.], v. 87, n. August 2018, p. 747–757, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.002>>.

XU, P. et al. EPathBrick: A synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*. **ACS Synthetic Biology**, v. 1, n. 7, p. 256–266, 20 jul. 2012.

ZABOT, G. L. et al. Hybrid modeling of xanthan gum bioproduction in batch bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 8, p. 975–986, 2011.

ZHU, S. et al. **Improving xanthan fermentation in a mechanically stirred aerated fermenter via external loop** *Research Journal of Microbiology*, 2010.

APÊNDICES

A - Considerações sobre a extração da Goma Xantana

Os dados obtidos a partir dos experimentos preliminares de extração da goma não foram conclusivos e aproveitados devido a um detalhe de procedimento, descoberto tardiamente, que afetaram significativamente os valores de produção estimados naquele momento. Os experimentos tinham como objetivo a comparação da capacidade de extração de goma entre os álcoois isopropanol e etanol. No entanto, o problema encontrado estava na precipitação de componentes do meio e de KCl proveniente da solução eletrolítica de 10% (m/v) adicionada ao álcool para separação da goma (Figura abaixo). Essas massas precipitadas contaminaram os valores apresentados.

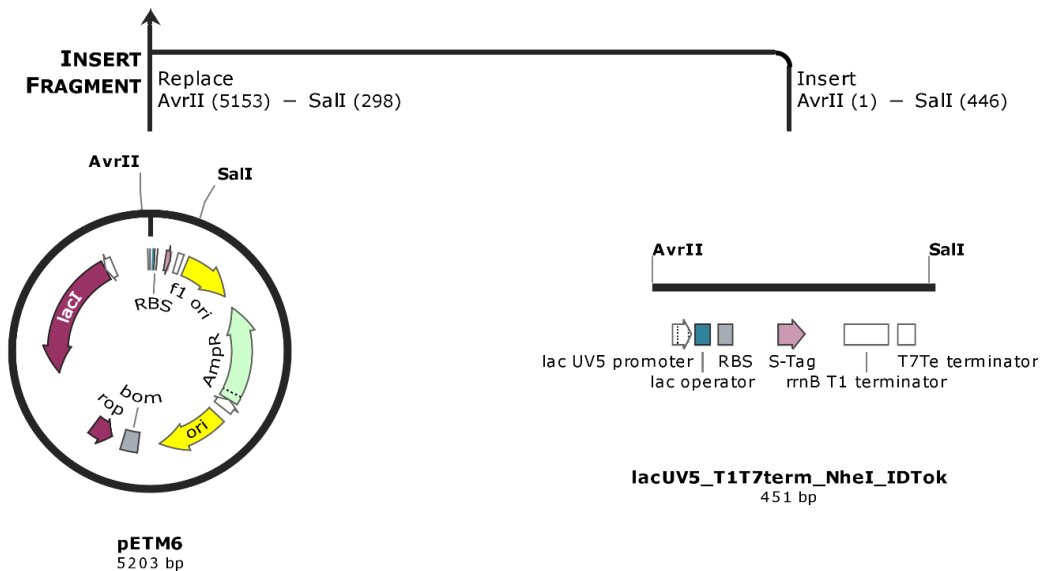
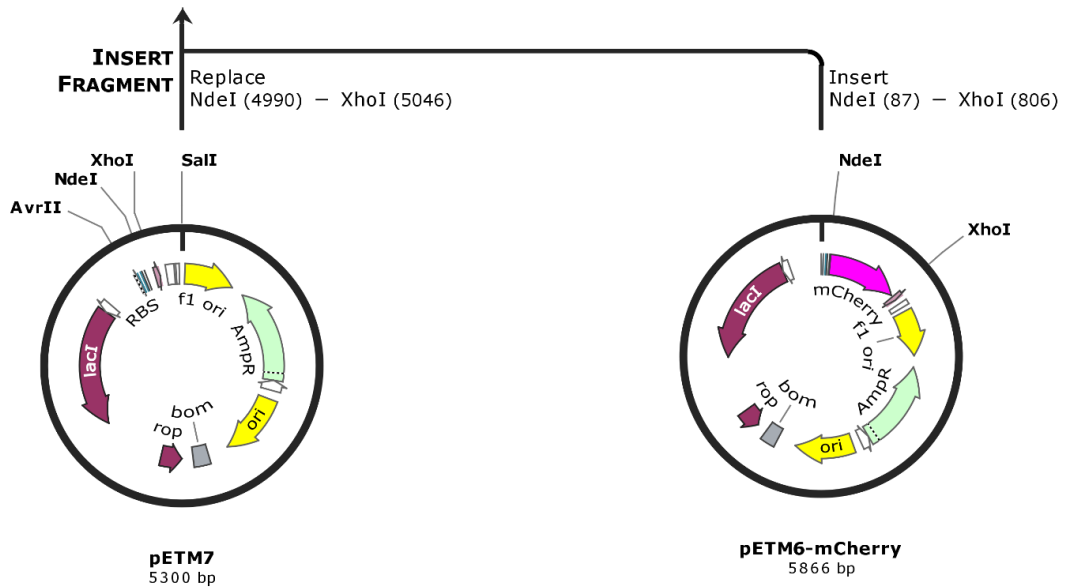
Chama a atenção que trabalhos publicados na literatura não tenham relatado a co-precipitação do cloreto de potássio junto à goma xantana após adição do álcool, não sendo possível avaliar se os dados relatados são realmente referentes apenas à goma xantana. A imagem na figura 35 abaixo mostra os tubos de centrífuga utilizados na extração com quantidades de massa de KCl precipitado a partir da solução de álcool + solução KCl 10% (m/v) (na ausência de goma xantana).



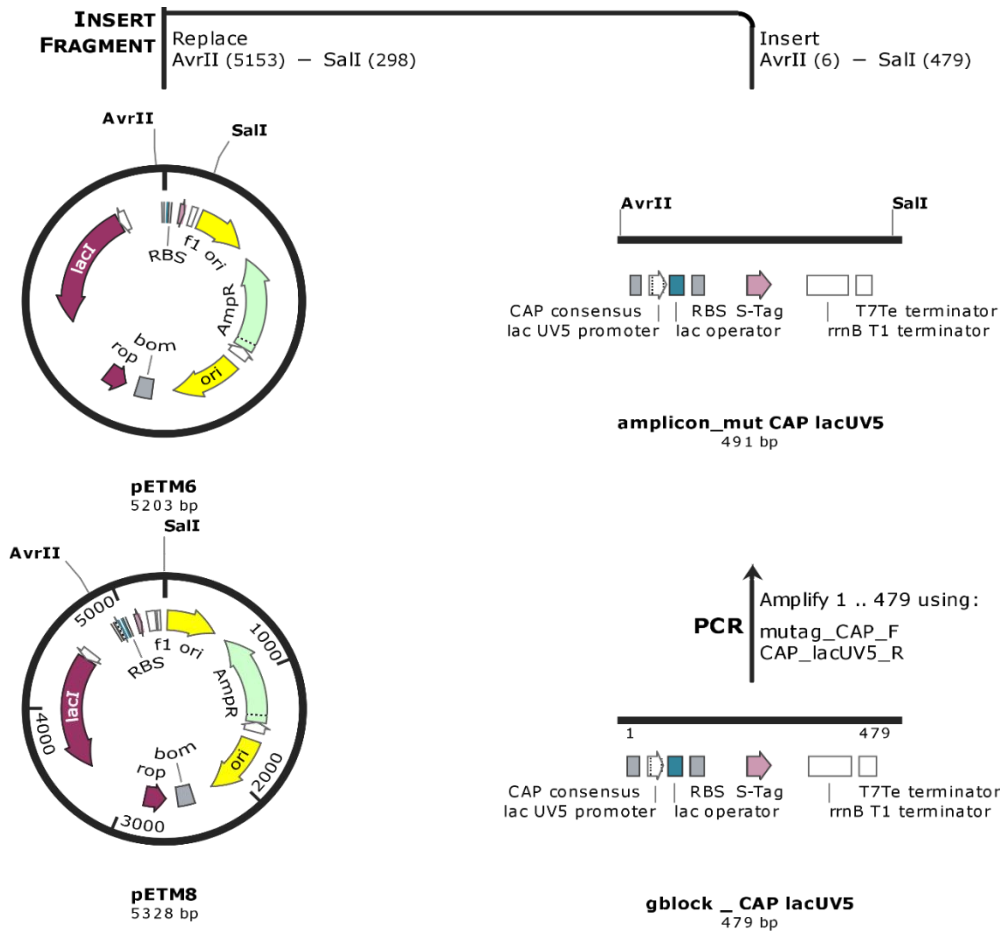
Figura: Tubos de centrífuga contendo precipitado de KCl após centrifugação de solução Álcool + solução KCl 10% (m/v). Fonte: Autor.

ANEXOS

A - Imagem representativa da construção dos plasmídeos pETM7 e pETM7_mCherry. Fonte: Autor, criado com SnapGene®.



B - Imagem representativa da construção do plasmídeo pETM8. Fonte: Autor, criado com *SnapGene*®.



C- Imagem representativa da construção do plasmídeo pRSM4. Fonte: Autor, criado com *SnapGene*®.

