

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul - UFRGS  
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - ICTA  
Programa e Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Andiara Wrzesinski

**Identificação, caracterização, clonagem e expressão heteróloga da enzima  
Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase) de *Stenotrophomonas maltophilia***

Andiara Wrzesinski

**Identificação, caracterização, clonagem e expressão heteróloga da enzima  
Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase) de *Stenotrophomonas maltophilia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Jeverson Frazzon

Porto Alegre

2013

## CIP - Catalogação na Publicação

WRZESINSKI, ANDIARA

Identificação, caracterização, clonagem e expressão heteróloga da enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase) de *Stenotrophomonas maltophilia* / ANDIARA WRZESINSKI. -- 2013. 68 f.

Orientador: JEVERSON FRAZZON.

Coorientadora: ROBERTA THYS.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Ciclodextrina glicosiltransferase. 2. *Stenotrophomonas maltophilia*. 3. clonagem molecular. 4. expressão heteróloga. I. FRAZZON, JEVERSON, orient. II. THYS, ROBERTA, coorient. III. Título.

Andiara Wrzesinski  
Bacharel em Biomedicina – Universidade de Cruz Alta

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:  
Pela Banca Examinadora.

Homologada em:  
Por:

Prof. Dr. Jeverson Frazzon  
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Thys  
Co-orientadora – PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub  
Coordenador do Programa de Pós-  
graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos - PPGCTA

Banca: Prof. Dr. Adriano Brandelli  
PPGCTA/UFRGS

Banca: Dr. Gustavo Pellicoli Riboldi  
PPCS/UFCSPA

Banca: Dr. Julio Xandro Heck  
IFRS

Prof. Dr. Vitor Mafroi  
Diretor do Instituto de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos  
(ICTA/UFRGS)

Porto Alegre  
2013

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço,

Primeiramente aos meus pais pelo apoio incondicional, incentivo e empenho para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada por tudo que me ensinaram, pelo amor e carinho que fez com que tudo isso fosse possível.

Ao Eliezer Piva, pelo apoio, paciência e, sobretudo pelo companheirismo e compreensão.

Ao meu orientador Jeverson Frazzon, por ter acreditado em mim e no meu potencial para desenvolver esse trabalho. Pela amizade, compreensão e ensinamentos transmitidos.

A minha co-orientadora Roberta Thys, pela dedicação paciência e atenção.

As colegas “tigras” do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos pela troca de conhecimentos, experiências e pela inigualável amizade. Bem como, aos colegas de mestrado que dividiram momentos de dúvidas, questionamentos, mas também de conquistas e realizações.

A minha família e a todo amigos, por entenderem a minha ausência, pelo apoio e carinho em todas as horas.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho, sem os quais não teria conseguido chegar até aqui.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de mestrado.

## SUMÁRIO

Lista de figuras .....	6
Resumo .....	7
Abstract .....	8
<b>Capítulo I .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Referencial teórico .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Família 13 das glicosil hidrolases (<math>\alpha</math>-amilases) .....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Estrutura tridimensional da família $\alpha$ -amilase.....	13
2.1.2 Regiões conservadas.....	14
<b>2.2 Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase).....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Ciclodextrinas (CDs).....</b>	<b>17</b>
2.3.1 Aplicação das CDs .....	18
<b>2.4 Produção da CGTase.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>2.6 Produção de proteínas recombinantes.....</b>	<b>21</b>
<b>2.7 Objetivos .....</b>	<b>24</b>
2.7.1 Objetivos gerais .....	24
2.7.2 Objetivos específicos .....	24
<b>Capítulo II .....</b>	<b>25</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>26</b>
<b>Identification, characterization, cloning and heterologous expression of a novel Cyclodextrin Glucanotransferase (CGTase) obtained from <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo III .....</b>	<b>48</b>
<b>Considerações finais .....</b>	<b>50</b>
<b>Referencias bibliograficas.....</b>	<b>51</b>
<b>Apêndices .....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Representação esquemática das estruturas da CGTase de *Bacillus circulans*: **A)** estrutura barril  $(\beta/\alpha)_8$  e **B)** 3D da CGTase (NILSEN & BORCHET, 2000).....13

**Figura 2:** Alinhamento da sequência de aminoácidos das regiões conservadas I, II, III e IV para diferentes membros da família  $\alpha$ -amilase. Código de cores: VERDE: aspartato e glutamato catalíticos; AMARELO: histidina funcional; ROSA: aspartato de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$ ; VERMELHO: resíduos não conservados; AZUL: arginina invariante; CINZA: resíduos conservados (JANECEK, 2002).....15

**Figura 3:** Reações de catálise da CGTase. Círculos representam moléculas de glicose e esferas brancas a extremidade redutora: (A) hidrólise, (B) desproporcionamento, (C) ciclização e (D) acoplamento. (VAN DER VEEN, et al., 2000a).....16

**Figura 4:** Estruturas da  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (VAN DER VEEN et al., 2000).....17

## RESUMO

A ciclodextrina glucosiltransferase (CGTase) é uma enzima industrialmente muito importante, capaz de converter o amido em ciclodextrinas (CDs). As CDs são capazes de formar complexos de inclusão com uma grande gama de compostos orgânicos e inorgânicos, podendo mudar suas propriedades químicas e físicas, propriedades estas que lhes confere extensiva aplicabilidade na indústria de alimentos, farmacêutica, química, cosmética e agrícola. Atualmente, diversas CGTases já foram isoladas e caracterizadas a partir de vários microrganismos, principalmente *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Thermococcus*, *Vibrio*, *Geobacillus* e *Thermoanaerobacterium*. Neste trabalho, demonstramos o primeiro relato envolvendo a clonagem e expressão heteróloga da CGTase de *Stenotrophomonas maltophilia*, microrganismo isolado do solo brasileiro. O gene codificador da CGTase de *S. maltophilia*, foi amplificado com êxito através da técnica de PCR, clonado no vetor pET-23a(+) e expresso em *Escherichia coli* BL21(DE3). As células recombinantes necessitaram de aproximadamente 4 horas de cultivo em meio Luria Bertani (LB) após a adição de 0,1 mM de IPTG para a expressão elevada da proteína alvo. Porém, a CGTase recombinante foi expressa sob forma de corpos de inclusão permanecendo na fração insolúvel, sendo necessário utilizar protocolos para solubilização, incluindo diferentes concentrações de uréia, mas a precipitação não foi eficaz. Embora tenha sido observada uma expressão elevada da proteína com cerca de 60 kDa em SDS-PAGE 12%, que correspondeu ao tamanho esperado da proteína, a forma ativa da enzima não foi obtida. Uma análise bioinformática foi realizada, onde foi observou-se uma proteína conhecida como uma importante possível facilitadora transmembrana (PMFTP – putative Major Facilitator Transmembrane Protein) que ancora o gene *cgf*. Proteína esta que pode ser utilizada em novos estudos a fim de desenvolver um novo e mais eficaz sistema para expressão da CGTase, podendo facilitar a sua expressão extracelular. Assim, mais estudos são necessários para desenvolver um sistema de co-expressão de rCGTase::PMFTP em *E. coli* e obter mais informações desta proteína de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Palavras-chave: *Stenotrophomonas maltophilia*, clonagem molecular, CGTase.



## ABSTRACT

Cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) is an industrially important enzyme, capable to convert starch into cyclodextrins (CDs). The CDs are able to form inclusion complexes with a wide range of organic and inorganic compounds, which can change their chemical and physical properties, that gives them extensive applicability in the food, pharmaceutical, chemical, cosmetics and agricultural. Currently, many CGTases have been isolated and characterized from various microorganisms, particularly *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Thermococcus*, *Vibrio*, *Geobacillus* and *Thermoanaerobacterium*. This work demonstrates the first report involving cloning and expression of heterologous CGTase from *Stenotrophomonas maltophilia*, microorganism isolated from Brazilian soil. The gene encoding the *S. maltophilia* CGTase, was successfully amplified by PCR, cloned into the vector pET-23a (+) and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). Recombinant cells required about 4 h of cultivation in Luria Bertani (LB) after addition of 0.1 mM IPTG for high expression of the target protein. However, the CGTase was expressed recombinant form of inclusion bodies remaining in the insoluble fraction, being necessary use protocols for solubilization, including different concentrations of urea, but the precipitation was not effective. Although it was observed a high expression of the protein about 60 kDa on SDS-PAGE 12%, corresponding to the expected size of the protein, but the active form of the enzyme was not obtained. Bioinformatic analysis was performed and observed a Putative Major Facilitator Transmembrane Protein (PMFTP) harboring the *cgt* gene. This protein can be used in further studies to develop a new and more effective system for expression of the CGTase, which may facilitate its extracellular expression. Thus, more studies are needed to develop a system of co-expression of rCGTase::PMFTP in *E. coli* and acquire more information about this protein of *Stenotrophomonas maltophilia*.

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*, molecular cloning, CGTase.

## Capítulo I

## 1. INTRODUÇÃO

A Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) é uma enzima da família das  $\alpha$ -amilases, que destaca-se das demais por possuir a habilidade de catalisar reações de transglicosilação intramolecular e intermolecular (VAN DER VEEN, et al. 2000a). Esta pode ser oriunda de diferentes fontes, podendo apresentar similaridade na seqüência de seus aminoácidos, variando de 47% a 99% (QI & ZIMMERMANN, 2005) e atualmente já existem vários microrganismos identificados como seus produtores, destacando-se o gênero *Bacillus*, que foi identificado como uma das melhores linhagens produtoras (MAHAT et al., 2004).

Esta enzima é uma das principais responsáveis pela síntese de moléculas cíclicas conhecidas ciclodextrinas (CDs), a partir de reações reversíveis de hidrólise do amido (GUNARATNE et al., 2007), podendo dar origem a três tipos de CDs:  $\alpha$ ,  $\beta$  e/ou  $\gamma$ -CD, sendo que na maioria das vezes ocorre formação de uma mistura das CDs e a proporção de cada uma varia dependendo da bactéria de origem, do tempo e das condições de reação (GOH et al., 2009).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos compostos de resíduos de glicose capazes de formar complexos de inclusão com um grande espectro de substâncias (VAN DER VEEN et al., 2000b). Além disso, apresentam muitas vantagens como a diversidade estrutural, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, produção a partir de substratos de baixo custo e disponibilidade (MATIOLI, 2000). O interesse na sua utilização vem crescendo ao decorrer dos anos, pela sua ampla gama de aplicações em vários setores da indústria agroquímica (NAIR & SAWANT, 2005), cosmética (REGIERT, 2006), química (BERKECZ et al., 2006) e de alimentos (CRAVOTTO et al., 2006).

As CDs já são aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em alimentos, o que acarretou o aumento nas pesquisas sobre suas aplicações nesta área. Entre as suas habilidades, destacam-se a encapsulação molecular de compostos lipofílicos e hidrofóbicos, que podem melhorar a estabilidade de aromas, vitaminas, cor e gorduras insaturadas presentes nos alimentos, aumentando a vida de prateleira dos produtos e também a sua aceitabilidade (SZENTE & SZEJTLI, 2004).

Com isso muitos estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de identificar novos microrganismos produtores da CGTase. Assim, através de uma análise bioinformática, foi possível identificar o gene codificador desta enzima no genoma de *Stenotrophomonas maltophilia*, que é um microrganismo que pode ser isolado do solo da região amazônica e também é conhecido como patógeno hospitalar, e até o presente momento ainda não foi descrita como produtor de CGTase. Com isso a aplicação crescente da engenharia genética, se pode produzir esta proteína recombinante, através da clonagem e expressão em um microrganismo hospedeiro (*Escherichia coli*), objetivando maior produção da enzima quando comparado a sua produção no microrganismo original, que por ser um patogênico não pode ser utilizado para a produção da proteína.

Este estudo se justifica porque é necessário mais pesquisas visando novas fontes produtoras de CGTase, especialmente buscando obter grandes quantidades de enzimas capazes de sintetizar um tipo peculiar de CD, oriundas de microrganismos não patogênico, obtidas através do seu crescimento controlado *in vitro* pelas técnicas de clonagem molecular.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Família 13 das glicosil hidrolases ( $\alpha$ -amilases)

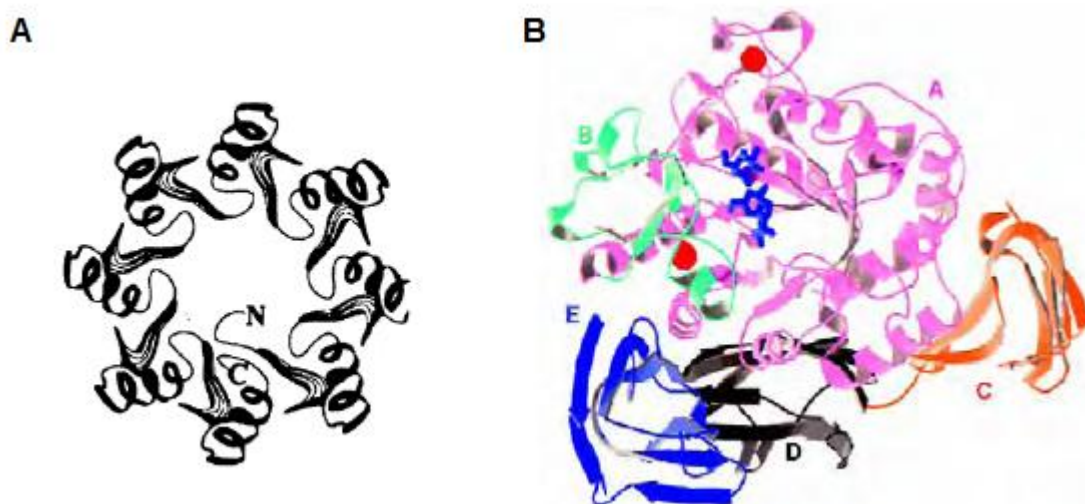
As enzimas da família glicosil hidrolase são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas entre dois carboidratos ou entre um carboidrato e um não carboidrato (LY & WITHERS, 1999). Estas enzimas são classificadas em 90 famílias de acordo com a similaridade das suas sequências de aminoácidos (HENRISSAT, 1991). Destas a família 13, conhecida como  $\alpha$ -amilase, é uma das mais estudadas (JANECEK, 1997; VAN DER MAAREL et al, 2002; SVENSSON,1994).

As  $\alpha$ -amilases são uma grande família que inclui a maioria das enzimas que degradam o amido como:  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase, pululanase, amilases produtoras de maltooligosacarídeos (maltotetraose, maltohexaose), glucodextranase, isoamilase e ciclodextrina glicosiltransferas (CGTase) (JANECEK, 2000). Estas enzimas agem sobre as ligações  $\alpha$ -glicosídicas e hidrolisam estas ligações produzindo mono ou oligossacarídeos, formando ligações  $\alpha$ -1,4 ou ligações  $\alpha$ -1,6 por transglicosilação, possuem estrutura  $(\beta/\alpha)_8$  e possuem quatro regiões altamente conservadas na seqüência primária (VAN DER KAAIJ *et al.*, 2007). A principal diferença dentro deste grupo de enzimas é a preferência por reações de hidrólise ou de transferência e a especificidade por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6 (LEEMHUIS, et al., 2003).

Uma das principais características das enzimas da família das  $\alpha$ -amilases é que todas utilizam o mecanismo de  $\alpha$ -conservação, mas seu substrato ou especificidade de produto é muito variável. Estas diferenças podem ser atribuídas à fixação de diferentes domínios aos centros catalíticos ou às ligações extras de açúcar ao subsítio em torno do sítio catalítico (VAN DER MAAREL et al., 2002). Nesta família destaca-se a enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19), por possuir a habilidade de catalisar reações de transglicosilação intramolecular e intermolecular, enquanto que as demais enzimas geralmente hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1, 4 (VAN DER VEEN, et al., 2000a).

### 2.1.1 Estrutura tridimensional da família $\alpha$ -amilase

Os membros da família  $\alpha$ -amilase são proteínas com multidomínios e o tipo de organização desses domínios determina a especificidade e ação da enzima (VAN DER MAAREL et al, 2002). O domínio A, geralmente está localizado na região N-terminal, compreende o domínio catalítico dessas enzimas, este é o domínio mais conservado dessa família e apresentam cerca de 300-400 aminoácidos contidos em uma dobra altamente simétrica de oito fitas  $\beta$ -paralelas, organizadas em forma tubular e cercadas por oito  $\alpha$ -hélices, dobradas dentro de uma estrutura característica de  $(\beta/\alpha)_8$ -barril. A estrutura de  $(\beta/\alpha)_8$ -barril apresenta diversas prolínas e glicinas, altamente conservadas, flanqueando a conexão das fitas  $\beta$  com as  $\alpha$ -hélices, as quais formam a região catalítica (JANECEK, 2000; HORVATHOVA et al, 2000).



**Figura 1:** Representação esquemática das estruturas da CGTase de *Bacillus circulans*: **A)** estrutura barril  $(\beta/\alpha)_8$ . e **B)** 3D da CGTase (NILSEN & BORCHET, 2000).

Os aminoácidos conservados de ligação catalítica e de ligação ao substrato na família  $\alpha$ -amilase estão localizados no “loop” da extremidade C das fitas  $\beta$ , no domínio A. Um longo “loop” que emerge entre a fita  $\beta_3$  e a  $\alpha$ -hélice 3 do domínio catalítico é considerado um domínio estrutural a parte. O domínio B é constituído de 44-133 aminoácidos, sendo que seu tamanho e sua estrutura variam de acordo com os membros da família e acredita-se ainda, que ele seja o responsável pelas diferenças na especificidade quanto ao substrato (SVENSSON, 1994; RODENBURGO, et al, 1994). Nele se encontram também, os aminoácidos

envolvidos na estrutura de ligação do cálcio, importante para a manutenção da estabilidade da estrutura requerida para a catálise (BOEL et al, 1990; JANECEK et al, 1997).

O domínio C tem a extensão de aproximadamente 100 aminoácidos e tem uma fita  $\beta$  interna e antiparalela. Os domínios complementares ao domínio A e B, que podem variar de C ao I, comuns às enzimas da família  $\alpha$ -amilase, podem estar posicionados posterior ou anteriormente ao domínio A (JESPERSEN et al, 1991).

Uma das principais diferenças entre as CGTase e demais  $\alpha$ -amilases é a presença de um domínio adicional na porção C-terminal desta enzima. (VAN DER VEEN *et al.*, 2000b).

### 2.1.2 Regiões conservadas

A similaridade entre todos os membros da família  $\alpha$ -amilase é menor que 30%, entretanto, foram identificadas sete regiões de sequências conservadas (I a VII) (JANECEK, 2000). Essas regiões estão posicionadas nas fitas  $\beta$  do domínio A, sendo que as quatro regiões mais conservadas, região I, II, III e IV estão nas fitas  $\beta$  3,  $\beta$  4,  $\beta$  5 e  $\beta$  7, outra região conservada, região V esta no “loop” 3 do domínio B e as duas regiões menos conservadas, região VI e VII estão nas fitas  $\beta$  2 e  $\beta$  8 do domínio A. Estas contêm os aminoácidos conservados envolvidos não apenas na catálise e ligação ao substrato (regiões I-IV), mas também na ligação do cálcio e na especificidade da enzima (V-VII) (JANECEK, 2002).

As regiões I-IV comportam os resíduos de aminoácidos conservados que tem um papel direto na clivagem da ligação glicosídica, ligação ao substrato, estabilização do estado de transição e na ligação do cálcio. As regiões II e III são importantes também, por conter os resíduos característicos para especificidade ao tipo de ligação ( $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6). As regiões VI e VII estão relacionadas à especificidade da enzima, entretanto sua importância é pouco conhecida até o momento (JANECEK, 2000).

	Região I – $\beta_3$	Região V – <i>loop3</i>	Região II – $\beta_4$	Região III – $\beta_5$	Região IV – $\beta_7$
$\alpha$ -amilase	117_DVVANH	173_LPDLD	202_GLRIDTVKH	226_YCIGEVLD	292_FVENHD
CGTase	135_DFAPNH	197_LADFN	225_GIRVDVAVKH	253_FTFGEWFL	323_FIDNHD
Isoamilase	135_DVVYNH	342_GANFN	371_GFRFDLASV	431_DLFAEPWA	505_FIDVHD
Cdase	238_DAVFNH	292_MPRLN	321_GWRDLVANE	350_YILGEVWH	416_LLDSHD
Neopululanase	242_DAVFNH	295_MPRLR	324_GWRDLVANE	353_YILGEIWH	419_LLGSHD

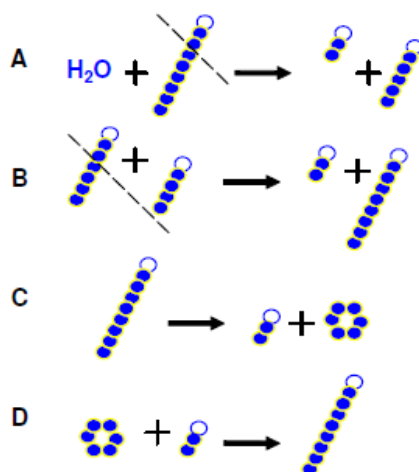
**Figura 2:** Alinhamento da sequência de aminoácidos das regiões conservadas I, II, III, IV e V para diferentes membros da família  $\alpha$ -amilase. Código de cores: VERDE: aspartato e glutamato catalíticos; AMARELO: histidina funcional; ROSA: aspartato de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$ ; VERMELHO: resíduos não conservados; AZUL: arginina invariante; CINZA: resíduos conservados (JANECEK, 2002).

## 2.2 Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase)

A CGTase é uma enzima composta por uma cadeia única de polipeptídios com aproximadamente 650 aminoácidos, possuindo massa molecular entre 70-75kDa (MATIOLI *et al.*, 2000). A sua formação é dependente da presença de amido e inibida pela presença de glicose (QI & ZIMMERMANN, 2005). As enzimas obtidas dos diferentes microrganismos apresentam propriedades diferentes, tais como estabilidade térmica, pH ótimo, massa molecular e capacidade de formação de CDs (MORIWAKI, *et al.*, 2007), e podem apresentar similaridade na sequência de aminoácidos, entre 47 a 99% (QI & ZIMMERMANN, 2005).

A CGTase é uma enzima complexa capaz de catalisar quatro tipos de reações: reação de transglicosilação intramolecular (reação de ciclização para formar as CDs), reação de acoplamento (reversa a ciclização, onde o anel de CD é clivado e transferido para um substrato receptor linear), reação de desproporcionamento (reação de transferase propriamente dita, onde um maltooligossacarídeo é clivado e transferido para um substrato receptor linear) e fraca atividade hidrolítica em presença de amido, maltooligossacarídeos ou CDs (ABELYAN, *et al.*, 1994; BENDER, 1986; BOVETTO, *et al.*, 1992; TOMITA, *et al.*, 1993; TONKOVA, 1998; VAN DE VEEN, *et al.*, 2000a; WIND, *et al.*, 1995; ZHEKOVA *et al.*, 2009).





**Figura 3:** Reações de catálise da CGTase. Círculos representam moléculas de glicose e esferas brancas a extremidade redutora: (A) hidrólise, (B) desproporcionamento, (C) ciclização e (D) acoplamento. (VAN DER VEEN, et al., 2000a).

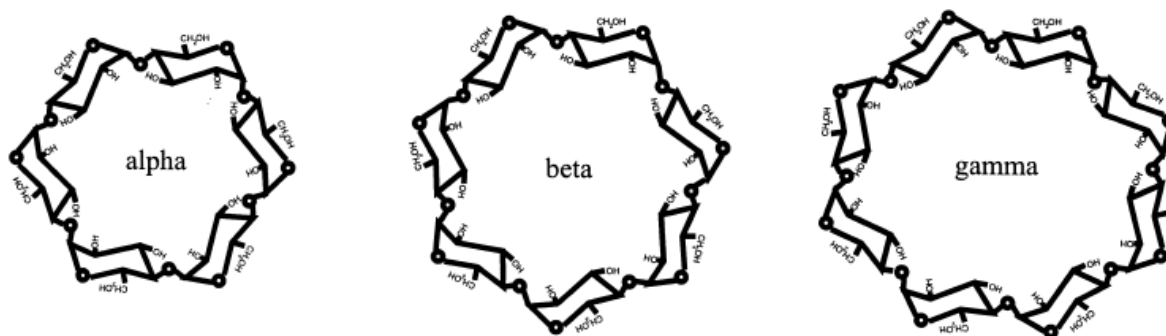
Dos quatro tipos de reações que esta enzima pode catalisar, podemos destacar a reação de ciclização, que ocorre quando a cadeia de um oligossacarídeo linear (amido ou maltodextrina) é clivada e um açúcar com final redutor é transferido para o açúcar não redutor da mesma cadeia. Mais especificamente, o aminoácido Asp 129 liga-se ao oligossacarídeo linear formando um intermediário covalente e a cadeia linear passa a assumir a conformação cíclica (UITDEHAAG, et al., 2002). Estas moléculas cíclicas são denominadas ciclodextrinas (CDs) (GUNARATNE, et al., 2007).

As enzimas CGTase são classificadas em três grupos de formação de CDs:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, sendo que a maioria vai originar uma mistura destes produtos, cuja proporção vai variar dependendo da bactéria de origem, do tempo e das condições de reação (GOH, et al., 2009), mas em condições normais a formação de  $\beta$ -CD ocorre em maiores quantidades (MORIWAKI, et al., 2007). Portanto a identificação de uma CGTase, capaz de sintetizar predominantemente um tipo de CD a uma taxa de crescimento elevada, torna-se muito importante (RAHMAN, et al., 2006), pois a separação de um tipo específico de CD exige elevado investimento financeiro e leva muito tempo (BONILHA, et al., 2006). Portanto, se for possível obter uma CGTase com esta peculiaridade, seria possível produzir CDs a partir da imobilização desta enzima, diminuindo os custos de sua produção (WANG, et al., 2006). Atualmente alguns métodos para produção industrial de CGTase têm sido

estabelecidos e muitas cepas bacterianas selvagem ou geneticamente modificadas têm sido utilizadas na indústria para produção de diferentes tipos de CGTase (QI & ZIMMERMANN, 2005).

### 2.3 Ciclodextrinas (CDs)

As ciclodextrinas (cicloamilose, ciclomaltose, dextrinas de Schardinger, cG, CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos principalmente de seis, sete ou oito resíduos de glicose unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, chamados respectivamente de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas (TONKOVA, 1998; SEON, et al., 2009). Produzidos a partir do amido, pela ação da CGTase de algumas espécies microbianas (VAN DER VEEN, et al., 2000b; SHIBUYA et al., 2003, SA BARRETO & CUNHA FILHO, 2008).



**Figura 4:** Estruturas da  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (VAN DER VEEN et al., 2000a).

As CDs com mais de oito unidades de D-glicose são mais raras, mas French, em 1957 já mencionava a existência de CDs com até dez unidades de glicose. Entretanto, devido à baixa produção e dificuldade de purificação, estas CDs não foram inteiramente caracterizadas. Também já foram caracterizadas e purificadas CDs com 9 a 19 unidades de glicose (LARSEN & ZIMMERMANN, 1999).

Uma das características das CDs é apresentar sabor doce (MATIOLI, 2000), pois apresenta resíduos de glicose no seu anel, que são arranjados de maneira que o segundo grupamento hidroxil (C2-C3) é localizado no limite do anel e o primeiro grupamento hidroxil (C6) no outro limite, resultando em uma molécula com forma cilíndrica. Os hidrogênios apolares C3 e C5, bem como seus oxigênios estão na parte interna e os grupamentos hidroxil na parte externa da molécula de CD (VAN DER VEEN, et al., 2000b). Essa conformação molecular faz ainda, com que as CDs apresentem um caráter hidrofílico no lado externo da molécula e os pares de

elétrons livres dos oxigênios envolvidos em ligações glicosídicas são dirigidos para o interior da cavidade, proporcionando uma elevada densidade eletrônica e, por consequência, um caráter apolar (MATIOLI, et al., 2000).

Tais características possibilitam a formação de complexos de inclusão com varias substâncias orgânicas e inorgânicas, que são encapsuladas na cavidade central da CD, podendo formar cristais. Os complexos de inclusão são formados e existem em soluções aquosas, permitindo assim, a investigação de substâncias hidrofóbicas muito importantes para os sistemas biológicos. Como possíveis efeitos da formação de complexos de inclusão sobre as moléculas inclusas, têm-se a estabilização de compostos sensíveis à luz ou oxigênio, estabilização de compostos voláteis, alteração de reatividade química, melhora da solubilidade, melhora de sabor e aroma (VAN DER VEEN, et al., 2000b).

As CDs são moléculas muito estáveis, pelo fato de serem circulares, não apresentam extremidade redutora e não redutora. Desta forma, não podem ser degradadas por enzimas com ação do tipo exonuclear, sendo que além das CGTases, apenas poucas enzimas podem abrir o anel das CDs (PARK, et al., 2000, HASHIMOTO, et al., 2001).

A forma tridimensional e o tamanho das moléculas de CDs fornecem uma importante informação a respeito da formação de complexos com compostos hidrofóbicos ou grupos funcionais. Sendo que as dimensões das CDs variam de acordo com o número de unidades de glicose e essa diferença repercute no diâmetro da cavidade interna, então cada CD mostra uma capacidade diferente de formação do complexo de inclusão com outras moléculas (BEKERS, et al., 1991).

### **2.3.1 Aplicação das CDs**

Devido a sua grande variedade da formação de complexos de inclusão (ABDEL-SHAFI, et al., 2009) as CDs promovem efeitos benéficos como a proteção contra oxidação de lipídios (HAIYEE, et al., 2009), a redução ou a estabilidade de aromas (SEON, et al., 2009), a estabilidade de cores (PROVENZI, et al., 2006) e vitaminas e o aumento da solubilidade de drogas (CHO, 2006). Por essas razões, são amplamente utilizadas em indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticas e químicas (SINGH, et al., 2002).

Na indústria de alimentos são utilizados na encapsulação de substâncias promovendo estabilidade de aromas, vitaminas, corantes e gorduras insaturadas, conseqüentemente estendendo o tempo de prateleira dos produtos (SZENTE, et al., 2004). As CDs são utilizadas na indústria de cosméticos e produtos de limpeza encapsulando fragrâncias, promovendo estabilidade físico-química e reduzindo a velocidade da oxidação dos compostos (CENTINI, et al., 2007).

Na indústria farmacêutica, o interesse da encapsulação de medicamentos como a penicilina e amoxicilina pela indústria farmacêutica ocorreu a partir da complexação do principio ativo  $\beta$ -lactama com CDs (RAWAT, et al., 2004; NAMAZI, et al., 2009), pois este era pouco solúvel em água, quimicamente ou fisicamente instável e apresentava sabor desagradável, o qual era mascarado pela utilização das CDs (LOFTSSON, et al., 2007; LU, et al, 2009; NAMAZI, et al., 2009). As CDs também auxiliam na ruptura de bolsas de lipídeos em células, melhorando o quadro de doenças vasculares (RODAL, et al., 1999; MATTERN, et al, 2009).

Na indústria química as CDs são utilizadas como catalisadores em reações químicas, como ocorre na oxidação de compostos e auxiliando na extração de um componente de uma mistura (ABDEL-SHAFI, et al., 2009; SASIKALA, et al., 2009). E na despoluição ambiental, as CDs são utilizadas na tentativa de evitar o efeito de substâncias tóxicas contidas no ambiente por meio da formação de complexos não tóxicos como dos resíduos industriais (OONITTAN, et al., 2009). Alguns compostos orgânicos são os maiores poluentes em água, podendo ser tóxicos ou carcinogênicos até em baixas concentrações. Com o aumento da tecnologia de remoção de poluentes orgânicos da água, as CDs chegam a remover de 47 a 58% de compostos indesejáveis (SALIPIRA, et al., 2006).

## 2.4 Produção da CGTase

O primeiro microrganismo descrito na literatura como produtor de CGTase foi o *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*) com o qual Villers produziu as primeiras dextrinas anteriormente descritas por Schardinger (FRENCH, 1957), que isolou o *Bacillus macerans* (*Aerobacillus macerans*) em 1904. Tilden e Hudson em 1939 realizaram os primeiros estudos com CGTase produzida por esse microrganismo, mas foi só em 1942 que comprovaram que as CDs não eram produtos sintetizados durante o metabolismo microbiano, e sim, resultado da ação

de uma enzima extracelular produzida pelo microrganismo, a qual hidrolisava o amido e compostos relacionados (MAHAT, et al., 2004).

Então, Tilden e Hudson estudaram 11 linhagens de *Bacillus macerans*, e concluíram que todas elas produziam uma amilase capaz de converter amido em dextrinas de Schardinger. A enzima permaneceu relativamente estável ao calor, sendo que a inativação ocorreu após 1 hora a 50°C e a maior atividade foi apresentada entre pH 5,0 e 6,0, a 40°C (MAHAT, et al., 2004). Após os estudos de Tilden e Hudson vários outros autores voltaram suas pesquisas à CGTase, a partir daí muitos microrganismos foram descritos como produtores da mesma, com predomínio do gênero *Bacillus* (MAHAT, et al., 2004), como descrito por Schardinger em 1903.

Além do gênero *Bacillus* outros gêneros de microrganismos também vêm sendo estudados: *Anaerobranca*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Microccus*, *Clostridium*, *Thermococcus*, *Thermoanaerobacter* e *Thermoanaerobacterium* (PINTO, et al., 2007; ALVES-PRADO, et al., 2007; BONILHA, et al., 2006; COSTA, et al., 2009; AVCI, et al., 2009; GAWAND, et al., 2001).

## **2.5 *Stenotrophomonas maltophilia***

A bactéria *S. maltophilia* foi inicialmente nomeado de *Pseudomonas maltophilia*, por Hugh e Ryschenkow, e nos anos 80 passou a fazer parte do gênero *Xanthomonas*. Mas, Van Zyl & Steyn, em 1992 publicaram um estudo argumentando a inconveniência dessa transferência de gêneros, o que gerou intensas pesquisas e discussões. Então, em 1993 foi proposto um novo gênero para esse microrganismo ser enquadrado, *Stenotrophomonas* (*stenus*, estreito; *trophus*, que se alimenta; *monas*, uma unidade, ou seja, uma unidade que se alimenta com pouco substrato) (PALLERONI & BRADBURY, 1993).

O gênero *Stenotrophomonas*, consiste de bastonetes aeróbios, gram negativos, não esporulantes, medindo de 0,5 a 1,5 µm, móveis com muitos flagelos polares e podendo produzir fímbrias. Sua temperatura ótima de crescimento ocorre aos 35°C, apresentando-se como colônias lisas, brilhantes, com margens regulares e brancas, cinzentas ou amarelo-pálidas (PALLERONI & BRADBURY, 1993).

A *S. maltophilia* é um patógeno oportunista em pacientes imunodeprimidos, possuindo baixa virulência e é frequentemente encontrado colonizando fluidos utilizados em hospitais e secreções de pacientes (GOPALAKRISHNAN, et al., 1999). É responsável por elevada morbi-letalidade, principalmente em pacientes sob terapia imunossupressora ou antibioticoterapia prolongada de amplo espectro (ALMEIDA, et al., 2005).

*S. maltophilia* também pode ser encontrada em água, plantas ou solo, e vêm sendo isolada principalmente de solos cultivados de trigo, aveia, pepino, sementes oleaginosas e batata. Alguns estudos vêm indicando um grande potencial da espécie em biotecnologia (BERG, et al., 1999).

Também, foi identificada como agente de controle biológico devido à produção de quitinase (YADAV, et al., 2007), como controladores de fungos patógenos de plantas (BERG, et al., 1999) e ainda possui a capacidade de degradar hidrocarbonetos policíclicos. Um estudo de cepa específica desse microrganismo mostrou que ela pode ser uma ferramenta poderosa e útil para o biotratamento de efluentes e descontaminação do solo devido a um amplo espectro de atividade de dioxigenases produzidas (GUZIK, et al., 2009).

Entretanto, apesar de muitos estudos envolvendo este microrganismo, até o momento não há nenhum relato na literatura que mostre a produção de CGTase por *S. maltophilia*. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo a produção da proteína recombinante, através da clonagem e expressão da CGTase produzida por esse microrganismo em um microrganismo hospedeiro, para posterior purificação, afim de viabilizar a sua produção, uma vez que o microrganismo produtor é considerado um patógeno.

## **2.6 Produção de proteínas recombinantes**

A expressão de proteínas recombinantes em microrganismos transformados tem se mostrado uma técnica fundamental na biologia molecular moderna e vem sendo feita desde a década de 70 (QORONFLECH, et al., 2007).

A produção em larga escala de proteínas recombinantes para subsequente purificação é hoje uma técnica em ascensão. Essa tecnologia possui importante aplicação englobando sua utilização em imunização, estudos bioquímicos, análise

tridimensional da proteína, uso biotecnológico e terapêutico (BALBAS, 2001; PAVLOU & REICHERT, 2004).

A produção de proteínas recombinantes envolve a clonagem do gene apropriado em um vetor de expressão sob controle de um promotor induzível. Com a obtenção da expressão para posterior purificação objetivando a obtenção de uma molécula biologicamente ativa (MAKRIDES, 1996). Podendo ser obtidas em diferentes hospedeiros como, bactérias, leveduras, células de mamíferos sendo que, a bactéria é o meio de expressão de proteínas heterólogas mais utilizado, pois é um organismo bastante conhecido geneticamente, seu cultivo é rápido e pode produzir altas quantidades de proteína recombinante a baixo custo, porém é um sistema limitado, pois não há modificações pós-traducionais (MAKRIDES, 1996).

No sistema bacteriano, a proteína recombinante expressa pode ser enviada para três regiões diferentes:

- **Meio extracelular:** onde a proteína recombinante é enviada para o meio de cultura e a expressão pode resultar em altas quantidades de proteína com conformação nativa. Porém, com o cultivo, o meio passa a ter proteases que degradam as proteínas produzidas, além de diluí-las (SORENSEN, et al., 2005).
- **Periplasma bacteriano:** região localizada entre a membrana celular e a parede bacteriana, onde o meio é oxidativo e possui enzimas que possibilitam a conformação natural da proteína, porém em baixas concentrações (MAKRIDES, 1996).
- **Citoplasma bacteriano:** onde a proteína é expressa em grandes quantidades, porém de forma agregada. Estes agregados podem conter 90% da proteína de interesse, mas para a obtenção da proteína solúvel é necessário o uso de reagentes desagregadores (guanidina ou uréia), técnicas com alta pressão hidrostática ou temperaturas de cultivo baixas (CLARK, 2001).

Entre vários sistemas de expressão heteróloga hoje disponíveis, a utilização da bactéria gram-negativa *E. coli* é a opção mais utilizada, devido ao seu rápido crescimento em alta densidade de cultura, baixo custo e amplo conhecimento sobre a sua genética (SCHUMANN & FERREIRA, 2004). Com isso, foram desenvolvidas inúmeras linhagens geneticamente modificadas para diferentes condições de expressão, bem como vetores a serem utilizados (MAKRIDES, 1996).

Apesar de já ser caracterizada a genética e a biologia molecular da *E. coli*, não existem garantias de que todo gene pode ser expresso eficientemente nesse vetor (BANEYX, 1999). Portanto, a produção de proteínas está baseada em “regras empíricas”, que fornecem uma guia para diminuir o tempo gasto em tentativas e erros (MAKRIDES, 1996). Mas não existe protocolo padrão para a síntese e purificação de proteínas recombinantes, então cada caso deve ser otimizado através de constantes ajustes nas metodologias.

Alguns fatores afetam o nível de expressão da proteína recombinante, como: características ímpares dos genes, estabilidade e eficiência do mRNA produzido, conformação funcional estrutural da proteína, códons necessários para a tradução, ação das proteases e toxicidade da proteína (MAKRIDES, 1996; BENEYX, 1999; BALBAS, 2001; BENEYX & MUJACIC, 2004; BERROW, et al, 2006).

As principais desvantagens no uso da *E. coli* como sistema de expressão incluem a incapacidade da bactéria de realizar as modificações pós-tradução que ocorrem nos eucariotos, a ausência de um mecanismo de secreção da proteína alvo para o meio de cultura e a limitada habilidade de promover a formação de pontes dissulfeto (MAKRIDES, 1996; BALBAS, 2001; SAHDEV, et al., 2008). Porém, atualmente diversas estratégias já foram desenvolvidas para contornar estes problemas, resultando na síntese de inúmeras proteínas recombinantes biologicamente ativas (TESFAI, et al., 2012; THOMAS, et al., 1997; GARDE, et al., 2007; ELORZA, et al., 2009; CHENG, et al., 2011; MA, et al., 2012).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Identificação, caracterização, clonagem e expressão da Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase) de *S. maltophilia*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Amplificação do gene codificante da enzima CGTase, a partir de DNA genômico de *S. maltophilia*, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Clonagem dos genes amplificados por PCR utilizando um vetor de expressão pET23a(+) (sistema pET da Novagen®);
- Identificação do gene clonado pelo sequenciamento do DNA;
- Otimização da expressão da CGTase em células hospedeiras de *E. coli*;
- Purificação e quantificação da proteína;
- Verificação da atividade da proteína.

## Capítulo II

## RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de um artigo, já formatado de acordo com as normas, a ser submetido para publicação na revista *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.

Identification, characterization, cloning and heterologous expression of a novel Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) obtained from *Stenotrophomonas maltophilia*

## Identification, characterization, cloning and heterologous expression of a novel Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) obtained from *Stenotrophomonas maltophilia*

Andiara Wrzesinski<sup>1</sup>, Roberta Cruz Silveira Thys<sup>1</sup>, Plinho Francisco Hertz<sup>1</sup>, Jeverson Frazzon<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

**Abstract** Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) is an important industrial enzyme used to produce cyclodextrins (CDs) from amido reidues. CGTase have been isolated and characterized from several bacteria mainly the genus *Bacillus*. Here we show the first report involved the cloning and heterologous expression of enzyme CGTase of *Stenotrophomonas maltophilia*, a microorganism isolated from Brazilian soil. Gene encoding cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *S. maltophilia*, was successfully amplified by PCR, cloned in pET23a+ vector and over-expressed in *E. coli* BL21(DE3). The recombinant cells required approximately 4 h culture time in LB medium after addition of 0,1mM IPTG to produce a high amount of CGTase. Recombinant CGTase was over expressed as an inclusion body remaining in the insoluble fraction. For solubilization, several protocols were used, but no precipitation was effective. Although it was observed high expression protein rate with approximately 60 kDa, that corresponds to the expected protein size an active form of enzyme was not obtained. As a system for heterologous expression in *E. coli* showed a high expression of recombinant protein, other alternatives of expression can be tested, thus, bioinformatic analysis was performed and observed a Putative Major Facilitator Transmembrane Protein (PMFTP) harboring the *cgt* gene, which may be employed to develop new and effective system for expression of enzyme, since this protein can facilitate the extracellular expression of recombinant CGTase.

Key-words: *Stenotrophomonas maltophilia*, recombinant protein, CGTase, insoluble, over expression.

---

· Corresponding Author: J Frazzon (jeverson.frazzon@ufrgs.br) Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa-Postal: 15095, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone +55 51 33087115; Fax +55 51 33087048.

## Introduction

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is an industrially important enzyme, which converts amido residues into cyclic  $\alpha$ -1,4-glucans, called cyclodextrins (CDs), cyclic oligosaccharides consisting of six ( $\alpha$ -CD), seven ( $\beta$ -CD), eight ( $\gamma$ -CD) glucose units (1, 2). The CDs can form inclusion complexes with many organic and inorganic compounds that change their physical and chemical properties. This property has a particular importance giving an extensive application of CDs in pharmaceutical, chemical, agricultural, cosmetic and food industries (3, 4).

CGTase is usually a monomeric enzyme, which is part of the glycoside hydrolase family 13 ( $\alpha$ -amylase family) that presents a sequence of amino acids, which reveals a structural similarity (5, 6). Members of this family contain a catalytic ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel and use an  $\alpha$ -retaining mechanism but they display a variety of reaction specificities (7). Generally,  $\alpha$ -amylases catalyze a reaction of hydrolysis of the amido residues, but CGTase can catalyze mainly transglycosylation reactions (cyclization and disproportionation coupling), and a low hydrolytic activity (8,9)

Since the discovery of CGTase from *Bacillus macerans* in 1903 (10), the production of the CGTase enzyme has been studied in several lineages of bacteria, mainly in genus as *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Thermococcus*, *Vibrio*, *Geobacillus*, and *Thermoanaerobacterium* (11, 12, 13, 14). The enzymes obtained from these microorganisms have different properties such as thermal stability, optimum pH, molecular mass and ability to form CDs (15) and have variable similarity in amino acid sequence, between 47 and 99% (6).

Most CGTases yields a mixture of CDs, whose proportion will varies depending on the bacterium of origin, the time and conditions for reaction (16), but under a usual conditions the formation of  $\beta$ -CD occurs in larger quantities (15). Qi and Zimmermann (2005) listed 31 different CGTases, only two of which produced strictly predominant  $\beta$ -CD. To isolate cyclodextrins from a mixture of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -CD, expensive separation techniques are usually applied. Then, if one type of CD is produced in high proportion, one attractive CGTase would be characterized. So it's

important isolate microorganisms that produce CGTase, especially, in order to obtain large quantities of enzymes able to synthesize a particular type of CD. So it's important to isolate microorganisms that produce CGTase, especially, in order to obtain large quantities of enzymes able to synthesize a particular type of CD. Thus, as until now has not been described CGTase production by *S. maltophilia*, the isolation, cloning and expression of this gene is necessary to obtain high amounts of recombinant protein using an expression vector. In this work, we describe the amplification, molecular cloning and expression of the *cgt* gene of *S. maltophilia*, isolated from Brazilian soil. So, this is the first report which shows the cloning and heterologous expression of enzyme CGTase of *S. maltophilia*.

## Materials and methods

### Bacterial stains and plasmids

*Stenotrophomonas maltophilia* strain was acquired by André Tosello Foundation (Campinas, São Paulo – Brazil) collection number CCT 7524. This *strain* was cultivated in alkaline media containing 2% of soluble starch, 5% yeast extract, 5% peptone, 0.2% MgSO<sub>4</sub>, 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with pH 9.7 to 10 overnight. *Escherichia coli* DH10B obtained from Novagen (Madison, USA) was used as host for cloning of PCR product. Plasmid pET23a+ (Novagen) was used as the expression vector. *E. coli* BL21(DE3) was used as expression host. *E. coli* strains were grown in Luria–Bertani (LB) media supplemented with the appropriate antibiotics at 37°C.

### Bioinformatics analysis

Bioinformatics analysis was performed using NCBI data bank, sequence analysis and comparison were performed with CLUSTAL W program and homology search was performed using BLAST search algorithm. Thus, identified *cgt* gene in the genome of *S. maltophilia* and an additional protein was observed in the operon anchoring *cgt* gene. This protein is part of the Major Facilitator Superfamily, and is described as Putative Major Facilitator Transmembrane Protein (PMFTP).

### Identification of *cgt* gene in *S. maltophilia* and cloning procedures

The total DNA of *S. maltophilia* was isolated with a DNA Genomic Extraction Kit (Invitrogen). The design of syntetic oligonucleotide primer used for PCR

amplification of *cgt* gene (5'-**ggactaatg**cgtggtgtcctggctgt-3' and 5'-**aagctt**ctaccgccccagacgctggt-3') and of *mft* gene (5'-**ggactaatg**aatcgccccgcaaaccg-3' and 5'-**caagctt**caaccacctccggacggg-3') were based on the complete genome sequence of *S. maltophilia* K279a (17). These primers were complementary to, respectively, the amino-terminal coding and carboxyl-terminal non coding *cgt* gene and of *mft* gene containing 5' *Nde*I and 3' *Hind*III restriction sites in bold. The first pair of primers were used to amplify the *S. maltophilia cgt* gene (1719 pb) from genomic DNA using *Taq* DNA polymerases (Invitrogen) under the following conditions 94°C for 280 seconds followed by 35 cycles of 94°C for 60 seconds, 58°C for 60 seconds, and 72°C for 120 seconds. The resulting *cgt* PCR fragments was purified using PCR Purification Kit (Invitrogen) and ligated into the pCR®-Blunt II-TOPO (Invitrogen) vector. The recombinant plasmid blunt::*cgt* was transformed in electrocompetent *E. coli* DH10B cells (Invitrogen), and selected on LB agar plates containing 50µg mL<sup>-1</sup> kanamycin. Single colonies were selected and the recombinant plasmid was extracted using PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen), the recombinant plasmid was digested with *Nde*I and *Hind*III, and purified. The resultant *cgt* gene was cloned in the pET-23a(+) vector (Novagen), under the control of the T7 promoter (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside inducible) and transformed by heat shock into *E. coli* BL21(DE3) cell (Novagen), that has been called recombinant *cgt* gene (*cgtR*). Nucleotide sequences of the *cgtR* carried by plasmids were determined by DNA sequencing that was carried out using the BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Then, analysis of the fragments was processed through an automatic sequencer ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequence analysis and comparison were performed with CLUSTAL W program (18). Homology search was performed using BLAST search algorithm (19).

The second pair of primers were used to amplify the *S. maltophilia mft* gene (1.485 pb) from genomic DNA using *Taq* DNA polymerases (Invitrogen) under the following conditions 94°C for 280 seconds followed by 35 cycles of 94°C for 60 seconds, 62°C for 60 seconds, and 72°C for 120 seconds. This DNA amplification required the presence of 10% Dimethyl sulfoxid (DMSO) in the reaction mixture. DMSO is a co-solvent that improves GC-rich DNA desaturation and helps to overcome the difficulties of polymerase extension through secondary structures, altering the structural conformation of DNA templates. PCR product was purified from



agarose gel, and the expected size of fragment (1.495 pb) was confirmed. Nucleotide sequences of the *mft* gene were determined by DNA sequencing that was carried out using the BigDye ® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Then, analysis of the fragments was processed through an automatic sequencer ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequence analysis and comparison were performed with CLUSTAL W program (18). Homology search was performed using BLAST search algorithm (19).

#### Heterologous expression

The recombinant plasmid pET-23a(+)::*cgf* was transformed by heat shock into *E. coli* BL21 (DE3) cell (Novagen), and selected on LB agar plates containing 50 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> ampicilin. Single colonies were used to inoculate 50 mL LB medium, and grown at 37°C and 180 rpm overnight, without addition of isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). This culture was used to inoculate 50mL of LB medium (in 250mL shake flask) with an initial OD 600nm of 0.1. Protein expression was induced by addition of IPTG 0,1mM at OD 600nm between 0.8 and 1. Effects of the post induction time on the CGTase production were also investigated. For protein expression analysis, cells were harvested by centrifugation at 5,000g for 20 min at 4°C, 1 mg of cells were resuspended in 500  $\mu$ l of phosphate buffer 0,1M, disrupted by sonication, and cells debris removed by centrifugation at 10,000g. Both soluble and insoluble fractions were analyzed by SDS-PAGE 12% (20). All experiments were performed at least twice and the control experiments were performed under the same experimental conditions using *E. coli* host cells were transformed with the expression vector lacking the target gene.

#### Experimental design

For optimization of recombinant protein expression levels of temperature and time of cultivation were studied through experimental design, using the Response Surface Methodology (RSM) (Table 1), with the response to recombinant protein expression. For this two-factor experiment was conducted in an experimental design based on a star 2<sup>2</sup> full factorial experiment, which consisted of four points with three replicates at the center point and four-point star (points where one of the factors is distanced from the center point of  $\pm \alpha$ , while the other two factors are positioned at zero).

### Solubilization of recombinant CGTase

The method used to solubilize the recombinant CGTase with Urea 8M. Then, the enzyme was extensively dialyzed in cellophane membrane with pores of 10,000 Da against 0.1 M phosphate buffer (pH 6).

### Results and Discussion

PCR products of approximately 1700 bp were successfully amplified from the genomic DNA of *S. maltophilia*, corresponding to the expected size for the *cgt* gene. Sequence analysis of the 1719 bp PCR product, demonstrated that this product corresponded to 572 deduced amino acids. The sequence was subjected to a search against all known sequences in databases using blastn and blastx searches (data not shown). The amino acid sequence of this gene exhibited high similarity with other CGTases, showing the highest similarity of 99% with *Stenotrophomonas maltophilia* K279a and another strains of *Stenotrophomonas maltophilia*, followed by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* F1.

Following, PCR fragment was inserted into pCR®-Blunt II-TOPO vector and eletroporated in to *E. coli* DH10 cells. In the blunt-end cloning, the insert and plasmid were linearized, and had no overhanging bases at their termini. It does not benefit from the hydrogen bond stabilization associated with the complementary overhanging bases used in cohesive-end cloning, but the transient associations of the available 5' phosphate and 3' hydroxyl groups are sufficient to produce successful clones (21). The fragment isolated of blunt-end cloning was cloned into pET23a(+) expression vector between *Nde*I and *Hind*III restriction sites, enzymes that were also used to confirm the expected fragment size (Figure 1 – A), and called *cgtR* (recombinant *cgt* gene). DNA sequencing of the *cgtR* by dideoxy chain termination method confirmed the identity of the cloned PCR product.

Recombinant plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) host cells by heat shock, the clones were selected on LB agar plates containing 50µg mL<sup>-1</sup> ampicilin, single colonies were inoculated in 50 mL LB medium and the protein expression was induced by addition of IPTG 0,1mM. Unfortunately, recombinant CGTase (rCGTase) remained in the insoluble fraction (Figure 1 - B).

Homology search was performed using BLAST search algorithm (19) and identify conserved regions I, II, III, IV and V described in  $\alpha$ -amylase family members (Figure 2) in deduced amino acid sequence of CGTase of *S. maltophilia*. Alignment of the conserved regions was performed with ClustalW program (18) between 4 microorganisms showing the amino acid conservation between species (Figure 3). From the multiple sequence alignment, the five highly conserved regions labelled I–V and located in the catalytic domain were found. These conserved regions would constitute the active center of the enzyme since it contained the three catalytic residues Asp229, Glu257, and Asp328 were also identified.

It should be pointed out that a screening of experimental conditions was carried out to obtain high yield of recombinant protein expression, including temperature of growth and time of growth after IPTG induction. In the pET vector system, target genes are positioned downstream of the bacteriophage T7 late promoter. Typically, production hosts contain a prophage ( $\lambda$ DE3) encoding the highly processive T7 RNA polymerase under control of the IPTG-inducible lacUV5 promoter that would ensure tight control of recombinant gene basal expression (23).

Then, for optimization of recombinant protein expression levels of temperature and time of cultivation were studied through experimental design, using the Response Surface Methodology (RSM), and the best results were obtained from grown for 4 hours after IPTG induction at 32,5 °C in LB medium (Figure 4). These conditions were established in attempt to avoid the formation of inclusion bodies and increase the solubility of the recombinant protein. Usually, it is chosen to decrease the temperature and the cultivation time. These conditions are primarily related to the following factors: a) the hydrophobic interactions that promote the formation of bodies inclusion, which are dependent on high temperatures, b) the partial elimination of heat shock proteins that have proteolytic activity and are active during conditions of over-expression, and c) the chaperones of the host bacterium that are in higher concentration in the cytoplasm in growth temperatures (24, 25).

One of the aims of this study is to confirm the correct assignment to the structural gene encoding CGTase, efforts were made to express recombinant *S. maltophilia* soluble rCGTase, but it is not possible to guarantee that they will yield large amounts of biologically active product (26). In addition, a number of protocols were tested to obtain the rCGTase in the soluble fraction but were ineffective.

Like all other proteins, CGTases are originally produced in the cytoplasm, but expressing them out into the periplasm or further to the culture media is preferred due to several advantages such as simplified downstream processing. Since *E. coli* other does not normally secrete extracellular proteins, many strategies have been tried to overcome this drawback using the recombinant technologies (27). Unfortunately, over secretion of the recombinant proteins most of the time results in the formation of inactive protein aggregates, called inclusion bodies, generally consequence of the methods employed to increase the protein secretion. Tesfai and cols in 2012 (28) described strategies to improve enhancement of extracellular secretion of CGTase, including co-expression of molecular chaperones, construction of expression plasmid and selection of promoters systems, use of signal peptides to improve secretion enhancement of recombinant proteins in *E. coli*, cultivation strategies (medium supplements, time and temperature of cultivation) and fermentation optimization to increase the yield of extracellular recombinant protein production.

The use of *E. coli* as a vector to develop an effective protein expression system has been used in many studies, which obtained higher levels expression of recombinant protein when compared expression of the same protein in other vectors, such as the genus *Bacillus*. In practice, it is interesting to test different combinations of vector / host to obtain the highest possible yield of protein in your desired shape. Thus, it is of great importance to expand studies using other combinations of vectors that could possibly obtain the target protein in large quantities and in the soluble fraction.

Can also be make an analysis of the relationship between preference codons and level of expression (29). Zhou and cols in 2012 (30) used systematic optimization of codons for production of  $\alpha$ -CD using *Bacillus megaterium* as host, obtaining significant results when compared to the same process in *E. coli*, which has no efficient secretory system. Even using the systematic optimization of codons, enzyme production still remained low, necessitating the process of fed-fermentation, which is a very complicated process (31).

The solubilization of the rCGTase from the native strain (*S. maltophilia*) was extremely hampered, because the enzyme stayed in the insoluble fraction (Figure 5) and also by the viscosity of the extract crude, probably due to the presence of polysaccharides of unknown nature. In the aim to overcome this problem, we have

tested the procedure used to purify the wild type CGTase (32). The crude extract was concentrated using urea 8M saturation and the enzyme was extensively dialyzed in cellophane membrane with pores of 10,000 Da against 0.1 M phosphate buffer (pH 6). But even after steps dialysis the highest percentage of the enzyme remained in the insoluble fraction. For this reason, we test different concentrations of urea precipitation, but were ineffective.

Advances have been made with respect to knowledge of translocation of proteins across the plasma membrane of *E. coli*, as well as integration of proteins into the membrane. Protein targeting to the *E. coli* internal membrane can occur via the secretion (Sec) pathway or the signal recognition particle (SRP) pathway. The extensively studied Sec pathway utilizes a cytosolic chaperone, SecB that binds post translational to the mature region of pre-proteins. The SecB pre-protein complex is targeted to the membrane, where SecA is activated for high-affinity recognition of the complex by the membrane-embedded bacterial translocon (33). SecB is released from the pre-protein SecA and drives them in a translocation by mediating repeated cycles of ATP binding and hydrolysis (34).

In order to develop a new and effective system for expression of the rCGTase in *E. coli*, as the expression of the recombinant protein was excellent in this vector, the prospect is to develop a new system of co-expression in order to express the recombinant protein extracellular. Then, bioinformatics analysis was performed and observed that in the genome of *S. maltophilia* there is a protein anchoring *cgt* gene that is part of the Major Facilitator Superfamily, and is described as Putative Major Facilitator Transmembrane Protein (PMFTP) (Figure 6). This gene has been isolated by our group and studies are being developed for elaboration of the system of co-expression. PCR products of approximately 1400 bp were successfully amplified from the genomic DNA of *S. maltophilia*, corresponding to the expected size for the *mft* gene. Sequence analysis of the 1488 bp nucleotide sequence, demonstrated that this product corresponded to 496 deduced amino acids. The sequence was subjected to a search against all known sequences in databases using blastn and blastx searches (data not shown).

From this discovery, and as *E. coli* lacks this gene present in the genome, his absence may have directly influenced the location problem of the recombinant enzyme. Then the attempt to solve the problem, maybe the co-expression of the *mft* gene could easily be exported to the supernatant rCGTase in biologically active form.

We are developing a system for co-expression of rCGTase::PMFTP in *E. coli*. In the expression system that was constructed utilizing the *cgt::pet23a(+)*, was obtained an excellent expression in *E. coli* rCGTase, so the prospect is improving the techniques described, employed for the expression of the protein, as well as the cultivation strategies, and then proceed to purification of rCGTase as well as evaluating catalytic activity, which until now could not be assessed due to the problems encountered in attempting to solubilize the recombinant protein.

## Conclusions

The *cgt* gene from *S. maltophilia* was successfully isolated and cloned into pET-23a(+) and a protein of approximately 60KDa, correspondent the size expected to CGTase was over expressed in *E. coli* BL21(DE3). Unfortunately, the protein was over expressed as an inclusion body remaining in the insoluble fraction. Solubilization protocols were tested in an attempt to makes soluble, in vain. Bioinformatic analysis was performed and it was observed a Putative Major Facilitator Transmembrane Protein (PMFTP) harboring the *cgt* gene, which may be employed to develop new and effective system for expression of enzyme, since this protein can facilitate the recombinant CGTase to be over expressed extracellularly. So, it's necessary work to develop a system for co-expression of rCGTase::PMFTP in *E. coli* and obtain more informations from this *Stenotrophomonas maltophilia* protein.

- (1) Bart, AV, Joost, CMU, Bauke WD and Lubbert D (2000) Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biophysics Acta*. 1543: 336-360.
- (2) Qi Q, Mokhtar MN, Zimmermann W (2007) Effect o fethanol on the synthesis of lage-ring cyclodextrins by cyclodextrin glucanotranseferases. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 57:95–99.
- (3) Astray G, Gonzales-Barreiro C, Mejuto JC, Rial-Otero R, Simal-Gandara J (2009) A review of the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23:1631–1640.
- (4) Del Valle EMM (2004) Cyclodextrins and their uses: a review *Process Biochemistry*, 39:1033–1046.

- (5) Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical Journal*, 280:309–316.
- (6) Qi Q, Zimmermann W (2005) Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66:475-485.
- (7) Kuriki T, Imanaka T (1999) The concept of alpha amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87:557–565.
- (8) Kelly, RM, Dijkhuizen, L and Leemhuis, H (2009) The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84:119–133.
- (9) van der Veen BA, Uitdehaag JCM, Dijkstra BW and Dijkhuizen L (2000) Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543:336–360.
- (10) Takano T, Fukuda M, Monma M, Kobayashi S, Kainuma K, Yamane K (1986) Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing, and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene. *Journal of Bacteriology* 166:1118–1122.
- (11) Pinto, FST, Flôres, SH, Ayub, MAZ., Hertz, PF (2007) Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alcaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30:377-382.
- (12) Alves-Prado, HF, Gomes, E, Silva, R (2007) Purification and characterization of a cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* H69-3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136:41-56.
- (13) Tonkova A (1998) Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 678-686.
- (14) Costa, H, Canto, S, Ferrarotti, S, Bonino, MJB (2009) Structure-function relationship in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Carbohydrate Research*, 344:74-79.
- (15) Moriwaki, C, Costa, GL, Pazetto, R, Zanin, GM, Moraes, FF, Portilho, M, Matioli, G (2007) Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. *Process Biochemistry*, 42:1384-1390.
- (16) Goh KM, Mahadi NM, Hassan O, Rahman RNZRA, Illias RM (2009) A predominant  $\beta$ -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein

structure and product specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57:270-277.

(17) Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E, Kerhornou A, Lord A, Murphy L, Seeger K, Squares R, Rutter S, Quail MA, Rajandream MA, Harris D, Churcher C, Bentley SD, Parkhill J, Thomson NR, Avison MB (2008) The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biology*, 9:R74.

(18) Altschul SF, Madden TL, SchäVer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389–3402.

(19) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25:4876–4882.

(20) Laemmli UK (1970) *Nature*. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. 227 680-685.

(21) Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

(22) Janecek S (2002) How many conserved sequence regions are there in the  $\alpha$ -amylase family? *Biologia, Bratislava*. v. 57(11), p. 29-41.

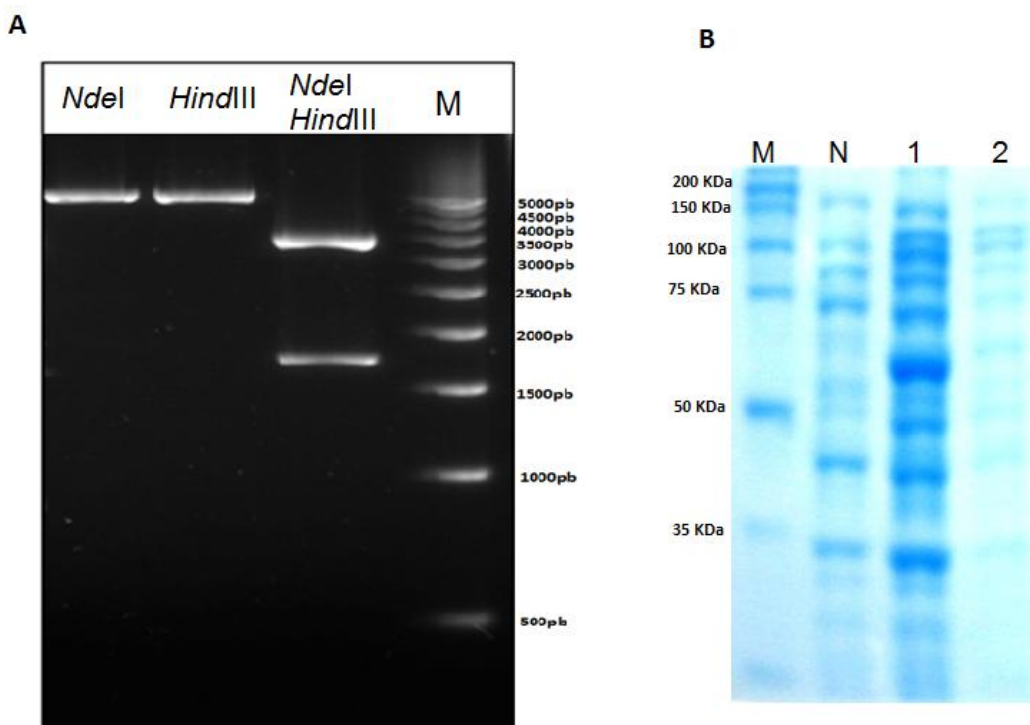
(23) Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189:113-30.

(24) Berrow NS, Büssow K, Coutard B, Diprose J, Ekberg M, Folkers GE, Levy N, Lieu V, Owens RJ, Peleg Y, Pinaglia C, Quevillon-Cheruel S, Salim L, Scheich C, Vincentelli R, Busso D (2006) Recombinant production of a difficult-to-express eukaryotic protein in a bacterial expression system. *Acta Crystallographica D Biological Crystallography*. 62:1218-26.

(25) Upadhyay AK, Murmu A, Singh A, Panda AK (2012) Kinetics of Inclusion Body Formation and Its Correlation with the Characteristics of Protein Aggregates in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. 7:33951.



- (26) Schein CH (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Biotechnology* 1141-1149.
- (27) Ma N, Wei L, Fan Y, Hua Q (2012) Heterologous expression and characterization of soluble recombinant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Actinosynnema pretiosum* ssp *auranticum* ATCC31565 through co-expression with Chaperones in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purification Journal*. 82:263–269.
- (28) Tesfai BT, Wu D, Chen S, Chen J, Wu J (2012) Strategies for Enhancing Extracellular Secretion of Recombinant Cyclodextrin Glucanotransferase in *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 167:897–908
- (29) Kurland C, Gallant J (1996) Errors of heterologous protein expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 7:489-493.
- (30) Zhou J, Liu H, Du G, Li J, Chen J (2012) Production of  $\alpha$ -cyclodextrin glycosyltransferase in *Bacillus megaterium* MS941 by systematic codon usage optimization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 60:10285–10292.
- (31) Cheng J, Wu D, Chen S, Chen J, Wu J (2011) High-level extracellular production of  $\alpha$ -cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 59:3797–3802.
- (32) Sian HK, Said M, Hassan O, Kamaruddin K, Ismail AF, Rahman RA (2005) Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1. *Process Biochemistry*. 40:1101–1111.
- (33) Driessen AJ, Fekkes P, van der Wolk JP (1998) The Sec system. *Current Opinion in Microbiology*. 1:216–222.
- (34) Fekkes P, Driessen AJ (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63:161–173.
- (35) Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, Doerks T, Stark M, Muller J, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2011) *STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored*. *Jan;39(Database issue):D561-8*.



**Figure 1: A)** Agarose gel 1%. Lane 1 and 2: simple enzymatic digestion indicating fragments with approximately 5.200 pb. Lane 3: double enzymatic digestion indicating a fragment with approximately 1.700 pb and other fragment with approximately 3.500 pb. Lane M: molecular weight marker. **B)** Protein samples loaded onto the 12% SDS-polyacrylamide gel were stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane M: molecular weight marker. Lane N: negative control of heterologous expression. Lane 1: insoluble fraction showing recombinant protein with about 60 kDa. Lane 2: soluble fraction.

MMRGVLAVAVSLALFAGQAAAAPRPDYVGTTEPFASDAVYFVVTDRLFVNGDPSNDHRDQGGAHRTFDIPV  
 PCPDKVDGNIGYLGDFRGLVLDNAQYIRNLGFGAVWITPIVDNPDEAFTGSKPISCTSTLTDRGKTGYHG  
 YWGINFYKLEHLPSRGLDFAGLTKGLHGAGLKVVLDIVGNHGS PAWTMPTRQPQFGQIFDKDGKLIADH  
 QNLPPQKLDPKHNPLHAFYNNIGPVDSKDGSI FDGNLAELSDFNQDNPAVMDYLVGAYLQWTAQGVDALR  
 IDTIGWLPHPWHEFVKRIRAEHPGMFMFGSAFDYDAARIAEHTWPAANVSVLDFPLRGALEQTFGTAG  
 KGFETLAEPLHLSGGPYANPYELMSFYDNHMPRLQASDDGFIDAHNWLFTARGIPVYYGSETGFMRGR  
 AEHAGNRAYFGQPRVDAAPKSPIFAPLQRIARLREATPALQRGLQVNERLQGDEAVFLRVLQHGEVAQTA  
 LVLLNKGDHARTLTVARFVQSGRWRDALDGGSLQVNGPLKADVPAHGVKVYVLDAAVQQPALQAELDKAM  
 ADQKARDQRLGR

**Figure 2:** Deduced amino acid sequence of cloned *cgt* gene demonstrating conserved regions in I, II, III, IV and V described in  $\alpha$ -amylase family members. Color Code: GREEN: catalytic aspartate and glutamate; YELLOW: functional histidine; PINK: aspartate binding of  $\text{Ca}^{2+}$ ; BLUE: invariant arginine (22). RED: conserved regions would constitute the active center of the enzyme with three catalytic residues Asp229, Glu257, and Asp328.

3 MKRFMKLTAVWTLWLSLTLGLLSPVHAAPDTSVSNKQNFSTDVYQIFTRDFSDGNPANN  
 4 MKRFMKLTAVWTLWLSLTLGLLSPVHAAPDTSVSNKQNFSTDVYQIFTRDFSDGNPANN  
 1 -----MMRGVLAVAVSLALFAGQAAAAPRPDYVGTTEPFASDAVYFVVTDTRFVNGDPSND  
 2 -----MAAPAAKDYYGTLEPFAAEAVYFVVTDTRFVNGDTGND  
 . . . . . \* : : : : \* : : \* : : \* : : \* : : \*

3 PTG-----AAFDSCTNLRLYCGGDWQGIINKINDGYLTGMGITAIWISQPVEN  
 4 PTG-----AAFDSCTNLRLYCGGDWQGIINKINDGYLTGMGITAIWISQPVEN  
 1 HRDQGAHRTFDIPVPCPKVDGNIGYLGDFRGVLDNA--QYIRNLGFGAVWITPIVDN  
 2 HRDQGAHRTFDVTPCADGSEDNIGYLGDFKGI VEHA--DYIRDLGFGAVWITPIVDN  
 . . . . . \* \* \* \* : : : : \* : : \* : : \* : : \*

3 -----IYSVINYSGVHNTAYHGYWARDSKKTNPAYG-TMQDFKNLIDTAHAHNK  
 4 -----IYSVINYSGVHNTAYHGYWARDFKKTNPAYG-TMQDFKNLIDTAHAHNK  
 1 PDEAFTGSKPISCTSTLTDGRKTYHGYWGINFYKLEHLPSRGLDFAGLTKGLHGAGLK  
 2 PDEAFTGGKPITCGSTLSDHGKTYHGYWGVNFYTLDEHLPSPLDFAGFTRAMHASKLK  
 \* . . . : : \* : \* \* \* \* . : : \* \* : : \* . : \*

Region I

3 VIIDFAPNHTSPASSDDPSFAENGRLYD-NGNLLGGYTNDTQNLFHYYGGTDFSTIENG-  
 4 VIIDFAPNHTSPASSDDPSFAENGRLYD-NGNLLGGYTNDTQNLFHYYGGTDFSTIENG-  
 1 VVLDIVGNHGS PAWTMPTRQPPQFGQIFDKDGKLIADHQNLPPQKLDPKHNPLHAFYNNIG  
 2 VVLDIVGNHGS PAYTMPQAQPGFGKLYDAQRLVADHQNLAPAQLDPQHNLHAFYNNIG  
 \* : \* : \* \* \* \* : . \* : : \* \* : \* : \* : \* . : . . . : :

Region V

Region II

3 -----IYKNLYDLADLNHNNSVDVYLKDAIKMWLDLGVGDIRVDAVKHMPFGWQK  
 4 -----IYKNLYDLADLNHNNSVDVYLKDAIKMWLDLGVGDIRVDAVKHMPFGWQK  
 1 PVDSKDGSI FFDGNLAELSDFNQDNPAVM DYLVGAYLQWTAQGVDA LRIDTIGWLPHPWWH  
 2 -----TGGGLAELSDLNENNPVLDYLAGAYLQWMEQGADAFRIDTIGWMPDRFWH  
 . \* : \* : \* : \* : \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* : \* : : \*

Region III

3 SFMSTINNYKP-VFTFGEWFLGNEISPEYHQFANESGMSLLDFRFAQKARQVFRDNTDN  
 4 SFMSTINNYKP-VFTFGEWFLGVNEISPEYHQFANESGMSLLDFRFAQKARQVFRDNTDN  
 1 EFVKRIRAEHPGMFMFGEAFD-YDAARIAEHTWPANANVSVLDFPLRGALEQTFGTAGKG  
 2 AFVARIREKRPGFMFGEAFD-YDANKIAGHTWTRNAGVSVLDFPLKQQLAAVFGHEQAG  
 \* : \* . : \* . \* \* \* \* : . \* : . . : : \* : \* \* \* \* : . \* . . .

Region IV

3 MYGLKAMLEGSEVDYARGEDQGLIDNHDMERFHTSNGDRRKLEEALAFTLTSRGVPAIY  
 4 MYGLKAMLEGSEVDYAQVNDQVTFIDNHDMERFHTSNGDRRKLEALAFTLTSRGVPAIY  
 1 FETLAEPLHLSGGPYANPYELMSFYDNHDM PRLQASDDG---FIDAHNLFTARGIPVYVY  
 2 FEKLAAPLFLRQGPYANPYALMSFYDNHDMARLDASDNG---FIDAHNLFTARGIPVIY  
 : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* \* : : \* : : \* : : \* : : \*

3 YGSEQ-YMSG-----GNPDNRRAIPSFSTTTTAYQVIQKLAPLRKSNPAIAYGSTQERW  
 4 YGSEQ-YMSG-----GNPDNRARIPSFSTTTTAYQVIQKLAPLRKSNPAIAYGSTQERW  
 1 YGSETGFMRGRAEHAGNRAYFGQPRVDAAPKSPIFAPLQRIARLREATPALQRGLQVNER  
 2 YGSEIGFMRGRAEHAGNRYFGVERIRTAPQSPIFGPLQRIAQVRRNTPALQRGVQVDVQ  
 \* \* \* \* : \* \* \* \* \* . . . : : \* : \* : \* : \* : \*

3 INNVDVIIYERKFGN--NVAVVAINRNMNTPASITGLATSLPQGSYNDVLGGILNGNTLTV  
 4 INNVDVIIYERKFGN--NVAVVAINRNMNTPASITGLVTSLPQGSYNDVLGGILNGNTLTV  
 1 LQGDEAVFLRVLQHGEVAQTALVLLNKGDHARTLTVARFVQSGRWRDALD---GGSLQV  
 2 LHGNQAFLRVYQHAGTTQTALVLLNKADTAATIQTFRFLQPGAWRDAIN---GEQLQV  
 : : : : \* : : . . . : \* \* : . : \* : : \* : : \* \* \*

3 GAGGAASNFTLAPGGTAVWQYTTDATAPIIGNVGPMMAKPGVTITIDGRGFGSGKGTVYF  
 4 GAGGAASNFTLAPGGTAVWQYTTDATAPIIGNVGPMMAKPGVTITIDGR-ASARQGTVYF  
 1 NGP-----  
 2 QRG-----

```

3      GTTAVTGADIVAWEDTQIRVKIPAVPGGIYDIKIANAAGAASNIYDNFEVLTGDQVTVRF
4      GTTAVTGADIVAWEDTQIQVKILRVPGGIYDIRVANAAGAASNIYDNFEVLTGDQVTVRF
1      -----LKADVPAHGKVKVYVLDAAVQQPALQAELDKAMADQKARDQ
2      -----FATAVPAHGVRVLLSDAPITDPALRQQLDLQMAEQAARDA
          **      : : :*.      . : :::      .:* :

3      VINNATTALGQNVFLTGNVSELGNWDPNNAIGPMYNQVVYQYPTWYYDVSVPAGQTIEFK
4      VINNATTALGQNVFLTGNVSELGNWDPNNAIGPMYNQVVYQYPTWYYDVSVPAGQTIEFK
1      RLGR-----
2      RNR-----

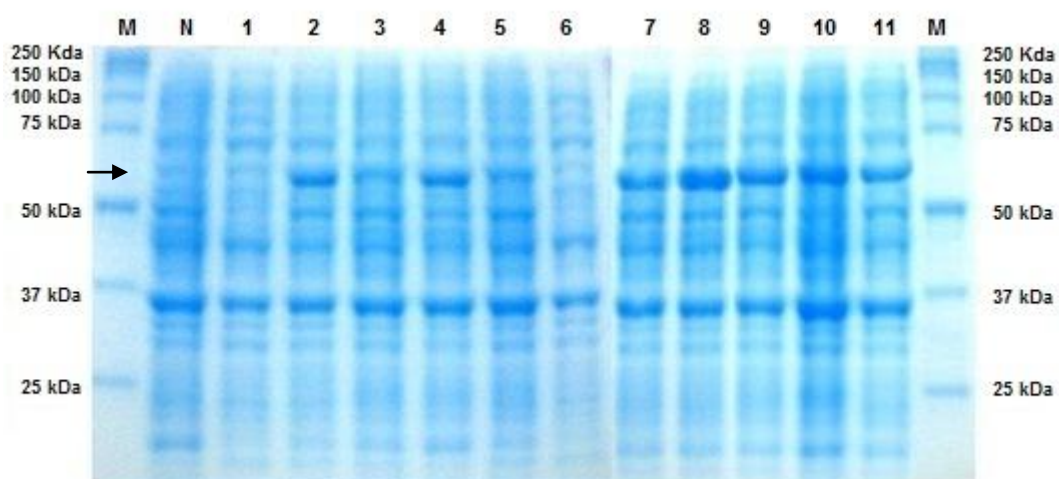
3      FLKKQGSTVTWEGGANATFTTPTSATVNVNWQP 713
4      FLKKQGSTVTWEGGANRTFTTPTSATVNVNWQP 712
1      -----
2      -----

```

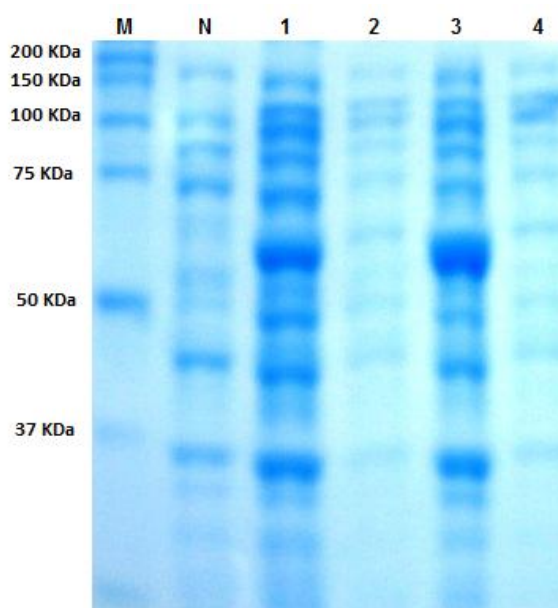
**Figure 3:** Comparison of the deduced amino acid sequences related CGTase. The five highly conserved amino acid I, II, III, IV and V are shaded in yellow, and the conserved residues of CGTase protein from different microorganisms: 1 *Stenotrophomonas maltophilia* (GenBank code number gi|190573204), 2 *Xanthomonas axonopodis* pv. citri str. 306 (GenBank code number gi|21243327), 3 *Paenibacillus* sp. JB13 (GenBank code number gi|172054128) and 4 *Bacillus* sp. I-5 (GenBank code number gi|39933006), are shaded in gray. The numbering stars after the respective signal sequence, with identity (\*), strongly similar (:), and weakly similar (·).

**Table 1:** Array, levels of the studied factors and total treatments.

Treatment	Encoded Values		Actual Values	
	Temperature ( $x_1$ )	Time( $x_2$ )	Temperature	Time
1	-1	-1	27° C	1,5 h
2	+1	-1	38° C	1,5 h
3	-1	+1	27° C	6,5 h
4	+1	+1	38° C	6,5 h
5	-1,41	0	25° C	4,0 h
6	0	-1,41	32,5° C	0,5 h
7	+1,41	0	40° C	4,0 h
8	0	+1,41	32,5° C	7,5 h
9	0	0	32,5° C	4,0 h
10	0	0	32,5° C	4,0 h
11	0	0	32,5° C	4,0 h

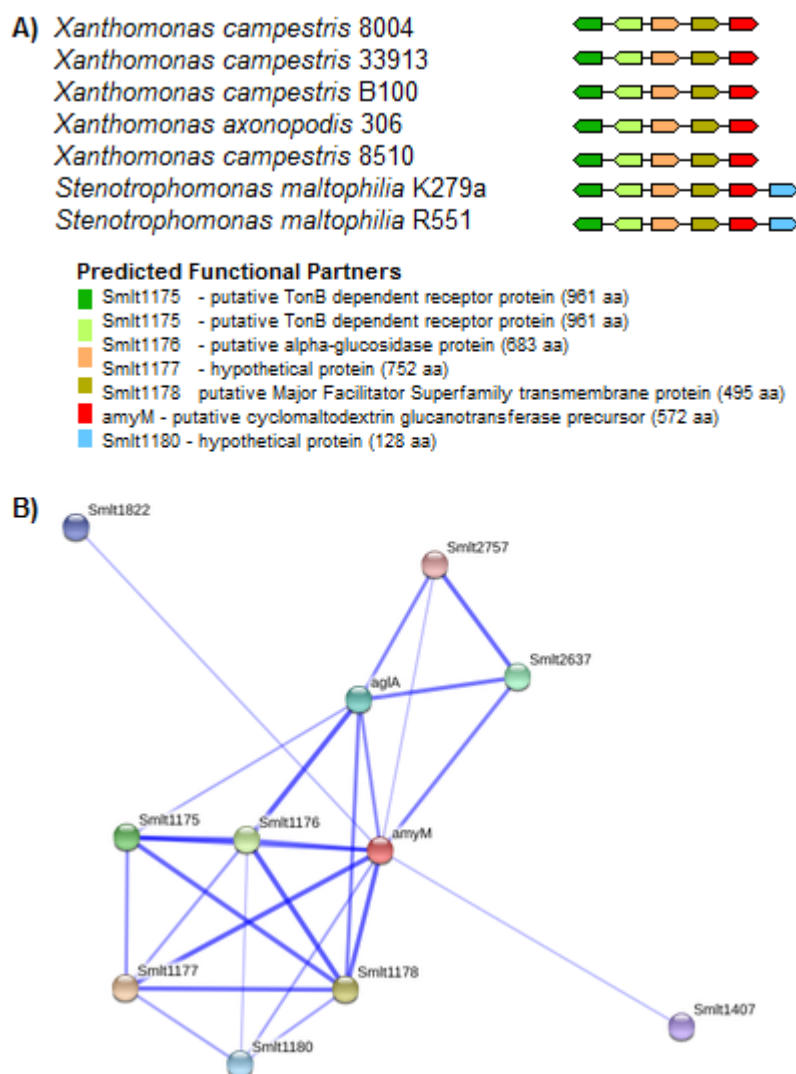


**Figure 4:** Lane M: molecular weight marker. Lane N: negative control of heterologous expression. Lane 1 to 11 representing the treatments set in experimental design (Table 1).



**Figure 5:** Lane M: molecular weight marker. Lane N: negative control of heterologous expression. Lane 2 and 4: intracellular fraction after sonication and after attempted precipitation with urea. Lane 1 and 3: extracellular fraction after sonication and attempted precipitation with urea.





**Figure 6:** **A)** Schematic design showing the operon of different species of *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas*. **B)** Schematic design showing the relationship of the *cgt* gene (AmyM) with protein operon, especially the direct link with the facilitator transmembrane putative protein (Smlt1178). \*Obtained of *STRING database* (35).

### Capítulo III

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma análise bioinformática foi realizada, onde foi observado o gene codificador a enzima CGTase no genoma de *S. maltophilia*, este gene foi isolado e clonado com sucesso o vetor pET-23a(+) e uma proteína com aproximadamente 60 kDa, foi sobre expressa em *E. coli* BL21(DE3) e observada em SDS-PAGE 12%, correspondendo ao tamanho esperado para a CGTase. Porém, a CGTase recombinante foi expressa sob forma de corpos de inclusão permanecendo na fração insolúvel e mesmo após várias tentativas de solubilização, utilizando diferentes métodos e diferentes concentrações de uréia, a precipitação não foi efetiva. Embora tenha sido observada uma expressão elevada da proteína com cerca de 60 kDa em SDS-PAGE 12%, a forma ativa da enzima não foi obtida.

Dentro do operon existe uma proteína conhecida como uma importante possível facilitadora transmembrana (PMFTP – putative Major Facilitator Transmembrane Protein) que ancora o gene *cgt*. Proteína esta que pode auxiliar a CGTase a se tornar extracelular, podendo ser utilizada em novos estudos a fim de desenvolver um novo e mais eficaz sistema para expressão da CGTase e facilitar a sua expressão extracelular. Assim, mais estudos são necessários para desenvolver um sistema de co-expressão de rCGTase::PMFTP em *E. coli* e obter mais informações desta proteína de *Stenotrophomonas maltophilia*.

### Perspectivas

1. Será realizado o seqüenciamento da proteína alvo do estudo e já expressa, para identificação dos aminoácidos e confirmação da sua identidade.
2. Desenvolver o sistema de co-expressão rCGTase::PMFTP em *E. coli*, caracterizar, purificar e verificar a atividade biológica da enzima CGTase.
3. Caso este sistema não funcione tentar desenvolver um sistema de expressão em *Bacillus megaterium* ou *Bacillus subtilis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAFI, A.A., AI-SHIHRY, S.S. Fluorescence enhancement of 1-naphthol-5-sulfonate by forming inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution. **Spectrochimica Acta A.**, v. 72, p. 533–537, 2009.

ABELYAN, V.A., YAMAMOTO, T., AFRIKYAN, E.G. On the mechanism of action of cyclomaltodextrin glucotransferases of alkalophilic, thermophilic and mesophilic microorganisms. **Biochemistry-Moscow.** v. 59, n. 8, p. 839-844, 1994.

ALMEIDA, M.T.G., BERTELLI, E.C.P., ROSSIT, A.R.B., BERTOLLO, E.M.G., MARTINEZ, M.B. Infecções Hospitalares por *Stenotrophomonas maltophilia*: aspectos clínicoepidemiológicos, microbiológicos e de resistência antimicrobiana. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 12, p. 154-158, 2005.

ALVES-PRADO, H.F., GOMES, E., SILVA, R. Purification and characterization of a cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* H69-3. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 41-56, 2007.

BALBAS, P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. **Molecular Biotechnology**, v. 19, p. 251-267, 2001.

BENDER, H. Production, Characterization, and application of cyclodextrins. **Advances in Biotechnological Processes.** v. 6, p. 31-71, 1986.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 411-421, 1999.

BANEYX, F., MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 1399-1408, 2004.

BEKERS, O., UIJTENDAAL, E., BEIJNE, J.H. BULT, A., UNDERBERG, W.J.M. Cyclodextrins in the Pharmaceutical Field. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 17, p. 1503-1549, 1991.

BERG, G., ROSKOT, N., SMALLA, K. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3594-3600, 1999.

BERKECZ, R., TOROK, R., ILISZ, I., FORRO, E., FULOP, F., ARMSTRONG, D.W. Enantioseparation of aryl-substituted  $\beta$ -lactams using variable-temperature conditions. **Chromatographia**, v. 63, p. 37-43, 2006.

BERROW, N.S., BUSSOW, K., COUTARD, B., DIPROSE, J., EKBERG, M., ELORZA, U.U., CORCHERO, J., FRUITOS, E.G., RUBIO, V.T., MENDOZA, R., CORRALES, A.V., MIRALLES, N.F. Recombinant production of a difficult-to-express eukaryotic protein in a bacterial expression system. **New Biotechnology**, v. 25, p. 121, 2009.

BOEL, E., BRADY, L., BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, Z., DODSON, G.G., JENSEN, V.J., PETERSEN, S.B., SWIFT, H., THIM, L., WOLDIKE, H.F. Calcium binding in alpha-amylases: an X-ray diffraction study at 2.1Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. **Biochemistry**, v. 29, p. 6244-6249, 1990.

BONILHA, P.R.M, MENOCCI, V., GOULART, A.J., POLIZELI, M.L.T.M., MONTI, R. Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 317-323, 2006.

BOVETTO, L.J., BACKER, D.P., VILLETTE, J.R., SICARD, P., JE BOUQUELET, S. Cyclomaltodextrin glucoamylase from *Bacillus circulans* E 192. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 15, p. 48-58, 1992.

CENTINI, M., MAGGIORE M., CASOLARO, M., ANDREASSI, M., FACINO, R.M., ANSELMINI, C. Cyclodextrins as cosmetic delivery systems. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**, v. 57, p. 109-112, 2007.

CHENG, J., WU, D., CHEN, S., CHEN, J., WU, J. High-level extracellular production of  $\alpha$ -cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 3797–3802, 2011.

CHO, S.H., KIM, S.Y, LEE S.I., LEE Y.M. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes for transdermal delivery: preparation, inclusion properties, stability, and release behavior. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 12, p. 50-59, 2001.

CLARK, E.D. Protein refolding for industrial processes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12(2), p. 202-207, 2001.

COSTA, H., CANTO, S., FERRAROTTI, S., BONINO, M.B.J. Structure-function relationship in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 74-79, 2009.

CRAVOTTO, G., BINELLO, A., BARANELLI, E., CARRARO, P., TROTTA, F. Cyclodextrins as food additives and in food processing. **Current Nutrition & Food Science**, v. 2(4), p. 343-350, 2006.

FOLKERS, G.E., LEVY, N., LIEU, V., OWENS, R.J., PELEG, Y., PINAGLIA, C., QUEVILLON-CHERUEL, S., SALIM, L., SCHEICH, C., VINCENTELLI, R., BUSSO, D. Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. **Acta Crystallography**, v. 62, p. 1218-1226, 2006.

FRENCH, D. The Schardinger dextrans. **Advance in Carbohydrate Chemistry**, v.12, p. 189-260, 1957.

GARDE, S., FRASER, J.E., NEMATPOOR, N., POLLEX, R., MORIN, C., FORTE, A., RABBANI, S., PANCHAL, C., GUPTA, M. B. Cloning, expression, purification and functional characterization of recombinant human PSP94. **Protein Expression and Purification**, v. 54, p. 193-203, 2007.

GOH, K.M., MAHADI, N.M., HASSAN, O., RAHMAN, R.N.Z.R.A., ILLIAS, R.M., A predominant  $\beta$ -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 270-277, 2009.

GOPALAKRISHNAN, R., HAWLEY, H.B., CZACHOR, J.S., MARKERT, R.J., BERNSTEIN, J.M. *Stenotrophomonas maltophilia* infection and colonization in the intensive care units of two community hospitals: A study of 143 patients. **Heart & Lung**, v. 28, p. 134-141, 1999.

GUNARATNE, A., CORKE, H. Influence of unmodified and modified cycloheptaamylose ( $\beta$ -cyclodextrin) on transition parameters of amylase-lipid complex and functional properties of starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 226-234, 2007.

GUZIK, U., GREN, I., WOJCIESZYNSKA, D., LABUZEK, S. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 285-291, 2009.

HAIYEE, Z.A., SAIM, O., SAID, M., ILLIAS, R.M., MUSTAPHA, W.A.W., HASSAN, O. Characterization of cyclodextrin complexes with turmeric oleoresin. **Food Chemistry**, v. 114, p. 459–465, 2009.

HASHIMOTO, Y., YAMAMOTO, T., FUJIWARA, S., TAKAGI, M., IMANAKA, T. Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of cyclomaltodextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain B1001. **Journal of Bacteriology**, v. 183 (17), p. 5050-5057, 2001.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry Journal**, v. 280, p. 309-316, 1991.

HORVATHOVA, V., JANECEK, S., STURDIK, E. Amilolytic enzymes: their specificities, origins and properties. **Biologia, Bratislava**. v. 55(6), p. 605-615, 2000.

JANECEK, S. How many conserved sequence regions are there in the  $\alpha$ -amylase family? **Biologia, Bratislava**. v. 57(11), p. 29-41, 2002.

JANECEK, S. Structural features and evolutionary relationship in the  $\alpha$ -amylase family. **Glycoenzymes**. p. 19-54, 2000.

JANECEK, S.  $\alpha$ -amylase family: molecular biology and evolution. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 67, p. 67-97, 1997.

JESPERSEN, H. M., MCGREGOR, E.A., SIERKS, M.R., SVENSSON, B. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. **Biochemistry Journal**, v. 280, p. 51-55, 1991.

LARSEN, K.L., ZIMMERMANN, W. Analysis and characterization of cyclodextrins and their inclusion complexes by affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 836, p. 3-14, 1999.

LEEMHUIS, H., KRAGH, K.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. Engineering cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase with a high exo- specificity. **Journal of Biotechnology**, v. 103, p. 203-212, 2003.

LOFTSSON, T., DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1-11, 2007.

LU, Z., CHENG, B., H.U., Y., ZHANG, Y., ZOU, G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 113, p. 17-20, 2009.

LY, H.D., WITHERS, S.G. Mutagenesis in glucosidases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, p. 487-522, 1999.

MA, N., WEI, L., FAN, Y., HUA, Q. Heterologous expression and characterization of soluble recombinant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Actinosynnema pretiosum* ssp *auranticum* ATCC31565 through co-expression with Chaperones in *Escherichia coli*. **Protein Expression Purification Journal**, v. 82, p. 263-269, 2012.

MAHAT, M.K., ILLIAS, R.M., RAHMAN, R.A., RASHID, N.A.A., MAHMOOD, N.A.N., HASSAN, O., AZIZ, S.A., KAMARUDDIN, K. Production of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from *alkalophilic Bacillus* sp. TS1-1: media optimization using experimental design. **Enzyme Microbial Technology**, v. 35, p. 467- 473, 2004.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 512-538, 1996.

MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**. Maringá: Eduem, 2000.

MATTERNM, H.M., RAIKAR, L.S., HARDIN, C.D. The effect of caveolin-1 (Cav-1) on fatty acid uptake and CD36 localization and lipotoxicity in vascular smooth muscle (VSM) cells. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 1, p. 1-14, 2009.

MORIWAKI, C., COSTA, G.L., PAZETTO, R., ZANIN, G.M., MORAES, F.F., PORTILHO, M., MATIOLI, G. Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1384-1390, 2007.

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique (Paris)**, v. 48, p. 579-82, 1990.

NAIR, R.K., SAWANT, M.R. Study of solubility of inclusion complex of permethrin with  $\beta$ -cyclodextrin. **Pestology**, v. 29(8), p. 38-43, 2005.

NANGIA, Y., WANGOO, N., GOYAL, N., SHEKHAWAT, G., SURI, C.R. A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles. **Microbial Cell Factories**, v. 8(39), 2009.

NAMAZI, H., KANANI, A. Investigation diffusion mechanism of  $\beta$ -lactam conjugated telechelic polymers of PEG and  $\beta$ -cyclodextrin as the new nanosized drug carrier devices. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 46–50, 2009.

NILSEN, J.E. e BORCHET, T.V. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 253-274, 2000.

OONNITTAN, A., SHRESTHA, R.A., SILLANPAA, M. Removal of hexachlorobenzene from soil by electrokinetically enhanced chemical oxidation. **The Journal of Hazardous Materials**, v.162, p. 989–993, 2009.

PALLERONI, N.J., BRADBURY, J.F. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 606-609, 1993.

PARK, K., KIM, T., CHEONG, T., KIM, J., OH, B., SVENSSON, B. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the  $\alpha$ -amylase family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1478, p. 165-185, 2000.

PAVLOU, A.K., REICHERT, J.M. Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 1513-1519, 2004.

PINTO, F.S.T., FLÔRES, S.H., AYUB, M.A.Z., HERTZ, P.F. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, p. 377-382, 2007.

PROVENZI, G., FALCÃO, L.D., FETT, R., LUIZ, M.T.B. Estabilidade de antocianinas de uvas cabernet sauvignon com  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, p. 165-170, 2006.

QI, Q., ZIMMERMANN, W. Cyclodextrin glucanotransferase : from gene to applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 475-485, 2005.

RAHMAN, K., ILLIAS, R.M., HASSAN, O., MAHMOOD, N.A.N., RASHID, N.A.A. Molecular cloning of a cyclodextrin glucanotransferase gene from alkaliphilic *Bacillus* sp. TS1-1 and characterization of the recombinant enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 74-84, 2006.



QORONFLEH, M.W., HESTERBERG, L.K. Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. **Protein Expression and Purification**, v. 55, p. 209-224, 2007.

RAWAT, S., JAIN, S.K. Solubility enhancement of celecoxib using  $\beta$ -y clodextrin inclusion complexes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 263-267, 2004.

REGIERT, M. Stabilizing linoleic add by complexation with  $\alpha$ -cyclodextrin. **Cosmetics & Toiletries**, v. 121, p. 43- 50, 2006.

RODAL, S.K., SKRETTING, G., GARRED, O., VILARDT, F., DEURS B., SANDVIG, K. Extraction of cholesterol with methyl- $\beta$ -cyclodextrin perturbs formation of clathrincoated endocytic vesicles. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 961-974, 1999.

RODENBURG, K.W., JUGE, N., GUO, X.-J., SOEGAARD, M., CHAIX, J.C., SVENSSON, B. Domain B protruding at the third  $\beta$ -strand of the  $\alpha/\beta$  barrel in barley  $\alpha$ -amylase confers distinct isoenzyme-specific properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 221, p. 277-284, 1994.

SA BARRETO L.C.L., CUNHA-FILHO M.S.S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmaceutico Funcional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27(4), p. 629-636, 2008.

SAHDEV, S., KHATTAR, S.K., SAINI, K.S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, p. 249-264, 2008.

SALIPIRA, K.L., MAMBA, B.B., KRAUSE, R.W., MALEFETSE, T.J., DURBACH, S.H. Carbon nanotubes and cyclodextrin polymers for removing organic pollutants from water. **Enviromental Earth Science**, v. 5, p.13-17, 2006.

SASIKALA, K., ARUNACHALAM, S. Studies on outer-sphere electron transfer between iron(II) and some surfactant-cobalt (III) complexes in micelles as well as in  $\beta$ -cyclodextrin, **Colloid and Surface A**, v. 335, p. 98-102, 2009.

SCHUMANN, W., FERREIRA, L.C.S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p .442-453, 2004.

SEON, K.H., AHN, J., KWAK. H.S. The accelerated ripening of cholesterol- reduced cheddar cheese by crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 49-57, 2009.

SHIBUYA, T., AGA, H., WATANABE, H., SONODA, T., KUBOTO, M., FUKUDA, S., KURIMOTO, M., TSUJISAKA, Y. Transglycosylation of glycosyl residues to cyclic tetrasaccharide by *Bacillus stearothermophilus* cyclomaltodextrin glucanotransferase using cyclomaltodextrin as the glycosyl donor. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.67(5), p. 1094-1100, 2003.

SINGH, M., SHARMA, R., BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrin. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 341-359, 2002.

SORENSEN, P.H., MORTENSEN, K.K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 4(1), p. 1-8, 2005.

SVENSSON, B. Protein engineering in the  $\alpha$ -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. **Plant Molecular Biology**, v. 25, p. 141-157, 1994.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 137-142, 2004.

THOMAS, J. G., AYLING, A., BANEYX, F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 66, p. 197-238, 1997.

TILDEN, E.B., HUDSON, C.S. Preparation and properties of amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa*. **Journal of Bacteriology**, v. 43, p. 527-544, 1942.

TOMITA, K., KANEDA, M., KAWAMURA, K., NAKANISHI, K. Purification and properties of a Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75 (2), p. 89-92, 1993.

TESFAI, B.T., WU, D., SHENG, C., CHEN, S., CHEN, J., WU, J. Strategies for Enhancing Extracellular Secretion of Recombinant Cyclodextrin Glucanotransferase in *E. coli* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 897-908, 2012.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 678-686, 1998.

UITDEHAAG, J.C.M., VAN DER VEEN, B.A., DIJKHUIZEN, L., DIJKSTRA, B.W. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the  $\alpha$ -amylase family. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 295-304, 2002.

VAN DER KAAIJ, R.M., YUAN, X.L., FRANKEN, A., RAM, A.F.J., PUNT, P.J., VAN DER MAAREL, M.J.E.C., DIJKHUIZEN, L. Two Novel, Putatively Cell Wall-Associated and Glycosylphosphatidylinositol-Anchored  $\alpha$ -Glucanotransferase Enzymes of *Aspergillus niger*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, p. 1178-1188, 2007.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C., VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L. Properties and Applications of Starch-Converting Enzymes of the  $\alpha$ -Amylase Family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2002.

VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., PENNINGA, D., ALEBEEK, G.W.M., SMITH, L.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. Rational design of cyclodextrin

glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase  $\alpha$ -cyclodextrin production. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, p. 1027-1038, 2000a.

VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 336-360, 2000b.

WIND, R.D., LIBL, W., BUITELAAR, R.M., PENNINGA, D., SPREINAT, A., DIJKHUIZEN, L., BAHL, H. Cyclodextrin formation by the thermostable  $\alpha$ -amylase of *Thermanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61(4), p. 1257- 1265, 1995.

ZHEKOVA B., DOBREV, G., STANCHEV, V., PISHTIYSKI, I. Approaches for yield increase of  $\alpha$ - cyclodextrin formed by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25(46), p. 1043-1049, 2009.

## **APÊNDICES**

## APÉNDICE 1

amyM putative cyclomaltodextrin glucanotransferase [*Stenotrophomonas maltophilia* K279a ]

Gene ID: 6395359

Locus tag: Smlt1179

amyM putative cyclomaltodextrin glucanotransferase:

>gj|190572091:1227582-1229300 *Stenotrophomonas maltophilia* K279a  
chromosome, complete genome

```
GTGATGCGTGGTGTCTTGGCTGTTGCTGTTTCCCTTGCCCTGTTCCGCCGGCCAGGCCGCGGCCGCGCCGCGCCGCG
GCCCCGACTACGTTCGGCACCACCGAGCCGTTCCGCCAGCGATGCGGTGTACTTCGTGGTCACCGACCGCTT
TGTC AACGGTGACCCGTCCAACGACCATCGTGACCAGGGTGGCGCGCACCGCACCTTCGATATCCCGGTG
CCATGCCCCGACAAGGTGGACGGCAACATCGGGTATCTCGGCCGCGACTTTCGCGGGCGTGTCTCGACAATG
CGCAGTACATCCGCAACCTGGGCTTCGGTGCGGTGTGGATCACGCCATCGTTCGACAACCCGGACGAGGC
CTTTACCGGCAGCAAGCCGATCAGCTGTACCAGCACGCTGACTGATCGTGGGAAGACCGGTTACCACGGC
TACTGGGGCATCAATTTCTACAAGCTCGACGAGCACCTGCCGAGCAGGGGCCCTGGACTTCGCCGGGCTGA
CCAAGGGCCTGCACGGTGTGGCTTGAAGTGGTGTGGATATCGTAGGCAACCACGGTTCGCCGGCCTG
GACCATGCCGACACGGCAGCCGAGTTCGGGCAGATCTTCGACAAGGACGGAAAACCTGATCGCCGACCAC
CAGAACCTGCCGCCGAGAACTGGATCCGAAGCACAACCCGTTGCACGCGTTCACAAACAACATCGGTC
CGGTTCGACAGCAAGGACGGCTCGATCTTCGACGGCAACCTGGCCGAGCTGTCCGACTTCAACCAGGACAA
TCCGGCGGTGATGGACTACCTGGTTCGGCGCCTACCTGCAGTGGACCGCGCAGGGCGTGGACGCGTTCGCG
ATCGACACCATCGGCTGGCTGCCGCACCCGTTGGTGGCATGAATTCGTC AAGCGCATCCGCGCCGAGCATC
CGGGCATGTTTCATGTTCCGGCGAAGCGTTCGACTACGATGCCGCGCGCATCGCCGAGCACACCTGGCCCCG
CAACCGGAACGTGAGCGTGTCTCGATTTCCCATTCGCGCGCGCGCTGGAGCAGACCTTCGGCACCGCCGGC
AAGGGCTTCGAAAACCTGGCCGAGCCGCTGCACCTGAGCGCGGACCGTACGCCAACCCGTACGAGCTGA
TGAGCTTCTACGACAACCACGACATGCCGCGCCTGCAGGCCAGCGACGATGGTTTCATCGATGCGCACAA
CTGGCTGTTACCGCGCGCGGCATTCGGTGGTCTACTACGGTTCGGAGACGGGCTTCATGCGTGGCCGT
GCCGAGCATGCCGCAATCGTGCCTACTTCGGCCAGCCGCGTGTGGATGCCGCGCCGAAGAGCCCCGATCT
TCGCGCCGCTGCAGCGTATCGCCAGGCTGCAGCAAGCCACCCGGCGCTGCAGCGCGGCTGCAGGTGAA
CGAGCGCCTGCAGGGCGATGAGGCAGTGTCTTCGCGGTGCTGCAGCATGGCGAGGTGGCGCAGACCGCG
CTGGTGTCTGTAACAAGGGCGACCACGCCAGGACCCCTACCGTGGCGCGTTCGTCAGTCCGGCCGCT
GGCGCGATGCGCTGGACGGCGGTTTCGTTGCAGGTGAACGGTCCGCTGAAGGCCGACGTGCCCGCGCACGG
CGTGAAGGTCTATGTGCTGGACGCTGCCGTGCAGCAGCCGGCGCTGCAGGCCGAGCTGGACAAGGCGATG
GCCGACCAGAAGGCCGCGGGACCAGCGTCTGGGGCGGTAG
```

amyM putative cyclomaltodextrin glucanotransferase:

>gj|190573204|ref|YP\_001971049.1| putative cyclomaltodextrin glucanotransferase  
[*Stenotrophomonas maltophilia* K279a]

```
MMRGVLAVAVSLALFAGQAAAAAPRPDYVGTTEPFASDAVYFVVTDRFVNGDPSNDHRDQGGAHRTFDIPV
PCPKVDGNI GYLGDFRGVLDNAQYIRNLGFGAVWITPIVDNPDEAFTGSKPISCTSTLTDGRKTYHG
YWGINFYKLDLPSRGLDFAGLTKGLHGAGLKVLDIVGNHGPSAWTMPTRQPQFGQIFDKDGKLIADH
QNLPPQKLDPKHNPLHAFYNNIGPVDSKDGSI FDNLAELSDFNQDNPAVMDYLVGAYLQWTAQGVDALR
IDTIGWLPHPWHEFVKRIRAEHPGMFMFGEAFDYDAARIAEHTWPANANVSVLDFPLRGALEQTFGTAG
KGFETLAEPLHLSGGPYANPYELMSFYDNHDMPRLQASDDGFI DAHNWLF TARGIPV VVY YGSETGFMRGR
AEHAGNRAYFGQPRVDAAPKSPI FAPLQRIARLREATPALQRGLQVNERLQGDEAVFLRVLQHGEVAQTA
LVLLNKGDHARTLTVARFVQSGRWRDALDGGSLQVNGPLKADVPAHGVKVYVLDAAVQQPALQAE LDKAM
ADQKARDQRLGR
```

## APÉNDICE 2

major facilitator superfamily transmembrane protein [Stenotrophomonas maltophilia K279a]

Gene ID: 6392386

Locus tag: Smlt1178

>gi|190572091:1226098-1227585 Stenotrophomonas maltophilia K279a  
chromosome, complete genome

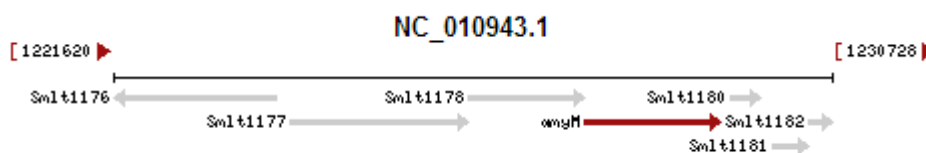
```
ATGAATCGTCCC GCCAAACCGCAGCTGTCGTTCTGGCAGATCTGGAACATGTGTTTCGGCTTCCTCGGCA
TCCAGTTCGGGTTCGCCCTGCAGAACGCCAACGCCAGCCGCATCTTCGAGACGCTGGGTGCGGACATCGA
CGCGGTACCCGGGCTGTGGATTGCCGCGCCGCTGACCGCCCTGCTGGTGCAACCGGTGATCGGTTACCTG
TCCGACCGCACCTGGACCCGCTGGGGTCGTCGTCGTCCTTTCATGATCGGTGCGGTGTTGACCACGC
TGGCGCTGCTGGTGATGCCGAACTCGCCGACGCTGTGGATCGCGGCCGGCACGCTGTGGGTGCTGGATGC
TTCGATCAACGTATCGATGGAGCCGTTCCGTGCCCTTTGTTCGGCGACCAGCTGGCGCCACGCCAGCGTCCG
GCCGGCTACGCGATGCAGAGCTTCTTCATCGGGCGTGGGCGCCATCGTCGCCAGCTTCCTGCCATTCATCC
TGGCCCCACTTCGGCGTTGCCAACACCGCGGGCCGCGGGGAAGTGCCCCGACACTGTGCGCTATGCGTTCTA
CTTCGGCGCGGTGGTGCTGCTCGCGGCGATCACTTGGACGGTGGTCAGCACCCGCGAATATTCACCAGCG
GAGCTGGCCGGGTTCGATGATGCCGAGCCACCGAACATCACGCGGCGGCCGCGATCAACGGCCCGGCTT
CATGGACGCGGGTGACCTGTGGCTTGGGTGGGTGTGTTGCTGGCGCTGCTGATCACCTGGCGGCAAGG
CGACAGGATGCTGTACGTGCTGGCCGGCCTGTGCGCCGGCTACGGCCTGCTGCTGGCGGCGGCGCGCGG
CTGCCGGCCACGCATATGCTGGCCGCCATCGTCGGCGACCTGCGCGCGATGCCGGTACCATGCGCCGCC
TGGCGTGGGTGCAGTTCTTCTCGTGGTTCGCGCTGTTCGCCATGTGGATCTACACCACCGCTGCGGTGGC
CGGTACCCACTTCGGTTCGACCGATCCACAGTCGGCCGCCCTACAACGAAGGTGCCAACTGGGTGGGCGTG
CTGTTTGGCGCCTACAACGGCTTCGCTGCGCTGGCGGCGGTGCTGATTCCGCCGATGGTGCGTGCGATCG
GCCTGCGCTGGAGCCACCTGGTCAACCTGTGGCTGGGCGGCGCCGGCCTGGTCTCGCTGATGTTTCATCCG
CGACCCGCACTGGCTGCTGCTGCTGATGGTGGGTGTGGGCTTTGCCTGGGCCTCGATCCTGTCGTTGCCG
TATGCACTGCTGTCGACAGCGTGCCGGCGTCAAGATGGGTGTGTACATGGGCATCTTCAATTTCTTCA
TCGTGATCCCGCAGCTGGTGGCGGCCAGCGCGCTTGGCTTTGCCCTGCGCGCATGGCTGGGTGGCCAGCC
GATGCATGTGCTGGTGTGTCGGCGGCTGCAGCCTGTTCTGGCCGGCCTGTGCGTGCTGCGGGTTCCGTCC
CGTCCGGAGGTGGTGTGA
```

major facilitator superfamily transmembrane protein [Stenotrophomonas maltophilia K279a]

>gi|190573203|ref|YP\_001971048.1| major facilitator superfamily transmembrane  
protein [Stenotrophomonas maltophilia K279a]

```
MNRPAKPLSFWQIWNMCFGLGIQFGFALQNASRIFETLGADIDAVPGLWIAAPLTGLLVQPVIGYL
SDRTWTRWGRRRPYFMI GAVLTTLALLVMPNSPTLWIAAGTLWVLDAS INVSMEPFRAFVGDQLAPRQRP
AGYAMQSFFIGVGAIVASFLPFILAHFGVANTAAAGEVPDTPVRYAFYFGAVVLLAAITWTVVSTREYSPA
ELAGFDDAEPPEHHAAAAINGPASWTRVTLWLGLGVLLALLITWRQDRMLYVLAGLCAGYGLLLAARA
LPATHMLAAIVGDLRAMPVTMRRLAWVQFFSWFALFAMWIYTTAAVAGTHFGSTDPQSAAYNEGANNWVG
LFGAYNGFAALAAVLI PPMVRAIGLRWHLVNLWLGAGLVS LMFIRDPHWLLLSMVGVGFVAWASILSLP
YALLSDSVPASKMGVYMGIFNFFIVIPQLVAASALGFALRAWLGGQPMHVLVLGGCSLFLAGLCVLRVPS
RPEVV
```

### APÊNDICE 3



Esquema demonstrando o operon, onde se pode observar a proteína possível facilitadora transmembrana (PMFTP – putative Major Facilitator Transmembrane Protein) que ancora o gene *cgt*, alvo deste trabalho.

## APÊNDICE 4

Alinhamento da sequência de nucleotídeos descritos para o *cgf* gene depositado no GenBank gene ID 6395359 (1), com o resultado do seqüenciamento do fragmento amplificado utilizando os primers desenhados para o *cgf* gene de *S. maltophilia* (2). Alinhados através do programa ClustalW. Os asteriscos (\*) abaixo das seqüências indicam a identidade.

```

1          GTGATGCGTGGTGTCTGGCTGTTGCTGTTTCCCTTGCCCTGTTTCGCCGGCCAGGCCGCG 60
2          -----GAATATCCGCGCTG-----CGTCGCACAG-----CGTCTGGG--GCG 35
           . * . ***   ****                * * * * . : *   * * * . * * * *

1          GCCGCGCCGCGCCCGGACTACGTCCGCACCACCGAGCCGTTCCGCCAGCATGCGGTGTAC 120
2          GTAGAGCTAGG---AGACTACGTCCGCACCACCGAGCCGTTCCGCCAGCATGCGGTGTAC 92
           * . * . * * . * . *****

1          TTCGTGGTCACCGACCGCTTTGTCAACGGTGACCCGTCCAACGACCATCGTGACCAGGGT 180
2          TTCGTGGTCACCGACCGCTTTGTCAACGGTGACCCGTCCAACGACCATCGTGACCAGGGT 152
           *****

1          GGCGCGCACCGCACCTTCGATATCCCGGTGCCATGCCCGGACAAGGTGGACGGCAACATC 240
2          GGCGCGCACCGCACCTTCGATATCCCGGTGCCATGCCCGGACAAGGTGGACGGCAACATC 212
           *****

1          GGCTATCTCGGCGGCGACTTTCGCGGCGTGCTCGACAATGCGCAGTACATCCGCAACCTG 300
2          GGCTATCTCGGCGGCGACTTTCGCGGCGTGCTCGACAATGCGCAGTACATCCGCAACCTG 272
           *****

1          GGCTTCGGTGCGGTGTGGATCACGCCATCGTCGACAACCCGGACGAGGCCTTTACCGGC 360
2          GGCTTCGGTGCGGTGTGGATCACGCCATCGTCGACAACCCGGACGAGGCCTTTACCGGC 332
           *****

1          AGCAAGCCGATCAGCTGTACCAGCACGCTGACTGATCGTGGAAGACCGGTTACCACGGC 420
2          AGCAAGCCGATCAGCTGCACCAGCACGCTGACCGACCGGCAAGACCGGTTACCACGGC 392
           *****

1          TACTGGGGCATCAATTTCTACAAGCTCGACGAGCACCTGCCGAGCAGGGGCTGGACTTC 480
2          TACTGGGGCATCAATTTCTACAAGCTCGACGAGCACCTGCCGAGCAGGGACCTGGACTTC 452
           *****

1          GCCGGGCTGACCAAGGGCCTGCACGGTGCTGGCTTGAAGGTGGTGTGGATATCGTAGGC 540
2          GCCGGGCTGACCAAGGGCCTGCACGGTGCTGGCTTGAAGGTGGTGTGGATATCGTAGGC 512
           *****

1          AACCACGGTTCGCCGGCCTGGACCATGCCGACACGGCAGCCGAGTTCGGGCAGATCTTC 600
2          AACCACGGTTCGCCGGCCTGGACCATGCCGACACGGCAGCCGAGTTCGGGCAGATCTTC 572
           *****

1          GACAAGGACGGAAAATGATCGCCGACCACCAGAACCTGCCGCCGCGAAAATGGATCCG 660
2          GACAAGGACGGAAAATGATCGCCGACCACCAGAACCTGCCGCCGCGAAAATGGATCCG 632
           *****

1          AAGCACAACCCGTTGCACGCGTTCCTACAACAACATCGGTCCGGTCGACAGCAAGGACGGC 720
2          AAGCACAACCCGTTGCACGCGTTCCTACAACAACATCGGTCCGGTCGACAGCAAGGACGGC 692
           *****

1          TCGATCTTCGACGGCAACCTGGCCGAGCTGTCCGACTTCAACCAGGACAATCCGGCGGTG 780
2          TCGATCTTCGACGGCAACCTGGCCGAGCTGTCCGACTTCAACCAGGACAATCCGGCGGTG 752
           *****

```



```

1 ATGGA CTACCTGGTCGGCGCCTACCTGCAGTGGACCGCGCAGGGCGTGGACGCGTTGCGC 840
2 ATGGA CTACCTGGTCGGCGCCTACCTGCAGTGGACCGCGCAGGGCGTG-ACGCGTTGCGC 811
*****

1 ATCGACACCATCGGCTGGCTGCCGCACCCGTGGTGGCATGAATTTCGTCAAGCGCATCCGC 900
2 ATCGACACCATCGGCTGGCTGCCGCACCCGTGGTGGCATGAATTTCGTCAAGCGCATCCGC 871
*****

1 GCCGAGCATCCGGGCATGTTTCATGTTTCGGCGAAGCGTTCGACTACGATGCCGCGCGCATC 960
2 GCCGAGCATCCGG-CATGTTTCATGTTTCAGCGAAGCG-TGACTACGATGCCGCGCGCATC 929
*****

1 G----- 961
2 GACGAGCACACTTGACCCGGCTACGCGAACTGTGAAGCGTACTGGAATTCCTGTCGCGC 989
*

1 -----
2 GCACTGTGGATCATGACCCCGCCACGACGGTGAGACGGGTGGCACATCACACATCTATCG 1049

1 -----
2 GTGGCTGCCGCACCCGTGTGTGCAATAATCATCACATGCATCGCGGCCGAGCATGCCGGG 1109

1 -----CCGAGCACACCTG 974
2 CACGTTTCATGTTTCGAGGGATCGATCGAGTACGATGCGCGTTCGCATAGCCGAGCACACCTT 1169
*****

1 GCCCGCCAACGCGAACGTGAGCGTGCTCGATTT-CCCATTGCGCGGCGCGCTGGAGCAGA 1033
2 GCCCGCCGACGGGAACGTGAGCGTGTGGATTTTCCCGTTGCGCCGCGCACTGGAGCAGA 1229
*****

1 CCTTCGGCACCCGCCAAGGGCTTCGAAACCCGTGGCCGAGCCGCTGCACCTGAGCGGCG 1093
2 GCTTCGGCACCCGCCAACAAGGGCTTCGAGACCCGTGGCTGAGCACCTGCACCTGAGCGGTG 1289
*****

1 GACCGTACGCCAACCCGTACGAGCTGATGAGCTTCTACGACAACCACGACATGCCGCG-C 1152
2 GCCCGTATGCCAATCCGTACGAGCTGATGAGCT-CTACGACAACACGACATGCCGCGCC 1348
*

1 CTGCAGGCCAGCGACGATGGTTTCATCGATGCGCACAACCTGGCTGTTTACCGCGCGCGGC 1212
2 CTTCAGGCCAGTGACAACGGCTTCATCGATGCGCACAACCTGGCTGTTTACCGCGCGCGGC 1408
**

1 ATTCCGGTGGTCTACTACGTTTCGGAGACGGGCTTCATGCGTGGCCGTGCCGAGCATGCC 1272
2 ATTCCGGTGGTCTACTACGTTTCGGAGACGGGCTTCATGCGTGGCCGTGCCGAGCATGCC 1468
*****

1 GGCAATCGTGCGTACTTCGGCCAGCCGCGTGTGGATGCGGCGCCGAAGAGCCCGATCTTC 1332
2 GGCAATCGTGCGTACTTCGGCCAGCCGCGTGTGGATGCGGCGCCGAAGAGCCCGATCTTC 1528
*****

1 GCGCCGCTGCAGCGTATCGCCAGGCTGCGCGAAGCCACCCCGGCGCTGCAGCGCGGCTG 1392
2 GCGCCGCTGCAGCGTATCGCCAGGCTGCGCGAAGCCACCCCGGCGCTGCAGCGCGGCTG 1588
*****

1 CAGGTGAACGAGCGCCTGCAGGGCGATGAGGCAGTGTCTTTCGCGGTGCTGCAGCATGGC 1452
2 CAGGTGAACGAGCGCCTGCAGGGCGATGAGGCAGTGTCTTTCGCGGTGCTGCACCATGGC 1648
*****

1 GAGGTGGCGCAGACCG-CGCTG--GTGCTGCTGAACAAGGGCGACCACGCCAGGACCCCTC 1509
2 GAGGTGGCGCAGACCCGCGTGGTGTGCTGCTGAACAAGGGCGACAGGGCAAAGAGCTTC 1708
*****

1 ACCGTGGCGCGTTTCGTCCAGTCCGCGCCGCTGGCGCGATGCGCTGGACGGCGGTTTCGTTG 1569
2 ACTGTGTGCGGTTACGTCCAGGCGGGCCGCTGGCGCGATGCGCTGGACGGCGGTTTCGTTG 1768
**

```

```
1 CAGGTGAACGGTCCGCTGAAGGCCGACGTGCCCGCGCACGGCGTGAAGGTCTATGTGCTG 1629
2 CAGGTGAACGGTCTGCTGAAGGCCGACGTGCCCGCGCACGGCGTGAAGGTCTATGTGCTG 1828
  *****

1 GACGCTGCCGTGCAGCAGCCG-GCGCTGCAGGCCGAGCTGGACAAGGCGATGGCCGACCA 1688
2 GACGCTGCCGTGCAGCAGCCGTGCGACATATGCGTAGTGTGCCTAGCTGCTGATGATACA 1888
  *****

1 GAAGGCGCGGGACCAGCGTCTGGGGCGGTAG 1719
2 GAGAGTGGG----- 1898
  **..* ****
```

## APÊNDICE 5

Alinhamento da sequência de nucleotídeos descritos para o *mft* gene depositado no GenBank gene ID 6392386 (1), com o resultado do seqüenciamento do fragmento amplificado utilizando os primers desenhados para o *mft* gene de *S. maltophilia* (2). Alinhados através do programa ClustalW. Os asteriscos (\*) abaixo das sequências indicam a identidade.

```

1          ATGAATCGTCCC GCCAAACCGCAGCTGTCGTTCTGGCAGATCTGGAACATGTGTTTCGGC 60
2          -----GCGCAG----TGTTCTGGCAGATCTGG-ACATGTGTTTCGGC 37
                *****
1          TTCCTCGGCATCCAGTTCGGGTTCGCCCTGCAGAACGCCAACGCCAGCCGCATCTTCGAG 120
2          TTCCTCGGCATCCAGTTCGGGTTCGCCCTGCAGAACGCCAACGCCAGCCGCATCTTCGAG 97
                *****
1          ACGCTGGGTGCGGACATCGACGCGGTACCCGGGCTGTGGATTGCCGCGCCGCTGACCGGC 180
2          ACGCTGGGTGCGGACATCGACGCGGTACCCGGGCTGTGGATTGCCGCGCCGCTGACCGGC 157
                *****
1          CTGCTGGTGCAACCGGTGATCGGTTACCTGTCCGACCGCACCTGGACCCGCTGGGGTCTGT 240
2          CTGCTGGTGCAACCGGTGATCGGTTACCTGTCCGACCGCACCTGGACCCGCTGGGGTCTGT 217
                *****
1          CGTCGTCCGTACTTCATGATCGGTGCGGTGTTGACCACGCTGGCGCTGCTGGTGATGCCG 300
2          CGTCGTCCGTACTTCATGATCGGTGCGGTGTTGACCACGCTGGCGCTGCTGGTGATGCCG 277
                *****
1          AACTCGCCGACGCTGTGGATCGCGGCCGGCACGCTGTGGGTGCTGGATGCTTCGATCAAC 360
2          AACTCGCCGACGCTGTGGATCGCGGCCGGCACGCTGTGGGTGCTGGATGCTTCGATCAAC 337
                *****
1          GTATCGATGGAGCCGTTCCGTGCCTTTGTGCGCGACCAGCTGGCGCCACGCCAGCGTCCG 420
2          GTATCGATGGAGCCGTTCCGTGCCTTTGTGCGCGACCAGCTGGCGCCACGCCAGCGTCCG 397
                *****
1          GCCGGCTACGCGATGCAGAGCTTCTTCATCGGCGTGGGCGCCATCGTCGCCAGCTTCCTG 480
2          GCCGGCTACGCGATGCAGAGCTTCTTCATCGGCGTGGGCGCCATCGTCGCCAGCTTCCTG 457
                *****
1          CCATTCATCCTGGCCCACTTCGGCGTTGCCAACACCGCGCCGCGGGGAAGTGCCCGAC 540
2          CCATTCATCCTGGCCCACTTCGGCGTTGCCAACACCGCGCCGCGGGGAAGTGCCCGAC 517
                *****
1          ACTGTGCGCTATGCGTTCTACTTCGGCGCGGTGGTGTGCTCGCGGCGATCAGTTGGACG 600
2          ACTGTGCGCTATGCGTTCTACTTCGGCGCGGTGGTGTGCTCGCGGCGATCAGTTGGACG 577
                *****
1          GTGGTCAGCACCCGGAATATTACCAGCGGAGCTGGCCGGGTTTCGATGATGCCAGCCA 660
2          GTGGTCAGCACCCGGAATATTACCAGCGGAGCTGGCCGGGTTTCGATGATGCCAGCCA 637
                *****
1          CCGGAACATCACGCGCGGCCGCGATCAACGGCCCGGCTTCATGGACGCGGGTG-ACCCT 719
2          CCGGAACATCACGCGCGGCCGCGC-TCCAACGACCCGCTTCATGGACGCGGGTGGAACCT 696
                *****
1          GTGGCTTGGG-TTGGGTGTGTTGCTGGCGCTGCTGATCACCTGG--CGGCAAGG-CGACA 775
2          GTGGCTTGGATTTGGGTGTGTAGCTG-CGCTGCTGATCACCTGGCTGGCAAGGCCGACA 755
                *****

```

1 GGATGCTGTACGTGCTGGCCGGCCTG-TGCGCCGGCTACGGCCTGTGCTGGCGGCGGCG 834  
 2 GGATGCTGTACGTGCTGGCCGGCCTGTTGCGCCGGCTACGGCCTGTGCTGGCGGCGGCG 815  
 \*\*\*\*\*

1 CGCGCGCTGCCGGCCACGCATATGCTGGCCGCCATCGTCGGCGACCTGCGCGCGATGCCG 894  
 2 CGCGCGCTGCCGGCCACGCATATGCTGGCCGCCATCGTCGGCGACCTGCGCGCGATGCCG 875  
 \*\*\*\*\*

1 GTCACCATGCGCCGCCTGGCGTGGGTGCAGTTCCTCTCGTGGTTCGCGCTGTTCCGCATG 954  
 2 GTCACCATGCGCCGCCTGGCGTGGGTGCAGTTCCTCTCGTGGTTCGCGCTGTTCCGCATG 935  
 \*\*\*\*\*

1 TGGATCTACACCACCGCTGCGGTGGCCGGTACCCACTTCGGTTCGACCGATCCACAGTCG 1014  
 2 TGGATCTACACCACCGCTGCGGTGGCCGGTACCCACTTCGGTTCGACCGATCCACAGTCG 995  
 \*\*\*\*\*

1 GCCGCCTACAACGAAGGTGCCAACTGGGTGGGCGTGTGTTGGCGCCTACAACGGCTTC 1074  
 2 GCCGCCTACAACGAAGGTGCCAACTGGGTGGGCGTGTGTTGGCGCCTACAACGGCTTC 1055  
 \*\*\*\*\*

1 GCTGCGCTGGCGGCGGTGCTGATTCCGCCGATGGTGCCTGCGATCGGCCTGCGCTGGAGC 1134  
 2 GCTGCGCTGGCGGCGGTGCTGATTCCGCCGATGGTGCCTGCGATCGGCCTGCGCTGGAGC 1115  
 \*\*\*\*\*

1 CACCTGGTCAACCTGTGGCTGGGCGGCGCCGGCCTGGTCTCGCTGATGTTTCATCCGCGAC 1194  
 2 CACCTGGTCAACCTGTGGCTGGGCGGCGCCGGCCTGGTCTCGCTGATGTTTCATCCGCGAC 1175  
 \*\*\*\*\*

1 CCGCACTGGCTGCTGCTGTGATGGTGGGTGTGGGCTTTGCCTGGGCTCGATCCTGTGCG 1254  
 2 CCGCACTGGCTGCTGCTGTGATGGTGGGTGTGGGCTTTGCCTGGGCTCGATCCTGTGCG 1235  
 \*\*\*\*\*

1 TTGCCGTATGCACTGCTGTCCGACAGCGTGCCGGCGTCAAGATGGGTGTGTACATGGGC 1314  
 2 TTGCCGTATGCACTGCTGTCCGACAGCGTGCCGGCGTCAAGATGGGTGTGTACATGGGA 1295  
 \*\*\*\*\*

1 ATCTTCAATTTCTTCATCGTGATCCCGCAGCTGGTGGCGGCCAGCGCGCTTGGCTTTGCC 1374  
 2 ATCTTCAATTTCTTCATCGTGATCCCGCAGCTGGTGGCGGCCAGCGCGCTTGGCTTTGCC 1355  
 \*\*\*\*\*

1 CTGCGCGCATGGCTGGGTGGCCAGCCGATGCATGTGCTGGTGTGGCGGCTGCAG-CCT 1433  
 2 CTGCGCGCATGGCTGGGTGGCCAGCCGATGCATGTGCTGGTGTGGCGGCTGCACGCCT 1415  
 \*\*\*\*\* \*\*\*

1 GTTCCTGGCCGGCCTGTGCGTGTGCGGGTTCGGTCCCGTCCGGAGGTGGTGTGA 1488  
 2 GTTCCTGGCCGGCCT---TGTGCGGCTG---CCGTCCCC----- 1448  
 \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*