UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PRISCILA ESTEVES DE FARIA

Análise genômica e construção de mapa metabólico de cepa com interesse biotecnológico da bactéria *Paenibacillus polymyxa*.

Rio de Janeiro

2019

Priscila Esteves de Faria

Análise genômica e construção de mapa metabólico de cepa com interesse biotecnológico da bactéria *Paenibacillus polymyxa*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Rafael Dias Mesquita

Rio de Janeiro

2019

Priscila Esteves de Faria

Análise genômica e construção de mapa metabólico de cepa com interesse biotecnológico da bactéria *Paenibacillus polymyxa*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em

_____

Dr. Rafael Dias Mesquita

_____

Dr. Rodrigo Volcan Almeida

_____

Dr. Marcos Paulo Catanho de Souza

_____

Dr. André Luis Souza dos Santos (Suplente interno)

_____

Dr. Antonio Basilio de Miranda (Suplente externo)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela força que me deu em todos os momentos da minha vida; fosse para superar algo ou passar por uma tribulação, fosse para ter a coragem necessária para encarar novos desafios e alcançar progresso. Agradeço imensamente minha mãe, que sempre me ensinou a buscar aquilo que desejo e acreditar em mim mesma.

Durante esses dois anos de mestrado, estive com muitas pessoas boas, a quem agradeço por terem tornado essa jornada mais leve e divertida. Na PPGBq, minhas amigas "fofoletes" Araceli (com quem compartilhei muitos desesperos na reta final), Taíssa, Natália e Bianca. Fora da pós, meus amigos de Campo Grande, especialmente Lucas Deforme (coração enorme e sempre disposto a ajudar) e Thais (com quem troco fofocas, dicas e delineador). Meus amigos que são como irmãos, pois cresceram comigo, Bárbara e Gabriel. Agradeço muito Vinicius, meu namorado e melhor amigo, por estar comigo há tanto tempo, com tanta paciência, carinho, amor e suporte. Sou grata também a minha família; meus avós, José e Jandira, e ao meu pai, pois mesmo não entendendo nada que eu faço (risos) têm muito orgulho de mim e do que venho trabalhando para me tornar. Óbvio, não posso deixar de agradecer Arthur, meu irmãozinho, meu amorzinho pequeno, a quem "amo do tamanho de um elefante".

Agradeço a todos do LabBioinfo, mas algumas pessoas são especiais. Bia, Thay e Eloy, por terem sido amigos tão queridos e fiéis, pela constante sensação de ter amigos torcendo por mim, e por poder compartilhar dos sucessos de vocês; obrigada por toda ajuda, científica ou não, e torço para que esse laço não se perca. À Larissa "Two", com quem criei uma amizade maravilhosa (isso resume!). À Jaqueline, minha querida aluna de IC, a qual sempre terei um carinho muito grande e me felicito muito em ter feito parte do seu progresso. Ao André, pela ajuda indescritível!, acho que só um enorme OBRIGADA (com uma barra de chocolate amargo maior ainda) pode expressar minha gratidão. À professora Glória, por ser tão amável e disposta a nos ajudar. Para fechar com chave de ouro, agradeço ao professor Rafael, que abriu as portas de seu laboratório, acreditou em mim em todos os momentos (o que foi essencial) e sempre me impulsionou a ser uma aluna melhor a cada dia.

Agradeço também aos colaboradores e todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho. À Dr.ª Denise Freire, Duda, Daniel, Fábio e Aline (LaBiIM) e à Dr.ª Lucy Seldin (Microbiologia-CCS) agradeço pela colaboração ao trabalho. Aos "Luiz" da Física (Luiz Ricardo, Luiz Felipe e Luiz Carlos) por fornecerem nitrogênio líquido e sempre me receberem com muito carisma (e cafezinho). Aos demais laboratórios que deram suporte, gentilmente disponibilizando algum equipamento. Agradeço a banca por ter aceito o convite a fazer parte de algo tão importante na minha caminhada. Agradeço também as agências de fomento (CAPES e CNPq) e à PPGBq.

Por fim, gostaria de reforçar que termino meu mestrado com enorme gratidão. Foram dois anos de muito esforço, e posso dizer tudo valeu a pena. Termino esse ciclo acreditando ainda mais na Ciência e na Pesquisa Científica, e que posso fazer muito pela sociedade através delas.

A flor que desabrocha na adversidade é a mais rara e bela de todas. (Mulan)

RESUMO

Faria, Priscila Esteves de. Análise genômica e construção de mapa metabólico de cepa com interesse biotecnológico da bactéria *Paenibacillus polymyxa*, 2018. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018

A bactéria *Paenibacillus polymyxa* foi um dos microrganismos utilizados pioneiramente na produção do 2,3-butanodiol (2,3-BDO), álcool que possui vasta aplicação industrial. Apesar do 2,3-BDO ser um conhecido produto do metabolismo microbiano, sua função biológica e quais condições levam a sua produção ainda não são bem elucidadas. Atualmente, a rota biotecnológica de geração do 2,3-BDO vem sendo amplamente estudada, a fim de substituir rotas derivadas de combustíveis fósseis. Dentro desse contexto, é também importante conhecer as características metabólicas deste microrganismo. Com isto, o presente trabalho visa elaborar um mapa metabólico da cepa PM3605 de *P. polymyxa* baseado em dados computacionais e em seus perfis de crescimento e geração de produtos em diferentes fontes de carbono (glicose, xilose e glicerol); e compreender a diversidade enzimática envolvida na geração do 2,3-BDO em diferentes bactérias. A cepa de *P. polymyxa* apresentou diferentes perfis de crescimento em cada uma das fontes de carbono. As análises de HPLC indicaram, ainda, que a maior geração de produtos fermentativos aconteceu em glicose (85% do rendimento teórico) e a produção do 2,3-BDO foi considerável também em xilose, mas não em glicerol. Quanto ao mapeamento metabólico, foi encontrada mais de uma forma de assimilação das fontes de carbono em *P. polymyxa*. Por outro lado, oito enzimas não foram encontradas, sugerindo a carência da via de reposição de glutationa reduzida, e de vias fermentativas de etanol, acetato, succinato, D-lactato e 1,3-propanodiol, além de uma via de catabolismo de acetoína na cepa PM3605. Por fim, a análise da diversidade enzimática envolvida na produção do 2,3-BDO em diferentes bactérias apontou características estruturais e funcionais determinantes para o reconhecimento diferencial do substrato por duas butanodiol desidrogenases com mesma estereoespecificidade. Como conclusão, os dados destacam PM3605, uma cepa segura, como equiparável a outras cepas utilizadas na produção microbiológica do 2,3-BDO e ressaltam enzimas essenciais para esse bioprocesso.

Palavras-chave: *Paenibacillus polymyxa*, 2,3-butanodiol, bioinformática

ABSTRACT

Faria, Priscila Esteves de. Análise genômica e construção de mapa metabólico de cepa com interesse biotecnológico da bactéria *Paenibacillus polymyxa*, 2018. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018

The bacterium Paenibacillus polymyxa was one of the first microorganisms used for the production of 2,3-butanediol (2,3-BDO), which has a wide range of industrial applications. Nowadays, biotechnological 2,3-BDO has great significance as an alternative for the replacement of fossil fuel derived routes. However, even though 2,3-BDO is a known product of the microorganism's metabolism, its biological function or which metabolic conditions lead to its production are still not well understood. Within this, this work aims to elaborate a metabolic model of the *P. polymyxa* strain PM3605 based on a computacional forecasting and growth and fermentative products with three carbon sources (glucose, xylose and glycerol); and to elucidate the enzyme diversity implicated in 2,3-BDO production in different bacteria. The strains showed different growth profiles in each carbon source. HPLC analysis indicated a major fermentative production in glucose (85% of the maximum theoretical yield), and also in xylose, but not in glycerol. The metabolic mapping showed the presence of two routes for the assimilation of each carbon source in *P. polymyxa*. On the other hand, eight enzymes were not found, suggesting the absence of ethanol, acetate, succinate, D-lactate e 1,3-propanediol fermentations, acetoin catabolism and reduced glutathione reposition in PM3605 strain. The enzyme diversity implicated in 2,3-BDO production in different bacteria analysis presented imperatives structural and functional features for the differential recognition of substrates by two butanediol dehydrogenases with the same stereospecificity. In conclusion, these data showed that PM3605 is a non-pathogenic organism comparable to other strains involved in the microbial production of 2,3-BDO and highlighted essential enzymes for this bioprocess.

Palavras-chave: *Paenibacillus polymyxa*, 2,3-butanediol, bioinformatics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biotecnologia, uma área multidisciplinar. ……..…..… 15

Figura 2: Projeto de industrialização da biotecnologia. …..……..…… 19

Figura 3: Principais aplicações das bactérias do gênero *Paenibacillus*. ……..….... 23

Figura 4: Comparação do número de famílias gênicas compartilhadas ou específicas entre oito cepas de *P. polymyxa*. ……...……...
24

Figura 5: Isômeros de 2,3-BDO, derivados e aplicações. ……..……. 29

Figura 6: Vias metabólicas de produção de 2,3-BDO. ……..……...…….. 31

Figura 7: Estrutura do *operon* de 2,3-BDO em diferentes espécie. ……..…….. 32

Figura 8: Resíduos que participam da diferenciação estereoespecífica entre os isômeros de 2,3-BDO em S e meso-BDHs. ……..….. 34

Figura 9: Ciclo do BDO. ……..……..... 36

Figura 10: Processo fermentativo conduzido com a cepa PM3605. ……...……... 45

Figura 11: Processo de extração e quantificação do DNA genômico. ……..... 48

Figura 12: Fermentação em glicose. ……..…….. 54

Figura 13: Fermentação em xilose. ……..... 55

Figura 14: Fermentação em glicerol. ……..……. 56

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose do DNA total extraído da cepa PM3605 de *P. polymyxa*. ……..... 57

Figura 16: Principais categorias das proteínas anotadas pelo *pipeline* RAST. ……..…..... 59

Figura 17: Vias ausentes em *P. polymyxa*. .....
61

Figura 18: Vias alternativas para as vias consideradas ausentes. .....…….....62

Figura 19: Vias alternativas para a assimilação de glicose, xilose e glicerol. ....……..... 63

Figura 20: Produção dos isômeros de 2,3-BDO e acetoína. .....…….…..... 66

Figura 21: Domínios conservados (DCs) presentes em três butanodiol desidrogenases clássicas representativas. .....……..... 67

Figura 22: Árvore filogenética de S e meso-BDHs de diversas bactérias 69

Figura 23: Cinco dos conjuntos gênicos encontrados em *P. polymyxa*. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características fenotípicas e bioquímicas de *P. polymyxa*. ……..……..... 24

Tabela 2. Informações referentes ao método e condições utilizadas na análise por HPLC. …..... 46

Tabela 3: Proteínas utilizadas como iscas no ProspectBio. ……....…..... 50

Tabela 4: Estatística de montagem reportada pelo pipeline RAST e avaliação da qualidade e integridade do genoma e da predição gênica pelo programa BUSCO. ……..... 58

Tabela 5: Enzimas não encontradas no genoma da cepa PM3605 de *P. polymyxa*. 60

Tabela 6: *Operons*/clusters gênicos mapeados em *P. polymyxa*. ….……....……..…… 64

Tabela 7: Valores de Km para S e meso-BDH clássicas, com diferentes substratos. ……... 71

Tabela 8: Aminoácidos componentes de cada uma das cinco tríades destacadas. …….. 89

LISTA DE ABREVIAÇÕES

1,3-PDO - 1,3-propanodiol

2,3-BDO - 2,3-butanodiol

ATP - adenosina trifosfato

BDH - butanodiol desidrogenase

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BUSCO - *Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*

CDS - sequência codificante

CiB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia

coA - coenzima A

DAD - Arranjo de Diodos

DAR - diacetil redutase

DC - domínio conservado

DEPC - dietil pirocarbonato

DNA - ácido desoxirribonucleico

EC - *Enzyme Commission number*

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EPS - exopolissacarídeo

ER - enoil-(proteína carreadora de acil)-redutase

FAT - *Functional Annotation Tool*

GDH - glicerol desidrogenase

Gb - Giga bases

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

iTOL - *Interactive Tree Of Life*

KDPG - 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Km - constante de Michaelis

LB - Luria-Bertani

MDR - *Medium-chain Dehydrogenase/Reductase*

NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

Pfam - *Protein family database*

PVDF - fluoreto de polivinilideno

pH - potencial hidrogeniônico

pb - pares de base

ProOpDB - *Prokaryotic Operon DataBase*

RAST - *Rapid Annotation using Subsystem Technology*

RID - Índice de Refração

RNA - ácido ribonucleico

rpm - rotações por minuto

SDR - *Short-chain Dehydrogenase/Reductase*

UniProt - *Universal Protein Resource*

SUMÁRIO

1. Introdução…….……. 15

1.1 Processos biotecnológicos. ……...…….…… 15

1.2 *Paenibacillus polymyxa*. …….…... 21

1.3 2,3-butanodiol. ……..... 28

1.3.1 Produção fermentativa do 2,3-BDO. …….…….…. 30

1.3.2 Funções biológicas do 2,3-BDO e otimização do processo fermentativo..

…….…..…… 35

1.3.3 Substratos residuais e produção de 2,3-BDO. …….…..…...… 39

1.3.4 Perspectivas para a produção biotecnológica de 2,3-BDO. ……... 42

2. Objetivos. ……...……...……...…....……. 43

2.1 Objetivo geral. ..……...…….….. 43

2.2 Objetivos específicos. ……...……...…….……..... 43

3. Metodologia. …….…….……. 44

3.1 Fermentações. ……...……..…….. 44

3.2 Análises por HPLC. ……...…….…….. 45

3.3 Genoma. ……...…….. 47

3.3.1 Extração de DNA genômico. ……..... 47

3.3.2 Sequenciamento, montagem e análise do genoma. ….……... 48

3.4 Mapa metabólico e anotação de *operons*/*clusters* gênicos. ……... 49

3.5 BDHs. …….…..... 52

4. Resultados……...…… 54

4.1 Fermentações: curvas de crescimento e análises por HPLC. ……...…….. 54

4.2 Análise do Genoma de PM3605. ……... 57

4.2..1 Extração de DNA genômico. …….…….. 57

4.2.2 Sequenciamento, montagem e análise do genoma. ……..... 57

4.3 Mapa metabólico e anotação de *operons*/*clusters* gênicos. ……... 60

4.4 BDHs. ……..... 65

5. Discussão…… 72

5.1 Fermentações: curvas de crescimento e análises por HPLC. …….…..... 72

5.2 Genoma. …….…... 76

5.3 Mapa metabólico e anotação de *operons*/*clusters* gênicos. ……...…….... 77

5.4 BDHs. …….....

88

6. Conclusão…….……..... 93

1. Introdução

1.1 Processos biotecnológicos

A biotecnologia pode ser definida como um conjunto de técnicas que permitem a aplicação de agentes biológicos (organismos vivos ou parte deles, como, por exemplo, enzimas) com a finalidade de desenvolver produtos ou soluções úteis à vida humana. Isso se aplica a diversas áreas, como saúde, energia, agricultura, meio ambiente, produção industrial, entre outras. Esta é uma área multidisciplinar, abrangendo conceitos de engenharia, biologia e química (Figura 1) (BRUNO et al, 2014; PEREIRA et al, 2008).

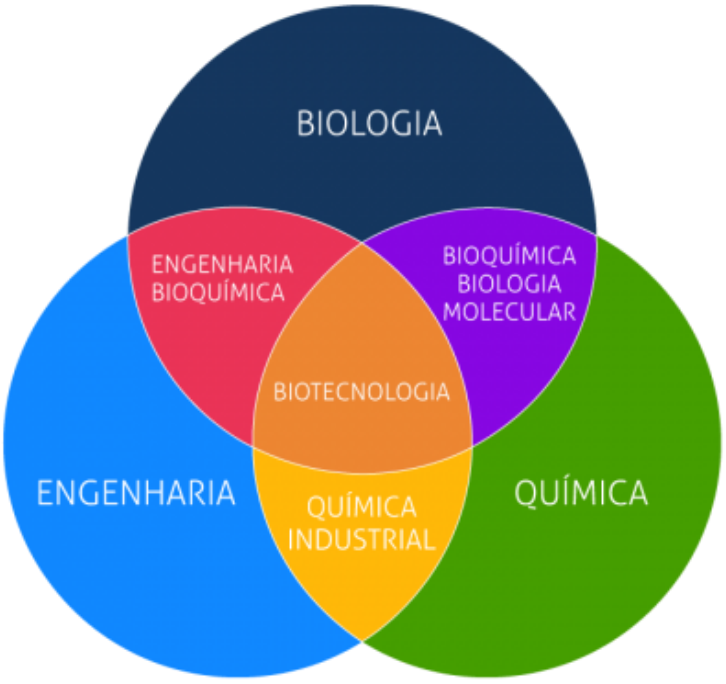


Figura 1: Biotecnologia, uma área multidisciplinar. Esquema retirado do site oficial do Conselho de Informações sobre Biotecnologia (CiB) (https://cib.org.br/faq/o-que-e-biotecnologia/).

Os processos biotecnológicos (ou bioprocessos) estão presentes na vida humana desde a antiguidade. Por exemplo, a fermentação de açúcares simples provenientes de sucos e outros extratos para a produção de cervejas e vinhos se iniciou há aproximadamente 8.000 anos. Durante grande parte desse tempo, os microrganismos atuaram de forma natural, isto é, sem interferência humana. Entre os anos de 1880 e 1950, já após a descoberta da existência de agentes microbiológicos e do seu papel na produção de bebidas e alimentos, surgiram as primeiras plantas de indústrias biotecnológicas. Dentre os principais itens que utilizaram

conhecimento biotecnológico para serem produzidos se destacam o fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), ácido cítrico, butanol e alguns tipos de antibióticos. Até este período, as maiores preocupações quanto aos bioprocessos eram compreender os processos metabólicos envolvidos na produção destes e outros produtos, além de alcançar um ambiente técnico adequado (AL-KAIDY et al, 2015).

No começo do século 20, antes do petróleo ser introduzido como matéria prima para a confecção dos diferentes combustíveis disponíveis no mercado, a indústria química utilizava carvão e outras fontes energéticas renováveis. Até 1930, diversos produtos químicos relevantes, como combustíveis (por exemplo, o etanol) e ácidos orgânicos (por exemplo, os ácidos acético, cítrico e láctico) eram produzidos por rota biotecnológica, através da utilização de biomassa. Com o desenvolvimento da indústria petrolífera, muitos desses bioprocessos foram substituídos por rotas de síntese química, que representavam uma solução mais vantajosa economicamente. Atualmente, os produtos petroquímicos se fazem presentes em todos os aspectos da vida humana, sustentando amplamente a economia mundial e exploração de combustíveis fósseis. Apesar dos benefícios, a exploração de petróleo e consumo de seus derivados oferecem riscos econômicos, ambientais e, até mesmo, de segurança global (BURK, 2010; CELINSKA & GRAJEK, 2009; SABRA et al, 2015).

Como alternativa à exploração de fontes energéticas não-renováveis, a partir dos anos de 1980, os recursos biotecnológicos foram expandidos rapidamente através de novas tecnologias (AL-KAIDY et al, 2015). O desenvolvimento de técnicas de engenharia genética e bioquímica permitiu considerável ampliação e progresso da área biotecnológica, atingindo a chamada biotecnologia moderna. Muitos desses processos permitiram maior agilidade, eficiência e flexibilidade de produção em ramos diversos, especialmente o farmacêutico, de diagnósticos, têxtil, forense, químico, de processamento de alimentos, de engenharia florestal, entre outros (RAJU, 2016).

Atualmente, os avanços na biotecnologia vegetal, biologia molecular e novas ferramentas e conceitos, como biorrefinarias, aumentam a competitividade de produtos bioquímicos gerados por rota biotecnológica frente aos tradicionalmente comercializados. No passado, muitos destes produtos só podiam ser gerados através de processos químicos, entretanto, uma das vantagens do processo enzimático sobre o químico é uma produção específica e seletiva, reduzindo a geração de subprodutos indesejáveis. A produção microbiológica de diols é um exemplo proeminente de sucesso da biotecnologia branca (ou industrial) nos últimos anos.

Esses compostos são álcoois com dois grupos hidroxila, e possuem uma ampla gama de aplicações na indústria química e de combustíveis. Os dióis que possuem maior destaque não só quanto à produção microbiológica, mas também pela possibilidade da utilização de resíduos e fontes renováveis nesse processo, são: 1,3-propanodiol, 1,2-propanodiol, 2,3-butanodiol, 1,4-butanodiol e 1,3-butanodiol (ZENG & SABRA, 2011; SABRA et al, 2015; AL-KAIDY et al, 2015).

A utilização de fontes glicídicas residuais nas biorrefinarias é importante não só para agregar valor a essa matéria, mas também para não competir com a indústria alimentícia. Alguns exemplos de fontes que se encaixam nesses parâmetros são, por exemplo, resíduos de madeira, palha e grama (LEE et al, 2008; AL-KAIDY et al, 2015), além de resíduos alimentares oriundos da indústria alimentícia e restos da alimentação diária, como cascas e bagaço de frutas, vegetais e farináceos (MAINA et al, 2017). Outra fonte de carbono alternativa com alto potencial de ser usada em escala industrial é o glicerol. Esse poliálcool é um resíduo abundante gerado pela indústria de biodiesel, o que aumenta os custos deste processo. O glicerol puro tem um grande valor comercial, porém, o glicerol residual contém impurezas (como outros álcoois, sais e até mesmo metais pesados) e sua purificação é economicamente desfavorável. A produção biológica eficiente, quanto ao processo e despesas, precisa operar no máximo rendimento e produtividade e deve se alinhar a demandas ambientais e econômicas (LANGE et al, 2016). Isso impulsiona a busca por métodos que permitam a utilização do glicerol bruto, o que pode ser feito através da ação de microrganismos em processos fermentativos. Por exemplo, o ácido cítrico, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol e lipídeos são produzidos a partir de glicerol através de bioprocessos (RASTOGI et al, 2013; YANG et al, 2012). Assim, há benefícios não só para a indústria de biocombustíveis, como também para a sociedade como um todo, que ficaria menos dependente de fontes não renováveis.

A bioindústria é considerada uma plataforma viável e diversos investidores já se mostraram otimistas quanto ao seu crescimento (BIO & Reuters). A revista *online Genetic Engineering & Biotechnology News,* voltada para a divulgação de pesquisas e estatísticas relacionadas a Engenharia genética e Biotecnologia, lançou uma lista das quinze melhores companhias de bioprocessamento do ano de 2017. A maioria delas tem como segmento de mercado a fabricação de produtos biológicos de forma geral, como, por exemplo, enzimas e meios de cultura. Entretanto, como a rota biotecnológica não é abordada na geração dos

produtos químicos comercializados, fica implícita a utilização de rotas químicas e sintéticas nesses processos de produção. Isso poderia ser justificado pelo fato das rotas biológicas ainda estarem passando por otimizações, o que as restringe aos segmentos de pesquisa, e não o do comércio. Apesar de não estarem no *ranking* lançado pela revista, duas empresas que exemplificam esses esforços são a Genomatica e a LanzaTech. Ambas já comercializam produtos provenientes de bioprocessos como, por exemplo, 1,4-butanodiol e isopropanol, respectivamente, mas ainda não conseguiram otimizar a produção biotecnológica de outros compostos que visam comercializar (BURK, 2010; LanzaTech, 2018).

Em 2017, a Genomatica, junto a uma das maiores empresas de consultoria na área petroquímica, de energia e fertilizantes do mundo, ICIS, realizou uma pesquisa acerca do interesse de produtores e consumidores em relação a produtos sustentáveis, aqueles gerados através da utilização de fontes renováveis e/ou produção biológica (BAKER, 2017). Abaixo estão listadas algumas observações interessantes provenientes dessa pesquisa mercadológica:

- 71% dos participantes acreditam que os produtos químicos sustentáveis serão de uso comum em cinco anos;
- 32% dos produtores pretendem investir em pesquisa e desenvolvimento como principal estratégia para a utilização de fontes renováveis (como açúcares, amidos e biomassa);
- 37% dos produtores esperam oferecer versões sustentáveis de seus produtos químicos no curto prazo, enquanto 42% já implementaram essa mudança;
- Alguns fatores envolvidos na produção sustentável foram classificados como muito ou moderadamente importantes pelos produtores. Os três principais fatores considerados como muito importantes foram: custo de produção (85%), disponibilidade de matérias-primas renováveis (77%) e demanda dos consumidores (77%);
- 82% dos consumidores considera como principal fator para o uso de um produto químico sustentável o mínimo de impacto na performance e características do mesmo;
- 59% dos produtores vê como principal problema da produção sustentável o fornecimento consistente de matérias-primas renováveis;
- 54% dos produtores acreditam que há vantagem econômica de longo prazo em trocar o processo tradicional de produção por outro baseado no uso de matérias-primas renováveis. Além disso, 52% dos produtores julgam que suas companhias deveriam reduzir a exposição ao mercado baseado em produtos petroquímicos;

- 65% dos produtores afirmam que seus clientes expressam interesse na geração sustentável de produtos químicos. Esse interesse aumentou 63% em comparação com 2014.

Apesar da perspectiva positiva, ainda é necessário melhorar a relação custo-benefício, o que pode se dar pelo aumento da eficiência dos processos (Figura 2). Isso se torna ainda mais desafiador pelo fato de metodologias tradicionais da indústria química, por exemplo, não serem aplicáveis a processos biológicos de forma satisfatória. Dentre os fatores relacionados a isso, estão a complexidade dos sistemas biológicos, além do conhecimento limitado em certos processos desses sistemas, resultando na carência de modelos de bioprocessos eficientes. A ausência dessas abordagens leva à experimentação extensiva e, muitas vezes, prescindível. O uso de técnicas baseadas em modelos computacionais contribui para a redução desses esforços, pois direciona quais genes, enzimas ou compostos tem potencial biotecnológico. Além disso, as informações viabilizadas por estes modelos têm um impacto direto na compreensão de sistemas biológicos, logo, também na otimização e controle de bioprocessos (KOMPALA et al, 1986; NIELSEN et al, 1991; KOUTINAS et al, 2012).

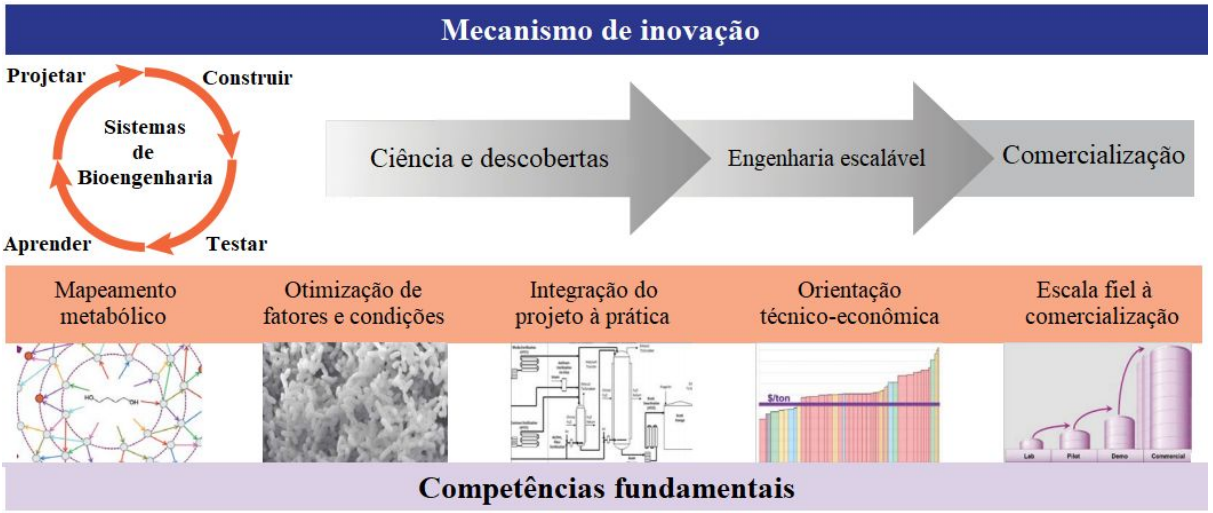


Figura 2: Projeto de industrialização da biotecnologia. A figura mostra etapas do processo de inclusão da biotecnologia no escopo industrial, atingindo uma plataforma integrada à bioengenharia computacional e experimental, a fim de projetar, criar e otimizar bioprocessos de alta produção. Adaptado de: CULLER, 2016.

O uso de um mapa metabólico[1] para o desenvolvimento de equações de equilíbrio é uma abordagem clássica e ainda muito utilizada (PAPOUTSAKIS, 1984). A contribuição experimental de modelos matemáticos vem desde os anos 1990, com, por exemplo, para o desenvolvimento de meios de cultura (XIE & WANG, 1994). Esses conceitos foram otimizados ao longo do tempo e hoje são capazes de reconstruir redes bioquímicas contendo diversas vias metabólicas e as enzimas envolvidas nas mesmas (ORTH et al, 2010). Além disso, modelos matemáticos e computacionais têm auxiliado consideravelmente no entendimento e melhoramento de processos desempenhado por microrganismos.

Há modelos matemáticos fidedignos disponíveis para diversos bioprocessos, o que os torna viáveis para a aplicação na indústria. Consequentemente, a construção de modelos complexos que registram a dinâmica de interação entre vários genes/proteínas/metabólitos poderia ser usada para simular condições dispendiosas, em tempo e custo, quando testadas experimentalmente. Entretanto, devido à carência de muitas informações sobre mecanismos relacionados a alguns processos biológicos, os modelos desenvolvidos são limitados quanto à extensão de sua validade e a real capacidade preditiva (STEPHANOPOULOS, 2002; TYSON & NOVAK, 2010; KOUTINAS et al, 2012). Diante dessas circunstâncias, os principais desafios para o emprego de rotas biotecnológicas em escala industrial são a produção sustentável a partir de fontes renováveis e alternativas, a compreensão do metabolismo do microrganismo de interesse, e a própria transferência dos experimentos piloto realizados em laboratório à produção em larga escala (CLOMBURG & GONZALEZ, 2010).

Além dos modelos computacionais, algumas estratégias práticas vêm sendo abordadas no sentido de minimizar as dificuldades supracitadas, como é o caso dos bioprocessos de dois estágios. Fermentações aplicáveis à indústria utilizando microrganismos anaeróbios facultativos combinam vantagens de condições aeróbicas e anaeróbicas em um mesmo bioprocesso (JENKINS et al, 1988; SAKAI et al, 2007). Esses organismos possibilitam um melhor controle quanto a variações na disponibilidade de oxigênio, conseguindo se manter viáveis diante de uma condição de anaerobiose, através da permuta entre respiração aeróbica e anaeróbica, ou da fermentação (UNDEN et al, 1994). Os bioprocessos de dois estágios salientam essa característica, pois consistem de um estágio aeróbico, para formação de

[1] Definição de mapa metabólico: demonstração de inter-relações e correlações de reações bioquímicas em sequências/rotas metabólicas. Fonte: Prytherch, Ray. Harrod's Librarians' Glossary and Reference Book: A Directory of Over 10,200 Terms, Organizations, Projects and Acronyms in the Areas of Information Management, Library Science, Publishing and Archive Management. 10ª edição. Editora: Routledge. 2016.

biomassa, e um anaeróbico, para a geração do produto de interesse (SANCHEZ et al, 2005). Esse tipo de processo pode atingir alto rendimento e produtividade favorável, especialmente se a fase anaeróbica não apresentar crescimento microbiano. Outra vantagem dos bioprocessos de dois estágios é que podem ser testados em escala laboratorial, possibilitando o ajuste das condições a fim de otimizar a produção de um determinado composto. Do ponto de vista econômico e financeiro, estes procedimentos ainda não são inteiramente viáveis em escala industrial, pois a coleta e re-inoculação da biomassa ainda são processos dispendiosos (LANGE et al, 2016).

Mesmo com alguns entraves, o uso de microrganismos têm um grande potencial de aplicação industrial, pois a seleção de novas cepas ou engenheiramento das já existentes podem positivar a relação custo-benefício da cadeia de produção baseada em bioprocessos. O melhoramento de microrganismos permanece como um dos maiores desafios da introdução da biotecnologia à produção industrial e requer a combinação de estratégias de engenharia e biologia molecular para a análise e engenheiramento de cepas e realização de ajustes nos conjuntos de bioprocessos (LEE et al, 2008; JIMENEZ-GONZALEZ & WOODLEY, 2010). Diante desse cenário, o estudo da biologia de microrganismos aplicáveis aos variados bioprocessos é imprescindível para que a consolidação desse modo de produção se estabeleça. No grupo dos procariotos, o gênero *Paenibacillus* se destaca por sua utilização biotecnológica na produção de compostos de valor agregado, como antimicrobianos, enzimas e produtos químicos. A aplicação dessas bactérias vai, ainda, além disso, despertando interesse também como substituinte de fertilizantes químicos na agricultura e como agentes na biorremediação, um processo que reduz a concentração de poluentes a um estado inócuo através de mecanismos biológicos (AZUBUIKE et al, 2016). As espécies que fazem parte desse gênero vêm sendo amplamente estudadas, em especial *Paenibacillus polymyxa*, que possui aplicações biotecnológicas bem estabelecidas (GRADY et al, 2016; LAL & TABACCHIONI, 2009). O tópico a seguir aborda com mais detalhes essa espécie.

1.2 *Paenibacillus polymyxa*

O gênero *Paenibacillus* inclui bactérias gram-positivas, anaeróbias facultativas e capazes de formar esporos (PRIEST, 2015). Suas espécies podem ser isoladas de ambientes variados, como, por exemplo, a rizosfera de diversas plantas em localizações geográficas distintas, como China (LUO et al, 2018), Brasil (MOTA et al, 2002), França (BERGE et al, 2002) e

Estados Unidos da América (DAANE et al, 2001). A nomenclatura deste gênero foi alterada de *Bacillus* para *Paenibacillus* em 1994 (PRIEST, 2015). À época, *Bacillus* era baseado nas características morfológicas em comum com a espécie *Bacillus subtilis*, isolada em 1872. Desta forma, quaisquer bactérias com formato de bastonete, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas e formadoras de esporos eram consideradas pertencentes ao gênero *Bacillus*, apesar das características utilizadas serem muito gerais para tal agrupamento (PRIEST, 2015; ZEIGLER, 2013). A espécie *Bacillus polymyxa* (atualmente *Paenibacillus polymyxa*) foi descrita na década de 1880 por Prazmowski, mas só foi reconhecida como uma nova espécie por Macé em 1889, uma das mais antigas espécies incluídas neste gênero (GORDON et al, 1973; PRIEST, 2015).

No final dos anos de 1980, trabalhos indicavam heterogeneidade entre espécies do gênero *Bacillus* que suportavam a divisão deste em outros gêneros (PRIEST et al, 1988; NAKAMURA, 1987). A espécie *P. polymyxa* teve um papel essencial para esse reconhecimento, já que foi utilizada nos estudos que constataram a heterogeneidade frente às demais espécies do gênero. As disparidades no conteúdo CG e em testes bioquímicos foram notadas primeiramente em 1987 (NAKAMURA, 1987). Em 1991, o sequenciamento do gene 16S (que codifica a subunidade menor do ribossomo) de 51 espécies de *Bacillus* mostrou que esse gênero se dividia em cinco grupos: 1-5 (ASH et al, 1991).

Apesar desta classificação, o grupo 3, que continha *B. polymyxa* foi novamente analisado em 1993 usando marcadores do gene 16S e, baseado nesse estudo, o gênero *Paenibacillus* foi descrito. A origem do prefixo "*paene*" significa "quase" em Latim; ou seja, as características compartilhadas entre as bactérias do grupo 3 com as dos outros 4 grupos não eram suficientes para mantê-las no gênero *Bacillus*. Este fato deu suporte à consolidação do novo gênero, *Paenibacillus* (ASH et al, 1993; MONTEFUSCO et al, 1993), o qual foi validado em 1994, assim como a espécie *Paenibacillus polymyxa* (List No. 51, 1994; PRIEST, 2015; TRUPER, 2005). Atualmente, *Paenibacillus* é um dos oito gêneros da família Paenibacillaceae (ZEIGLER, 2013). Estima-se que este gênero abrigue cerca de 200 espécies e é esperado que esse número ainda cresça, não só devido a identificação de novas espécies, mas também por reclassificações de bactérias já conhecidas (GRADY et al, 2016).

As espécies de *Paenibacillus* podem ser aplicadas em diversos bioprocessos, fazendo parte de patentes de produção enzimática, antibióticos, entre outras (Figura 3). Uma das características mais notáveis observadas nesses organismos é a capacidade de promover o

crescimento de plantas (GRADY et al, 2016). Dentre as espécies de *Paenibacillus*, uma das mais importantes é *P. polymyxa*, que foi tema de mais de 2.500 artigos de pesquisa já publicados (XIE et al, 2016).

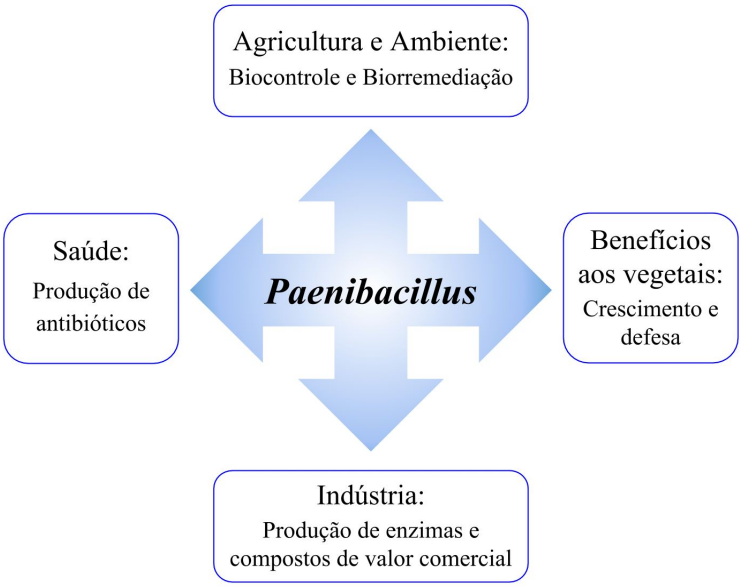


Figura 3: Principais aplicações das bactérias do gênero *Paenibacillus*.

Essa bactéria se destaca por ter importância em diversas das atribuições positivas de seu gênero. *P. polymyxa* é capaz de contribuir para o crescimento vegetal, participar de estratégias de biocontrole e biorremediação e produzir moléculas de interesse humano, além de não ser patogênica (GRADY et al, 2016). Quando mantidas em ágar nutriente são, esta bactéria forma colônias delgadas, pequenas, esbranquiçadas e, geralmente, com bordas irregulares (PRIEST, 2015). Características fenotípicas e bioquímicas de *P. polymyxa* são mostradas na Tabela 1. Embora a maior parte dos genes sejam compartilhados entre os isolados, cada cepa tem seu um conjunto de genes específicos que podem levar a fenótipos diferentes. Isto fica claro no estudo de genômica comparativa realizado por Lou e colaboradores (2018) que utilizou 8 cepas de *P. polymyxa* de diferentes localidades (Figura 4). Desde sua descoberta e até os dias de hoje, essa bactéria gram-positiva é amplamente estudada em diversas áreas.

Tabela 1: Características fenotípicas e bioquímicas de *P. polymyxa*

Crescimento a 50°C					--
Utilização de:		**Testes bioquímicos**		**Hidrólise de:**	
L-arabinose	+	Catalase	+	Caseína	+
D-glicose	+	Oxidase	-	Ureia	-
Glicerol	+	Redução de Nitrogênio	+	Amido	+
D-manitol	+	Voges-Proskauer	+		
D-xilose	+				

Fonte: PRIEST, 2015

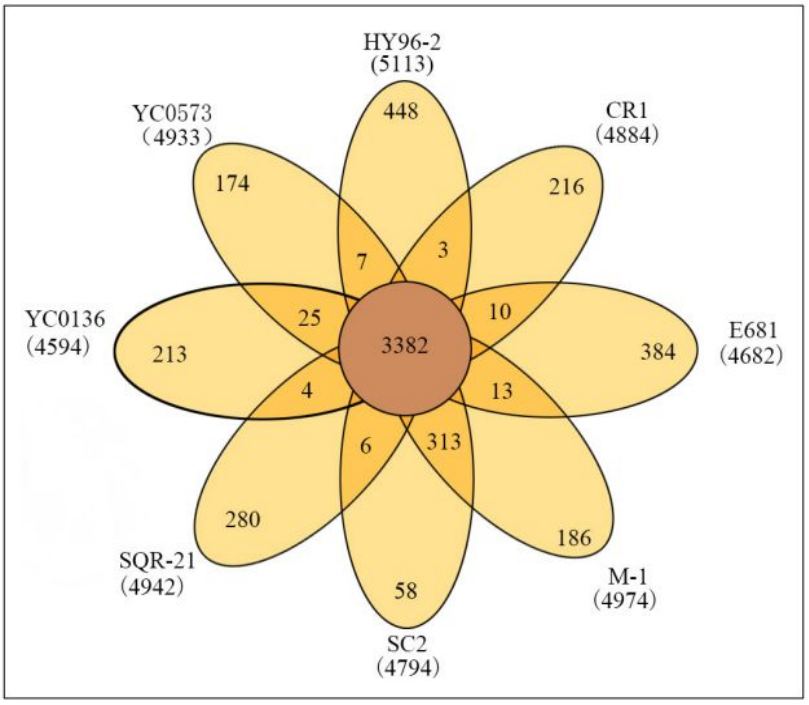


Figura 4: Comparação do número de famílias gênicas compartilhadas ou específicas entre oito cepas de *P. polymyxa*. As cepas HY96-2, YC0573, YC0136, SQR-21, SC2 (referência), M1, E681 e CR1 compartilham 3.382 famílias gênicas (círculo central). A cepa com maior número de famílias gênicas específicas é a HY96-2, com 448. O número total de famílias gênicas de cada cepa está entre parêntesis abaixo de seu nome. Retirado de LUO et al, 2018

A utilização de rizobactérias, como *P. polymyxa*, vem sendo explorada como uma alternativa aos fertilizantes químicos que podem ter efeitos negativos ao meio ambiente. Essa bactéria pode colonizar as raízes de diferentes espécies de plantas como, por exemplo, milho, trigo e pepino, como foi mostrado para a cepa WLY78. Isso reflete a participação dessa espécie na fixação biológica de nitrogênio, o que traz como um segundo benefício a prevenção do uso de fertilizantes químicos de nitrogênio. Associado a isso, há promoção do crescimento vegetal, também relacionada à atuação dessa espécie (HAO & CHEN, 2017). A cepa CR1 também é capaz de auxiliar o crescimento de plantas como milho, pepino, tomate, batata e de *Arabidopsis thaliana*, no entanto, além da fixação de nitrogênio, esta cepa promove a solubilização de fósforo e produz ácido indolacético, um hormônio que atua como regulador do crescimento vegetal (WESELOWSKI et al, 2016).

A capacidade de algumas cepas em atuar no biocontrole de certos fitopatógenos permite sua utilização também como alternativa aos pesticidas químicos. Por exemplo, a cepa CR1 foi capaz de combater seis patógenos, entre eles fungos e bactérias, o que sugere a produção de substâncias antimicrobianas (WESELOWSKI et al, 2016). Já a cepa NSY50 foi eficiente contra quatro fitopatógenos, dentre eles o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumberinum* (FOC), um problema global em cultivos de pepino. Essa bactéria conteve malefícios causados por esse fungo, como necrose e redução do crescimento do vegetal. Um dos prováveis mecanismos para isso é a produção de compostos antibióticos por NSY50 (DU et al, 2017) assim como mostrado para outras cepas dessa espécie (HUANG & YOUSEF, 2015).

Os antimicrobianos produzidos por *P. polymyxa* têm uma clara importância para o meio ambiente e biocontrole, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias que beneficiem a agricultura. Entretanto, alguns destes antibióticos também despertam interesse quando se trata da saúde humana. Um bom exemplo é a classe dos lantibióticos, um tipo de peptídeo antimicrobiano, dos quais se destaca, recentemente, a produção de paenibacilina pela espécie *P. polymyxa*. Em 2015, foi identificado na cepa OSY-DF a capacidade de realizar modificações pós-traducionais na paenibacilina. Uma das modificações é a adição de um grupo acetil ao terminal N do peptídeo, um fato interessante, já que a acetilação de proteínas é incomum em procariotos (HUANG & YOUSEF, 2015).

A análise do genoma da cepa OSY-DF mostrou a presença de genes de produção de polymyxina E, coproduzida com a paenibacilina, e de um novo lantibiótico. Também foram encontrados genes relacionados à produção de fusaricidina, um composto antifúngico. Esses

resultados apontam a produção de pelo menos três diferentes tipos de antibiótico por uma única cepa, fato de extrema importância mediante a demanda pelo desenvolvimento de novos antibióticos efetivos contra patógenos de humanos multirresistente às drogas disponíveis atualmente (HUANG & YOUSEF, 2012).

A espécie *P. polymyxa* desperta interesse também quanto à produção de enzimas com valor comercial. Por exemplo, um grupo de metaloproteases neutras, que hidrolisam ligações entre resíduos apolares, é comumente utilizado em rotinas de culturas celulares para soltar as células, permitindo sua transferência (ou passagem) para um novo frasco/substrato. Essas proteases podem também ser utilizadas para estabelecer culturas primárias a partir da dissociação de tecidos (RUF et al, 2013; Sigma-Aldrich, 2010). Além de artigos voltados para a caracterização da estrutura e atividade dessas enzimas, elas são alvo também de patentes de grandes empresas, como a companhia suíça Roche (GREINER-STOEFFELE & SCHOENERT, 2012). Atualmente, algumas proteases de *P. polymyxa* são comercializadas, por exemplo, pela empresa americana Sigma-Aldrich, sob o nome comercial de Dispase®.

Partindo para aplicações mais voltadas para a necessidade de indústrias, Hori e colaboradores (2014) investigaram a atuação de uma mananase da cepa KT551. Foi observado que, diferentemente das enzimas já disponíveis, a de *P. polymyxa* possui uma atividade mais específica, possibilitando a geração de um único tipo de oligossacarídeo ao final da reação. Esse é um aspecto muito vantajoso, pois representa uma possível ferramenta para o tratamento eficiente de resíduos da indústria alimentícia ricos em mananas, como os de soja, por exemplo (HORI et al, 2014).

Em um contexto semelhante, Zhang e colaboradores (2017) avaliaram a atuação da enzima protopectinase da cepa Z6 na extração de pectina do bagaço da maçã. A pectina é um complexo polissacarídeo derivado da protopectina e é utilizado em diversos produtos da indústria alimentícia, como ketchups, molhos, maionese, iogurtes, sorvetes, entre outros. O bagaço da maçã é um resíduo sólido gerado em grandes quantidades após a extração de seu suco. A extração da pectina presente nesse bagaço agrega valor a ele e evita o desperdício de um material rico nessa molécula. Foi observado que a protopectinase de *P. polymyxa* Z6 atua sobre toda a estrutura da protopectina, o que a torna capaz de liberar a pectina contida no resíduo de maçã e, assim, indica sua potencial utilização na indústria alimentícia para essa finalidade. A utilização de um método enzimático é considerada uma estratégia verde, que

substituiria de forma satisfatória as técnicas atuais de extração em larga escala por meio de hidrólise ácida em altas temperaturas (LI et al, 2014a; ZHANG et al, 2017).

Outros trabalhos descrevem enzimas aplicáveis às indústrias de produtos químicos e combustíveis, onde a utilização de biomassa vegetal, por exemplo, auxiliaria a substituir o uso de combustíveis fósseis. O principal objetivo destes estudos é a otimização da hidrólise da celulose, na qual participam primeiramente enzimas endoglucanases. A bactéria *P. polymyxa* BEb-40 se destaca por sua capacidade de produzir essas enzimas e, por esse motivo, foi selecionada em um estudo que visava avaliar sua potencial aplicação em escala industrial. Foram encontradas nessa cepa catorze isoenzimas com atividade endoglucanase, que possuem pesos moleculares distintos. Cada isoforma atua em uma específica faixa de pH e temperatura, que é diferente entre as catorze enzimas encontradas, o que permitiria o uso das mesmas em diversos processos e em condições variáveis. Esse resultado torna *P. polymyxa* BEb-40 conveniente para a produção de endoglucanases com potencial de serem aplicadas ao processamento biotecnológico de materiais lignocelulósicos (GASTELUM-ARELLANEZ et al, 2014).

Já um outro tipo de glucanase, as xiloglucanases são capazes de degradar o xiloglucano, um polissacarídeo derivado da celulose presente em paredes celulares de plantas terrestres. Essas enzimas foram estudadas em uma cepa não especificada de *P. polymyxa* e foi constatada sua capacidade em utilizar xiloglucanos de fontes variadas, como, por exemplo, tamarindo, cevada e alfarroba. Essa especificidade incomum, como o autor se refere, poderia contribuir como uma ferramenta complementar a metodologias de larga escala e novas aplicações dos xiloglucanos (ARIZA et al, 2011).

Tomando como base as enzimas citadas acima, *P. polymyxa* se destaca como uma espécie importante para o processamento de polissacarídeos presentes em estruturas vegetais e que costumam ser de difícil hidrólise. A produção dessas enzimas é uma característica vantajosa de *P. polymyxa* não apenas por sua evidente utilidade na indústria. Esse é também um aspecto associado à capacidade desta bactéria em utilizar variadas fontes de carbono, especialmente quando se trata de resíduos lignocelulósicos. Já foram empregados à *P. polymyxa* meios de cultura contendo, por exemplo, xilose (MARWOTO et al, 2002; YANG et al, 2017), extrato de inulina (GAO et al, 2010) e hidrolisado celulósico (ADLAKHA & YAZDANI, 2015; JIANG et al, 2015; MA et al, 2018). Além de sua capacidade em utilizar diversas fontes

glicídicas, já foi também relatada a capacidade desta bactéria em utilizar o glicerol como fonte de carbono (PRIEST, 2015).

Um aspecto vantajoso em relação à utilização de diversas fontes de carbono é o emprego de *P. polymyxa* em processos fermentativos para a produção de compostos de valor comercial (BIALKOWSKA, 2016; MA et al, 2018). Diversos trabalhos têm mostrado esse aspecto visando a produção biotecnológica do 2,3-butanodiol (2,3-BDO), um álcool que possui grande importância industrial (ADLAKHA & YAZDANI, 2015; XIE et al, 2015). A espécie *P. polymyxa* foi uma das primeiras a despertarem interesse quanto a esta finalidade, ainda na década de 1920 (CELINSKA & GRAJEK, 2009). O fato de não ser patogênica é uma característica que reforça a relevância dessa espécie para a obtenção de um processo fermentativo de larga escala (HABLER et al, 2012). Além disso, enzimas de *P. polymyxa* envolvidas na produção de 2,3-BDO são alvos de ensaios que visam otimizar o processo produtivo desse álcool (YU et al, 2011a; GAO et al, 2012).

1.3 2,3-butanediol

O 2,3-BDO é um álcool de quatro carbonos ($C_4H_{10}O_2$) que possui três estereoisômeros, 2R,3R-BDO (ou levorrotatório), meso-BDO (opticamente inativo) e 2S,3S-BDO (ou dextrorrotatório). Historicamente, e até os dias de hoje, a produção do 2,3-BDO se dá através de rota química (derivada de combustível fóssil). No início do século 20, ano de 1906, a produção microbiológica desse diol foi descrita pela primeira vez, em *Klebsiella pneumoniae* (HARDEN & WALPOLE, 1906). Em 1926, *P. polymyxa* foi utilizada para o mesmo propósito (GARG & JAIN, 1995; CELINSKA & GRAJEK, 2009) e em 1933 foi inicialmente proposto que essa rota biológica pudesse ser utilizada para a produção industrial do 2,3-BDO (FULMER et al, 1933).

Durante a Segunda Guerra Mundial, a escassez do composto 1,3-butadieno, um derivado do 2,3-BDO, reforçou a necessidade de uma rota de produção alternativa. Esses esforços foram reduzidos anos depois, quando a disponibilidade do petróleo tornou mais barata a síntese química. Entretanto, com a escalada do preço desse combustível fóssil e preocupação com a conservação do meio ambiente, surgiram estudos mostrando que a produção de 2,3-BDO por microorganismos é viável (CELINSKA & GRAKEJ, 2009; JI et al, 2011). Nos últimos anos, não só os organismos pioneiros, como outras espécies de bactérias e

cianobactérias, além de fungos e microalgas vêm sendo aplicados à produção biotecnológica do 2,3-BDO (BIALKOWSKA, 2016; YANG & ZHANG, 2018).

O 2,3-BDO é um composto de notável interesse industrial, já que não só ele, como seus derivados, possuem diversas aplicações (Figura 5). Os isômeros deste diol têm utilidades diferentes. O 2R,3R-BDO pode ser usado como agente anticongelante (SYU, 2001) enquanto meso-BDO é precursor de outro composto de valor comercial, o 2-butanol, e 2S,3S-BDO é visado na produção de solventes para tintas (BUSETTO et al, 2002). Uma das aplicações gerais do 2,3-BDO é, por exemplo, como aditivo de combustíveis. Quanto aos seus derivados, além do 1,3-butadieno, utilizado na produção de borracha sintética, o composto metil etil cetona pode ser usado como aditivo de combustíveis e solvente de resinas. Além disso, derivados da esterificação do 2,3-BDO são empregados nas áreas de saúde, farmacêutica e cosmética (BIALKOWSKA, 2016).

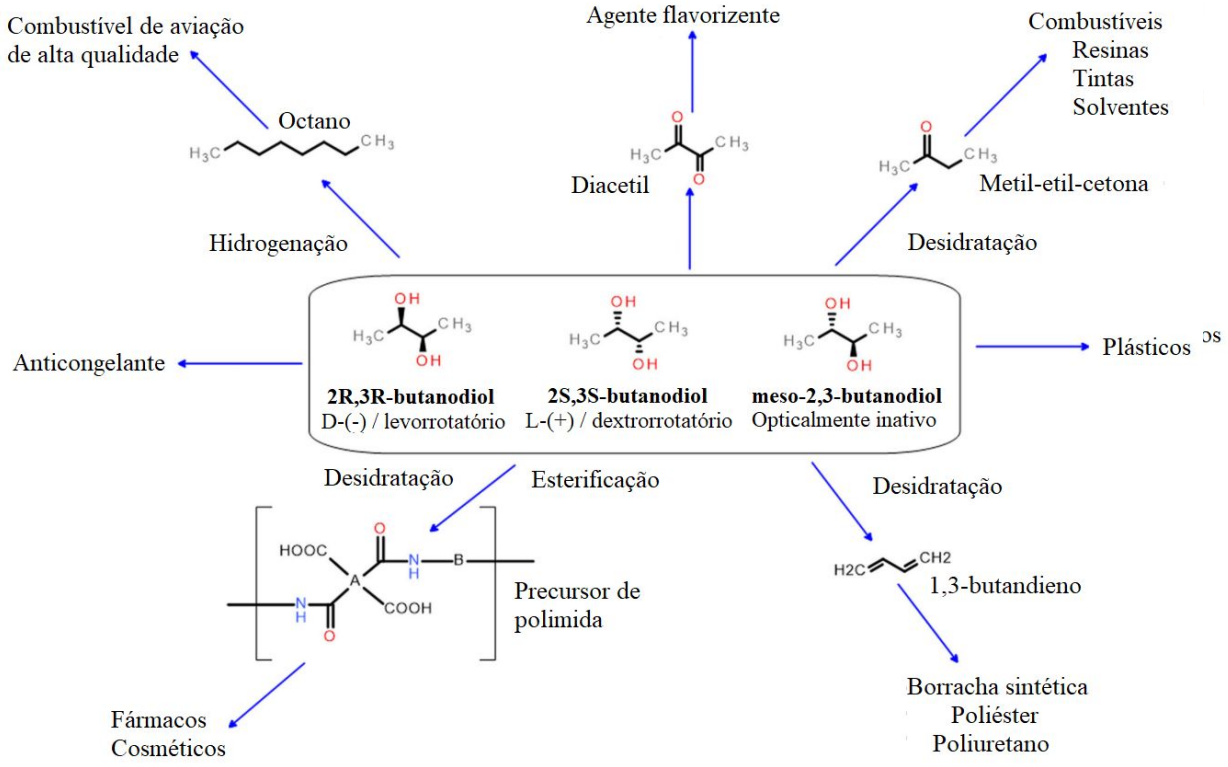


Figura 5: Isômeros de 2,3-BDO, derivados e aplicações. Adaptado de BIALKOWSKA, 2016

Perante sua relevância para a indústria, foi estimado que o mercado global de 2,3-BDO atingiu 61,8 mil toneladas em 2012 e espera-se que atinja 74 mil toneladas em 2018 (Transparency market research, 2012). Em 2011, os principais derivados do 2,3-BDO tiveram

no mercado global um valor de vendas de aproximadamente 43 bilhões de dólares (KOPKE et al, 2011). Ainda assim, o 2,3-BDO produzido por rota química não tem um mercado tão atrativo. Isso está diretamente relacionado ao alto custo de produção, que acaba elevando o seu preço no mercado (15.788 dólares/tonelada) (Transparency market research, 2012). Os processos fermentativos, por outro lado, necessitam de condições mais brandas de pressão e temperatura, além da possibilidade de aproveitar resíduos como fonte de carbono, agregando valor aos mesmos. Isso não só reduz o custo desse método em relação à síntese química, como também permite uma forma sustentável de produção e mais atrativa ao mercado. O 2,3-BDO, junto ao 1,3-propanodiol (1,3-PDO), é o diol mais estudado nos últimos anos quanto a sua produção microbiológica (SABRA et al, 2015).

A produção biotecnológica do 2,3-BDO pode envolver diversos substratos. O etanol, por exemplo, foi utilizado como substrato em um processo de catálise multienzimática não celular (*cell free multi-enzyme catalysis*). Aplicando as enzimas etanol desidrogenase, formolase, butanediol desidrogenase, diol desidratase e NADH oxidase, além de condições otimizadas para a reação, foi atingido mais de 88% de seu rendimento teórico (ZHANG et al, 2018). Além disso, até mesmo gases residuais da indústria de aço podem ser empregados na produção do 2,3-BDO. Em três espécies autotróficas do gênero *Clostridium* foi identificada uma via que permite a assimilação do CO_2 para esta finalidade (KOPKE et al, 2011).

Ainda assim, as fermentações são os métodos mais estudados quando se trata da produção de 2,3-BDO. Variadas fontes de carbono, inclusive residuais, podem ser empregadas nesse processo. Além disso, como, dito anteriormente, diversos organismos são capazes de produzir o 2,3-BDO de maneira satisfatória. Apesar da capacidade de certas de leveduras e microalgas nesse processo, o alvo dos trabalhos é na utilização de bactérias (YANG & ZHANG, 2018).

1.3.1 Produção fermentativa do 2,3-BDO

Entre as principais bactérias produtoras estão espécies dos gêneros *Bacillus* (*B. subtilis* e *B. licheniformis*), *Klebsiella* (*K. pneumoniae* e *K. oxytoca*) e *Enterobacter* (*E. aerogenes* e *E. cloacae*), além das espécies *Serratia marcescens* e *P. polymyxa*. As espécies de *Klebsiella* , especialmente *K. pneumoniae*, são consideradas capazes de atingir as maiores concentrações de 2,3-BDO já reportadas. Entretanto, estas, bem como outras das principais bactérias produtoras de 2,3-BDO, são patogênicas. Isso representa uma desvantagem, principalmente

quando se trata de um processo em escala industrial, reforçando a busca por bactéria não-patogênicas. Ainda assim, alguns trabalhos sugerem o desenvolvimento de linhagens mutantes para fatores de patogenicidade, sem afetar a eficiência de produção (LEE et al, 2015; SHRIVASTAV et al, 2013; YANG & ZHANG, 2018).

A produção fermentativa de 2,3BDO (Figura 6) pode acontecer por duas vias possíveis a partir do piruvato, já que há duas rotas de formação de acetoína. São comuns a ambas as vias as enzimas acetolactato sintase (que gera acetolactato a partir do piruvato) e butanodiol desidrogenase (BDH), que gera o 2,3-BDO a partir da acetoína (de forma reversível). A via majoritária utilizada pelos microrganismos envolve a enzima acetolactato descarboxilase, que produz acetoína diretamente a partir do acetolactato. A via secundária envolve a descarboxilação oxidativa espontânea do acetolactato, formando diacetil, que é convertido a acetoína pela enzima diacetil redutase. Além disso, a BDH pode realizar essa conversão de diacetil a acetoína de maneira irreversível (BLOMQVIST et al, 1993; UI et al, 1986).

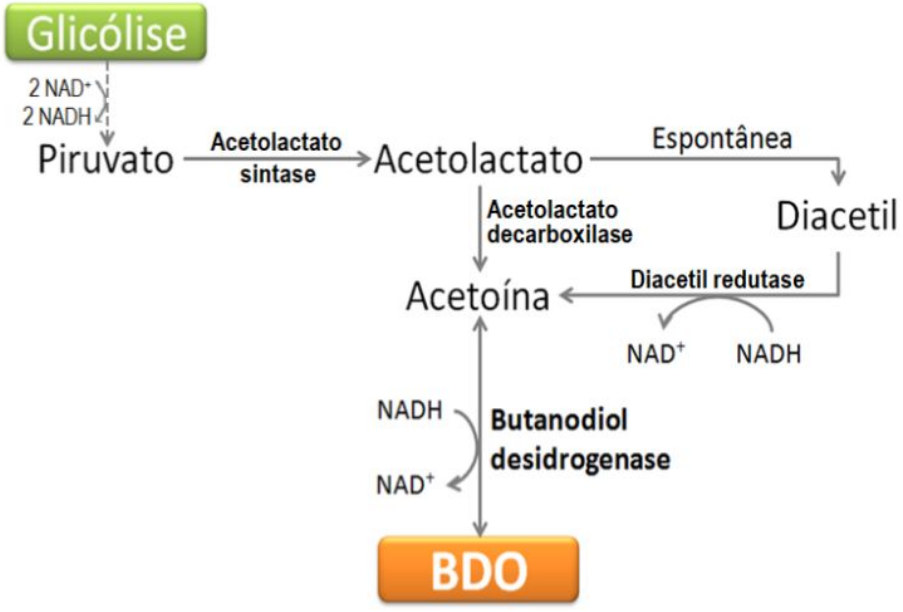


Figura 6: Vias metabólicas de produção de 2,3-BDO. Os microrganismos possuem duas rotas de produção do diol, que compartilham certas enzimas e envolvem diferentes capacidades de regeneração de NAD^+. A fermentação do 2,3-BDO é do tipo ácida mista.

Os genes das enzimas acetolactato sintase (*alsS*), acetolactato descarboxilase (*alsD*) e BDH (*bud* ou *bdh*) podem estar organizadas em *operons*, que apresentam estruturas diferentes entre bactérias (Figura 7). *Klebsiella* e *Enterobacter*, por exemplo, possuem um *operon* contendo as três enzimas (BLOMQVIST et al, 1993; ZHANG et al, 2015). As bactérias que

pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Serratia*, por outro lado, têm apenas os genes *alsS* e *alsD* contidos em um *operon.* Já o gene correspondente à BDH se localiza em uma unidade gênica monocistrônica afastada do *operon* (RENNA et al, 1993; MOONS et al, 2011).

Um dos fatores relacionados à produção biológica que merece destaque é a capacidade dos microrganismos em gerar diferentes isômeros de 2,3-BDO e acetoína. A aplicação industrial destas moléculas é dependente de isomeria, o que justifica um grande esforço desde o século passado para compreender melhor o tema. Em 1944 foi observado que bactérias produtoras de 2,3-BDO não eram capazes de utilizar/gerar todos os isômeros (STAINER & FRATKIN, 1944). Anos mais tarde, veio a ser confirmado que as enzimas BDH têm estero-especificidades distintas, o que contribui para a geração de diferentes isômeros de 2,3-BDO a partir da acetoína (TAYLOR & JUNI, 1958). Atualmente, é defendido que os isômeros de acetoína e 2,3-BDO produzidos e também sua proporção são características de cada cepa produtora (KANDASAMY et al, 2016).

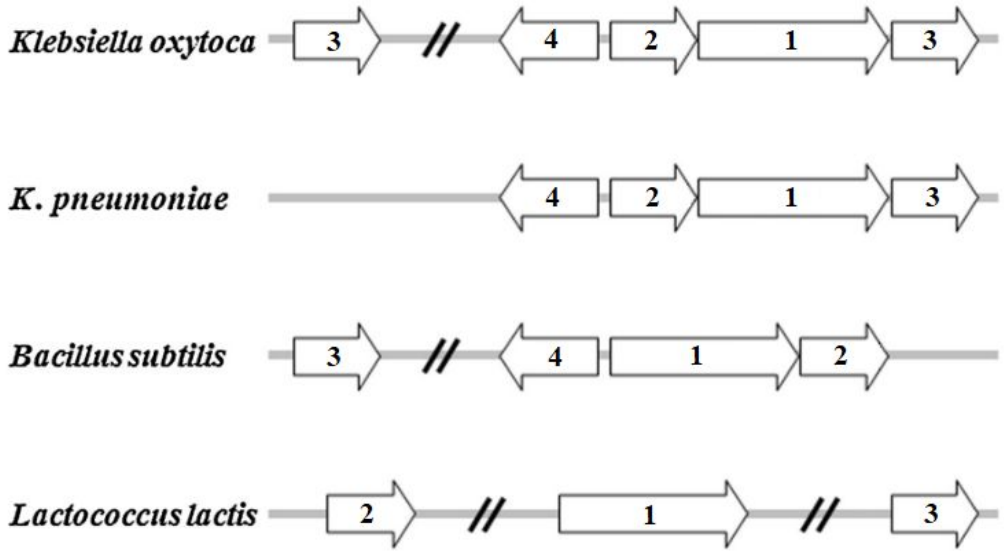


Figura 7: Estrutura do *operon* de 2,3-BDO em diferentes espécie. 1= acetolactato sintase (*alsS*); 2= acetolactato descarboxilase (*alsD*); 3= BDH (*bud/bdh*) 4= ativador transcricional do *operon* (*alsR*). Genes que se encontram em diferentes unidades gênicas estão separados por duas barras (//). Adaptado de: YANG et al, 2014

Considera-se a existência de três diferentes tipos de BDH. A R-BDH é uma desidrogenase/redutase de cadeia média (***M****edium-chain* ***D****ehydrogenase/****R****eductase* - MDR), capaz de adicionar um centro quiral R à molécula. Uma das R-BDHs mais estudadas pertence à *P. polymyxa*, devido a sua exímia capacidade de produção de 2R,3R-BDO. Já as enzimas S-BDH e meso-BDH são, ambas, desidrogenases/redutases de cadeia curta (***S****hort-chain*

***D**ehydrogenase/**R**eductase* - SDR) e adicionam um centro quiral S à molécula (YU et al, 2011a; GAO et al, 2012). A meso-BDH mais estudada pertence à *K. pneumoniae*, bactéria capaz de atingir uma das concentrações mais altas de 2,3-BDO já registrada (CHEN et al, 2014). As meso-BDHs de *B. subtilis* e *B. licheniformis* são também alvo de diversos trabalhos (FU et al, 2016; QIU et al, 2016). Já a S-BDH mais estudada pertence à bactéria *Brevibacterium saccharolyticum* (OTAGIRI et al, 2010; UI et al, 1998b; ZHANG et al, 2016).

Funcionalmente, as BDHs de diferentes microrganismos costumavam ser caracterizadas em relação à capacidade de utilização de cada isômero, cofatores utilizados e condições ótimas de atividade, como pH e temperatura. Entretanto, até a década de 1980, a meso-BDH não havia sido descrita, considerando-se a existência apenas de R-BDH e S-BDH (STRECKER & HARARY, 1954; TAYLOR & JUNI, 1960; HOHN-BENTZ & RADLER, 1978). Ui e grupo dedicaram esforços a fim de caracterizar a meso-BDH pertencente à *K. pneumoniae*. Comparando-a a BDHs de outros organismos, foi observada diferença no Km para alguns substratos, apesar da alta homologia entre as sequências. Ainda assim, não foi especificado qual tipo de BDH (R, S ou meso) pertencia aos microrganismos utilizados na comparação (UI et al, 1997).

No século seguinte, em 2016, um estudo caracterizou funcionalmente as enzimas R-BDH, S-BDH, meso-BDH e GDH de uma cepa de *Serratia*. Ensaios *in vitro* mostraram que há uma pequena diferença no Km de S-BDH e meso-BDH para meso-BDO (8,84 mM e 6,64 mM, respectivamente), mas a diferença de Km para 2S,3S-BDO foi bem acentuada (0,39 mM e 8,25 mM, respectivamente). Já, utilizando diacetil como substrato, ambas produziram 3S-acetoína e 2S,3S-BDO. Foram também realizados ensaios *in vivo*, com a deleção de cada uma das enzimas a fim de verificar o impacto na produção de 2,3-BDO/acetoína. Foi observado que a cepa Δmeso-BDH cresceu menos que a cepa selvagem, além de produzir menos meso-BDO, como já esperado. Já na cepa ΔS-BDH não houve alteração em nenhum destes dois fatores. Esses resultados sugerem distintas propriedades catalíticas para estas enzimas, porém, há pouca discussão acerca dessas informações (ZHANG et al, 2016).

Estruturalmente, alguns trabalhos envolvendo modelagem computacional dessas duas enzimas auxiliaram a esclarecer diferenças relevantes. Em 2010, Otagiri e seu grupo voltaram seu estudos para resíduos catalíticos da S-BDH de *B. saccharolyticum*, fazendo comparações com resultados prévios de meso-BDH de *K. pneumoniae*. Foi observado que a tétrade catalítica Asn-Ser-Tyr-Lys e o ponto de ligação ao NAD+, bem como os resíduos

circundantes, têm suas posições conservadas entre ambas, significando que possuem o mesmo mecanismo de reação. Este mesmo estudo identificou resíduos que teriam papel essencial no reconhecimento e ligação do substrato. As tríades não-catalíticas Ile142-Phe148-Trp192 (IFW) em S-BDH e Gly140-Asn146-Trp190 (QNW) em meso-BDH fariam pontes de hidrogênio com o substrato, promovendo uma diferenciação estereoespecífica entre os isômeros (Figura 8) (OTAGIRI et al, 2010).

Em 2017, um grupo realizou experimentos com a meso-BDH de *K. pneumoniae*, a fim de explorar a relação estrutura-função dessa enzima. Foi confirmada a importância do resíduo Asn146, tendo sido observado que este contribui para a etapa de liberação do produto enzimático. Mostrou-se também que a mutação Phe212Tyr é capaz de aumentar a eficiência catalítica em meso-BDHs (PU et al, 2017). Ainda assim, há a continuidade dos estudos a fim de melhor esclarecer as diferenças entre meso e S-BDHs, além de findar as inconsistências sobre as mesmas. Conhecer a diversidade enzimática envolvida em uma via metabólica é essencial para entender os mecanismos que contribuem para a geração de seu produto final (PEREGRIN-ALVAREZ et al, 2003; PROSSER et al, 2014).

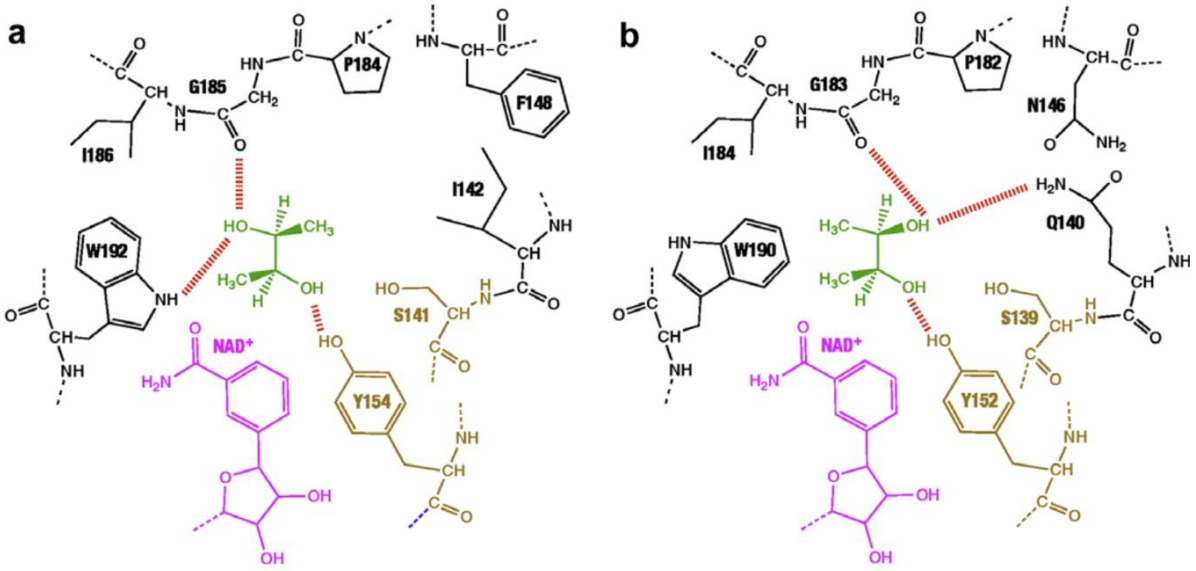


Figura 8: Resíduos que participam da diferenciação estereoespecífica entre os isômeros de 2,3-BDO em S e meso-BDHs. Na S-BDH (a) os resíduos relevantes são Ile142-Phe148-Trp192 (IFW), enquanto na meso-BDH (b) são Gly140-Asn146-Trp190 (QNW). Os resíduos em marrom são a serina e a tirosina da tríade catalítica; o NAD^+, cofator enzimático, está em rosa e o 2,3-BDO, em verde. As pontes de hidrogênio envolvidas na ligação e estabilização do substrato são mostradas em vermelho. Retirado de OTAGIRI et al, 2010

Além das rotas clássicas supracitadas, existem outras enzimas e vias que contribuem para a produção dos isômeros de 2,3-BDO e acetoína em diversos organismos. Um exemplo é uma via denominada "Ciclo do BDO" (Figura 9) (JUNI & HEYM, 1956), envolvendo a produção de acetilacetoína e acetilbutanodiol, que também possuem estereoisômeros (XIAO et al, 2009). Apesar de estar presente em diversas espécies de *Bacillus*, como *B. subtilis* (LÓPEZ & FORTNAGEL, 1972), *B. licheniformis* (QIU et al, 2016), *B. pumilus* (XIAO et al, 2009), *B. cereus* (UI et al, 1998a; UI et al, 2002) e *B. stearotermophilus* (GIOVANNINI et al, 2011), esta via não é amplamente estudada. Como consequência, ainda não foi esclarecido quais isômeros de 2,3-BDO e acetoína são gerados através do Ciclo do BDO.

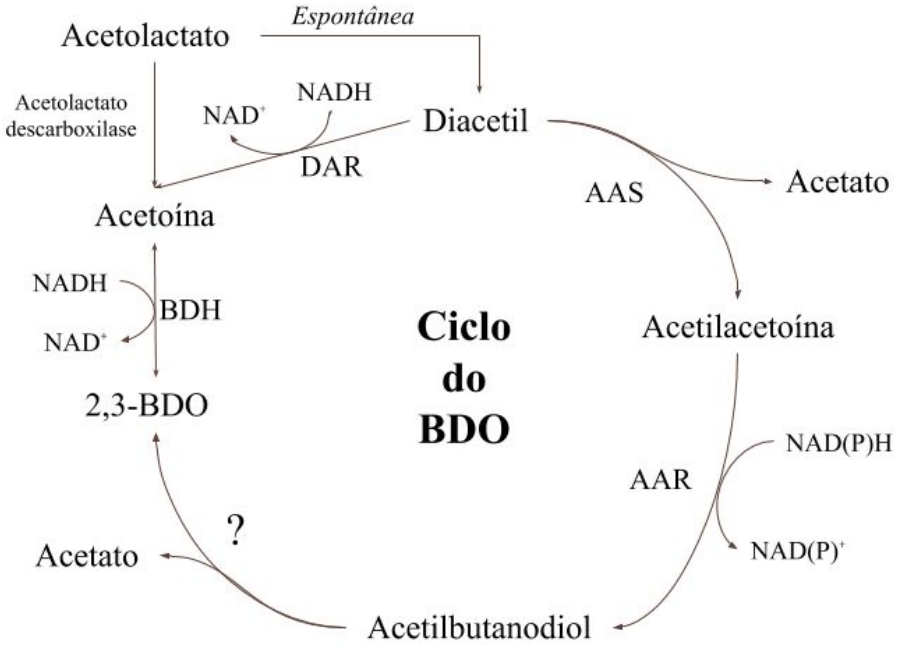


Figura 9: Ciclo do BDO. Os principais intermediários dessa via são a acetilacetoína e o acetilbutanodiol. Não há concordância sobre qual enzima realiza a conversão acetilbutanodiol - 2,3-BDO. BDH= butanodiol desidrogenase; DAR = diacetil redutase; AAS = acetilacetoína sintase; AAR= acetilacetoína redutase.

Além disso, é comum em diversos microrganismos a participação de outras álcool desidrogenases na rota clássica, principalmente a glicerol desidrogenase (GDH). A atividade de GDH é semelhante a de uma R-BDH e já foi observada em diversos organismos, como, por exemplo, *B. licheniformis* (LI et al, 2013b; QIU et al, 2016), *K. pneumoniae* (CHEN et al, 2014) e *S. marcescens* (ZHANG et al, 2014). Essa peculiaridade foi estudada inicialmente em organismos que não possuem a enzima R-BDH, mas são capazes de produzir 2R,3R-BDO.

1.3.2 Funções biológicas do 2,3-BDO e otimização do processo fermentativo

Quanto à função biológica do 2,3-BDO, há três principais hipóteses que tentam elucidar esta questão; são elas: armazenamento de carbonos, prevenção de acidificação e manutenção do balanço redox celular.

A primeira delas é que a molécula serviria como um estoque de carbono à célula. Mediante a presença da fonte de carbono, como, por exemplo, a glicose, a formação do 2,3-BDO ocorre normalmente. A partir do esgotamento dessa fonte, o 2,3-BDO pode ser revertido à acetoína (através da BDH) e esta passa a ser usada para a sobrevivência e manutenção do organismo. É conhecido que o sistema acetoína desidrogenase é essencial para permitir essa estratégia, pois viabiliza a conversão da acetoína a acetil-coA e acetaldeído (também convertido a acetil-coA pela célula, posteriormente). O acetil-coA é, por sua vez, direcionado ao ciclo do ácido cítrico. A utilização dessa estratégia resulta na manutenção da bactéria em uma fase estacionária de crescimento (CELINSKA & GRAJEK, 2009; JOHANSEN et al, 1975; WANG et al, 2012).

A segunda hipótese é um papel na prevenção da acidificação. Em organismos fermentativos, o acúmulo de produtos de fermentação ácida interrompe a homeostase de pH. Como resposta a isso, há a substituição de vias fermentativas ácidas por uma fermentação de composto neutro. Esse mecanismo evitaria o efeito tóxico das altas concentrações de ácidos fracos no meio, que culmina na inibição do crescimento bacteriano, ou até na morte. Exemplos bem estabelecidos na natureza são o do butanol em resposta ao butirato e do 2,3-BDO em resposta ao acetato (BOOTH, 1985).

A adição de ácido acético ao meio fermentativo é um fator considerado pela literatura como capaz de aumentar a produção do 2,3-BDO. Essa relação já foi observada em diversos estudos envolvendo, por exemplo, *P. polymyxa* (NAKASHIMADA et al, 2000) e *E. aerogenes* (STORMER, 1968). Esta última foi alvo de trabalhos que ajudaram a esclarecer esse fenômeno provocado pelo acetato. Já em 1968 foi observado um aumento na quantidade (e, assim, na atividade) das enzimas que participam da via do 2,3-BDO (acetolactato sintase, acetolactato descarboxilase e BDH) mediante adição de acetato no meio fermentativo (STORMER, 1968). Em 2016, foi verificado que acetolactato sintase, acetolactato descarboxilase, BDH, e até mesmo o regulador transcricional (gene *alsR*) da via tiveram um aumento em seus níveis transcricionais. Essa ação sobre *alsR* estaria ligada ao aumento da transcrição das outras três enzimas (LEE et al, 2016).

Além disso, trabalhos recentes apontam que a ação do ácido acético pode aumentar em quase 35% a produção de 2,3-BDO, também em *E. aerogenes* (LEE et al, 2016; LEE et al, 2017). De forma interessante, foi observado que a ação do acetato não se limita às fermentações que têm a glicose como fonte de carbono. Seu efeito já foi mostrado também em casos de processos fermentativos conduzidos em xilose. Até mesmo tendo resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono foi observada a importância do ácido acético. A presença desse ácido no hidrolisado empregado foi atribuída ao melhor desempenho da bactéria na produção de 2,3-BDO (JOO et a, 2016).

A terceira hipótese acerca da função biológica do 2,3-BDO se refere ao poder redutor. Como outras vias fermentativas, a via do 2,3-BDO participa da manutenção do balanço redox, refletido na razão $NADH/NAD^+$. Através da redução da acetoína, uma grande quantidade de NAD^+ é regenerada a partir do NADH gerado na glicólise. O 2,3-BDO é, assim, considerado um "reservatório de equivalentes redutores" (CELINSKA & GRAJEK, 2009; DAI et al, 2014; JOHANSEN et al, 1975). Entretanto, a regeneração do NAD^+ é promovida também através do uso do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons durante o crescimento de organismos facultativos e aeróbicos. A utilização do oxigênio tem maior rendimento para a produção de ATP, assim, a formação do 2,3-BDO é mediada pela disponibilidade de oxigênio (MAGEE & KOSARIC, 1987).

O efeito do suprimento de oxigênio, refletido na aeração e agitação aplicadas à fermentação, já foi estudado em diversos organismos. De forma geral, a produtividade do processo fermentativo e a variedade de isômeros gerados no mesmo são os fatores mais críticos. Em condições aeróbicas, há maior quantidade de acetoína do que 2,3-BDO, devido à atuação majoritária da cadeia respiratória na oxidação de NADH (FU et al, 2014; ZHANG et al, 2013). Além disso, foi observado que a limitação extrema na disponibilidade de oxigênio reduz a produção desse álcool devido à baixa densidade celular e lenta utilização de glicose. Com isso, considera-se que a microaeração seja a condição ideal para a produção de 2,3-BDO (FU et al, 2016; LI et al, 2013a).

O oxigênio impacta também a atividade e expressão de enzimas envolvidas na produção de 2,3-BDO. Há indícios de que a acetolactato sintase é inativada em condições aeróbicas (JI et al, 2011) e que o oxigênio favoreça a formação de diacetil, bem como o acúmulo de acetoína (HABLER et al, 2012). Além disso, foi mostrado em *B. subtilis* que o *operon alsSD* tem sua expressão aumentada em condições de limitada disponibilidade de oxigênio. Isso

favorece o direcionamento do fluxo de carbonos para a formação de 2,3-BDO em detrimento ao ciclo do ácido cítrico, evitando a formação de NADH por essa via (YU et al, 2011b).

Além disso, é observada uma relação da disponibilidade de oxigênio com a variedade de isômeros produzidos. O caso melhor abordado na literatura é o do isômero 2R,3R-BDO. Diversos trabalhos já relataram um melhor desempenho, em quantidade e pureza, na produção do isômero levorrotatório em baixo suprimento de oxigênio. Isso indica que os estados de oxidação e redução têm papel essencial na conversão de acetoína a 2R,3R-BDO e na seletividade da forma isomérica, especialmente entre meso-BDO e 2R,3R-BDO (DAI et al, 2014; FU et al, 2014; HABLER et al, 2012).

Baseado na importância da aeração no crescimento celular e na produção de 2,3-BDO, estratégias de otimização desse processo fermentativo vêm sendo desenvolvidas. Uma delas é a implementação de processos de dois estágios, onde cada um possui uma diferente velocidade de agitação. A redução dessa velocidade resultou em uma maior concentração de 2,3-BDO, em comparação a um processo que utiliza apenas uma velocidade de agitação (ZHANG et al, 2013). Um estudo potencializou esse efeito através da adição de vitamina C, que atua como agente redutor, impactando ainda mais na razão $NADH/NAD^+$ e na produção de 2,3-BDO (DAI et al, 2014).

Além da otimização das condições do processo fermentativo, o melhoramento dos organismos baseado no controle do poder redutor contribui para uma melhor produtividade. A superexpressão de oxidorredutases, juntamente a enzimas que participam da via do 2,3-BDO, se mostrou útil nesse sentido. Em *B. subtilis* foi observado que com o aumento da expressão de *alsS*, *alsD*, *budC* e *udhA* (oxidorredutase) foi possível atingir quase 100% do rendimento teórico da conversão de 2,3-BDO a partir de glicose (FU et al, 2014; FU et al, 2016).

A engenharia genética têm sido uma ferramenta útil também para eliminar subprodutos. A deleção das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase é frequente nessa estratégia. Uma cepa de *K. pneumoniae* com essas características apresentou 98% do rendimento teórico em glicose (GUO et al, 2014). Em *Lactococcus lactis* uma mutação adicional foi realizada. A deleção simultânea de fosfotransacetilase (que participa de uma das vias de produção de acetato) resultou em 80% do rendimento teórico (também em glicose) (KANDASAMY et al, 2016).

Em *B. subitilis* foram deletadas não só essas três enzimas, como também o sistema acetoína desidrogenase. No caso, essas alterações visavam, não evitar a formação de um

subproduto, mas sim prevenir a utilização da acetoína em outra via que não a de formação do 2,3-BDO. Além disso, a BDH de *K. pneumoniae* foi introduzida nessa bactéria e a superexpressão do *operon alsSD* foi realizada. Em condição microaeróbica e na presença de glicose, o rendimento atingido foi de aproximadamente 97% do teórico (FU et al, 2016).

As estratégias supracitadas, apesar de interessantes, têm uma desvantagem: envolvem a utilização de glicose pura (comercial) como fonte de carbono. Apesar da glicose ser facilmente metabolizada por todos os organismos, sua substituição por fontes menos custosas é almejada. A utilização da glicose comercial agrega um valor alto à produção, além de causar certa competição com a indústria alimentícia. Sua substituição por resíduos é uma medida que visa tornar o processo mais vantajoso economicamente. Isso também viabiliza uma finalidade útil aos resíduos, contribuindo ao meio ambiente e outras indústrias (LEE et al, 2008; AL-KAIDY et al, 2015).

1.3.3 Substratos residuais e produção de 2,3-BDO

Entre as fontes de carbono residuais mais estudadas estão as lignocelulósicas (hidrolisados vegetais) e, entre as não celulósicas, principalmente glicerol e melaços. Independentemente de qual delas é utilizada, há preocupação com um fenômeno denominado repressão catabólica (YANG & ZHANG, 2018). A glicose, fonte de carbonos preferencial, atua como um repressor da utilização simultânea das demais fontes presentes no meio. Após o esgotamento da glicose, é necessária a síntese de toda maquinaria para o metabolismo da fonte de carbono menos favorável, até que o crescimento seja retomado. Esse perfil é conhecido como crescimento diáuxico (DEUTSCHER et al, 2006).

Considerando o uso do glicerol, já foi observado em bactérias gram-positivas, por exemplo, que a glicerol quinase é inibida como consequência da repressão catabólica (DEUTSCHER et al, 1993; YEH et al, 2009). Ainda assim, a utilização simultânea de glicerol com um sacarídeo parece ter utilidades em bioprocessos. Uma possibilidade para superar o baixo consumo de glicerol observado em diversos organismos é, por exemplo, a inclusão de glicose ao processo. Para que essa metodologia funcione, entretanto, é necessário realizar um bloqueio do sistema promotor da repressão catabólica através de engenharia genética. Isso permitiu um consumo satisfatório do glicerol (YAO et al, 2016).

Com relação à produção de 2,3-BDO, resultados semelhantes foram observados em *P. polymyxa*. Entre outras otimizações, foi incluído glicerol ao meio fermentativo com glicose.

Isso possibilitou um aumento de quase 50% da produção de 2,3-BDO em um processo de batelada simples. Além disso, foi observada a redução de subprodutos, especialmente exopolissacarídeo (EPS) (OKONKWO et al, 2017a). Em *P. macerans* foi observado que aumentando a eficiência das vias de utilização do glicerol, é possível até mesmo reduzir a dependência do organismo por fontes complexas de nitrogênio, como a triptona (GUPTA et al, 2009). Entretanto, como para toda fonte de carbono, é importante salientar que há concentrações de glicerol toleradas pelos microrganismos. Em *Clostridium butyricum*, por exemplo, foi identificada que a concentração máxima, onde ainda não há inibição metabólica, é de 90 g/L para o glicerol puro e 70 g/L para o glicerol bruto (SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2015).

Além da importância da otimização das condições utilizadas na fermentação, a engenharia genética é também uma ferramenta essencial para aprimorar a metabolização de glicerol. Em *K. oxytoca*, foi realizada a deleção das vias de produção de 1,3-PDO e lactato. Essa estratégia permitiu atingir uma produção de 2,3-BDO correspondente a quase 90% do rendimento teórico em glicerol bruto (CHO et al, 2015). Entretanto, essa espécie foi capaz de alcançar um rendimento de quase 100%, em um processo envolvendo glicose como fonte de carbono. Além disso, foi também realizada a eliminação de subprodutos, mas, desta vez, através da combinação da deleção das vias de etanol, lactato e acetato (JANTAMA et al, 2015).

Além de estratégias de eliminação de subprodutos e otimização das condições fermentativas, a engenharia de cofatores tem se mostrado relevante para atingir uma melhor metabolização do glicerol. O principal alvo dessa estratégia é o sistema NADH/NAD^+. Em *Bacillus amyloliquefaciens* foi realizada uma superexpressão de enzimas que utilizam NAD^+, com o intuito de aumentar a quantidade de NADH disponível para a conversão de acetoína a 2,3-BDO. Adicionalmente, o fluxo de carbonos foi manipulado para a formação desse composto através da realização de uma fermentação de dois estágios. Isso permitiu atingir aproximadamente 90% do rendimento teórico da conversão de glicerol a 2,3-BDO. Esse resultado é ainda mais promissor por ter sido obtido com um organismo seguro (YANG et al, 2015).

A utilização de hidrolisados vegetais usualmente implica em condições de crescimento em misturas de glicose e xilose. Em *E. aerogenes*, por exemplo, o bloqueio da repressão catabólica permitiu atingir cerca de 60% do rendimento teórico na produção de 2,3-BDO

utilizando uma mistura desses açúcares em proporção semelhante à residual. Entretanto, o resultado da utilização de um hidrolisado de bagaço de cana como fonte de carbonos foi insatisfatório. A isso foi atribuída a presença de alguns inibidores, gerados durante a preparação química do hidrolisado (UM et al, 2017).

Em uma cepa termofílica de *B. licheniformis*, por outro lado, foi observada boa tolerância a substâncias tóxicas, como o furfural, presentes em um hidrolisado de palha de milho. Esse resíduo é majoritariamente composto por glicose e xilose, em uma razão 3:1. Foi observada uma capacidade interessante dessa bactéria em utilizar os dois açúcares praticamente de forma simultânea. Isso demonstra uma redução do efeito de repressão catabólica, sem a necessidade de engenharia genética. Por ser termofílica, a cepa ainda oferece a vantagem de permitir a condução de fermentações em temperaturas em torno de 50°C e 60°C, o que reduz o risco de contaminações e facilita a utilização de matérias-primas lignocelulósicas. Uma desvantagem observada, entretanto, foi a produção simultânea dos isômeros levorrotatório e meso-BDO em uma proporção 1:1 (LI et al, 2014b).

Em *P. polymxa* foi relatada a produção exclusiva de 2R,3R-BDO em um processo tendo um hidrolisado celulósico como fonte de carbono. Uma solução de infusão de milho foi utilizada como fonte de nitrogênio nessa mesma fermentação, o que a torna ainda mais interessante (ADLAKHA & YAZDANI, 2015). Em outra cepa dessa espécie, foi possível atenuar o efeito de repressão catabólica a partir da diluição da matéria-prima utilizada, um hidrolisado de palha de milho. Essa diluição foi baseada em resultados da fermentação em soluções com diferentes proporções de glicose e xilose. Foi observado que a concentração inicial de glicose é essencial para a determinação da repressão catabólica e deve ser mantida a no máximo 10 g/L para evitar esse efeito (MA et al, 2018).

Em ambos os trabalhos supracitados, *P. polymyxa* foi capaz de atingir rendimentos equiparáveis aos atingidos em glicose pura. Entretanto, o rendimento em glicose não chegou a alcançar 70% do teórico, mostrando que, apesar da utilização satisfatória dos resíduos, alguns melhoramentos ainda são necessários (ADLAKHA & YAZDANI, 2015; MA et al, 2018). Em cepas das espécies consideradas atualmente como melhores produtoras, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, foi observado um rendimento de 80% do teórico em glicose. Entretanto os resultados em hidrolisado hemicelulósico de espiga de milho não corresponderam às expectativas, especialmente no caso de *K. oxytoca* (GE et al, 2014).

A fim de melhorar a tolerância a xilose em uma cepa de *K. pneumoniae*, estratégias de engenharia genética foram empregadas. A superexpressão do fator transcricional sigma 70 resultou em um consumo três vezes maior em relação à cepa selvagem. Isso é consequência do aumento da transcrição de genes relacionados a diversas vias do metabolismo energético. Entre elas: glicólise, ciclo do ácido cítrico, via das pentoses fosfato, fosforilação oxidativa, além de vias fermentativas (como a do 2,3-BDO). Também foi observado o aumento da transcrição de genes relacionados ao transporte transmembrana (GUO et al, 2018).

1.3.4 Perspectivas para a produção biotecnológica de 2,3-BDO

Apesar de todos os fatores e de vários relatos de produção microbiológica eficiente, a produção industrial de 2,3-BDO ainda é baseada na rota química. Isso mostra que, apesar dos avanços, o processo biotecnológico ainda não é economicamente viável (KANDASAMY et al, 2016). A empresa LanzaTech é um ótimo exemplo de que a produção microbiológica avança para sua implantação industrial. Essa companhia se propõe a empregar uma nova tecnologia de fermentação, utilizando resíduos industriais gasosos como fonte de carbono. A LanzaTech vêm otimizando o bioprocesso e aumentando sua escala, visando alcançar a escala comercial (GUZMAN & CHANG, 2012). Mesmo com essa perspectiva, algumas considerações devem ser feitas por grupos que têm como objetivo o desenvolvimento de um processo microbiológico de produção do 2,3-BDO.

Um trabalho de 2016 voltado para a avaliação técnico-econômica desse bioprocesso ressaltou que os principais parâmetros que devem ser otimizados na fermentação a fim de maximizar a produção de 2,3-BDO, especialmente quando o glicerol foi usado como fonte de carbono. São eles: demanda nutricional, pH e aeração (em diferentes estágios da fermentação). Foi observado que o ajuste dessas variáveis permite atingir uma eficiência de fermentação compatível com a implementação desse processo em escala industrial. Além disso, o autor ressalta como resultado de sua avaliação técnico-econômica que a produção biotecnológica do 2,3-BDO seria uma opção economicamente competitiva, contribuindo para a bioeconomia (KOUTINAS et al, 2016).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Reconstruir e analisar as vias metabólicas relacionadas à produção de 2,3-BDO em *P. polymyxa* e identificar enzimas que contribuem para a geração de 2,3-BDO em bactérias.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil de crescimento e a geração de produtos fermentativos pela cepa PM3605 de *P. polymyxa* em diferentes fontes de carbono;
- Analisar o genoma da cepa PM3605 de *P. polymyxa*;
- Mapear as vias metabólicas relevantes para a produção de 2,3-BDO em *P. polymyxa*;
- Identificar os *operons* presentes em *P. polymyxa* relacionados às vias de interesse;
- Investigar a diversidade enzimática de butanodiol desidrogenases envolvida na produção estereoespecífica do 2,3-BDO em diferentes bactérias.

3. Materiais e métodos

3.1 Fermentações

Os estoques de *P. polymyxa* (cepa PM3605; MOTA et al, 2002), mantidos a -80°C em solução de meio de cultura com 20% de glicerol P.A, foram utilizados para gerar culturas em placas de petri contendo meio LB (Luria-Bertani) ágar (BERTANI, 1951). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e então armazenadas a 4°C. Cinco colônias foram transferidas para um erlenmeyer (de 125 mL) contendo 60 mL de meio de pré-inóculo (2% peptona bacteriológica (HIMEDIA®), 1% extrato de levedura (BD®) e 2% de glicose). Esse pré-Inóculo foi mantido em *shaker* (*G24 environmental incubator shaker* - New Brunswick Scientific) por 12 horas a 37°C e 200 rpm. Após esse tempo, uma amostra (100 µL) de pré-Inóculo foi coletada em ambiente estéril (fluxo PCRT2 Eco - Pachane) e diluída dez vezes em água destilada autoclavada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (UV-1800 - Shimadzu) no comprimento de onda de 600nm. A água destilada e o meio de inóculo foram testados como branco e, como a diferença é desprezível, a água foi escolhida como branco para zerar a absorbância no equipamento.

O volume necessário de pré-Inóculo foi calculado tendo em vista que o Inóculo deve ter absorbância inicial (0 horas de fermentação) de 0,5 a 600nm. Este volume, de aproximadamente 34 mL, foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm (centrífuga Universal 320R - Zentrifuger). O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, adicionado a um erlenmeyer (de 250 mL) contendo 150 mL de meio de Inóculo (15 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de K_2HPO_4, 0,5 g/L de KH_2PO_4, 0,3 g/L de KCl e 0,0225 g/L de $MnSO_4$; ADLAKHA & YAZDANI, 2015) com 20 g/L de fonte de carbono (glicose, xilose ou glicerol). As fermentações foram conduzidas por 48 horas, e a absorbância foi obtida em intervalos de duas horas durante as 12 horas iniciais (incluindo o tempo de 0 horas); entre 24 e 36 horas de fermentação, a leitura da absorbância foi feita em intervalos de seis horas até a última que ocorreu às 48 horas de fermentação. As fermentações de cada fonte de carbono foram conduzidas em três experimentos independentes e os valores de média e erro padrão das leituras foram calculados e utilizados na elaboração dos gráficos.

Uma amostra de pré-inóculo foi utilizada para repor os estoques guardados a -80°C. Para isso, em um eppendorf autoclavado, 20 µL de glicerol P.A. foram adicionados a 80 µL do

pré-inóculo; o tubo foi devidamente selado com Parafilm e imediatamente guardado no ultrafreezer (-80°C). A Figura 10 ilustra as etapas acima descritas.

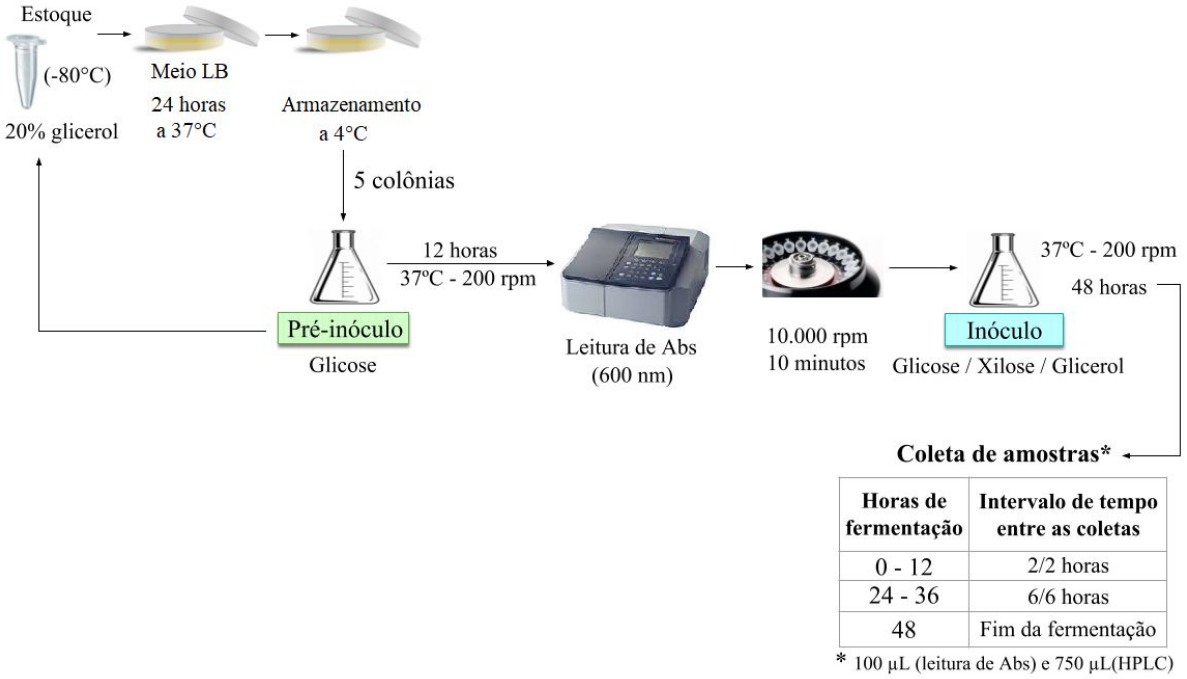


Figura 10: Processo fermentativo conduzido com a cepa PM3605. A figura ilustra a expansão da cultura de *P. polymyxa* PM3605, avaliação do perfil de crescimento em diferentes fontes de carbono (glicose, xilose e glicerol) e análise dos produtos resultantes. A tabela mostra os intervalos de tempo entre as leituras de absorbância e coleta de amostra para as análises de HPLC.

3.2 Análises por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Para analisar o perfil de produtos fermentativos secretados pela bactéria, 750 µl das amostras coletadas (nos intervalos de tempo supracitados) foram destinados à HPLC. Para isto, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm para sedimentar as células. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C até as análises. Antes do envio para a plataforma de HPLC do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM), as amostras foram descongeladas, diluídas dez vezes em água miliQ e filtradas através de filtros de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com poro de 0,22 µm (Analítica) e dispostos nos frascos que foram encaminhados para a análise.

A análise foi realizada a 45°C, utilizando uma coluna de cromatografia de troca iônica, volume de injeção de 20 µL e uma solução aquosa com 0,005 mM de H_2SO_4 como fase móvel (Tabela 2). Os detectores de arranjo de diodos (DAD) e de índice de refração

(RID) utilizados permitem aumentar a resolução da técnica e detectar isômeros diferentes de uma mesma molécula, respectivamente. O técnico Fábio Faria da Mota realizou estas análises. Informações e parâmetros pertinentes à análise dos produtos fermentativos por HPLC estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2. Informações referentes ao método e condições utilizadas na análise por HPLC.

Parâmetros	Especificações
Coluna	HPX-87H 300 mm x 7.8mm (troca iônica)
Fluxo	0,6 ml/min
Temperatura	45ºC
Fase móvel	Solução aquosa 0,005 mM H_2SO_4
Detectores	RID e DAD
Volume de injeção	20uL
Equipamento	Agilent Technologies 1260 Infinity

As análises por HPLC de cada uma das três fontes de carbono foram realizadas em triplicata biológica. Os valores médios de concentração e os respectivos erros padrão foram calculados e utilizados na construção dos gráficos. A partir dos valores de concentração inicial da fonte de carbono e das concentrações obtidas de 2,3-BDO foi também calculado o rendimento médio de produção. Para isso, primeiramente a massa (em gramas) da fonte de carbono e de 2,3-BDO (no ponto onde foi atingida maior concentração) foi calculada para o volume utilizado (150 mL) a partir das respectivas concentrações (em g/L). Em seguida, foi calculada a razão g(2,3-BDO)/g(fonte de carbono) para cada experimento, bem como uma média de rendimento para as triplicatas. O rendimento teórico da reação de produção do 2,3-BDO é de 0,5g/g glicose (KALLBACH et al, 2017), 0,6g/g xilose (ZENG & SABRA, 2011) e 0,49g/g glicerol (SHEN et al, 2012). Assim, foi calculada a porcentagem de cada rendimento obtido em relação ao rendimento teórico. Por fim, para verificar se havia diferença estatisticamente significativa entre os rendimentos de cada fonte de carbono foi

realizado um Teste T de Student pareado unicaudal, considerando $p<0,05$. O valor-p representa o valor de corte para rejeitar a hipótese nula, (FERREIRA & PATINO, 2015) que, no caso, é de que não há diferença significativa entre o rendimento das fontes de carbono.

Adicionalmente, após estas análises, o remanescente das amostras foi utilizado em leituras de pH (pHmetro PB-11; Sartorius), a fim de verificar se o parâmetro influencia o crescimento e o processo fermentativo das três fontes de carbono.

3.3 Genoma

3.3.1 Extração de DNA genômico

A obtenção do DNA genômico (Figura 11) foi feita a partir de 35 mL de um inóculo de glicose com 6 horas de fermentação. As células foram sedimentadas por centrifugação durante 10 minutos a 10.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi congelado em nitrogênio líquido e macerado em um tubo tipo eppendorf com o auxílio de um pistilo plástico com ponta cônica para microtubos (lise mecânica). Em seguida foram adicionados 4 mL de tampão TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA) ao conteúdo macerado e as amostras foram armazenadas a -20°C. Posteriormente ao processo de lise celular, o DNA foi purificado utilizando o *kit Genomic DNA purification kit* (#K0512; Fermentas) e eluído em água miliQ ao final da extração.

Após extraído, o DNA passou por uma etapa de controle de qualidade, constituída por eletroforese e quantificação. Para a avaliação por eletroforese em gel de agarose (1%), 1 µL de amostra foi solubilizado em 2 µL de água DEPC junto com 1 µL de tampão de carregamento (Fermentas) e 1 µL de GelRed™ (Biotium) antes de ser aplicado no poço. Para estimar o peso molecular da amostra o padrão de 1kb foi utilizado (GeneRuler™ - Fermentas). A mobilização do DNA através da matriz de agarose foi feita aplicando uma corrente elétrica de 90 volts no tampão. Após aproximadamente 30 minutos, a fonte elétrica foi desligada e o gel foi fotografado no fotodocumentador E-gel®Imager (Life Technologies) para a análise das bandas, sendo esperado observar uma única banda de alto peso molecular, correspondente à primeira banda do ladder.

A quantificação, foi realizada no equipamento Nanodrop One (Thermo Scientific), usando 1 µL de amostra. Para verificar se havia resquício de proteínas ou compostos fenólicos, as razões dos comprimentos de onda 260/280 e 260/230, foram calculadas. Apenas amostras com valores em torno de 1,8 para a razão 260/280 e 2,0 para 260/230

(MATLOCK, 2015) foram consideradas adequadas para o sequenciamento. Após o manuseio do DNA, o mesmo foi armazenado a -20°C.

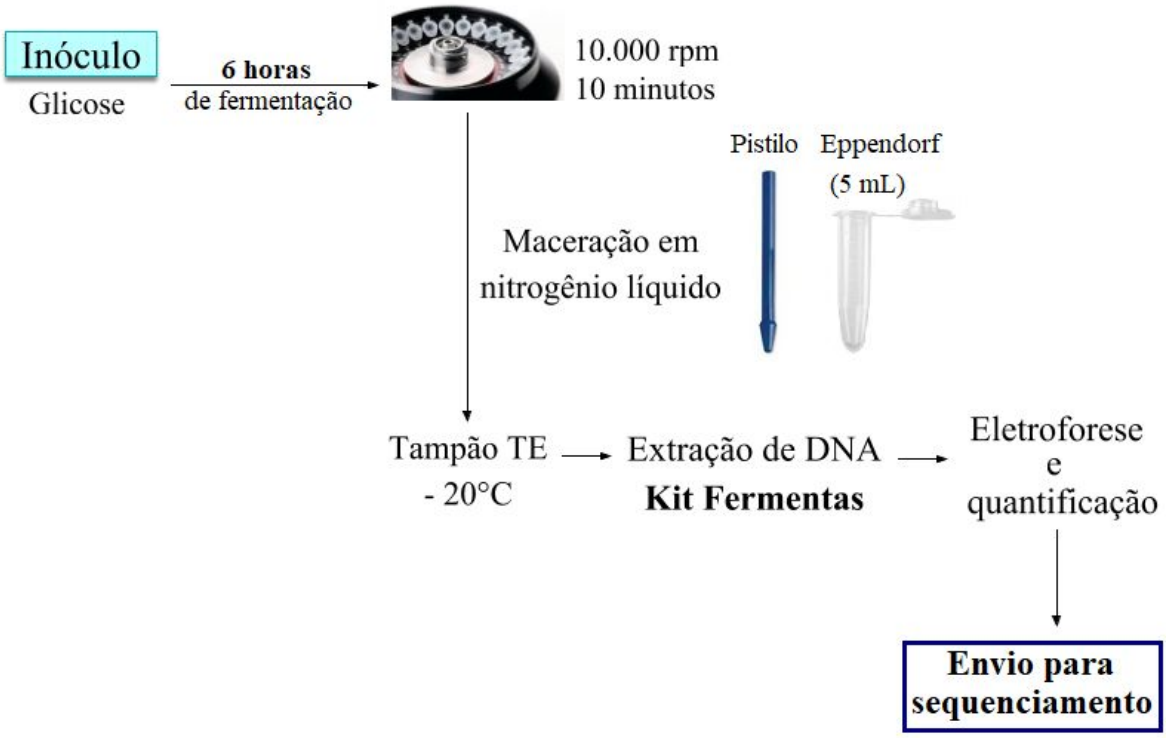


Figura 11: Processo de extração e quantificação do DNA genômico.

3.3.2 Sequenciamento, montagem e análise do genoma

O sequenciamento do DNA foi realizado pela empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul). Embora tenhamos analisado a integridade do DNA logo após a extração, uma nova análise foi feita pela empresa a fim de verificar se não houve degradação do DNA durante o transporte. A biblioteca do tipo Illumina TruSeq Shotgun foi construída, em um sistema de sequenciamento HiSeq 2.500/4.000 com reads pareados de 100 pb com cobertura de 1 Gb.

Os arquivos contendo as bibliotecas de *reads* pareados foram submetidos a uma análise de qualidade utilizando o programa FastQC versão 0.11.5 (ANDREWS, 2018). Com base nos resultados desse programa, a limpeza não foi realizada, uma vez que adaptadores não foram identificados e a qualidade média estava acima de 30 (de um máximo de 40). A montagem do genoma foi feita através do programa SPAdes versão 3.5.0 (BANKEVICH et al, 2012), utilizando os parâmetros padrões do programa.

Para analisar o conteúdo gênico, as sequências de DNA (*scaffolds*) foram submetidas ao *pipeline* RAST (***R**apid **A**nnotation using **S**ubsystem **T**echnology*) versão 2.0 (AZIZ et al, 2008; BRETTIN et al, 2015; OVERBEEK et al, 2014). Para aumentar a acurácia e precisão

da anotação, o código taxonômico (txid) do NCBI (***N**ational **C**enter for **B**iotechnology **I**nformation*) da espécie *P. polymyxa* (txid1406) foi fornecido. A primeira etapa do *pipeline* consiste na predição gênica. Em seguida, os genes com mais de 80% de identidade com homólogos compreendidos na base de dados externa (FIGfams, que se baseia em famílias proteicas de organismos próximos) e do próprio RAST são anotados. Os genes não anotados passam por uma segunda etapa de anotação usando uma base de dados específica do gênero que o organismo pertence. Por fim, redundâncias são eliminadas. O fluxograma desse processo está disponível no **Anexo A**.

Para avaliar a qualidade da predição gênica realizada pelo RAST, o conjunto de proteínas preditas foi submetido ao programa BUSCO (*Assessing genome assembly and annotation completeness with **B**enchmarking **U**niversal **S**ingle-**C**opy **O**rthologs*) versão 3.0.2 (SIMÃO et al, 2015; WATERHOUSE et al, 2018). Esse programa analisa a integridade genômica em termos de conteúdo gênico, baseado em ortólogos universais de cópia única. Os ortólogos utilizados pelo BUSCO foram baixados no site do próprio BUSCO (https://busco.ezlab.org/), que seleciona esses dados do banco de dados de ortólogos OrthoDB (ZDOBNOV, 2017). Em outras palavras, o programa BUSCO realiza uma análise de *core* genômico, isto é, baseada no conteúdo gênico compartilhado (conservado) por um grupo taxonômico (Bacillales, no caso). A partir disso, ele compara esses conjunto de ortólogos com os genes encontrados no seu organismo (através da predição gênica previamente executada). Mediante a duplicação ou ausência de uma grande quantidade desses ortólogos no seu genoma de trabalho, é considerado que a predição gênica (ou até mesmo a montagem) realizada não foi satisfatória. O BUSCO retorna, então, uma estatística para essa verificação.

3.4 Mapa metabólico e anotação de *operons*/*clusters* gênicos

Inicialmente foram buscadas nos bancos de dados MetaCyc (CASPI et al, 2016) as vias de interesse (metabolização de fontes de carbono, fermentações, produção/degradação de EPS, e combate ao estresse oxidativo). Em seguida, as enzimas componentes destas vias foram identificadas em todas as cepas de *P. polymyxa* disponíveis no KEGG (***K**yoto **E**ncyclopedia of **G**enes and **G**enomes*; KANEHISA et al, 2018). As enzimas não encontradas foram buscadas nos genomas de *P. polymyxa* de forma independente de anotação e predição gênica com o programa ProspectBio, desenvolvido por nosso grupo (registrado no INPI;

Anexo B). Neste caso foram utilizados todos os genomas de *P. polymyxa* disponíveis no NCBI.

Para a execução do ProspectBio, foi fornecido(a): (1) o nome da espécie, neste caso *P. polymyxa*, para que os genomas desta espécie disponíveis no NCBI fossem acessados (e baixados) automaticamente; (2) a sequência proteica do gene homólogo (aqui chamada de isca), de um organismo evolutivamente próximo à espécie *P. polymyxa* (Tabela 3); e (3) o modelo de Hidden Markov do domínio conservado presente na isca, o qual foi obtido na base de dados Pfam (***P****rotein* ***fam****ily database*; FINN et al, 2016).

Inicialmente, a sequência isca é usada como referência pelo programa Exonerate (SLATER & BIRNEY, 2005), para identificar os genes que codificam proteínas com alto percentual de identidade à proteína isca. Para verificar a integridade das sequências preditas e evitar a seleção de fragmentos de baixa qualidade, o ProspectBio executa uma busca pelo domínio conservado usando o programa HMMsearch (EDDY, 2011). Aquelas que possuem o domínio conservado em questão são armazenadas em um arquivo FASTA[2] pelo ProspectBio.

Tabela 3: Proteínas utilizadas como iscas no ProspectBio.

Nome da enzima	Espécie	Código de acesso #
Acetaldeído desidrogenase	*Moorella thermoacetica*	Moth_1776
Acetoína desidrogenase	*Paenibacillus durus*	PDUR_22495
Fosfogluconato desidratase	*Mycobacterium dioxanotrophicus*	BTO20_34925
Fosfotransacetilase	*Paenibacillus odorifer*	WP_076276591.1
Glicerol desidratase	*Paenibacillus macerans*	A0A090ZI26_PAEMA
Glicerol desidratase	*Clostridium baratii*	U729_91 U729_92 U729_93
Glutationa redutase	*Paenibacillus bovis*	AR543_05280
KDPG* aldolase	*Sporosarcina psychrophila*	AZE41_15840

[2] Formato FASTA: é uma forma textual de representar sequências (nucleotídicas ou peptídicas), onde cada par de base ou aminoácido é representado usando um código de uma letra. A primeira linha da sequência em FASTA é iniciada com sinal de maior (>) e contém uma breve descrição (por exemplo, nome do organismo e código da sequência). A sequência em si é apresentada a partir da segunda linha. Fonte: BLAST topics (NIH). Disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

1,3-propanodiol desidrogenase	*Lactobacillus paraplantarum*	ASU28_12380
S-BDH	*Paenibacillus terrae*	HPL003_23200
Succinato-coA transferase	*Parageobacillus thermoglucosidasius*	Geoth_3395

Todos os códigos são do KEGG, exceto para Fosfotransacetilase (NCBI) e Glicerol desidratase (Uniprot)

* 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato

As sequências encontradas com o ProspectBio foram anotadas automaticamente utilizando o programa FAT (***F**unctional **A**nnotation **T**ool*), também desenvolvido por nosso grupo. Com o FAT, cada sequência foi submetida a um BLASTp (***B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool*; ATLSCHUL et al, 1990; BORATYN et al, 2013) contra o banco de dados de proteínas de procariotos do KEGG. Todos os resultados foram inspecionados manualmente, considerando o *e-value*, para concluir sobre a presença (ou não) das enzimas buscadas. Após realizar esse mesmo procedimento para todas as vias de interesse, os genes encontrados foram adicionados ao mapa metabólico geral, isto é, aplicável às cepas de *P. polymyxa* disponíveis no NCBI.

Para o genoma da cepa PM3605, os mapas metabólicos para as mesmas vias foram anotados manualmente utilizando a anotação automática obtida com o *pipeline* RAST e com uma busca realizada pelo BLASTp tendo as proteínas identificadas no mapa geral (de outras cepas de *P. polymyxa*) como *query*. Em seguida, as sequências retornadas pelo BLAST foram anotadas utilizando o FAT (novamente com a base de dados de procariotos do KEGG). As ausências foram confirmadas através dos programas ProspectBio e FAT, conforme acima. No caso do RAST, para verificar se as enzimas de interesse haviam sido anotadas, foi feita uma busca nos resultados do RAST utilizando nome (e sinônimos) ou o número EC (***E**nzyme **C**ommission number*) das enzimas. Além disso, parte das proteínas anotadas foram categorizadas pelo RAST de acordo com sua função, em categorias pré-estabelecidas pelo próprio programa.

Operons/*clusters* gênicos (relacionados às vias de interesse) foram também mapeados utilizando os dados de anotação genômica do RAST. Este programa mostra a posição de cada gene no genoma, permitindo saber também os genes vizinhos e próximos. Além disso, através do RAST é possível acessar a composição do *cluster* gênico de interesse em outras espécies

(disponíveis na base de dados pública do programa). Todos os agrupamentos de genes identificados no RAST foram conferidos no banco de dados de *operons* ProOpDB (***Pro****karyotic* ***Op****eron* ***D****ata****B****as*e) (TABOADA et al, 2012) para as cepas de *P. polymyxa* SC2 (referência; txid886882), M1 (txid1052684) e E681 (txid349520). Essa averiguação teve como finalidade verificar quais agrupamentos eram *operons*. Entretanto, em alguns casos, o conjunto gênico conservado mostrado pelo RAST continha mais genes do que a estrutura de *operon* mostrada pelo ProOpDB. Nestes casos, foi realizada uma curagem manual dos conjuntos gênicos utilizando dados da literatura. Essa verificação foi importante para identificar casos de *clusters* gênicos (e se estes continham ou não *operons* em sua composição). A presença das enzimas e conjuntos gênicos identificados na cepa PM3605 também foi investigada nas cepas de *P. polymyxa*, SC2 (referência) e E681.

3.5 Butanodiol desidrogenases (BDHs)

A revisão da literatura incluiu artigos científicos acerca de BDHs e produção de isômeros de 2,3-BDO. Quanto aos bancos de dados, foram utilizados KEGG e Metacyc, a fim de auxiliar na compreensão de quais vias e enzimas são bem descritas quanto à sua contribuição na geração dos isômeros. Sequências de aminoácidos de BDHs foram buscadas por nome nos bancos de dados KEGG e Uniprot (***U****niversal* ***P****rotein* ***R****esource*; BATEMAN et al, 2017). Apenas enzimas de bactérias foram selecionadas; sequências de enzimas com ou sem evidência experimental foram aceitas. Em seguida, essas sequências passaram por uma análise de domínio conservado utilizando a ferramenta de busca em conjunto (*Batch CD-search;* MARCHLER-BAUER & BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al, 2011) do NCBI com a base de dados Pfam. O conjunto final de sequências para a construção da árvore era formado por 48 sequências, entre as quais enzimas com domínio enoil-(proteína carreadora de acil)-redutase (código Pfam: PF13561) ou SDR (desidrogenase/redutase de cadeia curta; código Pfam: PF00106).

As sequências foram alinhadas utilizando o programa online Clustal W versão 2.1 (THOMPSON et al, 1994; GenomeNet https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw). O alinhamento foi conferido manualmente no programa BioEdit versão 7.2.5 (HALL, 1999). Após esta etapa, o alinhamento foi utilizado para construir uma árvore de máxima verossimilhança com 500 *bootstraps*, no programa RAxML versão 8.2.12 (STAMATAKIS, 2014). A árvore foi visualizada através do programa iTOL (***I****nteractive* ***T****ree* ***O****f* ***L****if*e) 4.3

(LETUNIC & BORK, 2016); foi escolhido o modo de visualização de árvore sem raiz, por se tratar de uma comparação interna entre as sequências. A árvore filogenética foi analisada junto com dados relacionados à cinética enzimática obtidos do banco de dados *BRENDA enzymes* (PLACZEK et al, 2017). Informações provenientes de uma revisão da literatura, incluindo artigos acerca da produção dos isômeros de acetoína/2,3-BDO em diferentes organismos, também foram consideradas durante a interpretação dos resultados obtidos.

4. Resultados

4.1. Fermentações: curvas de crescimento e HPLC

Na fermentação com glicose (Figura 12) foi observada a produção de ácido acético, ácido fórmico, acetoína e 2R,3R-BDO, enquanto ácido succínico e meso-BDO não foram detectados. A fonte de carbono se esgotou em torno de 10 horas após o início da fermentação, enquanto que o ponto de produção máxima de 2R,3R-BDO foi atingido em torno de 8 horas. O pH inicial médio do meio na fermentação com glicose foi de 6,85. O pH tende a se manter em um valor de aproximadamente 6 a partir de 8 horas de cultivo.

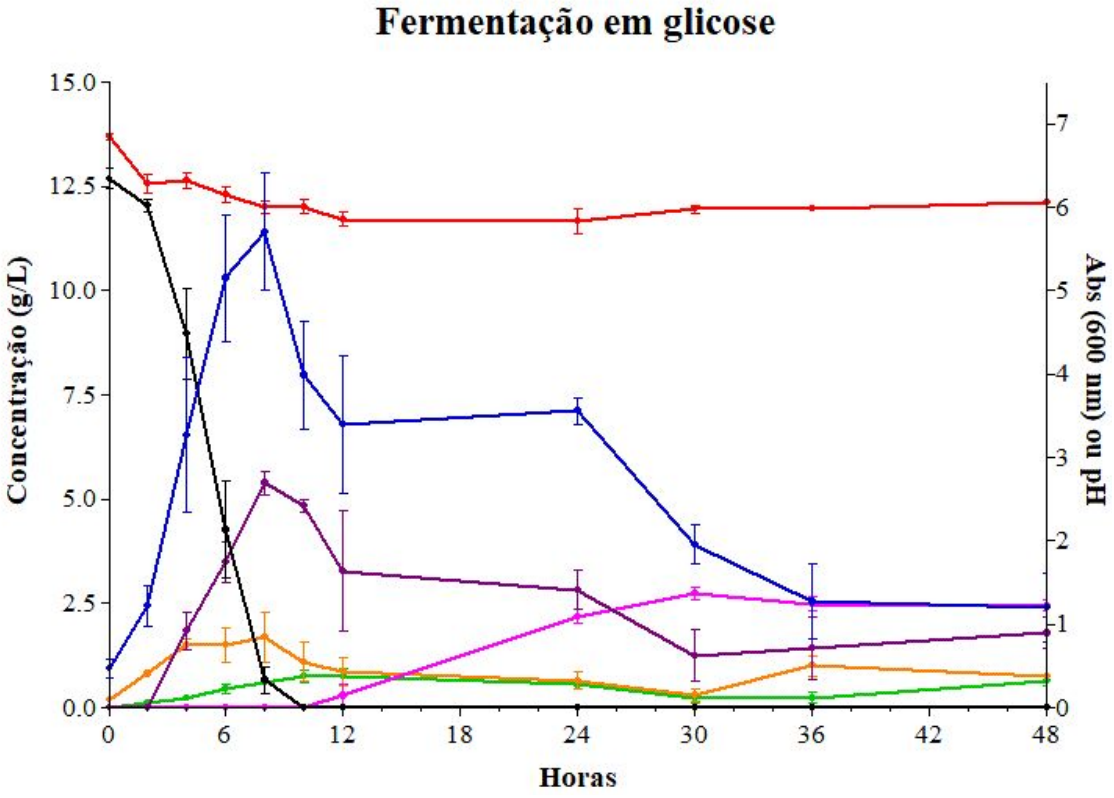


Figura 12: Fermentação em glicose. Curvas com valores de média e erro padrão para triplicatas biológicas. O eixo Y à direita corresponde às curvas de pH (vermelho) e crescimento (azul). O eixo Y à esquerda corresponde às curvas de fonte de carbono (preto), 2R,3R-BDO (roxo), acetoína (rosa), ácido acético (laranja) e ácido fórmico (verde).

Na fermentação com xilose (Figura 13) foi observada a produção majoritária de ácido acético, acetoína e 2R,3R-BDO. A produção de ácido fórmico foi pequena, enquanto que ácido succínico e meso-BDO não foram identificados pelas análises de HPLC. A fonte de carbono se esgotou após 10 horas de fermentação, mesmo tempo em que foi detectada a maior produção de 2R,3R-BDO. O pH inicial médio do meio na fermentação com xilose foi de 6,80

e é observado uma queda de seu valor até cerca de 4 horas de fermentação. O pH se manteve entre 6,10 e 6,20 a partir de 10 horas de cultivo

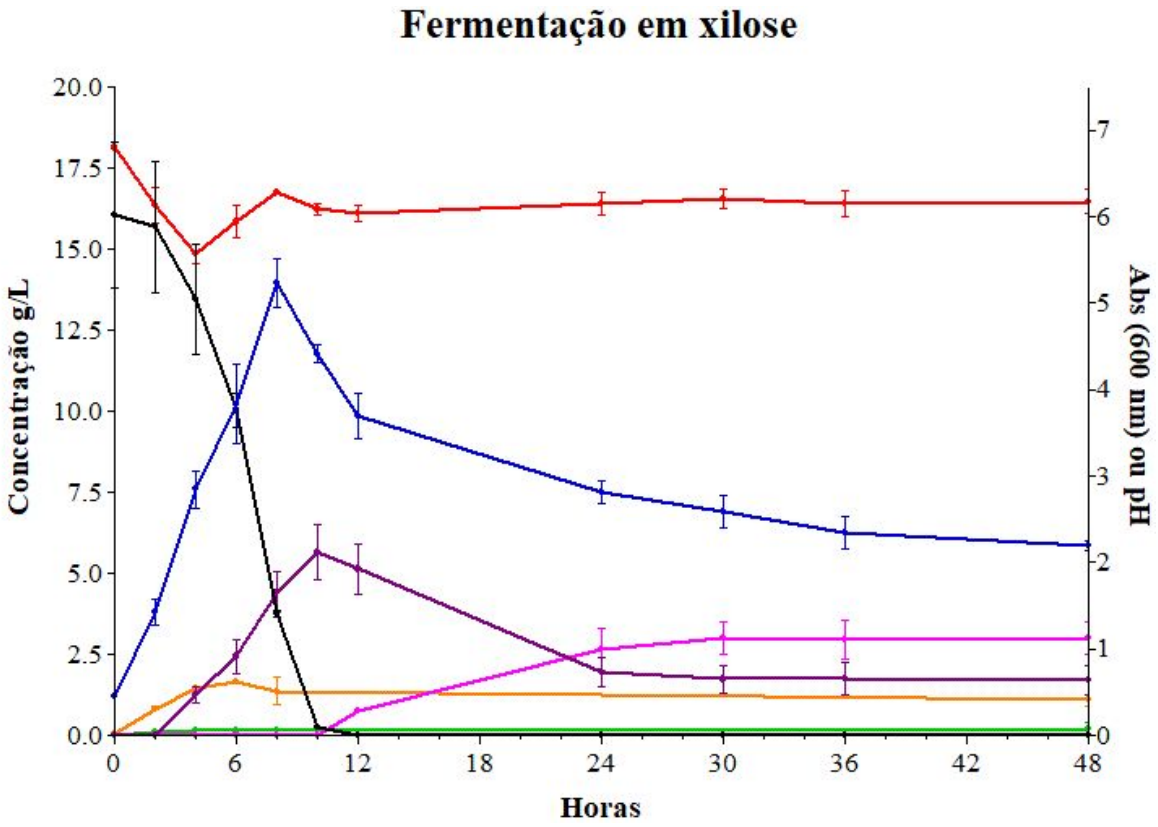


Figura 13: Fermentação em xilose. Curvas com valores de média e erro padrão para triplicatas biológicas. O eixo Y à direita corresponde às curvas de pH (vermelho) e crescimento (azul). O eixo Y à esquerda corresponde às curvas de fonte de carbono (preto), 2R,3R-BDO (roxo), acetoína (rosa), ácido acético (laranja) e ácido fórmico (verde). Nos pontos de 10 a 36 horas não foi possível quantificar os ácidos fórmico e acético.

Na fermentação com glicerol (Figura 14) foi observada a produção de ácido acético, ácido fórmico, acetoína e 2R,3R-BDO, enquanto ácido succínico e meso-BDO não foram detectados. Diferente das condições com glicose e xilose, o glicerol não se esgotou até às 48 horas de fermentação e o ponto de produção máxima de 2R,3R-BDO foi atingido tardiamente, em torno de 36 horas após o início do processo fermentativo. O pH inicial médio do meio na fermentação com glicerol foi de 6,90. Há uma redução do pH até o valor aproximado de 5,70, às 4 horas, que se mantém até 12 horas. Após esse tempo, o pH tende a voltar a aumentar, se mantendo em um valor maior do que 6.

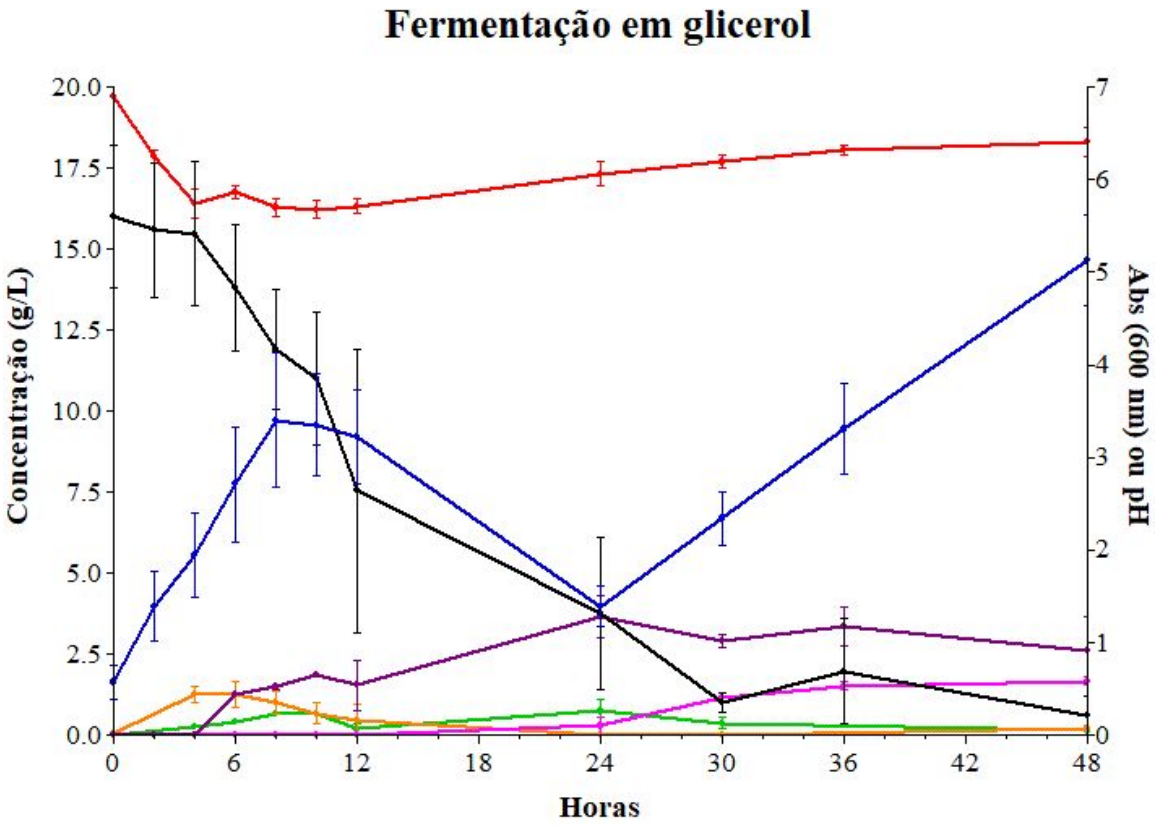


Figura 14: Fermentação em glicerol. Curvas com valores de média e erro padrão para triplicatas biológicas. O eixo Y à direita corresponde às curvas de pH (vermelho) e crescimento (azul). O eixo Y à esquerda corresponde às curvas de fonte de carbono (preto), 2R,3R-BDO (roxo), acetoína (rosa), ácido acético (laranja) e ácido fórmico (verde).

A partir das concentrações utilizadas de fonte de carbono e da produção máxima de 2,3-BDO em cada uma delas, foi calculado o rendimento dessa conversão. Assim, foi observado que em média, a glicose atinge 85,1%, enquanto a xilose atinge 58.3% e o glicerol, 48,2% de seus respectivos rendimentos teóricos. Os valores médios das razões foram: 0,43 g/g glicose, 0,35 g/g xilose e 0,24 g/g glicerol; o rendimento teórico (máximo) da reação de produção do 2,3-BDO é de 0,5g/g glicose (KALLBACH et al, 2017), 0,6g/g xilose (ZENG & SABRA, 2011) e 0,49g/g glicerol (SHEN et al, 2012). Diante das análises estatísticas, foi observado que há diferença significativa entre os rendimentos de glicose e glicerol ($p = 0,004$) e xilose e glicerol ($p= 0,03$), mas não entre os rendimentos de glicose e xilose ($p = 0,06$).

Os resultados mostram que nas três fontes de carbono há o aumento da produção de 2,3-BDO mediante a acidificação do meio.. Particularmente na condição de crescimento com glicerol os dois momentos em que foi observado o aumento da produção de 2,3-BDO estão sincronizados com alterações no pH.

4.2. Análise do Genoma de PM3605

4.2.1 Extração do DNA genômico

O DNA extraído apresentou concentração de 233,1 ng/µL com razão de A260/A280 igual a 1,83 e A260/A230 igual a 1,94. Esses valores indicam baixa presença de proteínas e compostos fenólicos na amostra de DNA, já que ficaram próximos a 1,8 e 2,0, como o descrito por Matlock (2015). A eletroforese em gel de agarose mostrou uma única banda de alto peso molecular, sem arrasto, indicando a integridade do material extraído (Figura 15A). O mesmo foi observado na análise da empresa de sequenciamento Macrogen (Figura 15B).

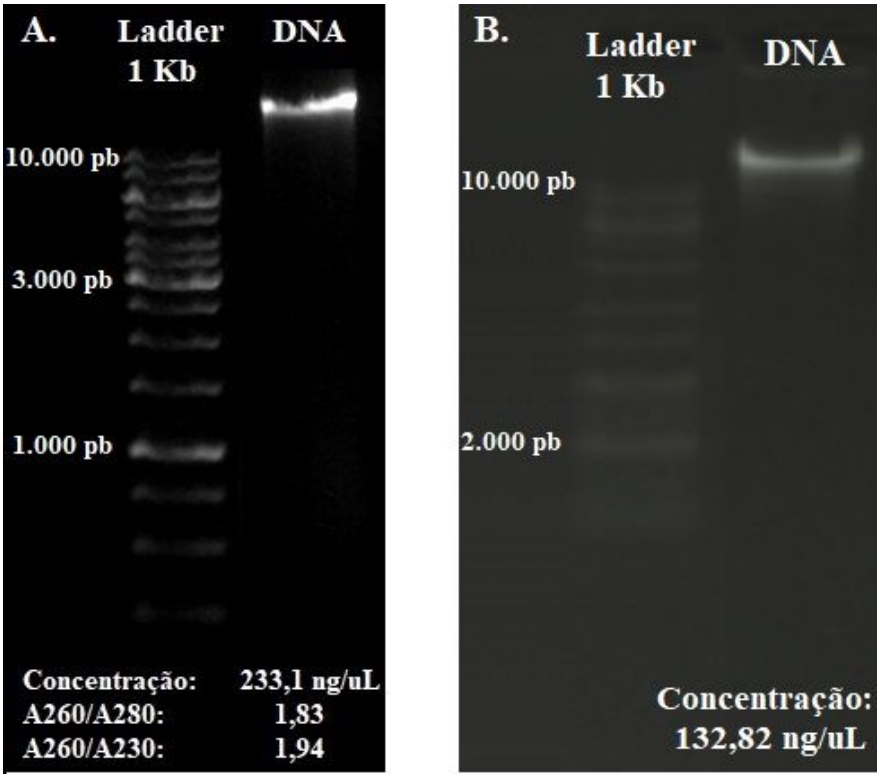


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose do DNA total extraído da cepa PM3605 de *P. polymyxa*. A) Gel gerado no laboratório, como controle de qualidade para o envio do DNA ao sequenciamento; B) Gel gerado no controle de qualidade da empresa Macrogen.

4.2.2 Sequenciamento, montagem e análise do genoma

O sequenciamento do DNA total gerou 5.712.267 *reads* pareados com tamanho médio de 100 pares de bases. A cobertura do sequenciamento foi estimada em aproximadamente 200 vezes. Os parâmetros analisados pelo programa FastQC mostraram que os *reads* senso possuíam qualidade média de 39. Na biblioteca de reads antissenso, a qualidade média foi de 36. O FastQC não reportou a presença de adaptadores e outros fragmentos altamente

representados nas duas bibliotecas, portanto, foram consideradas prontas para a etapa de montagem sem que houvesse necessidade de edição ou remoção de *reads* de baixa qualidade.

O tamanho do genoma da cepa PM3605 é de 5,536,689 pb e apresenta um conteúdo GC de 45,5%. A montagem realizada com o programa SPAdes gerou 437 *contigs* e 435 *scaffolds*, com valor de N50 e L50 de 527453 e 4, respectivamente (Tabela 4). A análise da integridade do genoma por meio da busca por genes ortólogos cópia única (BUSCO) compartilhado por procariotos mostrou que 98% destes genes foram encontrados em PM3605 (Tabela 4). Esse resultado mostra que a montagem do genoma da cepa PM3605 e a predição realizada pelo programa RAST tiveram um bom desempenho.

Tabela 4: Estatística de montagem reportada pelo *pipeline* RAST e avaliação da qualidade e integridade do genoma e da predição gênica pelo programa BUSCO.

RAST		BUSCO - 526 grupos de ortólogos (100%)	
Tamanho	5,536,689 pb	Ortólogos completos	515 (97,7%)
Conteúdo GC	45.5 %	Cópia única	506 (96,2%)
N50	527453	Duplicado	9 (1,7%)
L50	4	Ortólogos fragmentados	7 (1,3%)
Número de *scaffolds*	435	Ortólogos ausentes	4 (0,8%)

N50: Comprimento (em bases) do menor *scaffold* incluído em metade das bases da montagem; ou seja, *scaffolds* iguais ou maiores ao valor de N50 compreendem metade das bases da montagem

L50: Número de *scaffolds* iguais ou maiores que o comprimento N50, incluindo metade das bases da montagem

A anotação funcional realizada pelo RAST identificou 5.659 sequências codificantes (CDS). Destas, 1.831 CDS (33%) foram categorizadas de acordo com sua função (Figura 16). As demais (3.828 sequências, ou seja, 67% do total de CDS), mesmo anotadas, não foram incluídas em nenhuma dessas categorias.

A categoria de maior interesse para esta dissertação é a de Carboidratos, pois compreende enzimas envolvidas com o processamento de fontes de carbono, produção/degradação de EPS, fermentações e ciclo de Krebs. As 322 sequências alocadas nessa categoria correspondem a aproximadamente 17% das sequências categorizadas e 6% do total de CDS anotadas. Essa foi

também a categoria com maior representatividade no genoma da cepa PM3605 de *P. polymyxa*. As enzimas de combate ao estresse oxidativo, por sua vez, foram encontradas em categorias diversas, como ácidos nucléicos, metabolismo de enxofre e resposta a estresse.

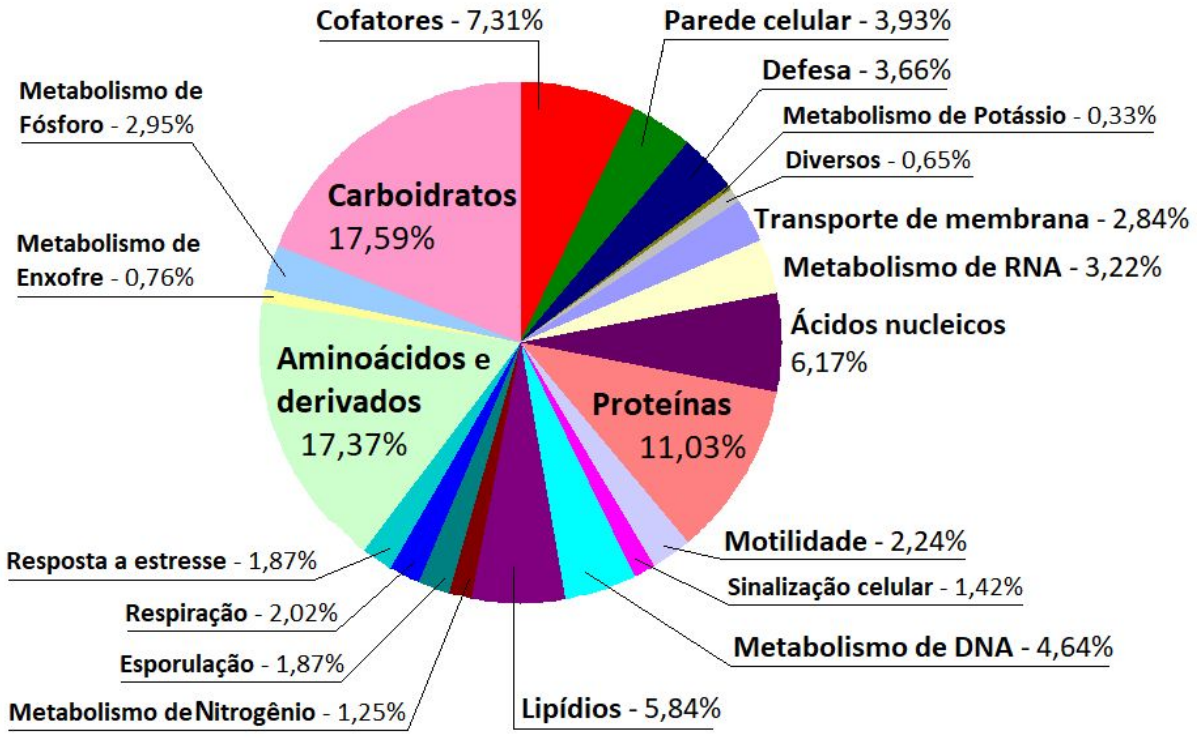


Figura 16: Principais categorias das proteínas anotadas pelo *pipeline* RAST. De 5.659 sequências anotadas automaticamente, o total de proteínas categorizadas foi de 1.831 (que corresponde a 100% das sequências representadas na figura). "Carboidratos", "Aminoácidos e derivados" e "Metabolismo de proteínas" são as três categorias mais expressivas nessa cepa de *P. polymyxa*. As categoria com menos que 0,33% não aparecem no gráfico. São elas: "Fagos, profagos, elementos transponíveis e plasmídeos", "Aquisição e metabolização de ferro", "Divisão e ciclo celular", "Metabolismo secundário" e "Metabolismo de compostos aromáticos".

4.3 Mapa metabólico e anotação de *operons*/*clusters* gênicos

A anotação (considerando as diferentes estratégias utilizadas) buscou 71 enzimas, das quais apenas 8 foram consideradas ausentes, enquanto 63 estão presentes (Anexos D e E). De acordo com esse mapeamento, todas enzimas que compõem a glicólise (via glicolítica), via de Entner-Doudoroff, via das pentoses, ciclo de Krebs, produção e degradação de EPS levana, sistema redox de tiol e fermentações de 2,3-BDO, ácido acético, etanol e L-lactato foram encontradas em *P. polymyxa* PM3605.

Por outro lado, as oito enzimas não identificadas nessa cepa (Tabela 5) estão envolvidas com rotas de produção de etanol, acetato, D-lactato e succinato, além do catabolismo de

acetoína/2,3-BD e a redução da glutationa (Figura 17). Apesar disso, duas dessas enzimas, 1,3-PDO desidrogenase e D-lactato desidrogenase, foram encontradas em outras cepas de *P. polymyxa*.

Tabela 5: Enzimas não encontradas no genoma da cepa PM3605 de *P. polymyxa*.

Enzima	**Via**
Glicerol desidratase	Fermentação de 1,3-PDO
1,3-propanodiol desidrogenase*	Fermentação de 1,3-PDO
D-lactato desidrogenase*	Fermentação de D-lactato
Piruvato descarboxilase	Fermentação de etanol
Succinato-coA transferase	Fermentação de acetato e succinato
Fosfotransacetilase	Fermentação de acetato
Acetoína desidrogase	Uso de 2,3-BDO/acetoína como fonte de carbono
Glutationa redutase	Sistema redox de tiol

* Enzima encontrada em outra(s) cepa(s) de *P. polymyxa*, mas não em PM3605

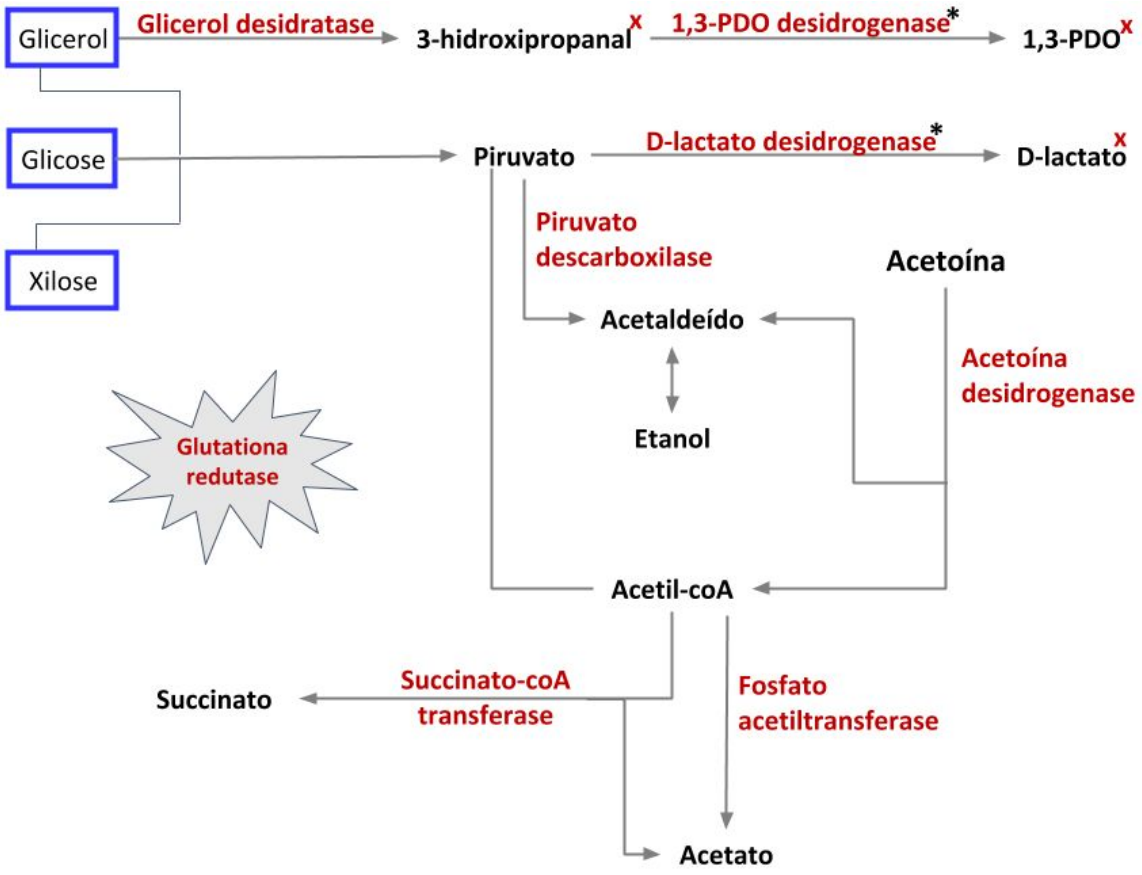


Figura 17: Vias ausentes em *P. polymyxa*. As enzimas, mostradas em vermelhos, estão ausentes, o que implica na ausência de vias fermentativas de acetato, succinato, etanol, D-lactato, 1,3-propanodiol, bem como do catabolismo de acetoína e do sistema redox glutationa. AcDH= Acetoína desidrogenase; D-LDH= D-lactato desidrogenase; PDO= propanodiol. Em negrito, substratos/produtos, onde aqueles com um "x" vermelho indicam produtos que não podem ser sintetizados. Retângulos azuis: fontes de carbono. Fundo cinza: combate ao estresse oxidativo. * Enzimas presentes em outras cepas de *P. polymyxa*, mas não em PM3605.

Ainda assim, existem outras rotas para a geração de etanol, acetato, succinato e metabolização de compostos contendo enxofre (Figura 18). Foi verificada na cepa PM3605 a presença das enzimas piruvato ferredoxina oxidorredutase (E.C. 1.2.7.1) e acetaldeído desidrogenase (E.C. 1.2.1.10) (sob os códigos 1406.159.peg.1394/1395 e 1406.159.peg.1479, respectivamente), componentes de vias alternativas para a produção de acetaldeído, permitindo a geração de etanol pela cepa. É necessário esclarecer que a enzima ferredoxina oxidorredutase tem como atividade clássica a conversão de piruvato a acetil-coA. Porém, essa enzima tem também a capacidade de atuar como piruvato descarboxilase (E.C. 4.1.1.1) convertendo piruvato a acetaldeído, o que justifica seu papel dúbio mostrado na Figura 18. Já o acetato pode ser sintetizado a partir de acetil-coA, através da enzima acetato-coA ligase (1406.159.peg.1558; E.C. 6.2.1.1), ou a partir de acetaldeído, através da enzima aldeído desidrogenase (1406.159.peg.4472; E.C. 1.2.1.4), ambas encontradas em *P. polymyxa*

PM3605. Quanto ao succinato, apesar de não haver uma via fermentativa correspondente a sua produção, sabe-se que esta molécula é um dos intermediários do Ciclo de Krebs, via que foi inteiramente mapeada neste genoma. Já o sistema redox de tiol pode ser efetuado pela presença da enzima tiorredoxina redutase, alocada na via sob o código ppm00450 no banco KEGG e detectada na cepa PM3605. Apenas D-lactato e 1,3-PDO não poderiam ser sintetizados, por não haver enzimas/vias alternativas para os mesmos que tenham sido encontradas em *P. polymyxa* PM3605.

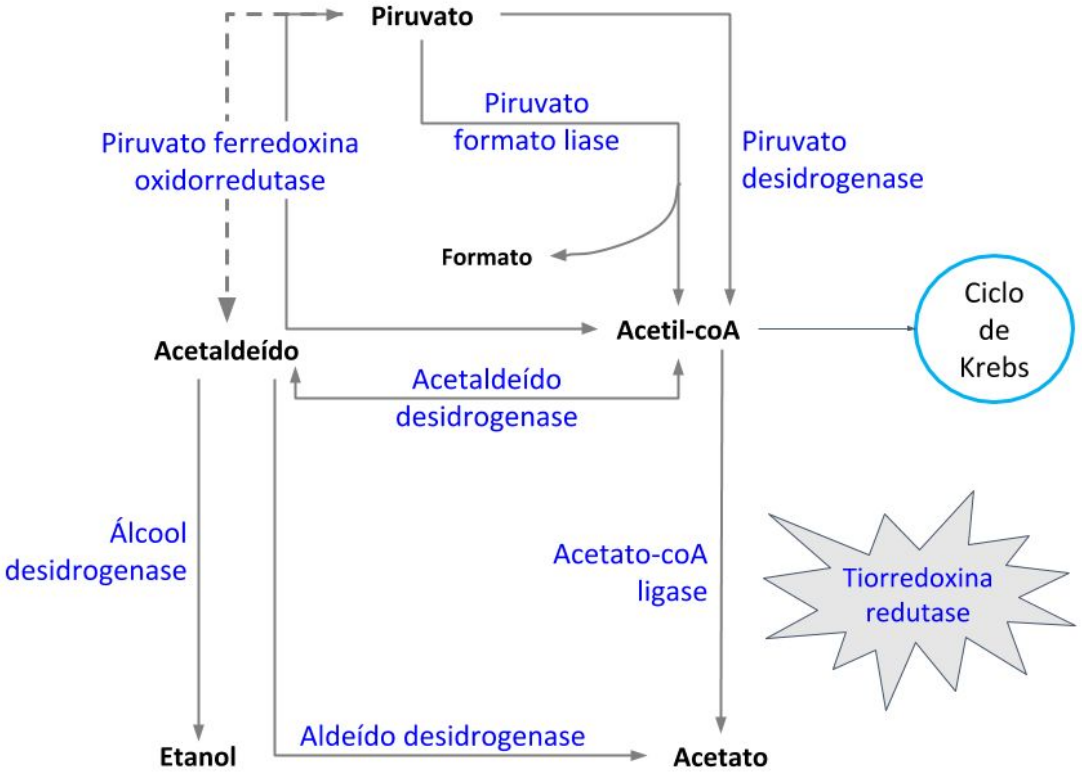


Figura 18: Vias alternativas para as vias consideradas ausentes. A seta tracejada indica uma reação não-clássica da enzima piruvato ferredoxina oxidorredutase. Em negrito, substratos/produtos; em azul escuro, enzimas. Fundo cinza: combate ao estresse oxidativo. O Ciclo de Krebs, via presente em *P. polymyxa*, foi representado por um círculo e suas enzimas foram omitidas a fim de simplificar a imagem.

Quanto ao metabolismo das fontes de carbono, a via glicolítica foi inteiramente mapeada, assim como a via de Entner-Doudoroff, ambas envolvidas na metabolização de glicose (Figura 19A). As enzimas fosfogluconato desidratase (1406.159.peg.5116; E.C. 4.2.1.12) e 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolase (KDPG aldolase - 1406.159.peg.2797; E.C. 4.1.2.14) são específicas à via de Entner-Doudoroff. A xilose e o glicerol também têm, cada um, duas formas de serem metabolizados pela célula que foram inteiramente mapeadas. No caso da xilose, as enzimas xilose isomerase e xiluloquinase são comuns a ambas as

estratégias. A diferença se dá na geração de gliceraldeído-3-fosfato (um intermediário da via glicolítica), o que pode ser feito através da via das pentoses ou diretamente pela ação da enzima fosfocetolase (1406.159.peg.4639; E.C. 4.1.2.9) (Figura 19B). No caso do glicerol as enzimas glicerol quinase (1406.159.peg.290; E.C. 2.7.1.30) e glicerol-3-fosfato desidrogenase (1406.159.peg.1363; E.C. 1.1.1.94) compõem uma estratégia de assimilação dessa fonte de carbono. Já na outra, as enzimas atuantes são glicerol desidrogenase (1406.159.peg.1720; E.C. 1.1.1.6) e diidroxicetona quinase (1406.159.peg.5052; E.C. 2.7.1.29) (Figura 19C). Independente da estratégia empregada é gerada diidroxicetona fosfato (também um intermediário da glicólise). Todas as enzimas/vias supracitadas estão presentes em em *P. polymyxa* PM3605.

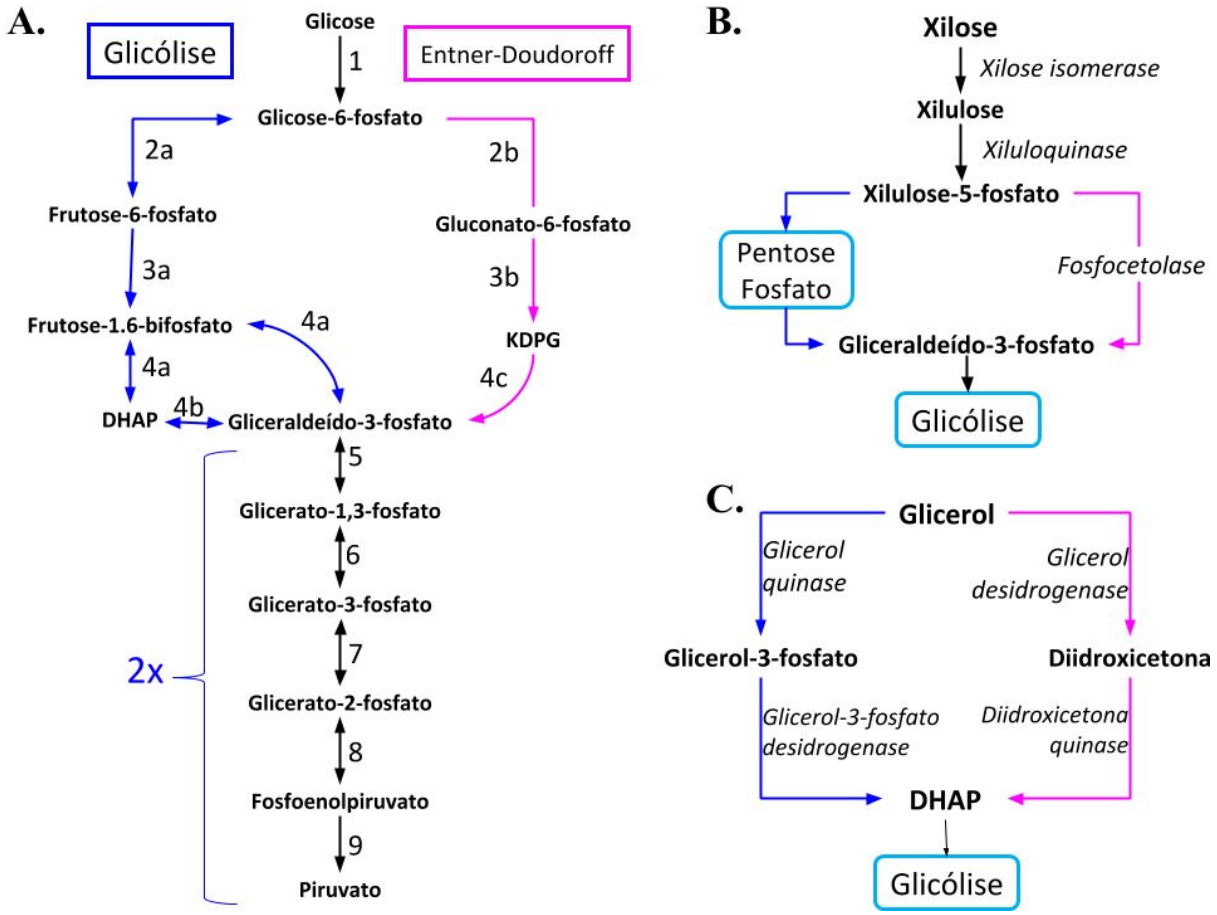


Figura 19: Vias alternativas para a assimilação de glicose, xilose e glicerol. A. Glicose. B. Xilose. C. Glicerol. 1= Glicoquinase; 2a= Glicose-6-fosfato isomerase; 2b= Glicose-6-fosfato desidrogenase; 3a= Fosfofrutoquinase; 3b= Fosfogluconato desidratase; 4a= Frutose-bifosfato aldolase; 4b= Triosefosfato isomerase; 4c= KDPG aldolase; 5= Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 6= Fosfoglicerato quinase; 7= Fosfoglicerato mutase; 8= Enolase; 9= Piruvato quinase. DHAP= Diidroxicetona fosfato; KDPG= 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato. Em negrito, substratos/produtos e em itálico, enzimas. Os retângulos indicam vias completas. Setas rosa e azul indicam alternativas diferentes de assimilação, enquanto setas pretas indicam etapas compartilhadas pelas alternativas.

Os *operons*/*clusters* gênicos que continham enzimas/vias de interesse também foram buscados. No total, 18 conjuntos gênicos foram mapeados (Tabela 6), onde 3 estão ausentes e 15 estão presentes (Anexo F). Esses resultados foram observados tanto na cepa PM3605 quanto nas cepas SC2 (referência) e E681 de *P. polymyxa*.

Tabela 6: *Operons*/clusters gênicos mapeados em *P. polymyxa*

Operon	**Enzimas**	**Status**
2,3-BDO (*alsSD*)	Acetolactato sintase (*alsS*) Acetolactato descarboxilase (*alsD*)	Presente
Produção de Etanol	Piruvato descarboxilase* Álcool desidrogenase	Ausente
Produção de Formato	Piruvato formato liase Enzima ativadora de piruvato formato liase	Presente
Produção de Acetato	Fosfotransacetilase* Acetato quinase	Ausente
Assimilação de Xilose (*xylAB*)	Xilose isomerase Xiluloquinase	Presente
Assimilação de Glicerol (I) (*GlpFK*)	Proteína facilitadora da captação de glicerol Glicerol quinase	Presente
Assimilação de Glicerol (II) #	Glicerol desidrogenase Diidroxicetona quinase Regulador transcricional da família AraC	Presente
Ciclo de Krebs	Citrato sintase Isocitrato desidrogenase Malato desidrogenase	Presente
Acetil-coA (*accD*)	Acetil-coA carboxil transferase - cadeia alfa Acetil-coA carboxil transferase - cadeia beta	Presente
Succinato desidrogenase	Succinate DH;subunidade citocromo b558 Succinato DH;subunidade flavoproteína Succinato DH; proteína ferro-enxofre	Presente
Succinil-CoA ligase	Succinil-CoA ligase - cadeia alfa Succinil-CoA ligase - cadeia beta	Presente

2-oxoglutarato desidrogenase	2-oxoglutarato DH; componente E1 2-oxoglutarato DH; componente E2	Presente
Glicólise #	Regulador de genes centrais da glicólise Triosefosfato isomerase Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase Fosfoglicerato quinase Fosfoglicerato mutase Enolase	Presente
pfk-pyk	Piruvato quinase Fosfofrutoquinase	Ausente
Complexo piruvato desidrogenase	Piruvato DH; componente E1, subunidade alfa Piruvato DH; componente E1, subunidade beta Diidrolipoamida acetiltransferase; componente E2 Diidrolipoamida acetiltransferase; componente E3	Presente
EPS (I)	Levansacarase 2,6-beta-frutano-6-levanbio-hidrolase	Presente
EPS (II) #	Transportador ABC de sacarose, proteína permease 2 Transportador ABC de sacarose, proteína permease 1 Transportador ABC de sacarose, SBP Levanase	Presente
Piruvato sintase	Subunidade alfa/beta Subunidade gama/delta	Presente

DH= desidrogenase; SBP= *substrate-binding protein* (proteína de ligação do substrato)
* Enzimas ausentes em *P. polymyxa*;
# Possíveis *clusters* gênicos

4.4 Butanodiol desidrogenases (BDHs)

A revisão da literatura, incluindo artigos científicos e bancos de dados, resultou em uma proposta contemplando o consenso atual sobre as enzimas que participam das rotas clássicas de produção de 2,3-BDO e acetoína, mais as enzimas ditas como alternativas para as reações (Figura 20). Com base nisso, a via de produção de acetoína envolvendo a enzima acetolactato

descarboxilase é capaz de gerar exclusivamente o isômero R dessa molécula. Na presença de uma R-BDH, que adiciona um centro quiral R, haverá a produção de 2R,3R-BDO. Já na presença de uma meso-BDH ou uma S-BDH, que adicionam um centro quiral S, há a formação de meso-BDO a partir da R-acetoína. Além disso, de acordo com alguns trabalhos, existem enzimas diacetil redutase (DAR) capazes de adicionar um centro quiral R, bem como outras capazes de adicionar um centro quiral S. Assim, a presença de DAR poderia levar à geração 3R-acetoína ou 3S-acetoína, dependendo do tipo presente no organismo. Além disso, o isômero 3S-acetoína pode ser gerado apenas através de diacetil, seja através de DAR ou da S-BDH. A situação é semelhante quando se trata de 2S,3S-BDO, já que este é gerado particularmente a partir de 3S-acetoína e não de 3R-acetoína. A partir de 3S-acetoína há, ainda, a possibilidade de gerar meso-BDO, mediante a presença de R-BDH. É possível perceber que meso-BDH e S-BDH são capazes de realizar as mesmas conversões, com iguais estereoespecificidades; isto é, ambas têm como substratos/produtos os isômeros 3S e 3R-acetoína, meso e 2S,3S-BDO, mas não 2R,3R-BDO.

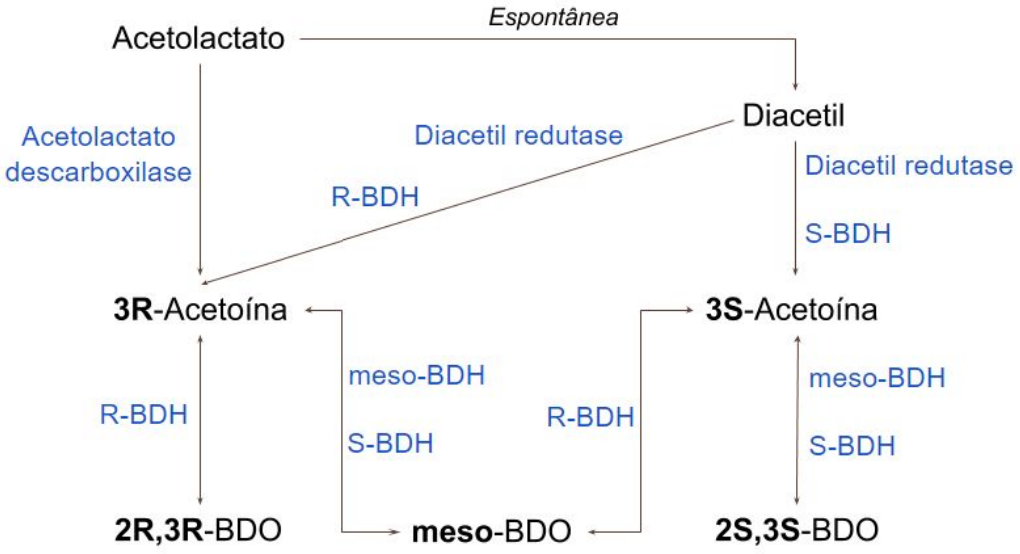


Figura 20: Produção dos isômeros de 2,3-BDO e acetoína. A determinação de quais isômeros serão gerados está relacionada à estereoespecificade da butanodiol desidrogenase (BDH) e diacetil redutase presentes em cada organismo. Os nomes das enzimas estão indicados na cor azul.

Posteriormente, foi realizada a análise de domínios conservados (DCs), que incluiu os três tipos de BDH, ou seja, S-BDH, meso-BDH e R-BDH (Figura 21). As sequências utilizadas para gerar a figura são representativas de cada tipo de BDH, onde a R-BDH pertence à *P. polymyxa* (código KEGG: PPSC2_18175), S-BDH à *B. saccharolyticum* (código Uniprot:

Q9ZNN8) e meso-BDH à *K. pneumoniae* (código Uniprot: Q48436). Ainda assim, resultados semelhantes foram encontrados com a grande maioria das BDHs já que todas tiveram seu conteúdo de DC avaliado. O resultado obtido na comparação dos três tipos de BDHs mostra uma relevante diferença entre R contra S ou meso BDHs, mas não entre S contra meso-BDHs.

Em relação ao tamanho, R-BDHs possuem quase 100 resíduos a mais do que S e meso-BDHs, possuindo aproximadamente 350 aminoácidos, enquanto as demais têm cerca de 260. Além disso, R-BDH é uma MDR (desidrogenase/redutase de cadeia média), enquanto S e meso-BDHs são SDRs (desidrogenase/redutase de cadeia curta), como explicado na introdução. Com isso, a primeira possui dois DCs, um domínio catalítico comum a álcool desidrogenases (ADH_N) e outro, que costuma estar relacionado ao primeiro em MDRs, de ligação ao zinco (ADH_zinc_N). Já as duas outras BDHs possuem um único domínio, clássico de SDRs (adh_short).

Figura 21: Domínios conservados (DCs) presentes em três butanodiol desidrogenases clássicas representativas. adh_short é o DC de desidrogenases/redutases de cadeia curta (SDR) tradicionais, enquanto ADH_zinc_N é um DC de desidrogenases/redutases de cadeia média (MDR) tradicionais. Ppol= *P. polymyxa*; Bsac= *B. saccharolyticum;* Kpne= *K. pneumoniae*. R= R-BDH, S= S-BDH; m= meso-BDH. Imagem adaptada do resultado fornecido pela busca em conjunto (*Batch CD-search*) do NCBI, utilizando o Pfam como base de dados.

Há a presença dos mesmos domínios conservados, de forma homogênea, entre R-BDHs de diferentes organismos. Isto é, não há, aparentemente, diversidade de domínios entre R-BDHs. Enquanto R-BDH é bem definida, meso-BDH e S-BDH podem ser confundidas entre si. Além disso, a enzima DAR também é uma SDR (YANG et al, 2014), mostrando maior semelhança

às duas BDHs de cadeia curta (S e meso) e reforçando que R-BDH é singular dentre esse grupo de enzimas. Com isso, a tentativa de melhor elucidar as diferenças entre BDHs, através de construção de uma árvore filogenética, reuniu apenas meso e S-BDH, mas não R-BDH. As breves diferenças mostradas pela literatura entre meso e S-BDH reforçaram essa decisão.

As sequências de S e meso-BDHs utilizadas para a construção da árvore filogenética passaram pela mesma análise de DC. Com isso, foi observado que entre elas havia não só enzimas com o domínio clássico de SDRs (código Pfam PF00106), mas também enzimas com um outro domínio redutase, enoil-(proteína carreadora de acil)-redutase (ER) (código Pfam PF13561). A fim de verificar a distribuição na árvore de enzimas com esses diferentes DCs e para evitar um viés na análise, foram selecionadas mais enzimas com o domínio ER, igualando ao número daquelas com o DC SDR clássico. Isso resultou nas 48 sequências empregadas na construção da árvore (Figura 22). Além disso, a meso-BDH clássica (*K. pneumoniae*) tem a tríade não catalítica estereo-seletiva QNW (preto), enquanto a S-BDH clássica (*B. saccharolyticum*) tem a tríade IFW (azul claro) e as tríades cinza e azul escuro são variações das tríades preta e azul claro, respectivamente.

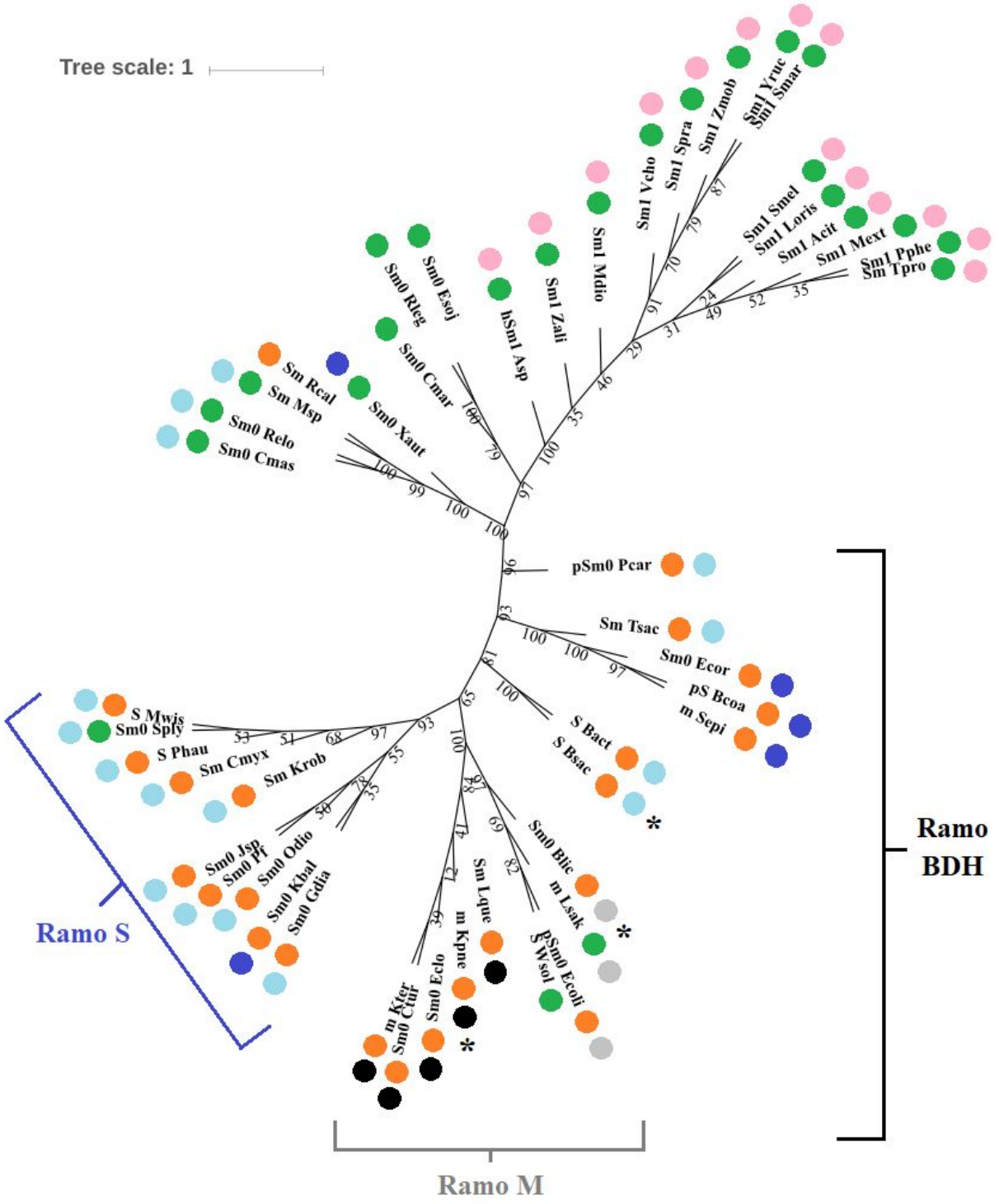


Figura 22: Árvore filogenética de S e meso-BDHs de diversas bactérias. Verde: domínio enoil-(proteína carreadora de acil)-redutase (PF13561) e; Laranja: domínio desidrogenase/redutase de cadeia curta (PF00106); Rosa: tríade não-catalítica Val-Asp-Thr (VDT); Azul escuro: tríade não-catalítica Ile-Tyr-Trp (IYW); Azul claro: tríade não-catalítica Ile-Phe-Trp (IFW); Preto: tríade não-catalítica Gln-Asn-Trp (QNW); Cinza: tríade não-catalítica Gln-Asn-Met (QNM). * Enzimas com evidência experimental. A nomenclatura das sequências foi baseada nas suas classificações PRÉVIAS (S = S-BDH; m = meso-BDH; Sm = S/meso-BDH; Sm0 = S/meso-BDH código K003366 (KEGG); Sm1 = S/meso-BDH código K18009 (KEGG); p = putativa; h = hipotética) seguida da primeira letra do nome do gênero e das três primeiras letras do epíteto específico (exemplo: meso-BDH de *Klebsiella pneumoniae* = m_Kpne); a lista completa dos organismos se encontra no Anexo G. A tríade não catalítica estereosseletiva é referente ao reconhecimento estereoespecífico do substrato; a tríade catalítica não foi indicada na árvore, pois é igual para todas as enzimas presentes.

A visualização não enraizada da árvore mostrou que as enzimas se agrupam de acordo com os DCs que possuem (SDR em laranja e ER em verde), cada grupo em extremidades diferentes da árvore, separadas por um *bootstrap* de valor 96 (sendo denominado de ramo BDH o que contém as sequências com domínio SDR). A exceção foram as sequências m_Lsak, S_Wsol e Sm0_Sply que apesar de possuir o domínio ER se agruparam no ramo BDH e Sm_Rcal, que possui o domínio SDR e ficou localizada no clado ER. Independente da classificação prévia das sequências como meso ou S-BDHs, ou mesmo da falta de classificação (nomenclatura S/meso), foi possível identificar um clado (ramo M) com suporte de 100% de *bootstrap* contendo todas as sequências com base experimental de atividade meso-BDH na literatura (m_Kpne e Sm0_Blic). Neste ramo, as proteínas apresentaram apenas dois tipos de tríade estereo-seletiva (QNW e QNM - preta e cinza na Figura 22) correlacionadas com esta atividade. O ramo S (93% de *boostrap*) agrupou sequências com tríade não catalítica estereo-seletiva (IFW) igual a da sequência com atividade S-BDH já comprovada experimentalmente (S_Bsac), a qual ficou alocada em um ramo com suporte de 81%. Quase todas as sequências do ramo S (9/10) possuíram a tríade estereo-seletiva IFW, também já correlacionada com a atividade S-BDH. Outros clados também tiveram sequências com potencial atividade S-BDH por possuírem mesmo DC, tríade não catalítica IFW ou IYW, e por estar dentro do grande ramo BDH, apesar de não agrupadas com o ramo S citado anteriormente. Ainda assim, o que de fato parece ser capaz de separar meso-BDH e S-BDH na árvore é a tríade de resíduos não-catalíticos estereo-seletivos.

A análise de função enzimática (Tabela 7) mostrou que dois exemplos de enzimas meso e S-BDH têm diferenças de Km para seus substratos. Esses valores sugerem que esta S-BDH faça a reação preferencialmente no sentido 2,3-BDO + NAD^+ → acetoína + NADH + H^+, pois o Km para 2S,3S-butanodiol é menor que o da S-acetoína e o do NAD^+ é menor que o do NADH. O oposto deve acontecer para a meso-BDH exemplificada na Tabela 7, fazendo a reação no sentido acetoína + NADH + H^+ → 2,3-BDO + NAD^+. Apesar destes dados sugerirem direções preferenciais opostas para estas duas S e meso BDHs isso não pode ser generalizado para todas estas enzimas. Entretanto, os demais dados disponíveis para as BDHs não permitem comparar a utilização de substratos pelas mesmas. No banco *Brenda enzymes* não foram encontradas informações de Km para a utilização de R-acetoína e meso-BDO para S-BDH, bem como não há de S-acetoína e 2S,3S-BDO para meso-BDH, além de não haver para ambas dados de Km para diacetil.

Tabela 7: Valores de Km para S e meso-BDH clássicas, com diferentes substratos.

Enzima (organismo)*	Substrato	Km (mM)
S-BDH (*B. saccharolyticum*)	3S-acetoína	0,44
	2S,3S-butanodiol	0,22
	NADH	0,1
	NAD^+	0,07
meso-BDH (*K. pneumoniae*)	3R-acetoína	0,65
	meso-2,3-butanodiol	13
	NADH	0,05
	NAD^+	0,66

* As condições utilizadas para cada organismo foram diferentes.
Fonte: banco de dados *Brenda enzymes*.

5. Discussão

5.1 Fermentações: curvas de crescimento e HPLC

As espécies do gênero *Paenibacillus* têm aplicações diversas, se destacando quanto aos seus benefícios aos vegetais e a produção de compostos de interesse humano (GRADY et al, 2016). A espécie *P. polymyxa* desperta um grande interesse para a produção industrial do 2,3-BDO, um álcool de alto valor agregado. Além de ser um organismo seguro, essa bactéria tem a capacidade de produzir o isômero levorrotatório com uma alta pureza (XIE et al, 2015).

Apesar de ser capaz de utilizar variadas fontes de carbono, a própria fermentação em glicose com *P. polymyxa* não apresenta rendimentos tão altos se comparado a espécies como *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*. Há relatos de que essas bactérias patogênicas são capazes de atingir mais de 80% do rendimento teórico em glicose (GE et al, 2014). Entretanto, diversos relatos em *P. polymyxa* registram rendimentos que não chegam a 70% desse teórico (ADLAKHA & YAZDANI, 2015; MA et al, 2018). Apesar de certos trabalhos considerarem rendimentos acima de 60% como satisfatórios (KALLBACH et al, 2017), o ideal é atingir com organismos seguros rendimentos iguais ou superiores aos de bactérias patogênicas.

A cepa utilizada no trabalho, por outro lado, teve um rendimento equiparável às espécies de *Klebsiella*. A bactéria *P. polymyxa* PM3605 foi capaz de atingir 85,1% do rendimento teórico em glicose, sugerindo maior eficiência na produção de 2,3-BDO por esta cepa em comparação com outras das mesma espécie. Além disso, o experimento foi realizado sem controle da variação de pH, enquanto as espécies de *Klebsiella* foram mantidas em um pH ótimo durante todo o processo. A implementação de processos com condições mais controladas, ou em biorreatores, poderia ser uma maneira de auxiliar o aumento dessa produção, como realizado por diversos trabalhos na literatura.

No caso da xilose, o rendimento médio obtido (0,35 g/g) é próximo, e até superior, ao rendimento da produção de 2,3-BDO obtido em vários trabalhos que se utilizaram de resíduos lignocelulósicos. O resultado obtido na fermentação com xilose comercial é promissor quanto à capacidade da bactéria utilizada em metabolizar fontes residuais contendo essa pentose. Além disso, é interessante observar que não foram necessárias modificações genéticas para atingir essa satisfatória assimilação da xilose, diferentemente de certas cepas de *K. pneumoniae*, por exemplo (GUO et al, 2018).

Em glicerol, *P. polymyxa* obteve 48,2% do rendimento teórico da conversão dessa fonte de carbono a 2,3-BDO. Esse resultado é consideravelmente inferior aos encontrados na literatura. Entretanto, não há muitos trabalhos disponíveis acerca da utilização de glicerol por essa espécie na produção de 2,3-BDO. Estudos neste tópico seriam importantes para compreender os principais fatores limitantes do processo, além das condições mais favoráveis à produção. Além disso, foram realizadas fermentações em *shaker*, por batelada simples. Já os demais trabalhos da literatura, principalmente aqueles que atingem maior rendimento, costumam realizar batelada alimentada em condições de pH, temperatura e aeração controladas. Estes fatores contribuíram para a obtenção de um rendimento não satisfatório na conversão de glicerol a 2,3-BDO.

Além disso, a fermentação em glicerol tem uma característica peculiar. O perfil de crescimento da bactéria se assemelha ao crescimento diáuxico. Entretanto, como o pré-inóculo é centrifugado antes da massa celular ser adicionada ao meio de inóculo, não há resíduo de glicose na fermentação, excluindo a possibilidade de diauxia. Além disso, é possível observar que o glicerol é utilizado durante todo o tempo de fermentação, reforçando a exclusão dessa possibilidade.

Uma hipótese para responder essa questão é que esteja havendo produção de EPS. Essas moléculas costumam ser produzidas como resposta ao estresse, incluindo restrições nutricionais (HABLER et a, 2012). A Figura 14 mostra uma retomada no aumento da absorbância após as 24 horas de fermentação. Neste momento, a concentração de glicerol já é baixa (menos de 5 g/L, em média), o que poderia sinalizar estresse e estimular a produção de EPS. Como o EPS pode afetar certas propriedades do meio, espera-se que o aumento da sua concentração afete a leitura de absorbância, aumentando-a. Entretanto, as observações visuais do meio fermentativo não indicavam um aumento da viscosidade acompanhando o aumento da absorbância lida, o que seria esperado, de acordo com as características do EPS comumente produzido por *P. polymyxa* (PRIEST, 2015). Além disso, no caso das fermentações em glicose e xilose, não há um perfil que se assemelhe ao observado em glicerol, mesmo que essas fontes de carbono glicídicas se esgotem mais precoce e rapidamente. Diante desses argumentos, é possível inferir que a causa do perfil peculiar de crescimento da cepa PM3605 em glicerol não seja a produção de EPS. Uma segunda hipótese com maior potencial de explicar o fenômeno observado é a influência do pH na fermentação.

De acordo com os resultados obtidos nas três fontes de carbono, a produção de ácido acético se inicia sempre antes da produção de 2,3-BDO. É relatado pela literatura que a produção de ácido acético é um fator relacionado ao 2,3-BDO. A relação do aumento da geração de 2,3-BDO em processos fermentativos com adição deste ácido já foi relatada em diversos organismos, inclusive *P. polymyxa* (NAKASHIMADA et al, 2000). Esse efeito seria devido a um aumento da expressão das enzimas acetolactato sintase, acetolactate descarboxilase e BDH, envolvidas na produção de 2,3-BDO (LEE et al, 2016).

Nas diferentes fontes glicídicas, quando o ácido atinge sua maior concentração há uma aparente tendência em mantê-la em um platô durante um tempo (maior ou menor dependendo da fonte de carbono) e depois reduzi-la. Pouco antes ou ao mesmo tempo em que a concentração máxima de ácido acético é atingida, a produção de 2,3-BDO inicia ou se intensifica. Essa troca de produto fermentativo é acompanhada por uma alteração no pH, que deixa de ser acidificado, ou diminui a velocidade de acidificação. Porém, a concentração do 2,3-BDO e o crescimento usualmente caem a partir do esgotamento da fonte de carbono. Além disso, seus perfis se assemelham, permitindo declarar a relação já esperada entre a propriedade de geração dos produtos fermentativos pela cepa com sua capacidade em metabolizar a fonte de carbono fornecida. Já no caso do glicerol, sua utilização é mais lenta, permitindo uma melhor interpretação da relação entre o metabolismo bacteriano e a variação de pH do meio. É possível inferir que o perfil de crescimento em duas curvas seja resultado de uma reprogramação metabólica. Isto é, cada curva de crescimento é resultado de um diferente conjunto metabólico, havendo um ajuste metabólico entre a primeira e a segunda curva. Esse ajuste pode estar diretamente ligado às variações de pH e à disponibilidade de oxigênio.

Entre 0 e 4 horas de fermentação, na metade da primeira fase exponencial da bactéria, há uma queda de pH, que chega a um valor de 5,7 em média, e que não é prontamente aumentado (como no caso da fermentação em xilose), permanecendo até cerca de 12 horas. Talvez a manutenção desse pH por mais tempo leve a bactéria a entrar em fase estacionária (8-12h) e depois um pouco de morte celular (12-24h), mesmo ainda havendo glicerol disponível para ser fermentado. O consumo de glicerol ainda existe na mesma taxa no intervalo de 8-12h e decresce de 12-24h. Há um aumento na concentração de 2,3-BDO e queda da concentração de ácido acético em todo este intervalo (8-24h), sugerindo que a opção fermentativa foque na correção do pH. Entre 12 e 24 horas o pH é elevado para 6,06 (em média), acredita-se pela produção de 2,3-BDO, e não de ácido acético. Juntos, esses

resultados podem ser um indicativo de que o meio estava excessivamente ácido, levando exatamente a uma reprogramação metabólica, que resultaria no segundo perfil de crescimento.

A partir de 24 horas é então observado um novo aumento na absorbância. Com o meio agora em pH em torno de 6,06, havendo ainda glicerol e havendo 2,3-BDO, as condições seriam adequadas novamente para o crescimento da bactéria, mas não para a produção de 2,3-BDO. De acordo com isso, é exatamente observado uma queda na concentração de glicerol e 2,3-BDO, e um certo acúmulo da acetoína, que começou a ser produzida em torno de 24 horas de fermentação. As observações realizadas estão de acordo com o que é postulado pela literatura, reforçando a que o efeito do pH é decisivo durante a fermentação de 2,3-BDO e acetoína.

Uma importante característica de *P. polymyxa* foi também reforçada pelos resultados obtidos. É possível observar que, independente da fonte de carbono utilizada, houve a produção apenas do isômero 2R,3R-BDO. De acordo com a literatura, isso pode acontecer em decorrência da microaeração (DAI et al, 2014), condição empregada nos experimentos realizados pelo uso da rotação de 200 rpm, que propicia essa condição (CHAN et al, 2016). Industrialmente, essa produção é vantajosa por dispensar etapas custosas de separação dos isômeros. Isso reforça a aplicabilidade da cepa PM3605 para a produção de 2R,3R-BDO.

Em todas as fontes de carbono pode ser observada uma relação entre o aumento da concentração de acetoína e a diminuição da concentração de 2,3-BDO. Esses dois eventos ocorrem em momentos próximos e também coincidem com o esgotamento da fonte de carbono. Entretanto, apesar da possibilidade já descrita na literatura de utilização da acetoína para sobrevivência (JOHANSEN et al, 1975), isso não foi observado nas fermentações conduzidas.

No caso das três fontes de carbono, a acetoína aumenta de concentração e atinge um platô, o que também acontece após uma redução proporcional na concentração do 2,3-BDO. Além disso, a bactéria não se mantém em fase estacionária, mas sim parece entrar em fase de morte, de acordo com as curvas de crescimento de glicose e xilose. Esses fenômenos, juntos, sugerem que a cepa PM3605 de *P. polymyxa* não deve ser capaz de utilizar acetoína para sua sobrevivência mesmo que a fonte de carbono já tenha se findado. Esse comportamento é relacionado à ausência da enzima acetoína desidrogenase, o que foi confirmado pelos resultados de bioinformática do genoma sequenciado.

Em organismos que possuem essa enzima, é observada a manutenção da bactéria em uma fase estacionária e como a acetoína é utilizada para essa finalidade, sua concentração se reduz após algumas horas do início desse processo. Em estudos com *B. subtilis* o gene da acetoína desidrogenase foi silenciado (HUANG et al, 1999; WANG et al, 2012) e os resultados obtidos são semelhantes aos observados com a cepa de *P. polymyxa* utilizada neste estudo. Outros aspectos relacionados a essa enzima são abordados na seção de discussão dos resultados de vias metabólicas.

5.2 Genoma

Diversos trabalhos já observaram a conservação de características entre cepas de *P. polymyxa*, o que é mais expressivo quando se trata de fatores relacionados à promoção do crescimento vegetal e fixação de nitrogênio. Independente do ambiente ou região geográfica de onde cada cepa foi isolada, seus genomas apresentam alta similaridade quanto à organização e sequência nucleotídica. Assim como na cepa utilizada neste trabalho, o genoma das demais cepas de *P. polymyxa* têm um conteúdo GC em torno de 45%, tamanho entre 5 e 6 Mb, e mais de 5.000 genes. Além disso, estudos genômicos observaram que, assim como na cepa PM3605, outras cepas de *P. polymyxa* têm uma grande representação do metabolismo de carboidratos e aminoácidos/proteínas em seus genomas (EASTMAN et al, 2014; LIU et al, 2017; LUO et al, 2018; XIE et al, 2016).

Ainda assim, estas bactérias apresentam diferenças suficientes para serem consideradas cepas distintas. Uma análise acerca da diversificação de seus genomas mostrou que as regiões variáveis não são uniformemente distribuídas. Existem regiões isentas de variações, as quais contêm genes vinculados ao reparo de dano ao DNA, replicação e manutenção celular (conhecidos como "*house-keeping*"). Por outro lado, um número ainda maior de regiões altamente variáveis foi encontrado e grande parte delas contém genes relacionados ao metabolismo secundário (por exemplo, síntese de antibióticos). Essa diversidade seria consequência da adaptação aos respectivos ambientes de onde as cepas foram isoladas. Um fator interessante que contribuiria para as peculiaridades de cada uma é a rizosfera de onde foram isoladas, já que cada tipo de vegetal proporcionaria a essa rizosfera certas características (EASTMAN et al, 2014; LIU et al, 2017; LUO et al, 2018; XIE et al, 2016).

5.3 Mapa metabólico e anotação de *operons*/*clusters* gênicos

A elaboração de mapas metabólicos e a utilização de modelos computacionais contribuem consideravelmente ao entendimento e melhoramento de processos industriais envolvendo microrganismos (ORTH et al, 2010). Além disso, é importante compreender a organização de conjuntos gênicos presentes no genoma, como *operons* e *clusters*, já que há uma implicação disso na regulação da expressão gênica. Os *operons* são unidades gênicas, isto é, todos os genes contidos em um determinado *operon* serão parte de um mesmo produto de transcrição, um RNA policistrônico. Por outro lado, um *cluster* gênico contém genes que sofrem transcrição separadamente, mas suas posições são conservadas. Uma característica importante para diferenciá-los é a direção dos genes que os compõem, pois em um *operon* todos estão em uma mesma direção, o que não é uma regra quando se trata de *clusters* gênicos. Ainda assim, os *clusters* podem conter *operon*(s), além de genes individuais (YANG & SZE, 2008; ZAIDI & ZHANG, 2017), apesar de 60% dos genes em procariotos serem encontrados em *operons* (MORENO-HAGELSIEB, 2015). Porém, é interessante ressaltar que há uma forte relação entre a conservação de genes vizinhos e a frequência de uma mesma direção dos genes em um *cluster* gênico (YANG & SZE, 2008). Além disso, os genes de muitas vias metabólicas (ou parte delas) são organizadas em conjuntos gênicos.

Quanto ao organismo estudado, uma característica em comum entre as três fontes de carbono (glicose, xilose e glicerol) é a existência de mais de uma possibilidade de rota de metabolização (Figura 19). No caso da glicose há a glicólise e a via de Entner-Doudoroff. Já a xilose pode ser assimilada de maneira dependente ou independente da via das pentoses. O glicerol, por fim, pode ingressar na glicólise através de duas estratégias, mas ambas capazes de gerar diidroxicetona fosfato, um intermediário da via glicolítica.

A via de Entner-Doudoroff é uma estratégia glicolítica alternativa à glicólise (Figura 19A), via mais estudada e conservada entre todos os organismos. Os pesquisadores, que deram seus nomes à via, a descobriram em 1952 em *Pseudomonas saccharophila* (ENTNER & DOUDOROFF, 1952). Apesar de ser uma via útil para a metabolização de derivados catabólicos, como o gluconato (PEEKHAUS & CONWAY, 1998), diversas bactérias a utilizam propriamente no metabolismo de glicose. Em comparação com a glicólise, há uma diferença não só nos cofatores utilizados, mas no rendimento de ATP. A via tradicional de Entner-Doudoroff tem saldo de 1 ATP, além de gerar 1 NADH e 1 NAPDH, contra um saldo de 2 ATPs e 2 NADHs da glicólise. Essa diferença se dá pelo fato da enzima KDPG aldolase

gerar como produtos gliceraldeído-3-fosfato e piruvato, levando à omissão de reações da fase de pagamento da glicólise.

Mesmo com um menor rendimento energético, é possível observar uma conservação dessa via, especialmente em bactérias gram-negativas, o que foi alvo do trabalho de Flamholz e colaboradores (2013). Esse estudo verificou um alto custo energético da glicólise, devido à maior necessidade de maquinaria enzimática, enquanto a via de Entner-Doudoroff envolve um custo proteico 3 a 5% menor. Além disso, a glicólise tem um gargalo termodinâmico, isto é, um conjunto de reações termodinamicamente desfavoráveis. As reações de gliceraldeído-3-fosfato a glicerato-2-fosfato fazem parte deste gargalo, sendo omitidas na via de Entner-Doudoroff a custo de rendimento de ATP. Diante desse fato, o artigo relata que, mediante a presença de outras vias de produção de ATP, a bactéria seria menos dependente da energia gerada na glicólise e optaria por realizar uma via com menor custo proteico. Foi observado que organismos anaeróbicos usam a glicólise quase exclusivamente, devido a essa dependência. Já em bactérias aeróbicas, a via de Entner-Doudoroff é super representada, enquanto organismos facultativos tendem a ter ambas estratégias (FLAMHOLZ et al, 2013).

Além disso, é interessante salientar que os genes que fazem parte do gargalo termodinâmico da glicólise são encontrados em um mesmo conjunto gênico, presente não apenas em variadas cepas de *P. polymyxa* (Figura 23E), mas também em outras espécies. De acordo com o ProOpDB, os genes das enzimas fosfoglicerato quinase, fosfoglicerato mutase (independente de 2,3-bifosfoglicerato) e enolase estão organizados em um *operon*. Contudo, genes de outras três enzimas (regulador de genes centrais da glicólise, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD^+ e triosefosfato isomerase) são conservados em conjunto com este *operon* em diversos outros organismos, de acordo com o RAST e a literatura (LUDWIG et al, 2001; RUD et al, 2010). Após a averiguação no RAST, ProOpDB e literatura, é possível sugerir que esse conjunto de genes é um *cluster* conservado que contém não só unidades gênicas individuais, como também um *operon* (que inclui as enzimas fosfoglicerato quinase, fosfoglicerato mutase e enolase). Quanto à via de Entner-Doudoroff, não foram encontrados conjuntos gênicos associados à mesma, seja em *P. polymyxa* ou outros organismos.

Ainda assim, a via de Entner-Doudoroff é amplamente estudada em bactérias gram-negativas, apesar de ser pouco conhecida sua verdadeira relevância e ocorrência em bactérias gram-positivas. Muitos estudos costumam considerar que esta via esteja ausente na

maioria dessas bactérias, apesar de evidências da sua presença em espécies de *Bacillus*. Além disso, uma forma de verificar sua ocorrência é através de duas enzimas consideradas específicas da via de Entner-Doudoroff: fosfogluconato desidratase e KDPG aldolase (FLAMHOLZ et al, 2013; KERSTERS & DE LEY, 1968; SUTTER et al, 2016).

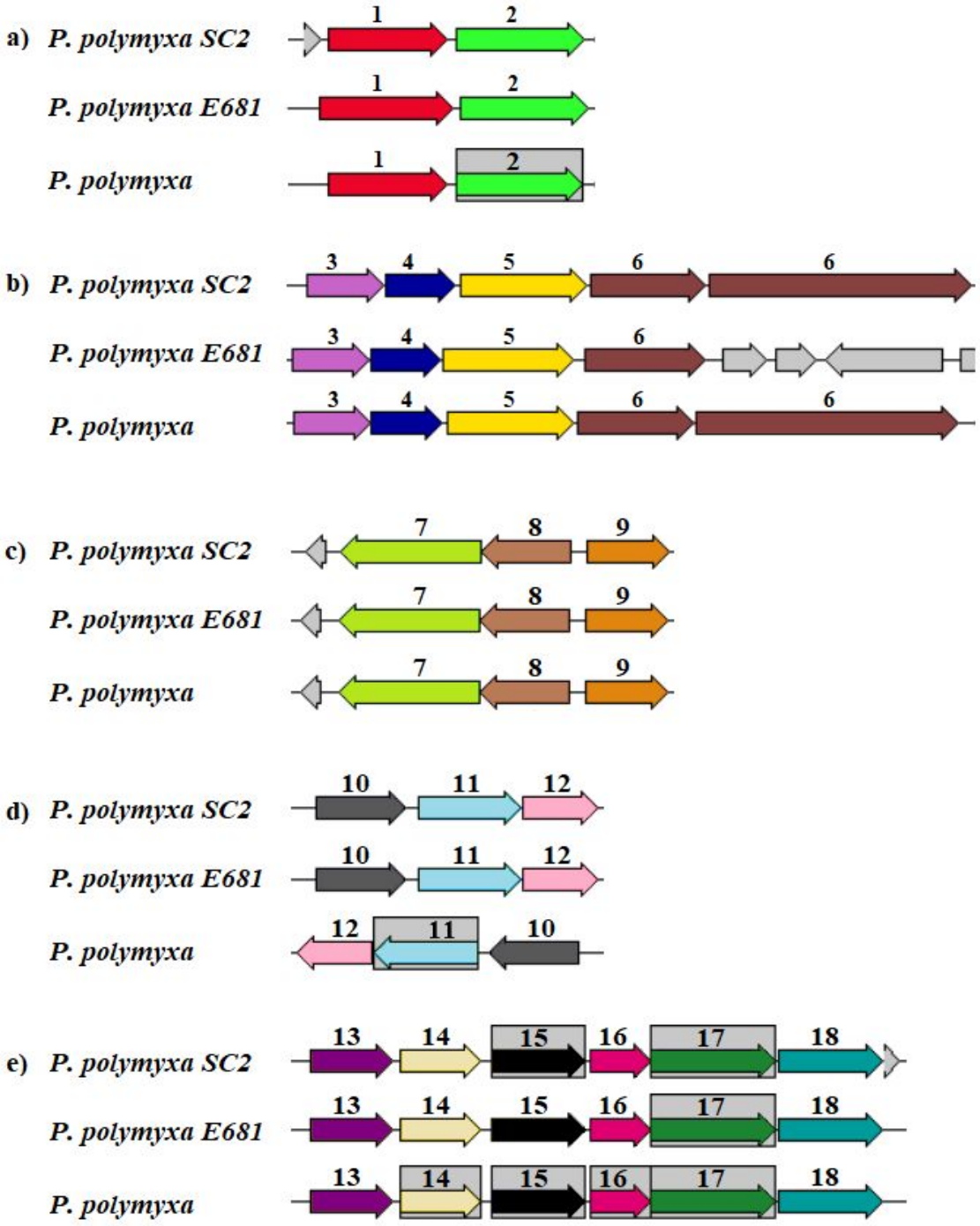


Figura 23: Cinco dos conjuntos gênicos encontrados em *P. polymyxa*. Genes (setas) sem números não estão relacionados ao *operon*/*cluster* gênico em questão. a) Metabolismo de EPS. 1= Levansacarase; 2= 2,6-beta-frutano 6-levanbiohidrolase; b) Metabolismo de sacarose e EPS. 3 e 4= Transportadores ABC para sacarose (permeases 1 e 2); 5= Transportador de sacarose (proteína de ligação ao substrato); 6= Levanase (ou proteína de função similar); c) Assimilação de glicerol. 7= Diidroxicetona quinase; 8= Glicerol desidrogenase;

9= Regulador transcricional da família AraC; d) Ciclo de Krebs. 10= Citrato sintase; 11= Isocitrato desidrogenase; 12= Malato desidrogenase; e) Glicólise. 13= Regulador de genes centrais da glicólise; 14= Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD^+; 15= Fosfoglicerato quinase; 16= Triosefosfato isomerase; 17= Fosfoglicerato mutase independente de 2,3-bifosfoglicerato; 18= Enolase.

Com relação a uma busca na literatura e no banco de dados KEGG, KDPG aldolase é amplamente encontrada em gram-positivas (e foi também encontrada no genoma analisado), enquanto fosfogluconato desidratase está anotada em um número muito restrito destas bactérias. Este poderia ser um dos fatores que contribuem para a ideia geral da ausência da via em gram-positivas. Durante a anotação manual da enzima fosfogluconato desidratase da cepa PM3605 de *P. polymyxa*, os resultados retornados pelo programa FAT indicavam uma enzima bifuncional diidroxiácido desidratase (EC 4.2.1.9) / fosfogluconato desidratase (EC 4.2.1.12). Buscas na literatura confirmaram essa bifuncionalidade, que seria resultado da promiscuidade de substratos da enzima diidroxiácido desidratase (KIM & LEE, 2006). Isso permite considerar a existência da via de Entner-Doudoroff na cepa de *P. polymyxa* utilizada no trabalho, apesar de não ser possível inferir a proporção de sua contribuição ao metabolismo de glicose nessa bactéria.

Dentro desse contexto da bifuncionalidade, e dando sequência à utilização do piruvato produzido na glicólise ou na via de Entner-Doudoroff, é possível, ainda, citar outra enzima presente em *P. polymyxa*, a piruvato ferredoxina oxidorredutase. Em sua ação tradicional, essa enzima realiza uma descarboxilação oxidativa do piruvato, formando acetil-coA e CO_2. Entretanto, uma vez deixando de utilizar a ferredoxina como cofator, a piruvato ferredoxina oxidorredutase é também capaz de produzir acetaldeído a partir do mesmo substrato (piruvato). Essa ação é dependente de coenzima A, que possui um papel estrutural, e não catalítico. Assim, a função secundária da piruvato ferredoxina oxidorredutase (EC 1.2.7.1) é como piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1), ilustradas na figura 18. Essa característica já foi identificada em diversas espécies de procariotos (ERAN et al, 2014; ERAN et al, 2015; MA et al, 1997) e permite inferir que o mesmo possa acontecer em *P. polymyxa*.

Em relação ao metabolismo de xilose, é possível perceber que *P. polymyxa* tem duas vias disponíveis para essa finalidade (Figura 19, B). Ambas partem de xilulose-5-fosfato, e não propriamente de xilose, pois ocorrem após a atuação das enzimas xilose isomerase e xiluloquinase. A via das pentoses fosfato é a rota metabólica universal de uso da xilulose-5-fosfato, que é um de seus intermediários. Essa via é capaz de gerar, entre outros

compostos, gliceraldeído-3-fosfato, um intermediário da glicólise (CHOMVONG et al, 2016). Assim, a via das pentoses contribui ao metabolismo de xilose por meio da produção do gliceraldeído-3-fosfato. Vale ressaltar que a glicólise é importante para a assimilação dessa pentose, já que é através da via glicolítica que há a formação do piruvato, de onde partem vias de extrema importância para a manutenção do microrganismo (como, por exemplo, fermentações).

A outra via de assimilação da xilose presente em *P. polymyxa* inclui a enzima fosfocetolase, permitindo a produção de gliceraldeído-3-fosfato independentemente da via das pentoses. Esse poderia ser um mecanismo natural de otimização da utilização dessa fonte de carbono uma vez que um trabalho de 2016 mostrou que o *bypass* artificial da via das pentoses melhorou a utilização de xilose em *Saccharomyces cerevisiae* (CHOMVONG et al, 2016). Entretanto, não foram encontrados na literatura maiores detalhes sobre a regulação entre a realização da via das pentoses ou seu desvio para a assimilação de pentoses. Além disso, apesar de existirem essas duas formas de metabolização da xilose, apenas as reações em comum a ambas são representadas em um *operon*. Isso se deve ao fato de apenas os genes das enzimas xilose isomerase e xiluloquinase estarem contidos em uma unidade gênica.

Alguns artigos mencionam que pode existir ainda mais possibilidades de metabolização da xilose na natureza. Entre essas, uma contribuiria com moléculas do ciclo de Krebs e a outra, com a produção de piruvato. Além disso, a presença de vias alternativas para o metabolismo de xilose já foi observada em outros grupos de bactérias (SEKAR et al, 2016), bem como em leveduras (KWAK & JIN, 2017). Essa variedade pode ser importante devido à diferente eficiência e aos cofatores envolvidos em cada uma dessas rotas metabólicas.

O metabolismo de glicerol, por sua vez, usualmente apresenta um ramo redutor (produção de 1,3-PDO) e ramos oxidativos (produção de diidroxicetona fosfato) (LIN, 1976) ilustrados nas figuras 17 e 19C, respectivamente. De acordo com o mapeamento dessas vias, a bactéria *P. polymyxa* não é capaz de produzir o 1,3-PDO, devido à ausência das duas enzimas envolvidas neste processo (glicerol desidratase e 1,3-PDO desidrogenase). Por outro lado, essa espécie tem a habilidade de realizar ambas as vias oxidativas, relacionadas à formação de piruvato e outras rotas de produtos fermentativos, como o 2,3-BDO. Essa é uma característica presente em outros organismos, como, por exemplo, *K. pneumoniae* (WANG et al, 2017).

De acordo com a literatura, entretanto, o funcionamento das rotas oxidativas (Figura 19, C) não é simultâneo. A via que envolve GDH (glicerol desidrogenase) e diidroxicetona

quinase seria majoritária, estando em pleno funcionamento. Enquanto isso, a via envolvendo glicerol quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase (conhecida como sistema glp) estaria naturalmente silenciada. Também já foi observado que a ativação artificial do sistema glp leva a um grande redirecionamento do fluxo metabólico, por exemplo reprimindo as vias de 1,3-PDO e 12,-PDO, o que se daria através da regulação da expressão de genes envolvidos nestas vias. O artigo atribui esse "efeito dominó" a uma sofisticada relação entre os genes ativos e os silenciados, mostrando a complexidade por trás do metabolismo do glicerol (WANG et al, 2017). Este é um importante estudo, tendo em vista os esforços atuais para a otimização do glicerol como fonte de carbono.

Os dados apresentados por WANG e grupo levam ainda a conjecturar sobre como está o funcionamento dessas vias em *P. polymyxa* durante as fermentações conduzidas em glicerol no presente trabalho. Essa bactéria não apresentou um resultado tão satisfatório, levando a hipotetizar que o metabolismo de glicerol majoritário se dê através de GDH e diidroxicetona quinase. Provavelmente, não está acontecendo toda "mobilização metabólica" impulsionada pela via que envolve a enzima glicerol quinase. Outros estudos reforçam o papel primordial da glicerol quinase para que haja uma adequada assimilação dessa fonte de carbonos, o que pode ser mais um indicativo da baixa (ou inexistente) atuação dessa enzima/via (YEH et al, 2009).

Ainda assim, é importante ressaltar que, diferentemente do que foi visto para a xilose, as duas estratégias de assimilação de glicerol são representadas por conjuntos gênicos (distintos). Desta forma, há um *operon* conhecido como GlpFK, envolvendo os genes das enzimas glicerol quinase e proteína facilitadora da captação de glicerol (mas não glicerol-3-fosfato desidrogenase), e outro *operon* composto pelos genes de diidroxicetona quinase e GDH (Figura 23c e Anexo F). Apesar deste último *operon* não ter sido encontrado através do banco ProOpDBOs, os genes foram visualizados juntos em outras espécies através do RAST, e dados da literatura apontaram a existência de um *operon* contendo diidroxicetona quinase e GDH. (RAYNAUD et al, 2011). Além disso, é ainda interessante observar que a ordem em que se encontram no *operon*/*cluster* é exatamente a ordem em que suas respectivas enzimas atuam: primeiro a GDH gera diidroxicetona e em seguida a diidroxicetona quinase fosforila essa molécula, gerando a diidroxicetona fosfato (Figura 19, C).

Ainda inserido no metabolismo energético celular, a letra "d" da Figura 23 mostra um conjunto de genes de enzimas que fazem parte do Ciclo de Krebs. O *operon* encontrado no

ProOpDB contém apenas os genes referentes às enzimas citrato sintase e isocitrato desidrogenase. Já no RAST, é possível verificar a conservação dos genes dessas enzimas junto ao gene da malato desidrogenase. Somado a isso, a literatura aponta o conjunto desses três genes como um *operon* (MITTAL et al, 2009), reforçando a conservação da organização desse conjunto gênico. Além disso, as enzimas succinato desidrogenase, succinil-CoA ligase e 2-oxoglutarato desidrogenase, que participam do Ciclo de Krebs, têm um *operon* de subunidades enzimáticas. Isto é, o *operon* da enzima succinato-coA ligase, por exemplo, é composto pelos genes que codificam as subunidades alfa e beta dessa mesma enzima (Tabela 6). Já sem relação ao Ciclo de Krebs, as enzimas acetil-coA carboxiltransferase, piruvato sintase e complexo piruvato desidrogenase têm também *operons* de subunidades enzimáticas. Quanto a fermentações de forma geral, foi encontrado um *operon* relacionado à produção de ácido fórmico. Três *operons* não foram encontrados em *P. polymyxa*; dois deles devido à ausência de uma das enzimas componentes (caso dos *operons* de etanol e acetato) e um deles pelo fato das enzimas não se encontrarem agrupadas (*operon* pfk-pyk, referente à fosfofrutoquinase e piruvato quinase).

Além da utilização de variadas fontes de carbono e capacidade de realização de variadas vias fermentativas, a bactéria *P. polymyxa* é tradicionalmente uma produtora de EPS (HAN & CLARKE, 1990). Biologicamente, a produção desse polissacarídeo estaria relacionada à resposta a estresses, como baixas condições nutricionais (HABLER et a, 2012). Além disso, há indícios de que o microrganismo poderia, também, passar a utilizar EPS do tipo levana a partir do esgotamento de sua fonte de carbono (OKONKWO et al, 2017b).

As letras “a” e “b” da Figura 23 são relacionadas à produção/degradação de um EPS do tipo levana. A letra “a” é um *operon* formado por um gene de uma enzima de produção (levansacarase) e outro de uma enzima de degradação (2,6-beta-frutano 6-levanbiohidrolase) deste EPS. De acordo com o RAST e o banco ProOpDB, *operons* semelhantes estão presentes em outras espécies. Nestas, entretanto, o gene da 2,6-beta-frutano 6-levanbiohidrolase é substituído pelo gene da levanase, que têm grande similaridade. Segundo o banco de dados KEGG, essas enzimas são capazes de clivar levana de maneiras diferentes, liberando dissacarídeos de frutose ou oligossacarídeos com pelo menos três frutoses, respectivamente. Dados da literatura mostram também que as três enzimas podem aparecer em um mesmo *operon* em alguns organismos (PEREIRA et al, 2001).

Quanto à letra "b" da Figura 23, esta mostra um possível *cluster* gênico, já que não foram encontradas informações sobre *operons* com suas características na literatura ou no ProOpDB. Esse *cluster* contém genes de transportadores de sacarose, substrato utilizado para a produção do EPS levana (Anexo D), além do gene da levanase. A presença de transportadores, ou outras enzimas relacionadas ao metabolismo de glicídeos, em conjunto com uma enzima de degradação, e não produção, de EPS, pode parecer curiosa. Entretanto, foi confirmada a conservação de *clusters* gênicos com esta composição em outros organismos através do RAST e da literatura (BUNTIN et a, 2017).

Apesar do EPS levana possuir utilidade na área da saúde, devido, por exemplo, a sua atividade antioxidante (LIU et al, 2009), pode trazer resultados negativos no processo de produção de outros compostos de interesse. Foi observado que o EPS do tipo levana afeta a aeração e a viscosidade do meio fermentativo, além de reduzir o rendimento da conversão de açúcares a 2,3-BDO (HABLER et al, 2012). Um trabalho de 2018 realizou um silenciamento do gene da enzima levansacarase (produtora de levana), a fim de minimizar esses malefícios. O resultado foi satisfatório, com significativa redução da produção de EPS, bem como aumento da concentração de 2,3-BDO (OKONKWO et al, 2018).

Além disso, apesar do EPS do tipo levana ser mais relacionado à *P. polymyxa*, assim como mais estudado nessa espécie, sabe-se que outros tipos de EPS podem também ser produzidos. Foi mostrado que a cepa SQR-21 gera um EPS que contém diversos monossacarídeos, e não apenas a frutose. Além disso, esse polissacarídeo envolveria Fe^{3+} e Ca^{2+} como importantes fatores para a sua síntese (RAZA et al, 2011). Isso reforça a necessidade em aprofundar o entendimento acerca da produção dessas moléculas em *P. polymyxa*. O mapeamento de *operons* e enzimas relacionados a essa atividade pode, ainda, dar pistas sobre sua relação com o metabolismo geral do microrganismo. Entretanto, é possível observar que nem todos os artigos realizam estas buscas, especialmente quando se trata de *operons*. Ainda assim, devido à interferência dos EPSs nos processos fermentativos, sua produção deve ser sempre considerada com atenção.

Quanto à produção de 2,3-BDO, os genes das enzimas acetolactato sintase e acetolactato descarboxilase formam um *operon* bicistrônico (*alsSD*) (Anexo F, letra a). De acordo com o banco ProOpDB e o programa RAST, o mesmo está presente nas cepas E681 e SC2 (referência). O gene da R-BDH se localiza separadamente no genoma, em unidade

monocistrônica. Como já esperado, essa organização se assemelha àquela observadas em bactérias do gênero *Bacillus*.

Ainda sobre vias relacionados ao 2,3-BDO, a discussão das enzimas diacetil redutase (DAR) e acetoína desidrogenase merece destaque. Em relação à DAR, dois BLASTs foram realizados para chegar às sequências candidatas que seriam anotadas no FAT. Em um deles, foi utilizada como isca uma DAR de *P. polymyxa* 12321 (YU et al, 2011a). No outro, foi escolhida uma meso-BDH clássica (*K. pneumoniae*), pois tanto esta quanto DAR fazem parte do mesmo grupo de ortólogos do KEGG, sob o código K03366 (YANG et al, 2014), chamado de meso-butanodiol desidrogenase / (S,S)-butanodiol desidrogenase / diacetil redutase.

A anotação manual apontou implicitamente a presença de DAR na cepa utilizada no trabalho, e outras evidências foram consideradas para esta conclusão. Os resultados retornados pelo FAT (para ambas as iscas utilizadas no BLAST) indicam uma SDR (desidrogenase/redutase de cadeia curta). Por sua proximidade à meso-BDH, como dito no parágrafo acima, é consistente que DAR tenha também esse mesmo domínio conservado, o que foi confirmado através do Pfam. Os resultados retornados pelo FAT devem, ainda, indicar uma enzima semelhante a uma BDH específica, devido à utilização da meso-BDH como isca do BLAST. É importante ressaltar que, ainda assim, a anotação não retornou BDHs, o que sugere a existência de enzima similar, mas suficientemente diferente para ser considerada outra enzima. Fazendo uma extrapolação, isso poderia ser um indicativo de funções relacionadas, até mesmo compartilhando substratos, o qual, nesse caso, seria o diacetil, considerando a capacidade descrita na literatura de BDHs realizarem a conversão diacetil-acetoína. Como dito anteriormente, entretanto, não há registros de que DAR seja capaz de realizar a conversão acetoína-2,3-BDO (e vice-versa), sugerindo que esta enzima seria, de fato, diferente de uma BDH. Além disso, a descrição prévia de DAR em *P. polymyxa* (GAO et al, 2013b; YU et al, 2011a) também é um forte argumento para sustentar a suspeita de que essa enzima esteja presente também na cepa de trabalho.

Já a acetoína desidrogenase faz parte do principal e mais estudado sistema de catabolismo da acetoína. Essa enzima gera acetil-coA e acetaldeído (que também é convertido a acetil-coA pela célula, posteriormente) a partir da acetoína. Além disso, os organismos que possuem BDHs, e, assim, formam 2,3-BDO, realizam primeiramente a conversão desse álcool à acetoína. Isso representa uma estratégia de sobrevivência após o esgotamento da fonte de

carbono (JOHANSEN et al, 1975). A presença do sistema acetoína desidrogenase já foi relatado em diversos organismos produtores de 2,3-BDO, como *B. subtilis* (WANG et al, 2012) e *K. pneumoniae* (DENG et al, 1994). Trabalhos antigos sugerem que outra possibilidade para o catabolismo da acetoína é o ciclo do BDO, mas essa hipótese foi intensamente refutada (XIAO & XU, 2007). Ainda assim, no presente trabalho foi realizada também uma tentativa de mapear as enzimas que fazem parte dessa via. Porém, a nomenclatura utilizada para as mesmas em artigos não corresponde a nenhum número E.C., dificultando esse mapeamento.

De acordo com a reunião dos dados obtidos, é possível perceber a viabilidade de rotas fermentativas de etanol, ácido fórmico, ácido acético, L-lactato e, claro, 2,3-BDO. Além disso, as vias fermentativas presentes, bem como o Ciclo de Krebs (também presente), podem acontecer a partir de quaisquer das três fontes de carbono, glicose, xilose ou glicerol. Cada uma dessas fontes têm, ainda, duas possibilidades diferentes para sua assimilação pela célula. Por outro lado, a utilização de 2,3-BDO/acetoína como fonte de carbono não é possível. Há ainda uma rota identificada para produção de EPS do tipo levana. Por outro lado, não foram encontradas na cepa PM3605 as enzimas envolvidas na produção de 1,3-PDO e D-lactato, sugerindo que essas fermentações sejam inviáveis na cepa de trabalho. Curiosamente, 1,3-PDO desidrogenase e D-lactato desidrogenase foram encontradas em outras cepas de *P. polymyxa*. Confirmações funcionais são importantes para concluir sobre a viabilidade e contribuição ao metabolismo de cada uma das vias supracitadas em *P. polymyxa*.

Essa conjunto de dados é de extrema importância para entender de forma geral o metabolismo da cepa PM3605 de *P. polymyxa*. Isso ajuda a esclarecer vias disponíveis para a geração do produto de interesse (2,3-BDO), bem como identificar rotas candidatas à depleção artificial, visando um melhor produção de 2,3-BDO. É interessante observar que a cepa PM3605 não tem naturalmente algumas enzimas que já foram alvo de engenharia genética para a exclusão de subprodutos, como é o caso da fosfotransacetilase (KANDASAMY et al, 2016). Vale ressaltar também que o 2,3-BDO já é produzido de forma natural - e satisfatória - por *P. polymyxa*.

Além disso, a presença da via do 2,3-BDO em rizobactérias, como *P. polymyxa*, pode ter uma função evolutiva. É observado que esse composto tem um efeito de indutor de resistência nas plantas, tornando-as menos suscetíveis a certas infecções (LUO et al, 2018). Esse efeito seria resultado da indução de genes marcadores de vias de defesa nos vegetais, bem como

suas respectivas vias. Trabalhos recentes mostraram esse efeito protetor do 2,3-BDO na proteção contra infecção de fungos e vírus. O isômero levorrotatório teria, ainda, um efeito mais potente que o dextrorrotatório (KONG et al, 2018; YI et al, 2016). Isso leva a pensar que, evolutivamente, a produção do 2,3-BDO pode ter garantido uma vantagem adaptativa a essas bactérias. A literatura indica ainda que houve uma co-evolução de plantas e rizobactérias (GOUDA et al, 2018; WU et al, 2018).

No caso do combate ao estresse oxidativo, é possível perceber a ausência em *P. polymyxa* da enzima glutationa redutase, que pertence ao importante sistema Glutarredoxina (Grx). Entretanto, o sistema Tiorredoxina (Trx) está presente na bactéria, o que é notado pela presença da enzima tiorredoxina redutase. Grx e Trx são os sistemas redox de tiol disponíveis em bactérias, além de mamíferos e organismos fotossintetizantes (BUEY et al, 2017; LU et al, 2013; PADGAONKAR et al, 2015). Esses sistemas são críticos para a viabilidade celular e proliferação, pois estão envolvidos com a prevenção de danos causados por espécies reativas de oxigênio. Entre esses danos pode-se citar a inativação de proteínas contendo ferro e enxofre, a oxidação de lipídios e os danos ao DNA, que podem levar à perpetuação de mutações no material genético (IMLAY, 2013; LU et al, 2013; WATSON et al, 2015)

Diversos organismos, entretanto, não têm o sistema Grx, como já observado em alguns *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. cereus* (FAHEY et al, 1978) e *B. anthracis* (GUSTAFSSON et al, 2012). Além disso, a ausência do sistema Grx em bactérias patogênicas é, inclusive, um fator explorado como alternativa para o desenvolvimento de novos antibióticos. Como a enzima tiorredoxina redutase de procariotos é muito diferente da enzima de mamíferos, alguns compostos atuam inibindo especificamente o sistema Trx de bactérias. Isso leva à destruição do único grande sistema de combate ao estresse oxidativo do microrganismo, causando sua morte, sem danos potenciais ao hospedeiro (LIANG et al, 2016; LU et al, 2013). Além disso, um trabalho com *B. subtilis* observou que o sistema Trx é essencial para a resposta a estresses múltiplos, como calor, salinidade e exposição a compostos tóxicos - etanol, peróxido de hidrogênio e puromicina (SCHARF et al, 1998). Isso reforça que a ausência do sistema Grx em *P. polymyxa* não compromete sua viabilidade.

5.4 BDHs

As enzimas são moléculas que têm tanto atributos biológicos quanto químicos, e estão envolvidas no controle do metabolismo e na formação de diversos produtos relevantes. Sua sequência e estrutura retratam sua habilidade catalítica. Esse fato justifica a necessidade de abordar esse fatores a fim de melhor compreender sua função biológica, bem como classificá-las corretamente (CUESTA et al, 2015; PROSSER et al, 2014).

As enzimas S-BDH e meso-BDH foram estudadas mais a fundo, a fim de melhor entender suas diferenças. Inicialmente, foi observado que ambas possuem o domínio conservado (DC) de SDRs (desidrogenase/redutase de cadeia curta). Entretanto, foram encontradas enzimas classificadas como meso ou S-BDHs que possuíam outro DC, denominado enoil-(proteína carreadora de acil)-redutase (ER), algo não preconizado pela literatura. Esses dois DCs se apresentaram claramente separados na árvore filogenética em dois clados independentes (Figura 22). Apesar de ambos os DCs estarem associados à atividade de desidrogenases, essa separação na árvore com valor alto de *bootstrap* sugere uma divergência entre as sequências dos domínios ER e SDR. Isso indica que funções diferentes podem ser exercidas por enzimas contendendo cada um desses DCs.

Quanto às enzimas S e meso-BDH, a árvore foi capaz de separá-las, fato também ilustrado pelas tríades não catalíticas que participam do reconhecimento estereoespecífico do substrato (isômeros de acetoína/2,3-BDO). Cinco possibilidades de tríades foram recorrentes nas sequências utilizadas na análise (Tabela 8). De acordo com as análises realizadas nessa dissertação foi possível inferir que o clado da árvore contendo as sequências com tríades marcadas em preto e cinza (ramo M) têm atividade meso-BDH, enquanto que o clado da árvore contendo as sequências com tríades marcadas em azul (ramo S) tem atividade S-BDH. Além do agrupamento realizado pela própria análise filogenética, a presença das tríades, já correlacionadas na literatura (OTAGIRI et al, 2010; PU et al, 2017) com a estereo-especificidade, dão suporte a esta anotação da atividade. Essa inferência independe se a anotação prévia das sequências eram S-BDH, meso-BDH ou ambas pelo banco de dados proveniente.

Estes estudos observaram que a tríade selvagem em meso-BDHs é QNW e que sua mutação para IFH levaria à reversibilidade de sua estereoespecificidade, fazendo com que passassem a ter atividade S-BDH (OTAGIRI et al, 2010; PU et al, 2017). Coincidentemente, a

meso-BDH clássica (*K. pneumoniae*) tem a tríade QNW (preto), enquanto a S-BDH clássica (*B. saccharolyticum*) tem a tríade IFW (azul claro). As tríades cinza e azul escuro são variações das tríades preta e azul claro, respectivamente, sem que haja variação das características físico-químicas do resíduo alterado (Tabela 8).

Tabela 8: Aminoácidos componentes de cada uma das cinco tríades destacadas

Tríade		**Aminoácido****	
Código	**Cor**	**Nome (código)**	**Classificação**
QNW	Preta	Glutamina (Gln)	Polar não carregado
		Asparagina (Asn)	Polar não carregado
		Triptofano (Trp)	Aromático
QNM*	Cinza	Metionina (Met)	Apolar
IFW	Azul claro	Isoleucina (Ile)	Apolar
		Fenilalanina (Phe)	Aromático
		Triptofano (Trp)	Aromático
IYW*	Azul escuro	Tirosina (Tyr)	Aromático
VDT	Rosa	Valina (Val)	Apolar
		Ácido aspártico (Asp)	Carregado negativamente
		Treonina (Thr)	Polar não carregado

*variação da tríade anterior
** Estrutura dos aminoácidos no Anexo C

No caso da tríade IYW (marcada em azul escuro na Figura 22) é mais provável que haja a manutenção da atividade S-BDH, pois a troca F148Y não representa grande variação espacial. Já no caso das enzimas com a tríade QNM (marcadas em cinza na Figura 22), apesar da substituição W190M manter o caráter hidrofóbico do resíduo, as cadeias laterais de triptofano e metionina seriam muito diferentes para considerar subitamente que há manutenção da atividade meso-BDH. Para isto, é necessário levar em consideração alguns fatores.

O primeiro deles é que uma das sequências com a tríade não catalítica QNM pertence à *B. licheniformis*, na qual a presença de uma meso-BDH funcional já foi reportada na literatura (LI et al, 2013b; QIU et al, 2016). O segundo fator se refere ao papel do resíduo 190 no reconhecimento estereoespecífico. Foi observado que este faz pontes de hidrogênio com o substrato e realiza um contato hidrofóbico com a acetoína. Além disso, constatou-se que mutações no resíduo da posição 194 podem interferir neste contato com a acetoína, mesmo com a manutenção do triptofano na posição 190 (PU et al, 2017). Isso poderia indicar que, uma vez não alterado o resíduo 194, a troca W190M não afetaria a funcionalidade, já que a metionina ainda poderia fazer pontes de hidrogênio através do enxofre presente na sua cadeia lateral. Um último fator a ser considerado é a conservação dos resíduos em cada posição da tríade. Foi mostrado que os resíduos W e M são igualmente frequentes na posição 190 (PU et al, 2017), o que não seria possível se essa substituição tornasse a enzima não-funcional.

Esse mesmo mapeamento acerca da conservação dos resíduos não catalíticos deve ser considerado para a discussão da tríade VDT (rosa). De acordo com esse, não há a conservação dessa tríade em enzimas funcionais. O fato de que todas as enzimas com a tríade VDT não têm evidência experimental e foram inferidas por homologia poderia reforçar que estas não apresentam atividade S ou meso-BDH. Outro fato que reforça esse argumento, é que as enzimas com a tríade VDT estão em ramos muito distantes das BDHs funcionais.

Apesar do domínio ER ser negligenciado na literatura, essa possível ausência de funcionalidade não estaria relacionada à presença desse DC (domínio conservado) ao invés do DC SDR clássico. Um artigo de 2014 mostrou que uma enzima de *K. pneumoniae*, mesmo com o domínio ER, e não SDR, tem atividade S-BDH (PARK et al, 2014). A verificação da tríade não catalítica estereo-seletiva presente nessa sequência de *K. pneumoniae* (IYW) concorda com essa observação do artigo. Isso reforça que a tríade não catalítica estereo-seletiva, mais do que a presença de um DC SDR clássico, é fundamental para a funcionalidade e distinção de S e meso-BDHs.

Por fim, é importante também ressaltar que a nomenclatura recebida pelas BDHs de cadeia curta (ou seja, S e meso-BDHs) deveria ser revista. Como foi possível observar na árvore, muitas das enzimas recebem uma classificação ambígua nos bancos de dados, sendo consideradas meso e S-BDHs simultaneamente (enzimas com código Sm na árvore). Porém, devido às diferenças aqui esclarecidas entre esses dois grupos de enzimas, essa nomenclatura é equivocada. Além disso, a BDH de *Weissella soli* (S_Wsol), apesar de constar como tipo S

no Uniprot, seria, na verdade, uma meso-BDH, não só por sua tríade não catalítica (cinza), como também pelo seu agrupamento na árvore. Da mesma maneira, a BDH de *Staphylococcus epidermis* (m_Sepi) consta como tipo meso no Uniprot, mas se caracteriza como uma S-BDH nas análises deste trabalho.

De acordo com a árvore filogenética e análise de verificação das tríades não-catalíticas estereo-seletivas é possível, então, compreender a atividade ou até mesmo classificar uma enzima, partindo de seu potencial estereo-específico. Quanto às BDHs avaliadas (meso e S), há, provavelmente, uma menor variabilidade entre meso-BDHs, pois suas sequências agruparam todas juntas, em um mesmo ramo com suporte de 100% (ramo M). Já em relação às S-BDHs, possivelmente, elas se dividem entre um grupo mais clássico (agrupado no ramo S, com suporte de 93%) e outras enzimas com certas divergências desse grupo (distribuídas em outros ramos da árvore). A presença de tríades não-catalíticas estereo-seletivas funcionais nessas enzimas possivelmente mais divergentes sugere que haja manutenção de atividade nas mesmas.

Além disso, a análise de função enzimática (Tabela 7) sugere direções preferenciais opostas para S e meso BDH, de acordo com os valores de Km. Ainda assim, a lei de ação das massas pode fazer a reação acontecer em direção não preferencial. Em relação à via consensual gerada, ela está de acordo com a maior parte da literatura. Entretanto, alguns pontos devem ser ressaltados. Na Figura 20, é possível perceber que meso e S-BDHs são capazes de realizar as mesmas conversões. Porém, alguns artigos estão em desacordo com isso, pois consideram que a meso-BDH poderia adicionar um centro quiral R ou S, dependendo do tipo e do organismos em questão. Entretanto, é bem conhecido na literatura que a meso-BDH produz meso-BDO utilizando 3R-acetoína. Desta forma, necessariamente essa enzima deve ser responsável pela adição de um centro quiral S, pois o centro R já existia no substrato.

São escassos trabalhos que exploram a diversidade de BDHs de um mesmo organismo e buscam especificar o papel de cada uma. Somando-se à imprecisão das diferenças entre meso-BDHs e S-BDHs, outro grupo de enzimas que participam da via de 2,3-BDO também têm uma definição vaga. As enzimas diacetil redutase (DAR) são conhecidas por formarem acetoína a partir da redução de diacetil e há um aparente consenso de que estas adicionam um centro quiral S à acetoína (UI et al, 1986; YU et al, 2011a; GAO et al, 2013a). Uma das

evidências para isto é que as bactérias *P. polymyxa*, nas quais a única BDH identificada é do tipo R, é capaz de produzir meso-BDO, o que só seria possível na presença de 3S-acetoína.

Em 2011, Yu e seu grupo anotaram e verificaram funcionalmente um gene correspondente à DAR na cepa ATCC 12321 de *P. polymyxa*. Esse resultado concorda também com o trabalho que descreveu a via de produção de acetoína através do diacetil, no qual a bactéria usada foi a própria *P. polymyxa* (UI et al, 1986; YU et al, 2011a). Entretanto, alguns artigos e bancos de dados utilizam o termo DAR como sinônimo de BDH, já que ambas têm a capacidade de formar acetoína a partir de diacetil (ZHANG et al, 2015). Ainda assim, os próprios artigos não costumam associar DAR com a produção de 2,3-BDO a partir de acetoína, uma função clássica de BDHs, o que torna complexa a compreensão da nomenclatura e efetiva função dessas enzimas (PARK et al, 2014).

A compreensão do cenário geral de produção dos isômeros é árdua, já que os artigos costumam abordá-la de uma maneira específica para um específico organismo de estudo. A anotação e classificação das enzimas envolvidas nestas vias também dificulta o entendimento das mesmas. Poucos trabalhos se dedicam a indicar diferenças estruturais e funcionais que deem suporte à nomenclatura atribuída a essas enzimas. Além disso, a nomenclatura e classificação de enzimas é historicamente complicada e problemática, apesar de extremamente relevante, principalmente para a prospecção de suas funções biológicas. Atualmente, acredita-se que a combinação de diversos fatores, como substrato(s), produto(s), mecanismo(s), estrutura, sequência e evolução da função enzimática, seria a melhor forma de atingir uma classificação adequada (CUESTA et al, 2015; PROSSER et al, 2014).

6. Conclusão

O trabalho realizado permite concluir que a cepa de *P. polymyxa* empregada (PM3605) é capaz de utilizar as três fontes de carbono, glicose, xilose e glicerol, para a geração de 2,3-BDO e outros produtos fermentativos, de forma equiparável a outras bactérias utilizadas em bioprocessos. Dentre as três, o maior rendimento foi observado para a glicose, seguido da xilose e glicerol. A produção de um único isômero óptico, 2R,3R-BDO, foi verificada durante todas as fermentações conduzidas. O mapeamento de vias fermentativas no genoma da cepa PM3605 mostrou que todas estavam completas, com exceção das fermentações de D-lactato e 1,3-propanodiol. Essas análises também esclareceram quais vias *P. polymyxa* PM3605 é capaz de realizar durante a geração de produtos como o 2,3-BDO, acetoína, ácido acético e ácido fórmico. A anotação de *operons/clusters* gênicos, por sua vez, pode dar indicações sobre a conservação de estruturas gênicas relevantes para o metabolismo energético. Por fim, as análises acerca das BDHs de diferentes bactérias mostram que é possível classificar as BDHs em R-BDH, S-BDH e meso-BDH, e que estas duas últimas diferem quanto ao reconhecimento estereoespecífico do substrato. Foi observado que os resíduos componentes de uma tríade não-catalítica são essenciais para essa diferença.

REFERÊNCIAS

ADLAKHA, N., YAZDANI, S. S. Efficient production of (R,R)-2,3-butanediol from cellulosic hydrolysate using Paenibacillus polymyxa ICGEB2008. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 21–28, 2015.

AL-KAIDY, H., DUWE, A., HUSTER, M., et al. Biotechnology and Bioprocess Engineering - From the First Ullmann's Article to Recent Trends. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 175–184, 2015.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

ANDREWS, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. **Babraham Bioinformatics**, 2018.

ARIZA, A., EKLÖF, J. M., SPADIUT, O., et al. Structure and activity of paenibacillus polymyxa xyloglucanase from glycoside hydrolase family 44. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 39, p. 33890–33900, 2011.

ASH, C., FARROW, J.A.E., WALLBANKS, S., et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus Bacillus revealed by comparative analysis of small‐subunit‐ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 202–206, 1991.

ASH, C., PRIEST, F. G., COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test - Proposal for the creation of a new genus Paenibacillus. Antonie van Leeuwenhoek, v. 64, n. 3–4, p. 253–260, 1993.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D., BEST, A., et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, 2008.

AZUBUIKE, C. C., CHIKERE, C. B., OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, 2016.

BAKER, John. Renewables push into the mainstream. **ICIS Chemical Business**, p. 32–35, 2017.

BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.

BATEMAN, A., MARTIN, M. J., O'DONOVAN, C., et al. UniProt: The universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D158–D169, 2017.

BERGE, O., GUINEBRETIÈRE, M. H., ACHOUAK, W., et al. Paenibacillus graminis sp. nov. and Paenibacillus odorifer sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 607–616, 2002.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293–300, 1951.

BIAŁKOWSKA, A. M. Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, 2016.

BIO, Biotechnology Industry Organization; REUTERS, Thomson. BIO/Thomson Reuters Investor Perception Study: Biotechnology Industry is Expected to Rebound. **Biotechnology Industry Organization**, 2009.

BLOMQVIST, K. NIKKOLA, M.; LEHTOVAARA, P.; et al. Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from Klebsiella terrigena and Enterobacter aerogenes. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 5, p. 1392–1404, 1993.

BOOTH, I. R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 49, n. 4, p. 359–378, 1985.

BORATYN, G. M.; CAMACHO, C.; COOPER, P. S.; et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements. **Nucleic acids research**, v. 41, 2013.

BRETTIN, T.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Scientific Reports,** v. 5, 2015.

BRUNO, A. N.; HORN, Â. C. M.; LANDGRAF, Sharon Schilling. Introdução à biotecnologia. **Biotecnologia I: Princípios e Métodos.** 2014.

BUEY, R. M.; GALINDO-TRIGO, S.; LÓPEZ-MAURY, L.; et al. A New Member of the Thioredoxin Reductase Family from Early Oxygenic Photosynthetic Organisms. Molecular Plant, v. 10, n. 1, p. 212–215, 2017.

BUNTIN, N.; HONGPATTARAKERE, T.; RITARI, J.; et al. An inducible operon is involved in inulin utilization in Lactobacillus plantarum strains, as revealed by comparative proteogenomics and metabolic profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 2, 2017.

BURK, M.J. Sustainable production of industrial chemicals from sugars. **International Sugar Journal**, v. 112, n. 1333, p. 30–35, 2010.

BUSETTO, L.; CASSANI, M. C.; MAZZONI, R.; et al. Coordination Chemistry of Ester-Functionalized Cp Ligands. A Versatile Approach to the Chiral Hydroxyalkoxycarbonylcyclopentadienide. **American Chemical Society**, v. 21, p. 4993–4999, 2002.

CASPI, R.; BILLINGTON, R.; FERRER, L.; et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. **Nucleic Acids Research,** v. 44, n. D1, p. D471–D480, 2016.

CELIŃSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 715–725, 2009.

CHAN, S.; JANTAMA, S. S.; KANCHANATAWEE, S.; et al. Process optimization on micro-aeration supply for high production yield of 2,3-butanediol from maltodextrin by metabolically-engineered Klebsiella oxytoca. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 2016.

CHEN, C.; WEI, D.; SHI, J.; et al. Mechanism of 2,3-butanediol stereoisomer formation in Klebsiella pneumoniae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 10, p. 4603–4613, 2014.

CHO, S.; KIM, T.; WOO, H. M.; et al. High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered Klebsiella oxytoca M1. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, 2015.

CHOMVONG, K.; BAUER, S.; BENJAMIN, D.; et al. Bypassing the pentose phosphate pathway: Towards modular utilization of xylose. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.

CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Biofuel production in Escherichia coli: The role of metabolic engineering and synthetic biology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 419–434, 2010.

CUESTA, S. M.; RAHMAN, S. A.; FURNHAM, N.; et al. The Classification and Evolution of Enzyme Function. **Biophysical Journal**, v. 109, n. 6, p. 1082–1086, 2015.

CULLER,. A Bioengineering Platform to Industrialize Biotechnology. Chemical Engineering Progress; **SBE SUPPLEMENT: Synthetic Biology**, September, p. 42–51, 2016.

DAANE, L. L.; HARJONO, I.; ZYLSTRA, G. J.; et al. Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2683–2691, 2001.

DAI, J. J.; CHENG, J. S.; LIANG, Y. Q.; et al. Regulation of extracellular oxidoreduction potential enhanced (R,R)-2,3-butanediol production by Paenibacillus polymyxa CJX518. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 433–440, 2014.

DENG, W. L.; CHANG, H. Y.; PENG, H. L. Acetoin catabolic system of Klebsiella pneumoniae CG43: Sequence, expression, and organization of the aco operon. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 12, p. 3527–3535, 1994.

DEUTSCHER, J.; FRANCKE, C.; POSTMA, P. W. How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 70, n. 4, p. 939–1031, 2006.

DU, N.; SHI, L.; YUAN, Y.; et al. Isolation of a potential biocontrol agent Paenibacillus polymyxa NSY50 from vinegar waste compost and its induction of host defense responses against Fusarium wilt of cucumber. **Microbiological Research**, v. 202, p. 1–10, 2017.

EASTMAN, A. W.; HEINRICHS, D. E.; YUAN, Z. C. Comparative and genetic analysis of the four sequenced Paenibacillus polymyxa genomes reveals a diverse metabolism and conservation of genes relevant to plant-growth promotion and competitiveness. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014.

EDDY, S. R. Accelerated profile HMM searches. **PLoS Computational Biology**, v. 7, n. 10, 2011.

ENTNER, N.; DOUDOROFF, M. Glucose and gluconic acid oxidation of Pseudomonas saccharophila. **The Journal of biological chemistry**, v. 196, p. 853–862, 1952.

ERAM, M. S.; ODUARAN, E.; MA, K. The bifunctional pyruvate decarboxylase/pyruvate ferredoxin oxidoreductase from Thermococcus guaymasensis. **Archaea**, v. 2014, 2014.

ERAM, M. S.; WONG, A.; ODUARAN, E.; et al. Molecular and biochemical characterization of bifunctional pyruvate decarboxylases and pyruvate ferredoxin oxidoreductases from Thermotoga maritima and Thermotoga hypogea. **Journal of Biochemistry**, v. 158, n. 6, p. 459–466, 2015.

FAHEY, R. C.; BROWN, W. C.; ADAMS, W. B.; et al. Occurrence of glutathione in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1126–1129, 1978.

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. What does the p value really mean? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 5, p. 485–485, 2015.

FINN, R. D.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016.

FLAMHOLZ, A.; NOOR, E.; BAR-EVEN, A.; et al. Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 24, p. 10039–10044, 2013.

FU, J.; HUO, G.; FENG, L.; et al. Metabolic engineering of Bacillus subtilis for chiral pure meso-2,3-butanediol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, 2016.

FU, J.; WANG, Z.; CHEN, T.; et al. NADH plays the vital role for chiral pure D-(-)-2,3-butanediol production in Bacillus subtilis under limited oxygen conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 10, p. 2126–2131, 2014.

FULMER, E. I.; CHRISTENSEN, L. M.; KENDALL, A. R. Production of 2,3-Butylene Glycol by Fermentation: Effect of Sucrose Concentration. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 798–800, 1933.

GAO, C.; ZHANG, L.; XIE, Y.; et al. Production of (3S)-acetoin from diacetyl by using stereoselective NADPH-dependent carbonyl reductase and glucose dehydrogenase. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 111–115, 2013a.

GAO, J.; XU, Y. Y.; LI, F. W.; et al. Production of S-acetoin from diacetyl by Escherichia coli transformant cells that express the diacetyl reductase gene of Paenibacillus polymyxa ZJ-9. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 274–281, 2013b.

GAO, J.; XU, H.; LI, Q. J.; et al. Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using Paenibacillus polymyxa ZJ-9 to produce R,R-2,3-butanediol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 18, p. 7076–7082, 2010.

GAO, J.; YANG, H. H.; FENG, X. H.; et al. A 2,3-butanediol dehydrogenase from paenibacillus polymyxa ZJ-9 for mainly producing R,R-2,3-butanediol: Purification, characterization and cloning. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 733–741, 2012.

GARG, S. K.; JAIN, A. Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 2–3, p. 103–109, 1995.

GASTELUM-ARELLANEZ, A.; PAREDES-LÓPEZ, O.; OLALDE-PORTUGAL, V. Extracellular endoglucanase activity from Paenibacillus polymyxa BEb-40: production, optimization and enzymatic characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 2953–2965, 2014.

GE, J. P.; HUANG, S. F.; LI, X. L.; et al. Comparison of Capacity for 2,3-Butanediol Production from Corn Cob Hemicelluose Hydrolysate Fermentation by Klebsiella oxytoca HD79 and Klebsiella pneumoniae. **Applied Mechanics and Materials**, v. 672–674, p. 147–153, 2014.

GIOVANNINI, P. P.; MANTOVANI, M.; GRANDINI, A.; et al. New acetoin reductases from Bacillus stearothermophilus: Meso- and 2R,3R-butanediol as fermentation products. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1–2, p. 15–20, 2011.

GORDON, R. E.; HAYNES, W. C.; PANG, C. H. The Genus Bacillus. **Agriculture Handbook 427**. Washington, D.C. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, 1973.

GOUDA, S.; KERRY, R. G.; DAS, G.; et al. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131–140, 2018.

GRADY, E. N.; MACDONALD, J.; LIU, L.; et al. Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: A review. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, 2016.

GREINER-STOEFFELESTEFAN, T.; SCHOENERT, S. Recombinantly produced neutral protease originating from Paenibacillus polymyxa.

GUO, X.W.; ZHANG, Y.; LI, L.; et al. Improved xylose tolerance and 2,3-butanediol production of Klebsiella pneumoniae by directed evolution of rpoD and the mechanisms revealed by transcriptomics. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, 2018.

GUO, X.; CAO, C.; WANG, Y.; et al. Effect of the inactivation of lactate dehydrogenase, ethanol dehydrogenase, and phosphotransacetylase on 2,3-butanediol production in Klebsiella pneumoniae strain. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 44, 2014.

GUPTA, A.; MURARKA, A.; CAMPBELL, P.; et al. Anaerobic fermentation of glycerol in Paenibacillus macerans: Metabolic pathways and environmental determinants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 18, p. 5871–5883, 2009.

GUSTAFSSON, T. N.; SAHLIN, M.; LU, J.; et al. Bacillus anthracis thioredoxin systems, characterization and role as electron donors for ribonucleotide reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 47, p. 39686–39697, 2012.

GUZMAN, D.; CHANG, J. Bio-based 2,3-BDO set for 2014 sales. **ICIS Chemical Business**, 2012

HÄBLER, T.; SCHIEDER, D.; PFALLER, R.; et al. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by Paenibacillus polymyxa DSM 365. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 237–244, 2012.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. Production and Characterization of Microbial Levan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 393–396, 1990.

HAO, T.; CHEN, S.. Colonization of wheat, maize and cucumber by Paenibacillus polymyxa WLY78. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 2017.

HARDEN, A.; WALPOLE, G. S. Chemical Action of Bacillus lactis aerogenes (Escherich) on Glucose and Mannitol: Production of 2,3-Butyleneglycol and Acetylmethylcarbinol. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, v. 77, n. 519, p. 399–405, 1906

HÖHN-BENTZ, H.; RADLER, F. Bacterial 2,3-butanediol dehydrogenases. **Archives of Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 197–203, 1978.

HORI, K.; KAWABATA, Y.; NAKAZAWA, Y.; et al. A Novel β-1,4-mannanase Isolated from Paenibacillus polymyxa KT551. **Food Science and Technology Research**, v. 20, n. 6, p. 1261–1265, 2014.

HUANG, E.; YOUSEF, A. E. Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by Paenibacillus polymyxa. **Microbiological Research**, v. 181, p. 15–21, 2015.

HUANG, M.; OPPERMANN-SANIO, F. B.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and molecular characterization of the Bacillus subtilis acetoin catabolic pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 12, p. 3837–3841, 1999.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 443–454, 2013.

JANTAMA, K.; POLYIAM, P.; KHUNNONKWAO, P.; et al. Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2,3-butanediol by a combined deletion of alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered Kl. **Metabolic Engineering**, v. 30, p. 16–26, 2015.

JENKINS, D. E.; SCHULTZ, J. E.; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against heat or H2O2challenge in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 9, p. 3910–3914, 1988.

JI, X. Jun; HUANG, H.; OUYANG, P. K.. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. **Biotechnology Advances,** v. 29, n. 3, p. 351–364, 2011.

JIANG, L.Q.; FANG, Z.; ZHAO, Z. L.; et al. 2,3-butanediol and acetoin production from enzymatic hydrolysate of ionic liquid-pretreated cellulose by Paenibacillus polymyxa. **BioResources**, v. 10, n. 1, p. 1318–1329, 2015.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, C.; WOODLEY, J. M. Bioprocesses: Modeling needs for process evaluation and sustainability assessment. **Computers and Chemical Engineering**, v. 34, n. 7, p. 1009–1017, 2010.

JOHANSEN, L.; BRYN, K.; STORMER, F. C. Physiological and biochemical role of the butanediol pathway in Aerobacter (Enterobacter) aerogenes. **Journal of Bacteriology**, v. 123, n. 3, p. 1124–1130, 1975.

JOO, J.; LEE, S. J.; YOO, H. Y.; et al. Improved fermentation of lignocellulosic hydrolysates to 2,3-butanediol through investigation of effects of inhibitory compounds by Enterobacter aerogenes. **Chemical Engineering Journal**, v. 306, p. 916–924, 2016.

JUNI, E.; HEYM, G. A. A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2, 3-butanediol, acetylmethylcarbinol and diacetyl. II. The synthesis of diacetylmethylcarbinol from diacetyl, a new diphosphothiamin catalyzed reaction. Journal of bacteriology, v. 72, n. 6, p. 746–753, 1956.

KALLBACH, M.; HORN, S.; KUENZ, A.; et al. Screening of novel bacteria for the 2,3-butanediol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 1025–1033, 2017.

KANDASAMY, V.; LIU, J.; DANTOFT, S. H.; et al. Synthesis of (3R)-acetoin and 2,3-butanediol isomers by metabolically engineered Lactococcus lactis. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; FURUMICHI, M.; et al. New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D590–D595, 2018

KERSTERS, K.; DE LEY, J. The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 34, n. 1, p. 393–408, 1968.

KIM, S.; LEE, S. B. Catalytic promiscuity in dihydroxy-acid dehydratase from the thermoacidophilic archaeon Sulfolobus solfataricus. **Journal of Biochemistry**, v. 139, n. 3, p. 591–596, 2006.

KOMPALA, D. S.; RAMKRISHNA, D.; JANSEN, N. B.; et al. Investigation of bacterial growth on mixed substrates: Experimental evaluation of cybernetic models. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 7, p. 1044–1055, 1986.

KONG, H. G.; SHIN, T. S.; KIM, T. H.; et al. Stereoisomers of the Bacterial Volatile Compound 2,3-Butanediol Differently Elicit Systemic Defense Responses of Pepper against Multiple Viruses in the Field. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

KÖPKE, M.; MIHALCEA, C.; LIEW, F. M.; et al. 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5467–5475, 2011.

KOUTINAS, A. A.; YEPEZ, B.; KOPSAHELIS, N.; et al. Techno-economic evaluation of a complete bioprocess for 2,3-butanediol production from renewable resources. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 55–64, 2016.

KOUTINAS, M.; KIPARISSIDES, A.; PISTIKOPOULOS, E. N.; et al. Bioprocess Systems Engineering: Transferring Traditional Process Engineering Principles To Industrial Biotechnology. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 3, n. 4, p. e201210022, 2012

KWAK, S.; JIN, Y. S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered Saccharomyces cerevisiae: A review and perspective. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, 2017.

LAL, S.; TABACCHIONI, S.. Ecology and biotechnological potential of Paenibacillus polymyxa: A minireview. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 2–10, 2009.

LANGE, J.; TAKORS, R.; BLOMBACH, B. Zero-growth bioprocesses: A challenge for microbial production strains and bioprocess engineering. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 1, p. 27–35, 2017.

LanzaTech. CCU-Now: fuels and chemicals from waste. SIMPSON, Sean (Org.). **EU India Conference in Advanced Biofuels**, 2018. Disponível em: <https://ec.europa.eu/energy/sites/ener/files/documents/25_sean_simpson-lanzatech.pdf>. Acesso em: 15/09/2018.

LEE, S. J.; CHOI, H. S.; KIM, C. K.; et al. Process strategy for 2,3-butanediol production in fed-batch culture by acetate addition. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 56, p. 157–162, 2017.

LEE, S. J.; THAPA, L. P.; LEE, J. H.; et al. Stimulation of 2,3-butanediol production by upregulation of alsR gene transcription level with acetate addition in Enterobacter aerogenes ATCC 29007. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 1904–1910, 2016.

LEE, S.; KIM, B.; YANG, J.; et al. A non-pathogenic and optically high concentrated (R,R)-2,3-butanediol biosynthesizing Klebsiella strain. **Journal of Biotechnology**, v. 209, p. 7–13, 2015.

LEE, S. K.; CHOU, H.; HAM, T. S.; et al. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 556–563, 2008.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic Acids Research**, v. 1, 2016.

LI, J.; WANG, W.; MA, Y.; et al. Medium optimization and proteome analysis of (R,R)-2,3-butanediol production by Paenibacillus polymyxa ATCC 12321. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 585–597, 2013a.

LI, L.; LI, K.; WANG, K. et al. Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic Bacillus licheniformis strain. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 256–261, 2014b.

LI, L.; ZHANG, L.; LI, K.; et al. A newly isolated Bacillus licheniformis strain thermophilically produces 2,3-butanediol, a platform and fuel bio-chemical. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, 2013b.

LI, X.; HE, X.; LV, Y.; et al. Extraction and functional properties of water-soluble dietary fiber from apple pomace. **Journal of Food Process Engineering**, v. 37, n. 3, p. 293–298, 2014a.

LIANG, W.; FERNANDES, A. P.; HOLMGREN, A.; et al. Bacterial thioredoxin and thioredoxin reductase as mediators for epigallocatechin 3-gallate-induced antimicrobial action. **FEBS Journal**, 2016.

LIN, E C C. Glycerol Dissimilation and its Regulation in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 535–578, 1976.

List Nº51. Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 852, 1994.

LIU, H.; LIU, K.; LI, Y.; et al. Complete genome sequence of Paenibacillus polymyxa YC0136, a plant growth-promoting rhizobacterium isolated from tobacco rhizosphere. **Genome Announcements**, v. 5, n. 6, 2017.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; et al. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium Paenibacillus polymyxa EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 275–281, 2009.

LÓPEZ, J.; FORTNAGEL, P.. The regulation of the butanediol cycle in Bacillus subtilis. **BBA - General Subjects**, v. 279, n. 3, p. 554–560, 1972.

LU, J.; VLAMIS-GARDIKAS, A.; KANDASAMY, K.; et al. Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: An antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione. **FASEB Journal**, v. 27, n. 4, p. 1394–1403, 2013.

LUO, Y.; CHENG, Y.; YI, J.; et al. Complete genome sequence of industrial biocontrol strain Paenibacillus polymyxa HY96-2 and further analysis of its biocontrol mechanism. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, 2018.

MA, K.; HUTCHINS, A.; SUNG, S.-J. S.; et al. Pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, Pyrococcus furiosus, functions as a CoA-dependent pyruvate decarboxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 18, p. 9608–9613, 1997.

MA, K.; HE, M.; YOU, H.; et al. Improvement of (R,R)-2,3-butanediol production from corn stover hydrolysate by cell recycling continuous fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 332, p. 361–369, 2018.

MAGEE, R. J.; KOSARIC, N.. The microbial production of 2,3-butanediol. **Advances in Applied Microbiology**, v. 32, p. 89–161, 1987.

MAINA, S.; KACHRIMANIDOU, V.; KOUTINAS, A. A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 8, p. 18–23, 2017.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: Protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Research,** v. 32, 2004.

MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B.; et al. CDD: A Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, 2011.

MARWOTO, B.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; et al. Enhancement of (RR)-2,3-butanediol production from xylose by Paenibacillus polymyxa at elevated temperatures. **Biotechnology Letters,** v. 24, n. 2, p. 109–114, 2002.

MATLOCK, B. Assessment of Nucleic Acid Purity. **Thermo Fisher Scientific: Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers**, 2015. Disponível em: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>. Acesso em: 10/11/2018

MITTAL, M.; PICOSSI, S; SONENSHEIN, A. L. CcpC-dependent regulation of citrate synthase gene expression in Listeria monocytogenes. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 862–872, 2009.

MONTEFUSCO, A. Bacillus peoriae sp. nov. **International journal of systematic bacteriology**, v. Vol. 43, N, n. 8, p. 388–390, 1993.

MOONS, P.; VAN HOUDT, R.; VIVIJS, B.; et al. Integrated regulation of acetoin fermentation by quorum sensing and pH in Serratia plymuthica RVH1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3422–3427, 2011.

MORENO-HAGELSIEB, G. The power of operon rearrangements for predicting functional associations. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 402–406, 2015.

MOTA, F. F.; NÓBREGA, A.; EVÓDIO MARRIEL, I.; et al. Genetic diversity of Paenibacillus polymyxa populations isolated from the rhizosphere of four cultivars of maize (Zea mays) planted in Cerrado soil. **Applied Soil Ecology**, v. 20, n. 2, p. 119–132, 2002.

NAKAMURA, L. K. Bacillus polymyxa (Prazmowski) Mace 1889 Deoxyribonucleic Acid Relatedness and Base Composition. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**, v. 37, n. 4, p. 391–397, 1987.

NAKASHIMADA, Y.; MARWOTO, B.; KASHIWAMURA, T.; et al. Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in Paenibacillus polymyxa. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 661–664, 2000.

NIELSEN, J.; PEDERSEN, A. G.; STRUDSHOLM, K.; et al. Modeling fermentations with recombinant microorganisms: Formulation of a structured model. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 9, p. 802–808, 1991.

OKONKWO, C.C.; UJOR, V.; EZEJI, T. C. Molecular inactivation of exopolysaccharide biosynthesis in Paenibacillus polymyxa DSM 365 2 for enhanced 2,3-butanediol production. 2018.

OKONKWO, C. C.; UJOR, V.; EZEJI, T. C. Investigation of relationship between 2,3-butanediol toxicity and production during growth of Paenibacillus polymyxa. **New Biotechnology**, v. 34, p. 23–31, 2017b.

OKONKWO, C.; UJOR, V.; MISHRA, P.; et al. Process Development for Enhanced 2,3-Butanediol Production by Paenibacillus polymyxa DSM 365. **Fermentation**, v. 3, n. 2, p. 18, 2017a.

ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. O. What is flux balance analysis? **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 245–248, 2010.

OTAGIRI, M.; UI, S.; TAKUSAGAWA, Y.; et al. Structural basis for chiral substrate recognition by two 2,3-butanediol dehydrogenases. **FEBS Letters**, v. 584, n. 1, p. 219–223, 2010.

OVERBEEK, R.; OLSON, .; PUSCH, G. D.; et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014.

PADGAONKAR, V. A.; LEVERENZ, V. R.; BHAT, A. V.; et al. Thioredoxin reductase activity may be more important than GSH level in protecting human lens epithelial cells against UVA light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 2, p. 387–396, 2015.

PAPOUTSAKIS, E. T. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, n. 6, p. 813–826, 1984.

PARK, J. M.; HONG, W. K.; LEE, S. M.; et al. Identification and characterization of a short-chain acyl dehydrogenase from Klebsiella pneumoniae and its application for high-level production of L-2,3-butanediol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 9, p. 1425–1433, 2014.

PEEKHAUS, N.; CONWAY, T. What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology,** v. 180, n. 14, p. 3495–3502, 1998.

PEREGRIN-ALVAREZ, J. M.; TSOKA, S.; OUZOUNIS, C. A. The phylogenetic extent of metabolic enzymes and pathways. **Genome Research**, v. 13, n. 3, p. 422–427, 2003.

PEREIRA, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de bioprocessos. Rio de Janeiro, RJ: **Escola de Química**/UFRJ, 2008.

PEREIRA, Y.; PETIT-GLATRON, M. F.; CHAMBERT, R. yveB, encoding endolevanase LevB, is part of the sacB-yveB-yveA levansucrase tricistronic operon in Bacillus subtilis. **Microbiology**, v. 147, n. 12, p. 3413–3419, 2001.

PHILIPPIDIS, Alex. Top 15 Bioprocessing Companies. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, 2018.

PLACZEK, S.; SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; et al. BRENDA in 2017: New perspectives and new tools in BRENDA. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D380–D388, 2017.

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; TODD, C. A Numerical Classification of the Genus Bacillus. **Microbiology,** v. 134, n. 7, p. 1847–1882, 1988.

PRIEST, F. G. Paenibacillus. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1–40, 2015.

PROSSER, G. A.; LARROUY-MAUMUS, G.; DE CARVALHO, L. P. S. Metabolomic strategies for the identification of new enzyme functions and metabolic pathways. **EMBO reports**, v. 15, n. 6, p. 657–669, 2014.

PU, Z.; JI, F.; WANG, J.; et al. Rational design of Meso-2,3-butanediol dehydrogenase by molecular dynamics simulation and experimental evaluations. **FEBS Letters**, v. 591, n. 20, p. 3402–3413, 2017.

QIU, Y.; ZHANG, J.; LI, L.; et al. Engineering Bacillus licheniformis for the production of meso-2,3-butanediol. **Biotechnology for Biofuels,** v. 9, n. 1, 2016.

RAJU P. World History of Modern Biotechnology and its Applications. **BioTechnology: An Indian Journal**, v. 12, n. 11, p. 1–5, 2016.

RASTOGI, G.; GURRAM, R. N.; BHALLA, A.; et al. Presence of glucose, xylose, and glycerol fermenting bacteria in the deep biosphere of the former Homestake gold mine, South Dakota. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. FEB, 2013.

RAYNAUD, C.; LEE, J.; SARÇABAL, J. L.; et al. Molecular characterization of the glycerol-oxidative pathway of Clostridium butyricum VPI 1718. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 12, p. 3127–3134, 2011.

RAZA, W.; MAKEEN, K.; WANG, Y.; et al. Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by Paenibacillus polymyxa SQR-21. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6095–6103, 2011.

RENNA, M. C.; NAJIMUDIN, N.; WINIK, L. R.; et al. Regulation of the Bacillus subtilis alsS, alsD, and alsR genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 12, p. 3863–3875, 1993.

Transparency Market Research. Butanediol (1,4-BDO & 2,3-BDO), 1,3 Butadiene And Methyl Ethyl Ketone (MEK) Market: Applications, Bio-Based Alternatives, Downstream Potential, Market Size And Forecast, 2010 - 2018, 2012. Disponível em: <https://www.transparencymarketresearch.com/butanediol-butadiene-and-mek-market.html>. Acesso em: 29/09/2018.

RUF, A.; STIHLE, M.; BENZ, J.; et al. Structure of Gentlyase, the neutral metalloprotease of Paenibacillus polymyxa. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography,** v. 69, n. 1, p. 24–31, 2013.

SABRA, W.; GROEGER, C.; ZENG, An Ping. Microbial cell factories for diol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 2016, v. 155, p. 165–197.

SAKAI, S.; TSUCHIDA, Y.; OKINO, S.; et al. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested Corynebacterium glutamicum R. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2349–2353, 2007.

SÁNCHEZ, A. M.; BENNETT, G. N.; SAN, K. Y. Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an Escherichia coli alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 2, p. 358–365, 2005.

SCHARF, C.; RIETHDORF, S.; ERNST, H.; et al. Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in Bacillus subtilis. **Journal of Bacteriology**, 1998.

SEKAR, R.; SHIN, H. D.; DICHRISTINA, T. J. Activation of an otherwise silent xylose metabolic pathway in Shewanella oneidensis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3996–4005, 2016.

SHEN, X.; LIN, Y.; JAIN, R.; et al. Inhibition of acetate accumulation leads to enhanced production of (R,R)-2,3-butanediol from glycerol in Escherichia coli. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 11, p. 1725–1729, 2012.

SHRIVASTAV, A.; LEE, J.; KIM, H. Y.; et al. Recent insights in the removal of Klebsiella pathogenicity factors for the industrial production of 2,3-butanediol. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 885–896, 2013.

SIGMA-ALDRICH. Dispase® II (neutral protease, grade II). p. 2, 2010.

SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; et al. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, n. 19, p. 3210–3212, 2015.

SLATER, G. St C.; BIRNEY, E.. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. BMC **Bioinformatics**, v. 6, n. 31, 2005.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics,** v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014.

STANIER, R Y; FRATKIN, S B. Studies on the bacterial oxidation of 2,3-butanediol and related compounds. **Can. J. Res.**, v. 22b, n. 5, p. 140–153, 1944.

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic engineering: Perspective of a chemical engineer. **AIChE Journal**, v. 48, n. 5, p. 920–926, 2002.

STORMER, F. C. Evidence for induction of the 2,3-butanediol-forming enzymes in Aerobacter aerogenes. **FEBS Letters**, v. 2, n. 1, p. 36–38, 1968.

STRECKER, H. J.; HARARY, I. Bacterial butylene glycol dehydrogenase and diacetyl reductase. **Journal of Biological Chemistry,** v. 211, n. 1, p. 263–270, 1954.

SUTTER, J. M.; TÄSTENSEN, J. B.; JOHNSEN, U.; et al. Key enzymes of the semiphosphorylative entner-doudoroff pathway in the haloarchaeon Haloferax volcanii: Characterization of glucose dehydrogenase, gluconate dehydratase, and

2-Keto-3-Deoxy-6-phosphogluconate aldolase. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 16, p. 2251–2262, 2016.

SYU, M. J. Biological production of 2,3-butanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 10–18, 2001.

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of Clostridium butyricum DSP1. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 128–133, 2015.

TABOADA, B.; CIRIA, R.; MARTINEZ-GUERRERO, C. E.; et al. ProOpDB: Prokaryotic operon database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, 2012.

TAYLOR, M. B.; JUNI, E. Mechanisms of formation of stereoisomers of 2,3-butanediol during microbial fermentation of sugars. **Nature**, v. 181, n. 4620, p. 1389–1390, 1958.

TAYLOR, M B.; JUNI, E Stereoisomeric specificities of 2,3-butanediol dehydrogenases. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 39, n. 3, p. 448–457, 1960.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

TRÜPER, H. G. The type species of the genus Paenibacillus Ash et al. 1994 is Paenibacillus polymyxa. Opinion 77. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 55, n. 1, p. 513, 2005.

TYSON, J. J.; NOVÁK, B. Functional Motifs in Biochemical Reaction Networks. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 219–240, 2010

UI, S.; HOSAKA, T.; MIZUTANI, K.; et al. Acetylacetoin synthase as a marker enzyme for detecting the 2,3-butanediol cycle. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** v. 93, n. 2, p. 248–251, 2002.

UI, S.; HOSAKA, T.; WATANABE, K.; et al. Discovery of a new mechanism of 2,3-butanediol stereoisomer formation in Bacillus cereus YUF-4. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 1, p. 79–83, 1998a.

UI, S.; MASUDA, T.; MASUDA, H.; et al. Mechanism for the formation of 2,3-butanediol stereoisomers in Bacillus polymyxa. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, n. 6, p. 481–486, 1986.

UI, S.; OKAJIMA, Y.; MIMURA, A.; et al. Sequence analysis of the gene for and characterization of D-acetoin forming meso-2,3-butanediol dehydrogenase of Klebsiella pneumoniae expressed in Escherichia coli. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 1, p. 32–37, 1997.

UI, S.; OTAGIRI, M.; MIMURA, A.; et al. Cloning, expression and nucleotide sequence of the L-2,3-butanediol dehydrogenase gene from Brevibacterium saccharolyticum C-1012. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1998b.

UM, J. KIM, D. G.; JUNG, M. Young; et al. Metabolic engineering of Enterobacter aerogenes for 2,3-butanediol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technolog**y, v. 245, p. 1567–1574, 2017.

UNDEN, G.; BECKER, S.; BONGAERTS, J.; et al. Oxygen regulated gene expression in facultatively anaerobic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 66, n. 1–3, p. 3–22, 1994.

WANG, M.; FU, J.; ZHANG, X.; et al. Metabolic engineering of Bacillus subtilis for enhanced production of acetoin. **Biotechnology letters,** v. 34, n. 10, p. 1877–1885, 2012.

WANG, Y.; TAO, F.; XIN, B.; et al. Switch of metabolic status: redirecting metabolic flux for acetoin production from glycerol by activating a silent glycerol catabolism pathway. **Metabolic Engineering**, v. 39, p. 90–101, 2017.

WATERHOUSE, R. M.; SEPPEY, M.; SIMAO, F.; et al. BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 3, p. 543–548, 2018.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. B.; et al. Manutenção do genoma. **Biologia Molecular do Gene**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015, p. 912.

WESELOWSKI, B.; NATHOO, N.; EASTMAN, A. W.; et al. Isolation, identification and characterization of Paenibacillus polymyxa CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, 2016.

WU, LIMING; LI, XI; MA, LIUMIN; et al. Acetoin and 2,3-butanediol from Bacillus amyloliquefaciens induce stomatal closure in Arabidopsis thaliana and Nicotiana benthamiana. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 22, p. 5625–5635, 2018.

XIAO, Z.; MA, C.; XU, P.; et al. Acetoin catabolism and acetylbutanediol formation by Bacillus pumilus in a chemically defined medium. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, 2009.

XIAO, Z.; XU, P. Acetoin metabolism in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 127–140, 2007.

XIE, J.; SHI, .; DU, Z.; et al. Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in Paenibacillus polymyxa and its closely related species. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

XIE, L.; WANG, D. I.C. Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor. **Cytotechnology**, v. 15, n. 1–3, p. 17–29, 1994.

XIE, N. Z.; LI, J. X.; SONG, L. F.; et al. Genome sequence of type strain Paenibacillus polymyxa DSM 365, a highly efficient producer of optically active (R,R)-2,3-butanediol. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 72–73, 2015.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol - A byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels,** v. 5, n. 13, 2012.

YANG, H.; PURI, A.; PADDA, K. P.; et al. Substrate utilization by endophytic bacteria Paenibacillus polymyxa P2b-2R that may facilitate bacterial entrance and survival inside diverse plant hosts. **Facets,** v. 2, n. 1, p. 120–130, 2017.

YANG, Q.; SZE, S. H.. Large-scale analysis of gene clustering in bacteria. **Genome Research**, v. 18, n. 6, p. 949–956, 2008.

YANG, T. H.; RATHNASINGH, C.; LEE, H. J.; et al. Identification of acetoin reductases involved in 2,3-butanediol pathway in Klebsiella oxytoca. **Journal of Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 59–66, 2014.

YANG, T.; RAO, Z.; ZHANG, X.; et al. Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in Bacillus amyloliquefaciens. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, 2015.

YANG, Z.; ZHANG, Z.. Recent advances on production of 2, 3-butanediol using engineered microbes. **Biotechnology Advances**, 2018.

YAO, R.; XIONG, D.; HU, H.; et al. Elucidation of the co-metabolism of glycerol and glucose in Escherichia coli by genetic engineering, transcription profiling, and13C metabolic flux analysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, 2016.

YEH, J. I.; KETTERING, R.; SAXL, R.; et al. Structural characterizations of glycerol kinase: Unraveling phosphorylation-induced long-range activation. **Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 346–356, 2009.

YI, H. S.; AHN, Y. R.; SONG, G. C.; et al. Impact of a bacterial volatile 2,3-butanediol on Bacillus subtilis rhizosphere robustness. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, 2016.

YU, B.; SUN, J.; BOMMAREDDY, R. R.; et al. Novel (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase from potential industrial strain Paenibacillus polymyxa ATCC 12321. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4230–4233, 2011a.

YU, W. B.; GAO, S. H.; YIN, C. Y.; et al. Comparative transcriptome analysis of bacillus subtilis responding to dissolved oxygen in adenosine fermentation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011b.

ZAIDI, S. S. A.; ZHANG, X. Computational operon prediction in whole-genomes and metagenomes. **Briefings in Functional Genomics**, v. 16, n. 4, p. 181–193, 2017.

ZDOBNOV, E. M; TEGENFELDT, F.; KUZNETSOV, D.; et al. OrthoDB v9.1: cataloging evolutionary and functional annotations for animal, fungal, plant, archaeal, bacterial and viral orthologs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D744–D749, 2017.

ZEIGLER, D. R. The family paenibacillaceae. **Strain Catalog and Reference - BGSC**. Columbus, USA, 2013, p. 32.

ZENG, A.P.; SABRA, W. Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 749–757, 2011.

ZHANG, J.; ZHAO, L.; GAO, B.; et al. Protopectinase production by Paenibacillus polymyxa Z6 and its application in pectin extraction from apple pomace. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 1, 2017.

ZHANG, L.; GUO, Z.; CHEN, J.; et al. Mechanism of 2,3-butanediol stereoisomers formation in a newly isolated Serratia sp. T241. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

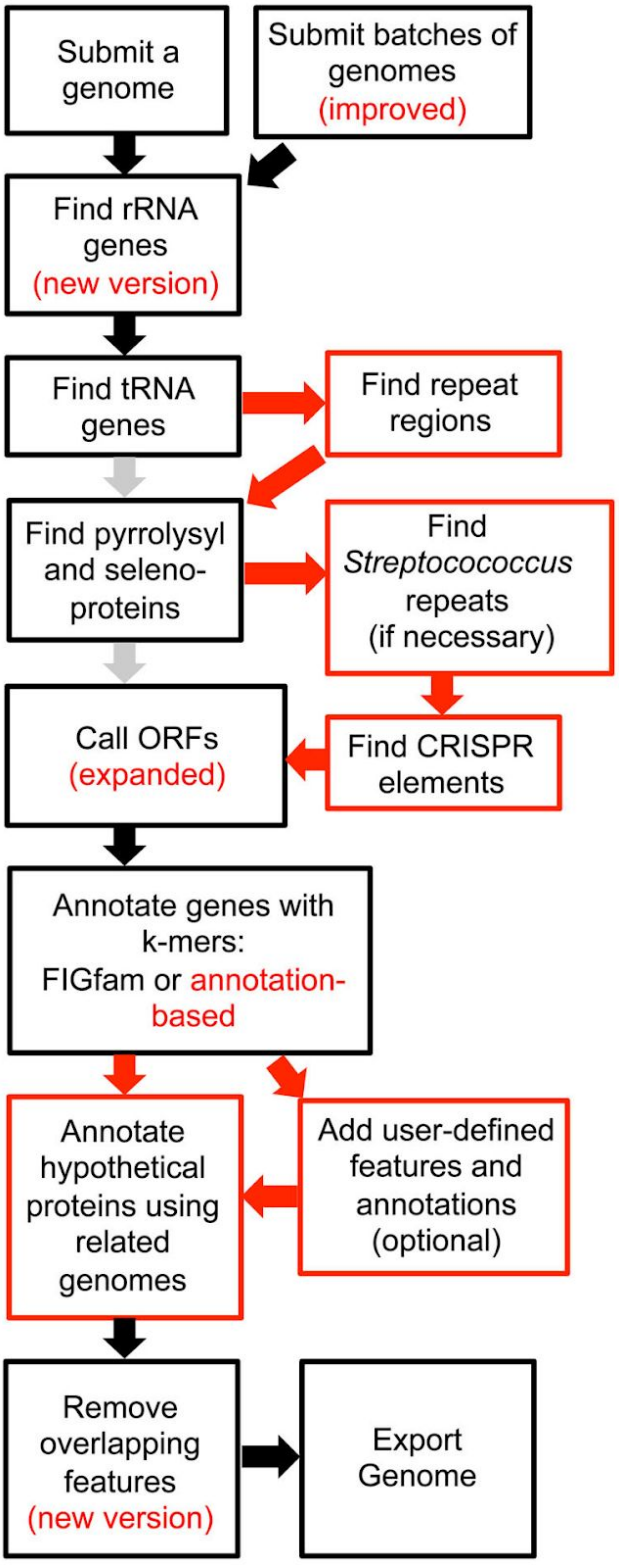
ZHANG, L.; SINGH, R.; SIVAKUMAR, D.; et al. An artificial synthetic pathway for acetoin, 2,3-butanediol, and 2-butanol production from ethanol using cell free multi-enzyme catalysis. **Green Chemistry,** v. 20, n. 1, p. 230–242, 2018.

ZHANG, L.; XU, Q.; PENG, X.; et al. Cloning, expression and characterization of glycerol dehydrogenase involved in 2,3-butanediol formation in Serratia marcescens H30. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 9, p. 1319–1327, 2014.

ZHANG, L.; ZHANG, Y.; LIU, Q.; et al. Production of diacetyl by metabolically engineered Enterobacter cloacae. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

ZHANG, Y.; LI, S.; LIU, L.; et al. Acetoin production enhanced by manipulating carbon flux in a newly isolated Bacillus amyloliquefaciens. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 256–260, 2013.

ANEXO A - Fluxograma de funcionamento do RAST



As etapas em vermelho são novas; os textos em vermelho são melhoramentos em relação à versão antiga e as setas em cinza indicam etapas retiradas da versão mais atual. Retirado de BRETTIN et al, 2015.

ANEXO B - Registro do programa ProspectBio

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512018000940-9**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1° de janeiro subsequente à data de 01/09/2017, em conformidade com o §2°, art. 2° da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: ProspectBIO

Data de publicação: 01/09/2017

Data de criação: 01/09/2017

Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, CNPJ: 33.663.683/0001-16

Autor(es): RAFAEL DIAS MESQUITA, CPF: 035.541.517-85; ELOY DA SILVA SEABRA JUNIOR, CPF: 128.013.597-26; YURI SILVEIRA RODRIGUES, CPF: 129.109.127-01; MARIA CLARA REIS NUCCI, CPF: 125.198.487-82; PRISCILA BASTOS PINHEIRO, CPF: 118.864.467-09; PRISCILA ESTEVES DE FARIA, CPF: 146.599.617-61; IVALDO ITABAIANA JUNIOR, CPF: 116.749.507-13; ANDRÉ LUIZ QUINTANILHA TORRES, CPF: 105.884.377-00

Linguagem: C; C++

Campo de aplicação: BL-02; BL-07; CO-02

Tipo de programa: TC-01

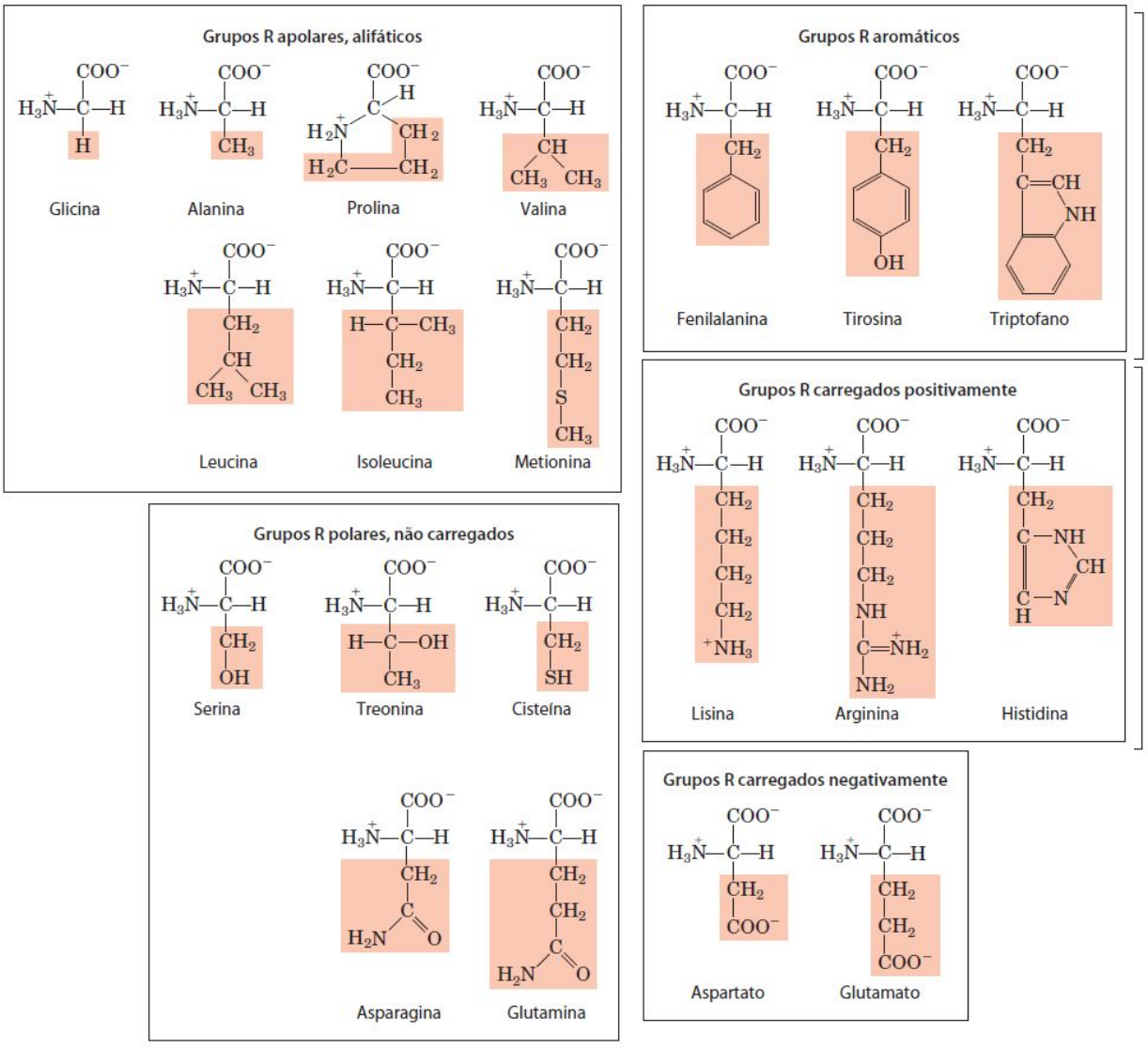
Algoritmo hash: SHA-512

Resumo digital hash:
a4740024bd1bce011a88e5b771cb0f2a5fbecfc0be399cabe6bae46704d523e8c4e520965a851a5ad9d08daa32f424be39649b976f56c9e379b7470f5ebd9115

Expedido em: 19/06/2018

Aprovado por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos

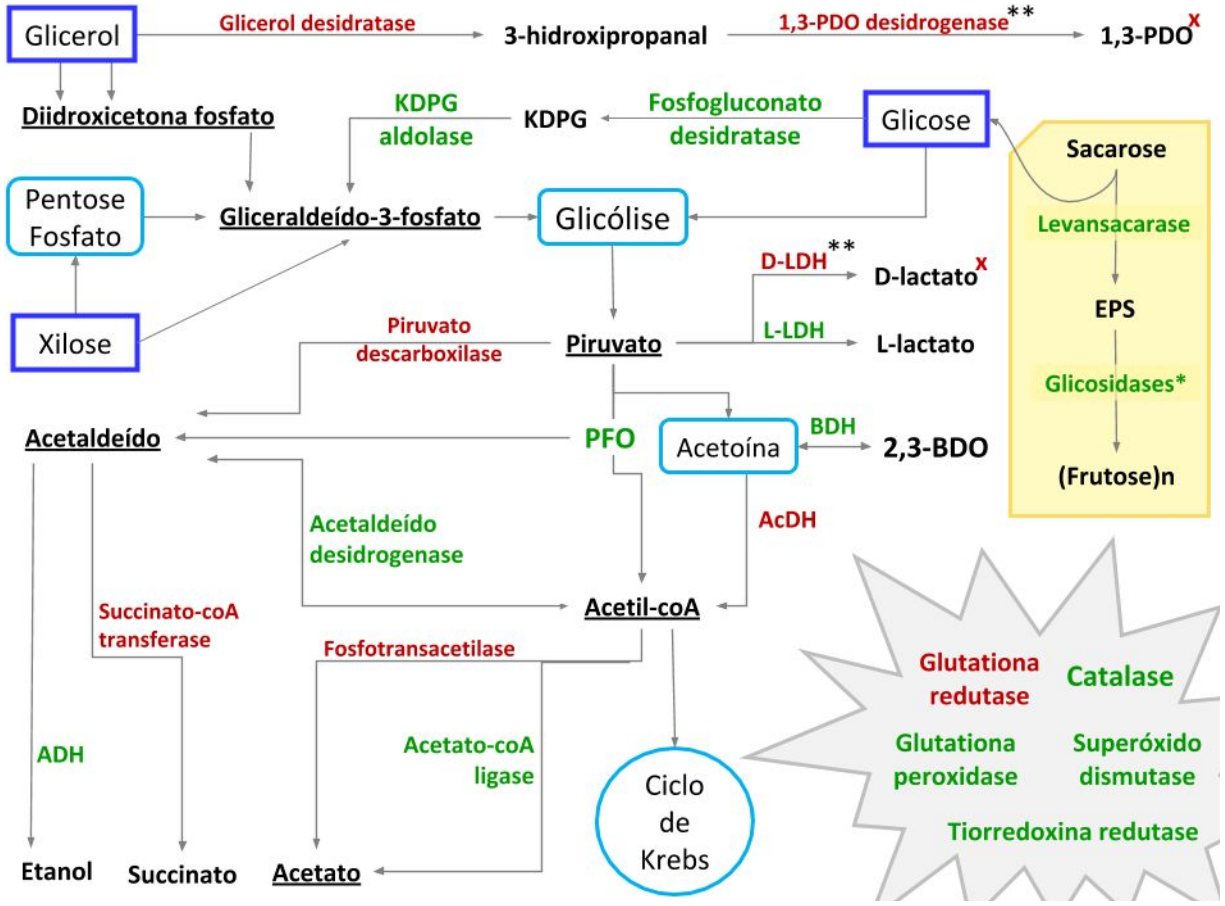
ANEXO C - Estrutura dos 20 aminoácidos essenciais



Estrutura dos 20 aminoácidos essenciais.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. Princípios de Bioquímica. 4 ed. Sarvier. São Paulo, 2006.

ANEXO D - Mapa metabólico de *P. polymyxa* PM3605



Mapa metabólico resultante da combinação das estratégias de anotação. Devido ao grande número de enzimas buscadas, algumas foram ocultadas. Escrito em vermelho: enzimas ausentes; em verde: enzimas presentes; e em preto, substrato/produto, onde aqueles escritos apenas em negrito são produtos de vias tradicionais, sublinhados indicam produtos possíveis por mais de uma via, e aqueles com um "x" vermelho são produtos que não podem ser sintetizados; Retângulos em azul escuro: fonte de carbono; em azul claro: via completa. Fundo cinza: enzimas de combate ao estresse oxidativo; Fundo bege: via de produção/degradação do exopolissacarídeo (EPS) levana. Siglas: 1,3-PDO= 1,3-propanodiol; 2,3-BDO= 2,3-butanodiol; LDH= lactato desidrogenase; AcDH= Acetoína desidrogenase; ADH= álcool desidrogenase; BDH= butanodiol desidrogenase; KDPG= 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato PFO= Piruvato ferredoxina oxidorredutase. *Levanase e 2,6-beta-frutano 6-levanbiohidrolase. ** Enzimas presentes em outras cepas de *P. polymyxa*, mas não em PM3605.

ANEXO E - Enzimas buscadas para *P. polymyxa*

Via	**Enzima**	
	Nome	**Código (RAST)***
Glicólise	Glicoquinase	1406.159.peg.4600
	Glicose-6-fosfato isomerase	1406.159.peg.392
	Fosfofrutoquinase	1406.159.peg.3598
	Frutose 1,6-bifosfato aldolase	1406.159.peg.2127
	Triosefosfato isomerase	1406.159.peg.4611
	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	1406.159.peg.4609
	Fosfoglicerato quinase	1406.159.peg.4610
	Fosfoglicerato mutase[1]	1406.159.peg.4612
	Fosfoglicerato mutase[2]	1406.159.peg.2759
	Enolase	1406.159.peg.4613
	Piruvato quinase	1406.159.peg.4720
	Regulador de genes centrais da glicólise	1406.159.peg.4608
Via de Entner-Doudoroff	Glicose-6-fosfato desidrogenase	1406.159.peg.3261 1406.159.peg.5214
	6-fosfogluconolactonase	1406.159.peg.3255
	Fosfogluconato desidratase	1406.159.peg.5116
	KDPG aldolase	1406.159.peg.2797
Assimilação oxidativa de Glicerol (I)	Proteína facilitadora da captação de glicerol	1406.159.peg.289
	Glicerol quinase	1406.159.peg.290
	Glicerol-3-fosfato desidrogenase	1406.159.peg.1363
Assimilação oxidativa de Glicerol (II)	Glicerol desidrogenase	1406.159.peg.5053
	Diidroxicetona quinase	1406.159.peg.5052
Assimilação redutora de	Glicerol desidratase	-

Glicerol[3]	1,3-propanodiol desidrogenase	-
Assimilação de Xilose	Xilose isomerase	1406.159.peg.4856
	Xiluloquinase	1406.159.peg.4855
	Fosfocetolase #	1406.159.peg.4639
Via das Pentoses	Glicose-6-fosfato desidrogenase	1406.159.peg.3261 1406.159.peg.5214
	6-fosfogluconolactonase	1406.159.peg.3255
	6-fosfogluconato desidrogenase	1406.159.peg.1570 1406.159.peg.3260
	Ribulose-fosfato 3-epimerase	1406.159.peg.1518
	Ribose 5-fosfato isomerase	1406.159.peg.3489
	Transcetolase	1406.159.peg.389
	Transaldolase	1406.159.peg.3496
Fermentação de 2,3-BDO	Acetolactato sintase	1406.159.peg.3244
	Acetolactato descarboxilase	1406.159.peg.3245
	Diacetil redutase	1406.159.peg.1188
	Butanodiol desidrogenase	1406.159.peg.2066
Fermentação láctica (I)	L-lactato desidrogenase	1406.159.peg.91 1406.159.peg.730
Fermentação láctica (II)	D-lactato desidrogenase	-
Produção de acetaldeído	Acetaldeído desidrogenase	1406.159.peg.1479
	Aldeído desidrogenase	1406.159.peg.4472
	Piruvato ferredoxina oxidorredutase	1406.159.peg.1394 1406.159.peg.1395
	Piruvato descarboxilase	-
Produção de acetil-coA	Acetoína desidrogenase	-
	Acetaldeído desidrogenase	1406.159.peg.1479
	Piruvato desidrogenase	1406.159.peg.3240

	Piruvato ferredoxina oxidorredutase	1406.159.peg.1394 1406.159.peg.1395
	Piruvato formato liase (Proteína ativadora da piruvato formato liase)	1406.159.peg.1478 (1406.159.peg.1477)
Fermentação alcoólica	Acetaldeído desidrogenase	1406.159.peg.1479
	Álcool desidrogenase	1406.159.peg.3476
Fermentação a acetato/succinato	Succinil-CoA:acetato CoA-transferase	-
	Succinil-CoA ligase	1406.159.peg.3424 1406.159.peg.3425
Fermentação a acetato	Aldeído desidrogenase	1406.159.peg.4472
	Fosfotransacetilase	-
	Acetato quinase	1406.159.peg.1301
	Acetato-coA ligase	1406.159.peg.1558
Ciclo de Krebs	Citrato sintase	1406.159.peg.3699
	Aconitato hidratase	1406.159.peg.4535
	Isocitrato desidrogenase	1406.159.peg.3698
	2-oxoglutarato desidrogenase	1406.159.peg.470 1406.159.peg.471
	Succinil-CoA ligase	1406.159.peg.3424 1406.159.peg.3425
	Succinato desidrogenase	1406.159.peg.5324 1406.159.peg.5325 1406.159.peg.5326
	Fumarato hidratase	1406.159.peg.109
	Malato desidrogenase	1406.159.peg.3697
	Malato:quinona oxidorredutase	1406.159.peg.2587
Combate ao estresse oxidativo	Catalase	1406.159.peg.3745
	Glutationa peroxidase	1406.159.peg.357 1406.159.peg.2921
	Glutationa redutase	-

	Superóxido dismutase	1406.159.peg.4518
	Tiorredoxina redutase	1406.159.peg.447 1406.159.peg.3265 1406.159.peg.3311 1406.159.peg.4599 1406.159.peg.4859 1406.159.peg.5309 1406.159.peg.5384
Metabolismo de EPS	Levansacarase	1406.159.peg.4493
	Levanase	1406.159.peg.4013
	2,6-beta-frutano 6-levanbiohidrolase	1406.159.peg.4494

*Código da predição realizada para *P. polymyxa* PM3605

Fosfocetolase representa um *bypass* da Via das Pentoses

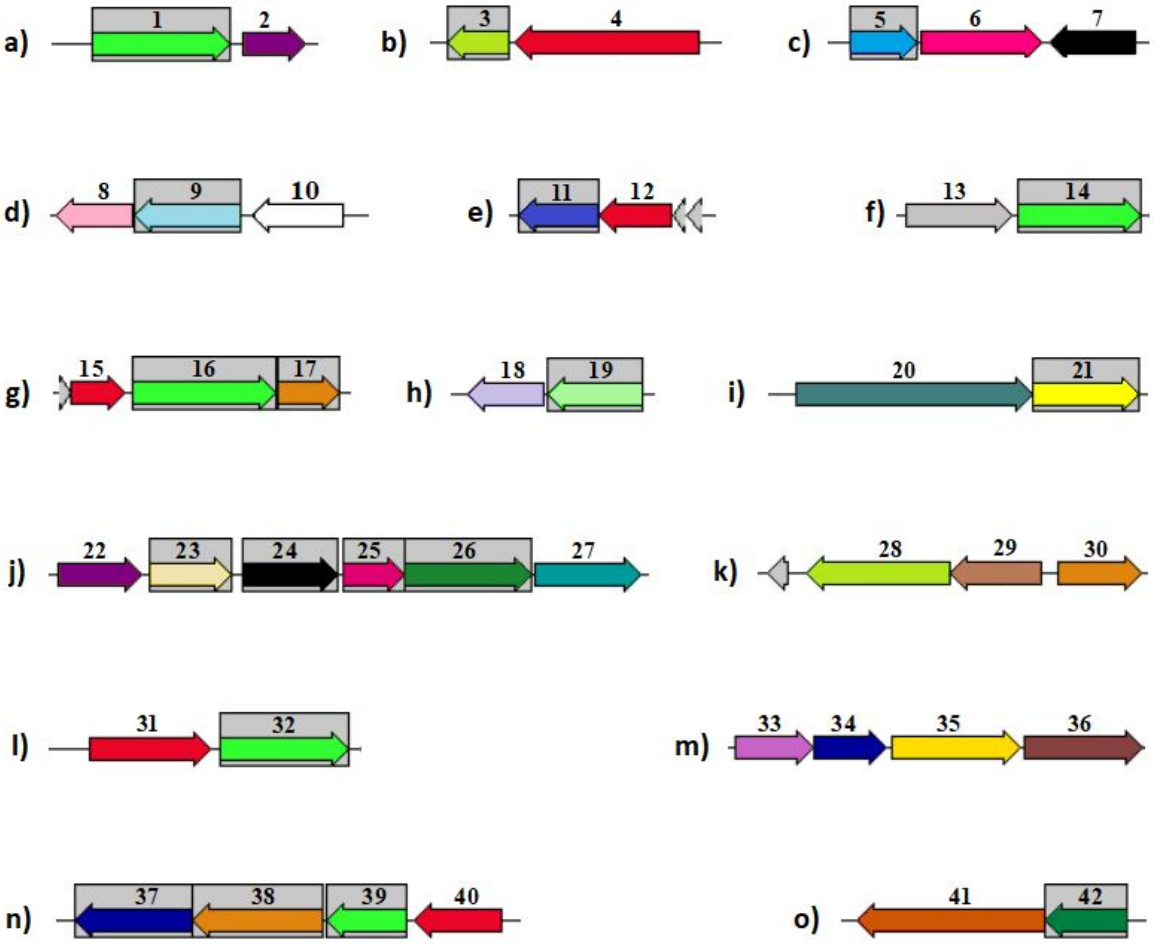
- Enzima ausente

[1] Independente de 2,3-bisfosfoglicerato

[2] Dependente de 2,3-bisfosfoglicerato

[3] Fermentação de 1,3-propanodiol

ANEXO F - Estrutura dos *operons* encontrados em *P. poylymxa* PM3605



As setas indicam genes, onde aquelas não numeradas remetem a genes não relacionados ao *operon*. As cores não têm significado. **a) *alsSD* (síntese de acetoína)**: 1= Acetolactato sintase, 2= Acetolactato descarboxilase; **b) Produção de ácido fórmico**: 3= Piruvato formato liase, 4= proteína ativadora da Piruvato formato liase; **c) GlpFK - Assimilação de glicerol (I)**: 5= Proteína facilitadora da captação de glicerol, 6= Glicerol quinase, 7= Regulador transcricional da família LacI; **d) Ciclo de Krebs**: 8= Malato desidrogenase, 9= Isocitrato desidrogenase, 10= Citrato sintase; **e) acetil-coA carboxil transferase**: 11= Subunidade alfa, 12= Subunidade beta; **f) Assimilação de xilose**: 13= Xilose isomerase, 14= Xiluloquinase; **g) Succinato desidrogenase**: 15= Subunidade citocromo b558, 16= Subunidade flavoproteína, 17= Proteína ferro-enxofre; **h) Succinil-coA ligase**: 18= Subunidade alfa, 19= Subunidade beta; **i) 2-oxoglutarato desidrogenase**: 20= Componente E1, 21= Componente E2; **j) Glicólise**: 22= Regulador de genes centrais da glicólise, 23= Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 24= Fosfoglicerato quinase, 25= Triosefosfato isomerase, 26= Fosfoglicerato mutase (independente de 2,3-bifosfoglicerato), 27= Enolase; **k) Assimilação de glicerol (II)**: 28= Diidroxicetona quinase, 29= Glicerol desidrogenase, 30= Regulador transcricional da família AraC; **l) EPS (I)**: 31= Levansacarase, 32= 2,6-beta-frutano 6-levanbiohidrolase; **m) EPS (II)**: 33= Permease 2 (transportador ABC de sacarose), 34= Permease 1 (transportador ABC de sacarose), 35= Transportador de sacarose (proteína de ligação ao substrato), 36= Levanase; **n) Complexo piruvato desidrogenase**: 37= Diidrolipoamida desidrogenase, 38= Diidrolipoamida acetiltransferase, 39= Subunidade beta do Componente E1 da Piruvato desidrogenase, 40= Subunidade alfa do Componente E1 da Piruvato desidrogenase; **o) Piruvato ferredoxina oxidorredutase**: 41= Subunidade alfa/beta, 42= Subunidade gama/delta.

ANEXO G - Sequências utilizadas para a construção da árvore filogenética

Organismo	**Código**	
	Árvore	**Banco de dados**
Brevibacterium saccharolyticum	S_Bsac	Q9ZNN8
Klebsiella pneumoniae	m_Kpne	Q48436
Klebsiella terrigena	m_Kter	Q04520
Ketogulonicigenium robustum	Sm_Krob	A0A1W6NW12
Lactobacillus sakei subsp. sakei	m_Lsak	Q38YY3
Roseibaca calidilacus	Sm_Rcal	A0A0N8K768
Marinobacter sp. HL-58	Sm_Msp	A0A0P7X5G6
Staphylococcus epidermidis	m_Sepi	Q8CQD2
Weissella soli	S_Wsol	A0A288QVZ2
Bifidobacterium actinocoloniiforme	S_Bact	A0A086YZC8
Moellerella wisconsensis	S_Mwis	A0A0N0IAP6
Thiobacimonas profunda	Sm_Tpro	A0A1U7D589
Bacillus coagulans	pS_Bcoa	A0A0C5CIR7
Bacillus licheniformis	Sm0_Blic	BLi02066
Pseudomonas fluorescens	Sm0_Pf	PflA506_2313
Gluconacetobacter diazotrophicus	Sm0_Gdia	GDI2623
Enterobacter cloacae	Sm0_Eclo	EcWSU1_01150
Serratia marcescens	Sm1_Smar	SMWW4_v1c20820
Mycobacterium dioxanotrophicus	Sm1_Mdio	BTO20_28760
Lactobacillus oris	Sm1_Loris	AYI71_10410
Paraburkholderia phenoliruptrix	Sm1_Pphe	BUPH_05581
Janthinobacterium sp.	Sm0_Jsp	YQ44_27765
Pelobacter carbinolicus	pSm0_Pcar	Pcar_0903
Escherichia coli	pSm0_Ecoli	ECSE_P3-0048

Zymomonas mobilis subsp. mobilis	Sm1_Zmob	ZMO0318
Acidovorax citrulli	Sm1_Acit	Aave_1551
Vibrio cholerae	Sm1_Vcho	Vch1786_I1088
Cronobacter turicensis	Sm0_Ctur	CTU_29850
Eikenella corrodens	Sm0_Ecor	SAMEA4412678_1370
Proteus hauseri	S_Phau	A0A1B7JCK9
Orrella dioscoreae	Sm0_Odio	ODI_R3186
Terribacillus saccharophilus	Sm_Tsac	A0A1H8EWC7
Lonsdalea quercina	Sm_Lque	A0A1H4FIC3
Kozakia baliensis	Sm0_Kbal	A0U89_03685
Cosenzaea myxofaciens	Sm_Cmyx	A0A198GD04
Yersinia ruckeri	Sm1_Yruc	BD65_651
Sodalis praecaptivus	Sm1_Spra	Sant_3892
Zhongshania aliphaticivorans	Sm1_Zali	AZF00_12930
Azoarcus sp. CIB	hSm1_Asp	AzCIB_1476
Sinorhizobium meliloti	Sm1_Smel	SM11_pC0373
Methylobacterium extorquens	Sm1_Mext	Mext_1326
Serratia plymuthica	Sm0_Sply	M621_16790
Cobetia marina	Sm0_Cmar	BFX80_11005
Roseibacterium elongatum	Sm0_Relo	roselon_03671
Ensifer sojae	Sm0_Esoj	SJ05684_b54230
Rhizobium leguminosarum	Sm0_Rleg	Rleg2_2038
Xanthobacter autotrophicus	Sm0_Xaut	Xaut_4042
Celeribacter marinus	Sm0_Cmas	IMCC12053_1984

A nomenclatura das sequências foi baseada nas suas classificações nos bancos de dados de onde foram retiradas (UniProt/KEGG): S= S-BDH; m= meso-BDH; Sm= S/meso-BDH; Sm0= S/meso-BDH código K003366 (KEGG); Sm1= S/meso-BDH código K18009 (KEGG); p = putativa; h = hipotética.