



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

ANÁLISE METABOLÔMICA DE *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) EM DEPLEÇÃO DE BIOTINA

Irvin Bryan Machado Ferraz

Brasília, julho de 2022



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

ANÁLISE METABOLÔMICA DE *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) EM DEPLEÇÃO DE BIOTINA

Irvin Bryan Machado Ferraz

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Ferreira do Vale

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (CEL/UnB)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Brasília, julho de 2022

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luis Henrique Ferreira do Vale (Presidente, orientador)

Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Prof. Dr. Thomas Christopher Rhys Williams (Membro 1)

Universidade de Brasília

Departamento de Botânica

Laboratório de Fisiologia Vegetal

Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte (Membro 2)

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Prof. Dr. Eliane Ferreira Noronha (Suplente)

Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Laboratório de Enzimologia

Agradecimentos

A jornada acadêmica apresenta diversos desafios que fazem parte do amadurecimento e aperfeiçoamento, porém, realizar um mestrado em um período de pandemia mundial foi extremamente difícil. Os problemas técnicos referentes ao laboratório e a pesquisa em si eu sabia que era só ter paciência e perseverança que uma hora daria certo, porém a parte psicológica foi a mais difícil de conseguir lidar e só fui capaz pelo enorme apoio que recebi das mais diversas pessoas, e é a essas importantíssimas pessoas que dedico os agradecimentos.

Agradeço meu orientador, o professor Luis Henrique Ferreira do Vale, que me aceitou como aluno e motivou a fazer o mestrado desde quando eu fazia iniciação científica em seu laboratório. Sua orientação foi muito importante para eu conseguir me manter firme e focado no trabalho mesmo depois de tantos imprevistos e falhas. Ao professor Thomas Christopher Rhys Williams, agradeço por toda atenção, disponibilidade e paciência que teve comigo desde quando nos conhecemos em meu primeiro semestre da graduação, além de toda ajuda e suporte de seu laboratório para eu realizar os experimentos do projeto. Agradeço ao mestre Reynaldo Magalhães Melo, que com sua experiência me auxiliou em vários experimentos, e ajudou a solucionar os diversos problemas através de nossas constantes discussões científicas. Sou muito grato ao técnico Nuno Manuel Domingues, pois foi com ele que aprendi muito do que sei sobre laboratório, desde o preparo de soluções a conhecimentos teóricos de química e dos equipamentos utilizados, sem contar que foi a pessoa com quem mais tive contato durante todos os anos que passei no laboratório do LBQP. Pelo fornecimento da minha bolsa de mestrado que propiciou que me dedicasse integralmente a pesquisa, agradeço a CAPES.

Agradeço a minha família, que foi muito importante nesses anos tão turbulentos, mesmo morando em regiões diferentes conseguiram me dar todo o apoio, do afetivo ao financeiro, que precisei. Assim agradeço: a meu pai, José Domingos Martins Ferraz; minha mãe, Jania Aparecida Machado Maués, que ainda não consegui ensinar para ela o que é o mestrado; meu padrasto, Walter Raick Maués, com quem tive ótimas conversas sobre o projeto; e por fim, a minha namorada Raehli Oliveira Hage que me acompanhou por todo o percurso do mestrado me ajudando tanto na vida quanto no trabalho, como os belos fluxogramas presentes nesta dissertação.

Apoio financeiro

Agradeço ao fomento providenciado pela CAPES, responsável pelo pagamento da minha bolsa, e ao financiamento feito pela FAP-DF que por meio de projetos de demanda espontânea e pronex fomentou custos variados ao longo do desenvolvimento desse projeto.

“Se você for uma pessoa que busca realmente a verdade, é necessário que ao menos uma vez na vida duvide de todas as coisas, da maneira mais profunda possível.”

(René Descartes)

RESUMO

Assim que descoberto o grande potencial industrial da bioprospecção de microrganismos, iniciou-se uma corrida em busca das melhores cepas e genes com o objetivo de inovar nessa área. *Corynebacterium glutamicum* revelou ser uma das melhores bactérias para esse fim, inicialmente pela sua alta produção e secreção do glutamato em cultivos com limitação de biotina. A seguir, com os desenvolvimentos das técnicas ômicas, foi possível observar o rico repertório de vias metabólicas que podem ser utilizadas e melhoradas, o que levou a otimização da produção desenvolvendo técnicas como a depleção de biotina.

Este projeto teve como objetivo utilizar as técnicas de metabolômica com o intuito de caracterizar e melhor compreender os mecanismos de funcionamento que as técnicas já empregadas de maximização de produção de aminoácidos possuem, dessa forma tornando possível o desenvolvimento de estratégias e novas propostas que possibilitem uma melhora na produção dessas biomoléculas. Especificamente este trabalho teve como fundamental intuito estudar o mecanismo conhecido como depleção de biotina, que até então não foi bem elucidado pelas mais atuais publicações científicas.

Foi possível observar com o cultivo que a bactéria crescida em meio de cultura com limitação de biotina apresentou uma OD600 máxima de 25 às 18 h, porém ela continuou consumindo a glicose presente no meio até o fim, e as 24 h foi possível encontrar 47 mmol/L de glutamato. Também obtivemos maiores concentrações de alanina, prolina, aspartato e glicerol, bem como menor concentração de valina. O aumento dessas moléculas pode ser explicado devido aos desvios de vias metabólicas que foram suprimidas pela escassez da biotina, uma coenzima importante no metabolismo de carboidratos. Dentre os diferentes métodos de cultivo, o que apresentou melhor resultado foi o realizado com 50 ml em Erlenmeyer com defletores e com OD600 inicial na depleção de biotina de 0,1. Essas condições de cultivo foram importantes para aumentar a aeração otimizando o crescimento celular e a produção de glutamato, demonstrando a eficiência da depleção de biotina.

Palavras-chave: *Corynebacterium glutamicum*, depleção de biotina, produção de aminoácidos, metabolômica.

Abstract

As soon as he discovered the great industrial potential of bioprospecting for microorganisms, a race began in search of the best strains and genes with the aim of innovating in this area. *Corynebacterium glutamicum* proved to be one of the best bacteria for this purpose, initially due to its high production and secretion of glutamate in cultures with limited biotin. Then, with the development of omics techniques, it was possible to observe the rich repertoire of metabolic pathways that can be used and improved, which led to the optimization of production by developing techniques such as biotin depletion.

This project aimed to use different metabolomics techniques with the characterization mechanism as the working mechanisms that have already been used as techniques for maximizing the production of amino acids in order to be used for the development of better strategies and new proposals that allow an improvement in the production of these biomolecules. Specifically, this work aimed to study the mechanism known as biotin depletion, which was not well elucidated by the most current scientific publications.

It was possible to observe with the cultivation that the bacteria grown in a culture medium with biotin limitation presented a maximum OD600 from 25 to 18 h, but it continued to consume the glucose present in the medium until the end, and at 24 h it was possible to find 47 mmol/ L of glutamate. We also obtained higher concentrations of alanine, proline, aspartate, and glycerol, as well as lower concentrations of valine. The increase in these molecules can be explained by the deviation of metabolic pathways that were suppressed by the scarcity of biotin, an important coenzyme in carbohydrate metabolism. Among the different cultivation methods, the one that presented the best results was carried out with 50 ml in an Erlenmeyer flask with baffles and with an initial OD600 at a biotin depletion of 0.1. These culture conditions were important to increase aeration optimizing cell growth and glutamate production, demonstrating the efficiency of biotin depletion.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, biotin depletion, amino acid production, metabolomics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala. Alanina

Arg. Arginina

Asn. Asparagina

Asp. Aspartato

Cis. Cisteína

CGXII. Meio de cultura *Corynebacterium glutamicum* XII

Fen. Fenilalanina

GC-MS. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Glc. Glicose

Gli. Glicina

Glu. L-glutamato

Gln. Glutamina

His. Histidina

HPAE-PAD. High performance Anion-Exchange with Pulsed Amperometric Detection

HPLC. Cromatografia líquida de alta eficiência

Ile. Isoleucina

KEGG. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LB. Luria-Bertani

Leu. Leucina

Lis. L-lisina

MCL. meio complexo líquido

MCS. meio complexo sólido

Met. Metionina

MOPS. Ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico

MSTFA. N-Trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamida

OD. Densidade óptica

ODHC. 2-oxoglutarato desidrogenase

PCA. Ácido protocatecuico

Pro. Prolina

Ser. Serina

Ter. Treonina

Val. Valina

Tir. Tirosina

Trp. Triptofano

TSB. Caldo Soja Tripticaseína

Lista de figuras

FIGURA 1: ÁRVORE DE MÁXIMA PARCIMÔNIA MOSTRANDO AS POSIÇÕES DAS ESPÉCIES INDUSTRIALMENTE RELEVANTES DO GÊNERO <i>CORYNEBACTERIUM</i>	16
FIGURA 2: MICROGRAFIA POR CONTRASTE DE FASE DE CÉLULAS DE <i>C. GLUTAMICUM</i> CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA COMPLEXO.	17
FIGURA 3: CONSUMO MUNDIAL DE GLUTAMATO MONOSSÓDICO EM 2021.	18
FIGURA 4: REDE BIOQUÍMICA DO METABOLISMO CENTRAL DE <i>C. GLUTAMICUM</i>	20
FIGURA 5: CADEIA DE VALOR BIOECONÔMICO DE PRODUTOS DE CONSUMO GERADOS ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DE <i>C. GLUTAMICUM</i>	21
FIGURA 6: FLUXOS DE IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE A PAREDE CELULAR DE <i>C. GLUTAMICUM</i>	23
FIGURA 7 VIAS METABÓLICAS FORNECIDAS PELO KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES (KEGG) REPRESENTANDO O METABOLISMO DA BIOTINA.	26
FIGURA 8 : A VIA BIOSSINTÉTICA DA BIOTINA DE <i>E. COLI</i> E <i>B. SPHAERICUS</i>	27
FIGURA 9 : ESQUEMA GERAL DE CULTIVO UTILIZADO EM TODOS OS MÉTODOS.	31
FIGURA 10: MICROTUBOS CONTENDO 2 ML DO CULTIVO APÓS 24 H.	34
FIGURA 11: EM A) FRASCOS ERLLENMEYER DE FUNDO CHATO DE 500 ML CONTENDO 200 ML DE MEIO CGXII; EM B) SÃO FRASCOS CONTENDO VILOSIDADES E 50 ML DE MEIO.	34
FIGURA 12: FLUXOGRAMA GERAL REPRESENTANDO AS ETAPAS DO ÚLTIMO EXPERIMENTO. ...	36
FIGURA 13: CROMATOGRAFIA POR TROCA CATIONICA (STRONGLY ACIDIC DOWEX 50W x8 – 200).	38
FIGURA 14: HEATMAP REPRESENTANDO OS AMINOÁCIDOS DETECTADOS PELO HPAE-PAD.	41
FIGURA 15: GRÁFICO REPRESENTANDO A CURVA DE CRESCIMENTO ATRAVÉS E O CONSUMO DE GLICOSE.	43
FIGURA 16: CURVA DE CRESCIMENTO REALIZADA UTILIZANDO ERLLENMEYER COM VILOSIDADES.	44
FIGURA 17: GRÁFICO REPRESENTANDO A CURVA DE CRESCIMENTO E O CONSUMO DE GLICOSE. FORAM UTILIZADOS OS FRASCOS ERLLENMEYER COM VILOSIDADES.	45
FIGURA 18: CROMATOGRAMAS OBTIDOS ATRAVÉS DE ANÁLISE EM HPAE-PAD.	45
FIGURA 19: AMINOÁCIDOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS IDENTIFICADOS ATRAVÉS DE ANÁLISE FINGERPRINTING EM CG/MS.	47

Lista de tabelas

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA OBTIDO A PARTIR DE KEILHAUER ET AL. (1993)	24
TABELA 2: COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA TSB.	32
TABELA 3: COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LB.	32
TABELA 4: CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMATO EM GRAMAS POR LITRO E EM MM OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE NO HPAE-PAD.....	46
TABELA 5: QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE NO HPAE-PAD.	46

Sumário

Agradecimentos	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Corynebacterium glutamicum</i>	15
1.2. Potencial industrial	17
1.3. Transportadores de membrana	21
1.4. Meios de cultura e otimização	23
1.5. Biotina	25
1.6. Metabolômica	27
1.7. Análise de fluxo metabólico	29
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS GERAIS	30
3.1. Objetivos específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Microrganismo e cultivo da bactéria	31
4.1.1. Cultivo em meio TSB	32
4.1.2. Cultivo em meio LB	32
4.1.3. Depleção de biotina	32
4.1.4. Cultivo em meio CGXII	34
4.2. Curva de crescimento	36
4.3. Quantificação de glicose	36
4.4. Metabolômica	37
4.4.1. Quantificação de aminoácidos	38
4.4.2. Análise de perfil metabólico	39
4.5. Análise estatística	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Primeiro experimento	40
5.2. Segundo experimento	42
5.3. Terceiro experimento	43
5.4. Quarto experimento	44
5.4.1. Quantificação de glutamato	45
5.4.2. Análise de metabólitos	46
6. CONCLUSÕES	48

7. PERSPECTIVAS	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Corynebacterium glutamicum*

Em 1896 Lehmann e Neumann definiram o gênero *Corynebacterium* como forma de acomodar diversas espécies de bactérias fixas e patogênicas a animais e plantas como os bacilos differóides [1]. Com o passar dos anos, as bactérias de solo com semelhanças morfológicas também foram incluídas no gênero [2]. Por várias décadas, as técnicas baseadas em morfologia celular, propriedades de coloração e metabolismo respiratório, foram responsáveis em agrupar no gênero *Corynebacterium* uma grande coleção diversificada de microrganismos [3]. Durante as décadas de 70 e 80 o avanço nos estudos por marcadores quimiotaxonômicos (principalmente a composição lipídica, bases de DNA e parede celular) foram muito importantes para a remodelação do gênero, tendo como consequência a transferência de diversas espécies para outros gêneros, assim como a entrada nesse gênero de bactérias que pertenciam a outros [4-7]. Nas últimas décadas, muitas novas espécies de *Corynebacterium* foram isoladas e classificadas. Atualmente as abordagens filogenéticas, principalmente análises de sequência de RNA ribossomal 16s (16S rRNA) vem sendo utilizadas rotineiramente como forma de classificação, além dos marcadores quimiotaxonômicos descritos anteriormente. No decorrer deste processo de redefinição do gênero *Corynebacterium*, verificaram-se que as “bactérias corineformes patogênicas de plantas” que anteriormente pertenciam ao gênero [8] foram transferidas para outros gêneros como o *Curtobacterium* e *Clavibacter* [6].

As análises comparativas da sequência de 16S rRNA dos táxons de *Actinomycetales* com quimiótipos IV da parede celular e ácidos micólicos revelaram que as espécies do gênero *Corynebacterium* formam um grupo monofilético [9, 10], em contraste com outros gêneros, *Corynebacterium* apresentam heterogeneidade química em termos de composição lipídica, assim como não apresentam uma única ou majoritária menaquinona (vitamina K2) ou tipo de ácido graxo [11]. Uma árvore de máxima parcimônia, com base nos dados da sequência 16S rRNA demonstrando a radiação das espécies do gênero *Corynebacterium*, está demonstrada na Figura 1 [10].

Em outubro de 2017, havia 110 espécies validamente publicadas de *Corynebacterium* [12], tornando este gênero um dos dez principais gêneros procarióticos em relação ao número de espécies conhecidas sendo altamente diversificado, incluindo

espécies de relevância médica, veterinária ou biotecnológica [13-15]. Muitas das novas espécies do gênero foram descritas há relativamente pouco tempo, o que demonstra um reflexo do crescente interesse medicinal e industrial. Boa parte das descrições das novas espécies são de cepas isoladas de amostras clínicas humanas ou animais, sendo as principais fontes de isolados provenientes de amostras do solo, fezes, esfregaços de laticínios, legumes, frutas e forragens de animais [4, 16]. Este número crescente de novas espécies classificadas dentro do gênero indica que ainda resta muito a se descobrir sobre a diversidade das possíveis espécies de corinebactérias [17-19]. Além das espécies descobertas a partir de origem humana ou animal, também existe considerável diversidade inexplorada nos outros campos que podem vir a ser descritas [20], como bactérias que foram isoladas de amostras marinhas [21]. No entanto, esses isolados ainda não foram diferenciados ao nível de espécie por falta de investigações sistemáticas através dos marcadores moleculares, de uma maneira geral ainda temos poucos dados disponíveis acerca do número de corinebactérias presentes nos diferentes habitats.

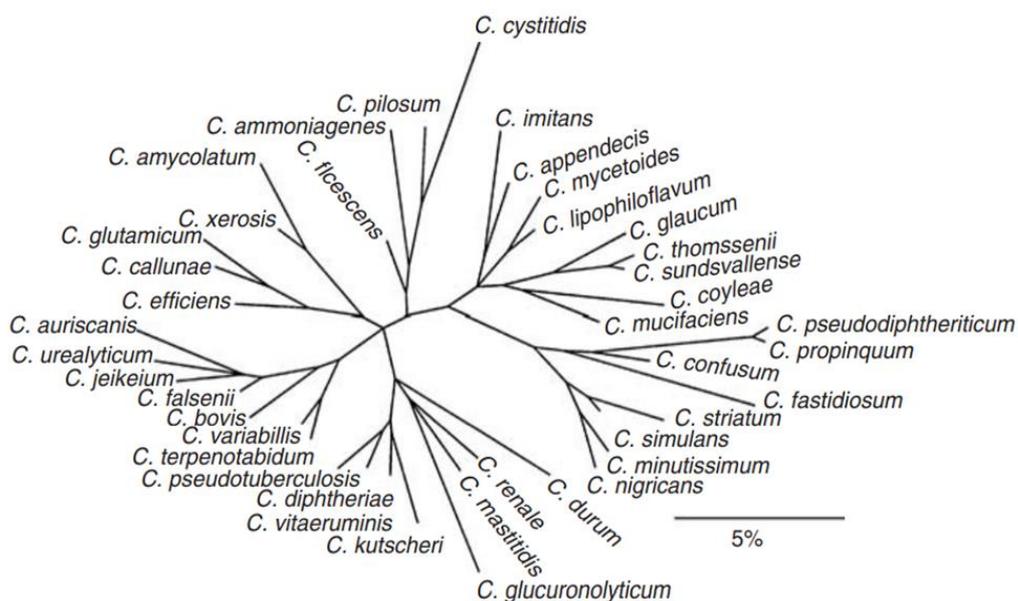


FIGURA 1: ÁRVORE DE MÁXIMA PARCIMÔNIA MOSTRANDO AS POSIÇÕES DAS ESPÉCIES INDUSTRIALMENTE RELEVANTES *C. GLUTAMICUM*, *C. CALLUNAE*, *C. EFFICIENS* E *C. AMMONIAGENES* NA RADIAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *CORYNEBACTERIUM*. A BARRA DE ESCALA INDICA 5% DE DIVERGÊNCIA DE SEQUÊNCIA. OBTIDO A PARTIR DE W. LUDWIG.

As principais características do gênero *Corynebacterium*, descritas por Collins e Cummins [11] são: Gram-positiva (algumas podendo apresentar coloração desigual); sésseis; presença de grânulos metacromáticos; geralmente as células exibem arranjo típico em forma de V, como pode ser observado na Figura 2 [22]; não esporulantes; não resistente a descoloração por ácido; morfologia reta, ligeiramente curvas ou ovais; anaeróbios e aeróbios facultativos; quimiorganotróficos; catalase positiva; parede celular predominantemente formada por arabinose e galactose; presença de ácidos graxos monoinsaturados; em alguns casos tem-se a presença de ácidos graxos de cadeia ramificada (10-metil); presença de menaquinonas hidrogenadas com oito a nove unidades de isopreno.

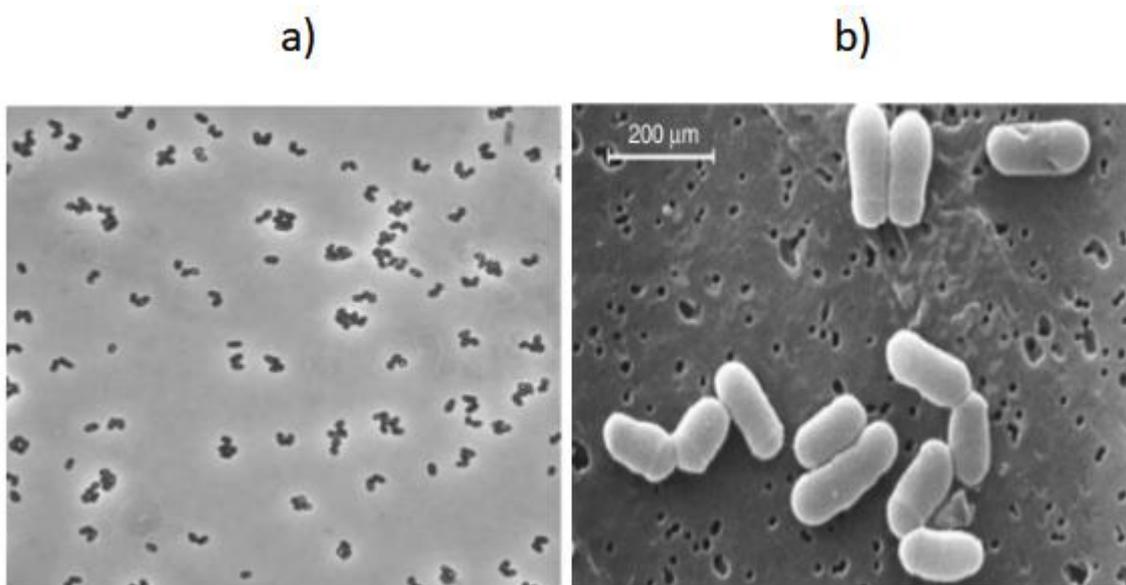


FIGURA 2: A) MICROGRAFIA POR CONTRASTE DE FASE DE CÉLULAS DE *C. GLUTAMICUM* CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA COMPLEXO, É POSSÍVEL OBSERVAR OS FREQUENTES ARRANJOS EM PARES DO TIPO V, DEVIDO AO “SNAPPING DIVISION”. B) MESMAS CÉLULAS COLOCADAS EM MEMBRANA DE NUCLEOPOROS E VISUALIZADA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. OBTIDO A PARTIR DE W. LIEBL.

1.2. Potencial industrial

Os grupos de biomoléculas mais produzidas seguindo o método de fermentação industrial são o etanol, antibióticos e aminoácidos [23]. O método de fermentação não se limita apenas as reações anaeróbias como são comumente definidas em bioquímica, mas a qualquer produto de interesse que pode ser obtido com o cultivo controlado de um microrganismo. O cultivo é realizado em um tanque apropriado esterilizado, comumente referido como biorreator, contendo todos os nutrientes necessários para o crescimento e com as condições de temperatura, pH, oxigenação e aeração controlados [24].

Um fato importante em relação à produção de aminoácidos e um incentivo para a biotecnologia em geral, foi a descoberta de *C. glutamicum* e sua excreção de L-glutamato [25] dependente de biotina. O Glu é preferencialmente utilizado na indústria alimentícia, sendo o principal constituinte do tempero glutamato monossódico.

Em 1909, o glutamato monossódico foi produzido comercialmente com o nome AJI-NO-MOTO, considerado o primeiro tempero umami do mundo. Atualmente, a marca expandiu sua presença em 35 países e regiões do mundo, trazendo esse aditivo à mesa de todas as famílias. Os principais fabricantes do mercado de glutamato monossódico são: Ajinomoto Co., Inc.; Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.; Vedan (Vietnam) Enterprise Corp., Ltd.; todas tendo sua origem na Ásia. A Ajinomoto é a maior fabricante mundial, com fábricas no Peru, Brasil, Japão, Estados Unidos, China, França, entre outros [25].

A produção de Glu atingiu 2,20 milhões de toneladas nos últimos anos na China, o que representa aproximadamente 80% da produção global, sendo este o país que mais consome no mundo, exportando dentre toda essa produção apenas 400 mil toneladas [26]. Como pode ser observado na Figura 3 a Ásia é a região que mais consome no mundo, seguida da África [27].

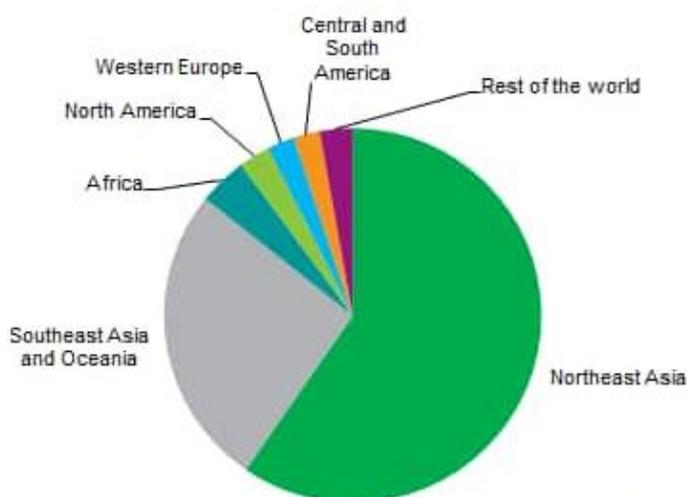


FIGURA 3: CONSUMO MUNDIAL DE GLUTAMATO MONOSSÓDICO EM 2021 (IHS MARKIT).

Existem quatro métodos gerais na produção industrial de glutamato: extração de fontes naturais; síntese química; catálise enzimática; e fermentação [28]. Entre esses métodos, a fermentação é o mais utilizado [29]. A desvantagem deste método é que sua produção é realizada em bateladas (lotes), o que pode levar a grandes perdas se o processo não for controlado adequadamente. No entanto, apenas o isômero L desejado do ácido glutâmico é produzido e o rendimento pode chegar a 60% [27]. A

indústria alimentícia aproveita os resíduos orgânicos, ricos em nutrientes, como fertilizantes para substituir adubos, reduzindo os custos agrícolas e poluição da água [30].

Após a descoberta do potencial industrial de *C. glutamicum*, principalmente devido a sua fácil indução para síntese e excreção de L-glutamato (Glu), foram desenvolvidos diversos mutantes para a produção biotecnológica tanto do glutamato e lisina quanto de vários outros aminoácidos [31-33].

Os L-aminoácidos ocupam a posição de liderança entre todos os produtos de fermentação de *C. glutamicum*. Através dos métodos clássicos de mutagênese aleatória e seleção, foi possível criar cepas de produção eficientes para vários L-aminoácidos. Mais recentemente, o foco mudou para engenharia direcionada com o objetivo de desenvolver formas mais racionais e modernas de produção de cepas. Enquanto a cepa selvagem consegue produzir até 26 g/L, a modificada chega a produzir 32 g/L, porém ainda assim esses processos industriais novos têm dificuldade de alcançar o alto desempenho das cepas clássicas que chegam a 100 g/L que foram continuamente otimizadas e selecionadas nos últimos 60 anos [34].

Muito além da produção tradicional de L-aminoácidos, o genoma de *C. glutamicum* revelou um rico repertório de vias metabólicas que podem ser utilizadas e melhoradas de forma a gerar um amplo portfólio de produtos, o que particularmente é uma característica muito atraente para a produção industrial [35]. Poderosas tecnologias ômicas para análises mais aprofundadas de *C. glutamicum* [36], combinadas com modificações genéticas direcionadas [37] fornecem uma excelente caixa de ferramentas para engenharia da cepa. Desde a década de 1980 são utilizadas técnicas de engenharia metabólica em *C. Glutamicum* e nos últimos anos essas técnicas contribuíram fortemente para o desempenho da bactéria na produção industrial, incluindo modificações de vias metabólicas através de gargalos bem estabelecidos [38], bem como redirecionamento de fluxo para eliminação de subprodutos indesejados [39] ou fornecimento aprimorado de blocos de construção [40], poder redutor [41] ou energia. Esses estudos não se limitaram apenas a produção de aminoácidos, mas também na criação de vias biossintéticas para a produção de muitos outros produtos químicos, incluindo ácido itacônico, succinato e 2,3-butanodiol [42-45].

A biologia sintética está ampliando ainda mais o portfólio de bioprodutos provenientes de *C. glutamicum* com reações e caminhos para novos produtos químicos e

até não naturais, assim como também permitindo a implementação de novas matérias-primas a serem utilizadas como observado na Figura 4 [34].

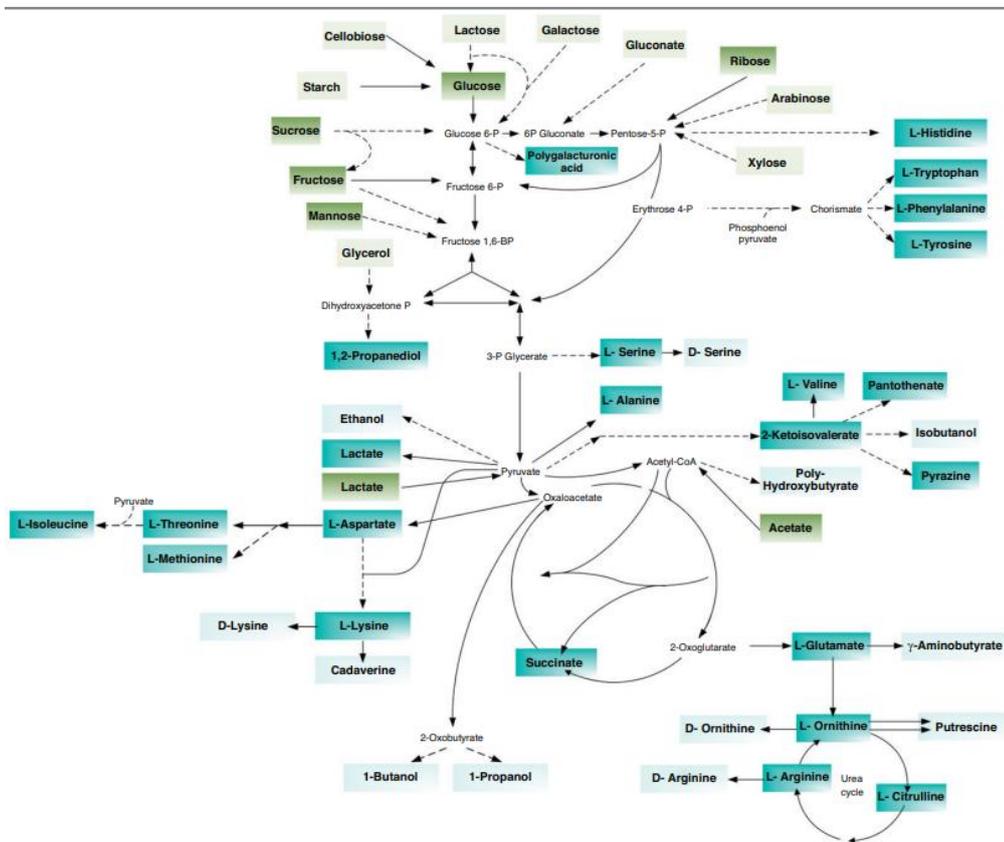


FIGURA 4: REDE BIOQUÍMICA DO METABOLISMO CENTRAL DE *C. GLUTAMICUM*, INCLUINDO AS VIAS BIOSINTÉTICAS DE PRODUTOS QUÍMICOS, MATERIAIS E COMBUSTÍVEIS IMPLEMENTADOS E PROJETADOS NESTE MICRORGANISMO. INCLUINDO AQUI A UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS NATURAIS (VERDE) E NÃO NATURAIS (CINZA CLARO) ASSIM COMO ESTÃO REPRESENTADOS OS PRODUTOS NATURAIS (AZUL ESCURO) E OS SINTÉTICOS PELAS VIAS MUTANTES (AZUL CLARO). OBTIDO A PARTIR DE C. WITTMANN.

O potencial de crescer naturalmente em diferentes tipos de substratos garante à bactéria grande flexibilidade e competitividade para sobreviver sobre permanente mudança e disponibilidade de nutrientes em seu ambiente natural [34]. No entanto, certos substratos com relevância industrial não podem ser utilizados, gerando assim uma intensa pesquisa quanto a quais possíveis matérias-primas baratas e ecoeficientes podem vir a ser utilizadas Figura 5 [34]. Dentre esses possíveis substratos os que mais chamam atenção são os lignocelulósicos contendo celulose, hemicelulose e lignina que são os recursos orgânicos renováveis mais abundantes no planeta [46].

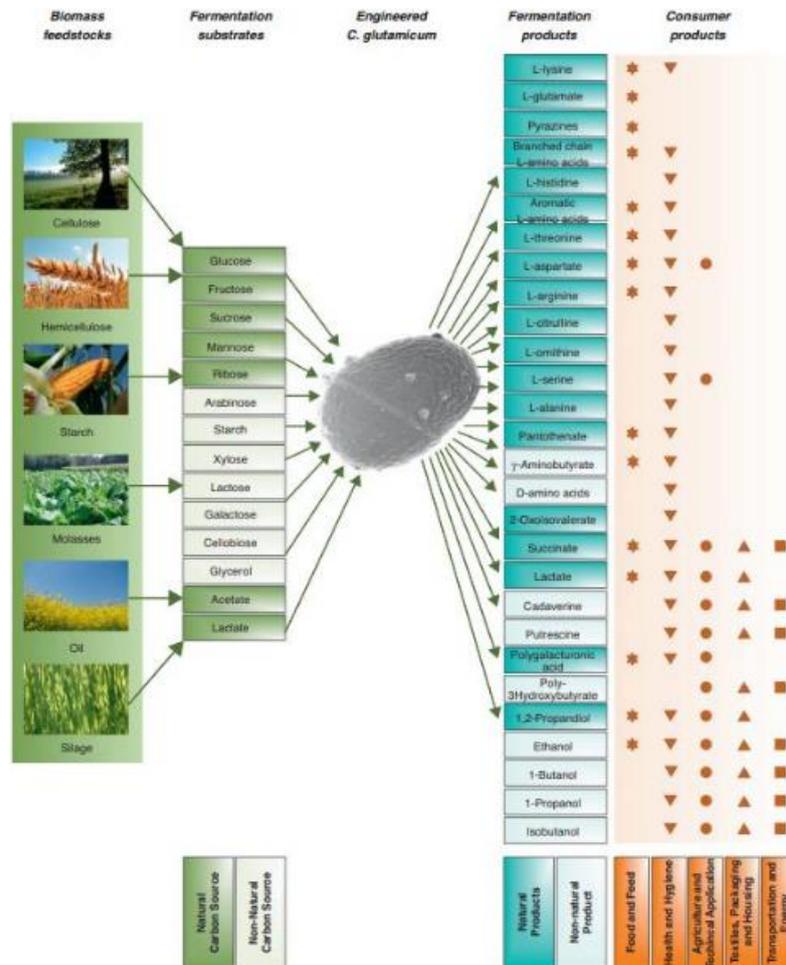


FIGURA 5: CADEIA DE VALOR BIOECONÔMICO DE PRODUTOS DE CONSUMO GERADOS ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DE *C. GLUTAMICUM* ENGENHEIRADA E CULTIVADA ATRAVÉS DE DIFERENTES FONTES DE MATÉRIA-PRIMA RENOVÁVEIS. A LISTA DE PRODUTOS INCLUI MATERIAIS, COMBUSTÍVEIS, E QUÍMICOS DE ORIGEM BIOLÓGICA. OBTIDO A PARTIR DE C. WITTMANN.

1.3. Transportadores de membrana

Utilizando o método de limitação de biotina como otimização para produção e secreção de Glu, foi possível observar secreção a uma intensa taxa de cerca de 12 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por g (peso seco) [47], dessa forma era de vital importância desvendar os seus mecanismos de transporte, porém diferentemente dos estudos relacionados à regulação e etapas individuais de biossíntese dos aminoácidos, a análise e o entendimento dos mecanismos de transporte (secreção) não seguiram o mesmo ritmo. Um dos motivos é que inicialmente não acreditavam que fosse possível existir transportadores específicos para esse fim, dessa forma os primeiros mecanismos de excreção do L-glutamato propostos foram da difusão através da membrana plasmática [48, 49]. Tanto o L-glutamato quanto a L-lisina (Lis) são aminoácidos que apresentam carga, sendo o Glu um aminoácido ácido e Lis um aminoácido básico, dessa forma é óbvio que a difusão passiva seja impossível [50]. Porém, embora ambos sejam translocados contra uma concentração de gradiente [51], a voltagem da membrana pode garantir o

envolvimento de um poro. Mais tarde veio a ser apresentado um sistema de captação de glutamato mediado por transporte ativo utilizando como fonte energética a força próton-motriz, e foi proposto que esse sistema pode excretar glutamato em casos de desacoplamento devido ao aumento do nível de ácidos graxos saturados e degradação de lipídios de membrana [52]. Porém esse modelo não se aplica a *C. glutamicum* na cepa mutante com o sistema de captação dependente de ATP GluABCD excluído, pois mesmo nesse caso a atividade transportadora de L-glutamato se manteve inalterada [53]. Atualmente é aceito que os mecanismos de translocação de aminoácidos, do citosol para o meio circundante, presentes em *C. glutamicum* ocorre através de proteínas específicas de transporte, tendo sido estas identificadas através de informações do genoma e estando presentes em outros microrganismos. Foram identificados mecanismos de transporte ativo: para L-glutamato [54], L-lisina [55], L-isoleucina [56] e L-treonina [57].

Além do transporte ativo alguns aminoácidos são secretados através de mecanismos de difusão. Uma visão geral resumida dos transportes pode ser vista na Figura 6. Para expressar as diferentes possibilidades de transporte dos aminoácidos do meio citosólico entre as diferentes camadas da parede celular para o meio circundante, os autores utilizam o termo exportação para representar os catalisadores de proteínas transportadoras, enquanto importação se refere ao transporte passivo de difusão que ocorrem devido ao gradiente de concentração [22]. Alguns aminoácidos são exportados tanto pelo transporte ativo quanto por difusão como é o caso da L-treonina [57] e dos aminoácidos hidrofóbicos de cadeia ramificada [56], porém existem outros aminoácidos que possivelmente apresentam como único mecanismo de transporte a difusão, como é o caso da L-tirosina e L-fenilalanina [58].

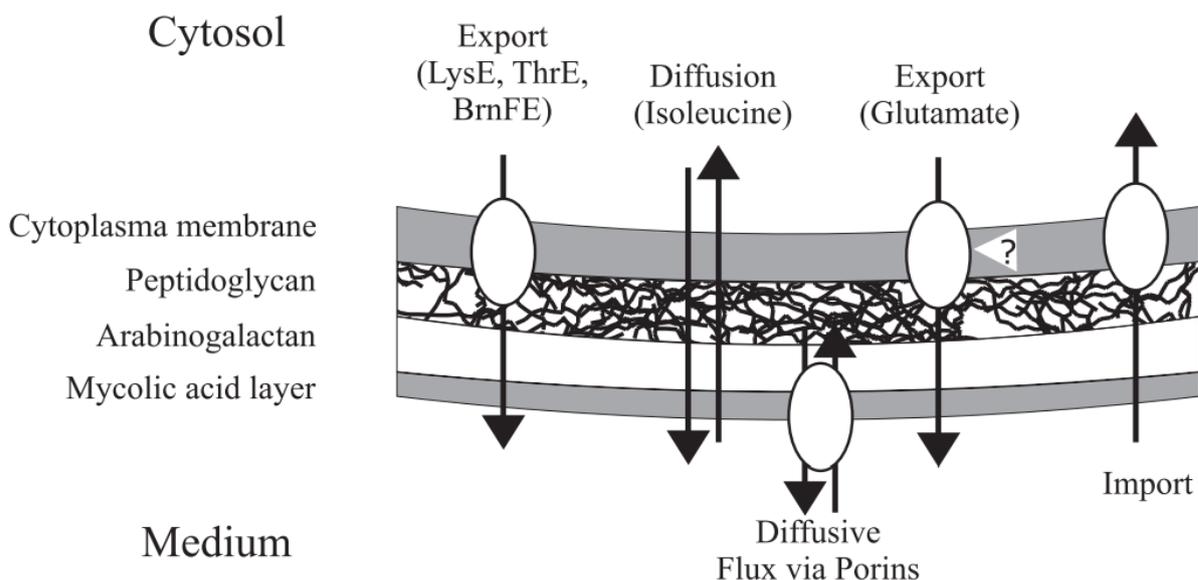


FIGURA 6: FLUXOS DE IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE A PAREDE CELULAR DE *C. GLUTAMICUM* OBTIDO A PARTIR DE L. EGGELING.

1.4. Meios de cultura e otimização

Um dos primeiros meios de cultura utilizados para *C. glutamicum* com uma composição claramente definida (CGXII), contém apenas glicose como fonte de carbono e energia, bem como diferentes fontes para nitrogênio, fósforo, enxofre, vitaminas, sais minerais e elementos traços [59]. Curiosamente, este meio, também contém grandes quantidades de carbonato de cálcio (CaCO_3), que se mostrou ser benéfico para o crescimento da cepa.

Em 1989 foi descoberto que na ausência de compostos quelantes de ferro, como CaCO_3 , o crescimento de *C. glutamicum* é interrompido. Dessa forma, foi proposto a utilização do ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocatecuico, PCA) para uso padrão em meios definidos [60]. Posteriormente o meio CGVIII foi substancialmente modificado adicionando o quelante de ferro PCA e trocando o CaCO_3 por quantidades muito baixas de fontes alternativas de cálcio (CaCl_2), sendo este o meio comumente referido como meio mínimo CGXII, apresentado na Tabela 1, que dependendo do sistema de cultivo, é usado com ou sem o ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico (MOPS) como tampão regulador de pH [61]. Desde que CGXII foi formulado, ele se tornou o meio padrão para Engenharia Metabólica e Biologia de Sistemas com *C. glutamicum* até agora.

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA OBTIDO A PARTIR DE KEILHAUER ET AL. (1993)

Meio CGXII, pH=7	
(NH₄)₂SO₄	20 g/L
Ureia	5 g/L
KH₂PO₄	1 g/L
K₂HPO₄	1 g/L
MgSO₄. 7H₂O	0,25 g/L
Ácido 4-Morfolinopropanosulfônico (MOPS)	42 g/L
CaCl₂	10 mg/L
FeSO₄. 7H₂O	10 mg/L
MnSO₄. H₂O	10 mg/L
ZnSO₄. 7H₂O	1 mg/L
CuSO₄	0,2 mg/L
NiCl₂. 6H₂O	0,02 mg/L
Biotina	0,02 mg/L
Glicose	40 g/L
Ácido protocatecuico (PCA)	0,03 mg/L

A biotina contida no meio é uma vitamina (B7) que atua principalmente como cofator das enzimas piruvato carboxilase e acetil-CoA carboxilase, que são importantes nas vias metabólicas da gliconeogênese e síntese de ácido graxo. Estudos demonstraram que as células cultivadas em meio pobre de biotina podem formar glutamato tanto na fase estacionária quanto na exponencial, enquanto maiores adições de biotina ao meio de cultura reduzem a produção [62]. Análises bioquímicas demonstraram que o excesso de biotina reduz a permeabilidade celular dos aminoácidos, nesses casos foi observado [63] que ocorreu uma redução da liberação de glutamato e atividade da enzima aspartato aminotransferase. Foram realizados experimentos com a adição de detergentes para aumentar a permeabilidade celular, o que demonstrou um leve aumento de glutamato total (intracelular e secretado) o que pode indicar que o excesso de biotina resulta em acumulação de glutamato intracelular, deslocando o equilíbrio químico em direção de formação do precursor, ou seja, ação de feedback negativo em evento de regulação metabólica.

Foram realizados nas últimas décadas muitos estudos com o intuito de elucidar a genética molecular da produção de aminoácidos pela bactéria *C. glutamicum*, prin-

principalmente através das construções por vetores de clonagem [64, 65], estabelecimento de sistemas eficientes de transferência de DNA [66], e os estudos com os genes envolvidos nas vias biossintética [67-69]. Devido à grande importância industrial deste microrganismo, existem extensas pesquisas focadas no melhoramento de cepas [70, 71] utilizando técnicas como: mutagênese aleatória; técnicas de DNA recombinante [72] ou por meio dos transposons, o que permite a criação de grandes bibliotecas mutantes [73].

Essas experiências demonstram claramente que um conhecimento quantitativo detalhado da fisiologia metabólica é necessário para projetos racionais de otimização de cepas para obter maior produção de aminoácidos por *C. glutamicum*, que é caracterizada por uma conexão estreita entre o metabolismo central e as vias biossintéticas do produto, uma melhor compreensão da regulação metabólica global acabou sendo crucial para melhorias efetivas da cepa [74].

1.5. Biotina

As cepas bacterianas produtoras de ácido glutâmico que foram usadas industrialmente são dependentes da presença de biotina no meio de cultura [3] como na Figura 7 pode ser observado o metabolismo da biotina em *C. glutamicum*. A concentração de biotina no meio de crescimento tem sido utilizada com sucesso como um parâmetro para otimizar a produção de aminoácidos, tendo como exemplo, a limitação de biotina pode melhorar a secreção [75] de ácido glutâmico [54]. Pelo contrário, a adição de biotina em excesso pode melhorar a produção de lisina através da ativação da piruvato carboxilase [76]. A biotina é o cofator da acetil-CoA carboxilase, que é a primeira enzima para a biossíntese de ácidos graxos. Devido a limitação de biotina durante a otimização para produção de Glu ocorre uma diminuição da biossíntese de ácidos graxos e fosfolípidios [77].

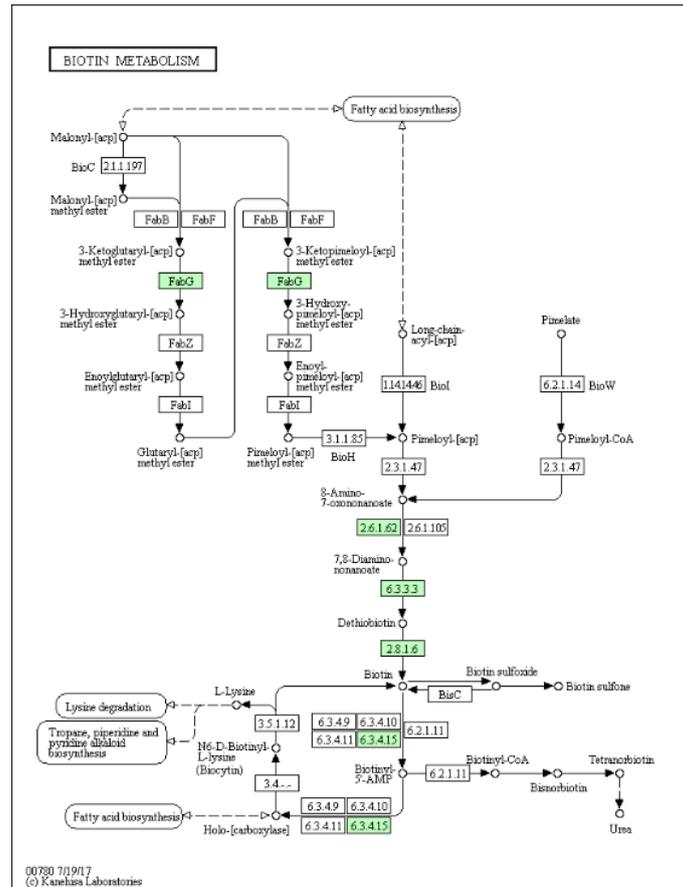


FIGURA 7 VIAS METABÓLICAS FORNECIDAS PELO KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES (KEGG) REPRESENTANDO O METABOLISMO DA BIOTINA. OS CÍRCULOS REPRESENTAM OS METABÓLITOS, OS RETÂNGULOS AS ENZIMAS ENVOLVIDAS, E AS SETAS A DIREÇÃO DA REAÇÃO (SEJA REVERSÍVEL OU IRREVERSÍVEL), OS RETÂNGULOS VERDES REPRESENTAM AS ENZIMAS IDENTIFICADAS NA CEPA *C. GLUTAMICUM* ATCC 13032.

A via Biosintética da biotina Figura 8 tem sido estudada principalmente utilizando cepas de *Escherichia coli* e *Bacillus sphaericus* [78]. Os genes biossintéticos da biotina são organizados em um operon em *E. Coli* [79], mas em dois grupos diferentes em *B. Sphaericus* [80]. Entre as enzimas da via, todas as que estão envolvidas na síntese de detiobiotina a partir do ácido pimélico foram documentadas: pimelil-CoA sintetase [81] (bioW); ácido 7-ceto-8-aminopelargônico (KAPA) sintetase [82] (bioF); ácido 7,8-diaminopelargônico (DAPA) aminotransferase [83] (bioA); detiobiotina sintase [84, 85] (bioD); e biotina sintase [63] (bioB). *C. glutamicum* não possui a capacidade de sintetizar o pimeloil-CoA a partir da enzima BioW, no entanto as enzimas para montagem do anel de biotina, BioA, BioD e BioB, são funcionais [77, 86, 87].

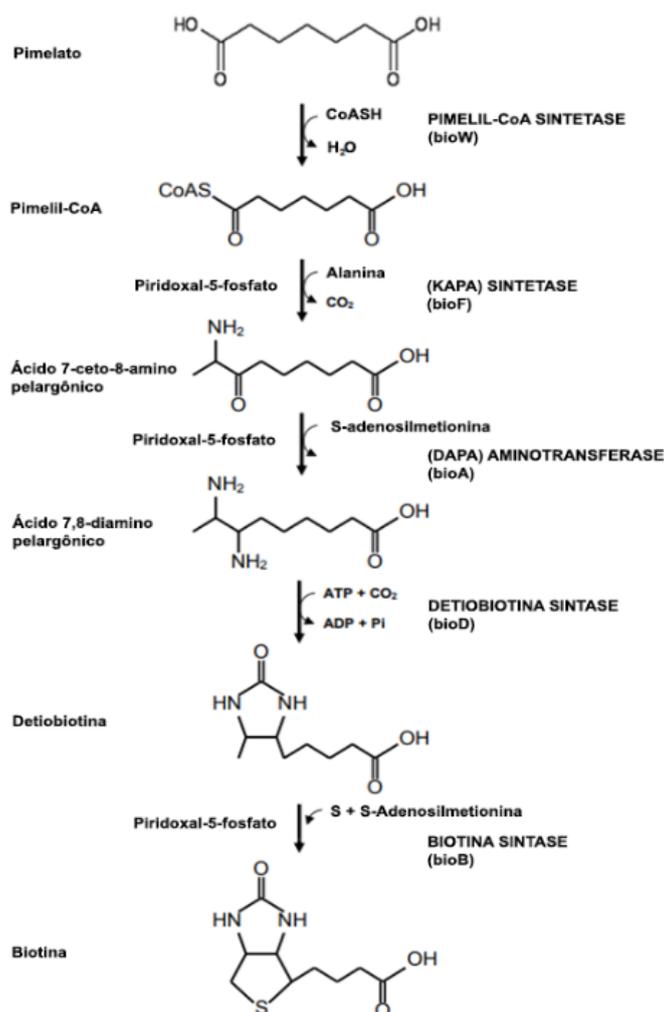


FIGURA 8 : A VIA BIOSSINTÉTICA DA BIOTINA DE *E. COLI* E *B. SPHAERICUS*.

1.6. Metabolômica

Após a conclusão de vários projetos de sequenciamento genômicos, atualmente o foco principal está na genômica funcional, ou seja, a determinação ou predição das funções genômicas. Os principais passos nesse caminho englobam as técnicas “ômicas”, como a transcritoômica, proteômica, metabolômica e fluxômica, todas associadas com modelagens matemáticas [88]. Para realizar os estudos de metabolômica e fluxômica é necessária uma análise quantitativa simultânea de diversos metabólitos presentes nas células em uma determinada condição bem definida. O metaboloma representa um método de caracterização muito mais sensível do fenótipo que as curvas de crescimento, pois após uma mudança no genoma de bactéria mutante, a taxa de crescimento dela pode não ser muito alterada, mas isso se deve ao fato de que as concentrações dos metabólitos intracelulares mudam para compensar os efeitos da mutação [89-91]. Dentre as análises metabolômicas de compostos bacterianos,

existem vários trabalhos significativos realizados com os mais diversos métodos analíticos, dentre esses temos como os principais: RMN (ressonância magnética nuclear [92]); MALDI-TOF MS (Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser e espectrômetro de massa por tempo-de-Voo [93]); HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência [94]); CE-MS (eletroforese capilar-espectrometria de massa [95]); GC-MS (cromatografia gasosa com espectrômetro de massas [96]) ou HPLC-MS (cromatografia líquida de alta eficiência com espectrômetro de massas [97]). A maior parte dessas publicações foram de estudos que investigaram funções bacterianas definidas e direcionadas a vias metabólicas específicas, por exemplo o ciclo do glioxilato, produção de lisina ou caracterizações taxonômicas. Portanto, apenas um número limitado de metabólitos extracelulares de interesse aparenta terem sido analisados, sendo que um perfil metabólico completo, incluindo a determinação das interações entre os diferentes níveis bioquímicos, são essenciais e fornecem informações sobre muitos processos complexos que ocorrem em uma célula viva [98]. Também é evidente que análises rápidas do metaboloma comparativo de organismos complexos é difícil, em particular devido à sua forte variabilidade e sua compartimentalização subcelular [89].

Para esse tipo de estudo de metabolômica uma técnica que apresenta boas vantagens a ser utilizada é a da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS), um dos potenciais dela está na praticidade da técnica em comparação aos outros métodos anteriormente descritos, podem ser necessários alguns preparos prévios dependendo do tipo de amostra a ser analisada porém é uma técnica que permite analisar um vasto espectro de diferentes metabólitos intracelulares ou extracelulares como polares e apolares com ou sem carga em uma mesma análise sem comprometer o método. Realizando uma análise abrangente de concentrações de metabólitos dessa forma é possível obter uma caracterização fenotípica altamente sensível às mudanças que podem ser induzidas pelas diferentes condições de cultivo ou genotípicas [99]. Utilizando o equipamento de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa em quadrupolo com impacto em elétrons, é possível medir em torno de 20 amostras únicas por dia o que resulta em um aumento da produtividade de quatro vezes em comparação com o desempenho padrão, tendo em vista que o baixo custo e a simplicidade do método permite analisar grandes quantidades de réplicas, o desvio padrão observado acaba sendo significativamente menor em comparação com as técnicas de análise de transcriptômica ou proteômica [98].

1.7. Análise de fluxo metabólico

O conhecimento detalhado sobre as distribuições do fluxo de carbono é crucial para a compreensão e otimização direcionada de sistemas celulares. Métodos analíticos de quantificação de fluxos através de diferentes vias de uma rede metabólica estão, portanto, no centro da engenharia metabólica. Uma abordagem elegante para análise de fluxos metabólicos é fornecida por experimentos com isótopos estáveis [100].

O uso de substratos marcados com os isótopos estáveis, ^{13}C (glicose) ou ^{15}N (ureia), consiste em uma técnica geral para a determinação do fluxoma, ou seja, todos os fluxos metabólicos, estequiométricos, intracelulares dentro das vias bioquímicas. A análise de fluxo metabólico foi a primeira abordagem para o desenvolvimento de cepas de *C. glutamicum* com foco em nível de sistemas [88]. Com o surgimento das análises de fluxo metabólico utilizando isótopos estáveis combinados com a análise de balança de fluxo [101], formam o “state of the art” das análises do fluxoma [102-104]. Nesses estudos compostos marcados com isótopos são utilizados como substratos passíveis de serem rastreados. Quando as células cultivadas metabolizam esses isótopos, ocorre a distribuição de átomos marcados na rede metabólica, permitindo assim rastrear as transições carbono-carbono (ou nitrogênio-nitrogênio) dentre as possíveis reações e fluxos metabólicos presentes na célula. Os padrões de marcação metabólica em tais estudos rastreadores podem ser medidos por espectrometria de massa (MS) ou ressonância magnética nuclear (RMN). Uma vez que as reações de transferência que envolvam o átomo marcável dentro da rede metabólica estiverem bem definidas, os dados de rotulagem podem ser usados para estimar os fluxos metabólicos.

Nos últimos anos, a análise de fluxo metabólico tornou-se uma ferramenta poderosa para fornecer conhecimento quantitativo detalhado das atividades *in vivo* das várias enzimas e vias envolvidas na rede metabólica central. Devido ao grande interesse industrial e o impacto nas técnicas de melhoria de cepa, *C. glutamicum* certamente ocupa uma posição de destaque em aplicações e desenvolvimentos adicionais desta ferramenta [105-107]. Uma das aplicações permitidas por técnicas cada vez mais precisas de espectrometria de massa, devido à alta sensibilidade dos equipamentos e conseqüentemente menor quantidade de amostras necessárias [89, 108-110], serão as comparações amplas dos fluxos em métodos de cultivo miniaturizados,

pois os altos custos dos substratos rotulados com isótopos geram demandas por pequenos volumes de cultivo [111]. Outra perspectiva futura importante é a possibilidade das análises de fluxo metabólico em condições dinâmicas visando a caracterização cinética de enzimas *in vivo* e de regulação metabólica.

Combinando a análise de fluxo metabólico com outras ferramentas, como as análises de transcriptoma e proteoma, podem ser realizadas investigações mais profundas fornecendo assim uma compreensão significativamente melhorada da regulação metabólica e otimização direcionada de *C. glutamicum*. Proporcionando a criação ou otimização dos processos atualmente estabelecidos [109].

2. JUSTIFICATIVA

Corynebacterium glutamicum é um organismo amplamente utilizado na indústria principalmente para produção de aminoácidos, tendo como o mais importante aquele que nomeou a espécie o ácido glutâmico (Glu) onde teve seu potencial revelado pela década de 50 [112]. A cepa 13032 não apresenta algumas das enzimas relacionadas com a síntese de biotina, sendo essa vitamina essencial para o crescimento celular, necessitando assim de suplementação externa, no entanto a produção de Glu é reduzida dependendo da concentração de biotina presente no meio de cultura, sendo assim necessárias técnicas para contornar esse problema [62]. Alguns trabalhos utilizam diferentes concentrações de biotina limitante tentando alcançar um equilíbrio entre o crescimento e a produção de Glu em relação ao meio padrão que favorece o crescimento máximo. Neste trabalho objetivamos compreender qual a melhor forma de cultivar a bactéria, utilizando uma variação na concentração de biotina de forma que favoreça seu crescimento, ao mesmo tempo em que otimiza a produção de Glu.

3. OBJETIVOS GERAIS

Analisar o metabolismo de *C. glutamicum* durante o procedimento de depleção de biotina para compreender os efeitos metabólicos nas vias reguladoras da biossíntese de aminoácidos principalmente pela otimização de produção e secreção do Glu.

3.1. Objetivos específicos

- I. Cultivo de *C. glutamicum* utilizando o meio de cultura CGXII utilizando o procedimento da depleção de biotina.

- II. Análise correlacional do crescimento e do consumo da fonte de carbono (glicose) e sua relação com a depleção de biotina.
- III. Quantificação de glutamato extracelular produzido através do método da depleção de biotina.
- IV. Identificação comparativa dos metabólitos extracelulares entre o meio de cultivo padrão e o meio com depleção de biotina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados quatro experimentos, cada um seguindo metodologias diferentes para o cultivo da bactéria *C. glutamicum* cepa 13032, um esquema geral do cultivo pode ser mais bem observado no fluxograma da Figura 9. O pré-inóculo e a depleção de biotina tiveram duração de 24 h e foram realizados utilizando frascos Erlenmeyer de 500ml em câmara incubadora com agitação orbital (Shaker), o cultivo final teve coletas realizadas entre o período de 24 h para o estabelecimento da curva de crescimento, consumo de glicose e foi encerrado em 48 h para coleta final destinada às análises dos metabólitos extracelulares.

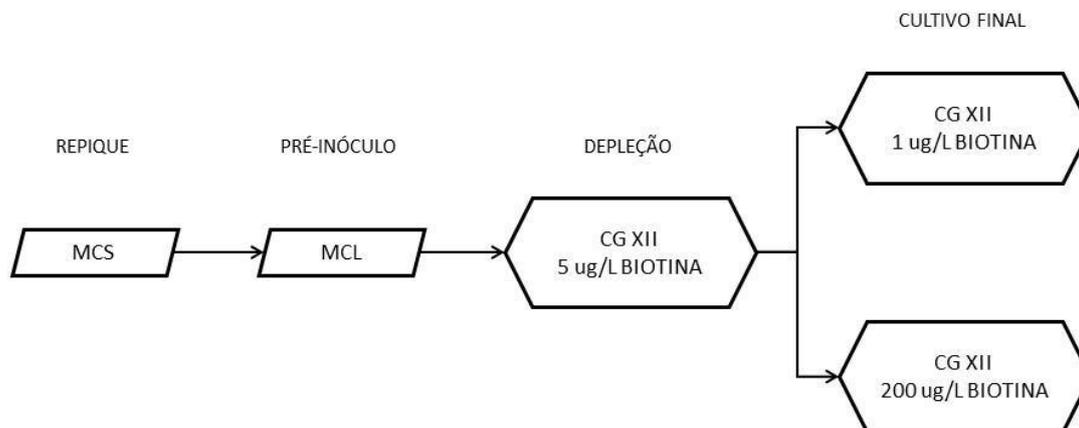


FIGURA 9 : ESQUEMA GERAL DE CULTIVO UTILIZADO EM TODOS OS MÉTODOS, EM ORDEM PODEMOS OBSERVAR: O REPIQUE REALIZADO EM MEIO COMPLEXO SÓLIDO (MCS); PRÉ-INÓCULO EM MEIO COMPLEXO LÍQUIDO (MCL); PROCESSO DE DEPLEÇÃO DE BIOTINA EM MEIO GCXII COM 5 UG/L DE BIOTINA; CULTIVO FINAL DIVIDIDO ENTRE O TRATAMENTO E O CONTROLE RESPECTIVAMENTE COM 1 UG/L E 200 UG/L DE BIOTINA.

4.1. Microrganismo e cultivo da bactéria

Como mencionado anteriormente foram realizadas quatro metodologias diferentes de cultivo. Para o preparo do pré-inóculo foi retirada colônia isolada da bactéria que fora previamente crescida em meio sólido em placa de petri, nos três primeiros experimentos as etapas de repique e pré-inóculo foram realizadas da mesma forma, utilizando respectivamente o meio de cultura complexo Caldo Soja Trypticaseína (TSB)

com ágar e sem ágar, no último experimento o meio complexo utilizado foi o Luria-Bertani (LB) com e sem ágar. Os cultivos de pré-inóculo foram realizados utilizando os frascos Erlenmeyer no shaker com a rotação de 120 rpm a temperatura de 30 °C. A seguir serão mais bem especificadas as diferenças entre os cultivos.

4.1.1. Cultivo em meio TSB

Foi escolhido a partir de experimentos prévios já realizados no laboratório [113], cultivado por 24 h em frasco Erlenmeyer com 25 ml de meio. A composição do meio está descrita na Tabela 2.

TABELA 2: COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA TSB.

MEIO TSB, pH = 7	
Peptona de Caseína	17 g/L
Fosfato monopotássico	2,5 g/L
Glicose	2,5 g/L
Cloreto de sódio	5 g/L

4.1.2. Cultivo em meio LB

Escolhido a partir do protocolo obtido no livro Handbook of *Corynebacterium glutamicum* [22], foi utilizado apenas no último cultivo em frasco Erlenmeyer com 50 ml do meio. A composição do meio está descrita na Tabela 3.

TABELA 3: COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LB.

MEIO LB, pH = 7	
Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
Glicose	0,8 g/L
Cloreto de sódio	10 g/L

4.1.3. Depleção de biotina

O procedimento da depleção de biotina foi desenvolvido a partir do protocolo obtido no livro Handbook of *Corynebacterium glutamicum* [22]. Após a realização do pré-inóculo foram coletados volume suficiente para estabelecer uma densidade óptica (comumente referido como OD600), inicial padrão para o cultivo em depleção, que foi

calculada utilizando o espectrofotômetro (CLARIOstar Plate Reader da BMG LAB-TECH) incidindo um feixe de luz com um comprimento de onda de 600 nm nas amostras contidas em placa de 96 poços com path length de 5 mm, nos três primeiros experimentos foram coletadas 3 ml, o suficiente para obter uma OD inicial de 1, no último experimento a OD inicial foi de 0,1 com uma coleta de 0,55 ml. Estes volumes foram centrifugados por 10 minutos em 5000 xG, sendo descartado o sobrenadante e o pellet ressuspendido em solução NaCl 0,9%, para realizar uma lavagem e assim remover resquícios do meio complexo. Fez-se nova centrifugação, sendo o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido e inoculado no Erlenmeyer de 500 ml contendo 50 ml do meio depleção CGXII 5 µg/L biotina.

O cultivo em meio depleção durou 24 h, após isso novamente foram coletados um volume suficiente para estabelecer uma OD inicial para o cultivo final, nos três primeiros experimentos foram coletados 11 ml obtendo 0,1 de OD, enquanto no último experimento foram coletados 3,33 ml obtendo 1 de OD. Estes volumes foram centrifugados, seguida de etapa de lavagem com 0,9% de NaCl. Por fim, o pellet foi ressuspendido no meio final CGXII 1 µg/L de biotina para o tratamento e 200 µg/L de biotina para o meio controle. Assim no primeiro experimento: foram inoculados em 2 ml na placa para cultura de células de 12 poços Kasvi; nos dois experimentos seguintes foram inoculados em Erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml e 50 ml respectivamente de meio CGXII, e no último experimento foi inoculado em Erlenmeyer de 500 ml contendo 50 ml. No fim do cultivo as 48 h de crescimento foram coletadas alíquotas de 2 ml as quais foram centrifugadas a 10.000 xG por 10 minutos; o sobrenadante foi coletado para ser preparado para as análises extracelulares, enquanto o pellet formado foi descartado. Na Figura 10 pode ser observado os Microtubos turvos devido a concentração de células, e após a centrifugação a formação do pellet contendo as células e o sobrenadante ficando translúcido.

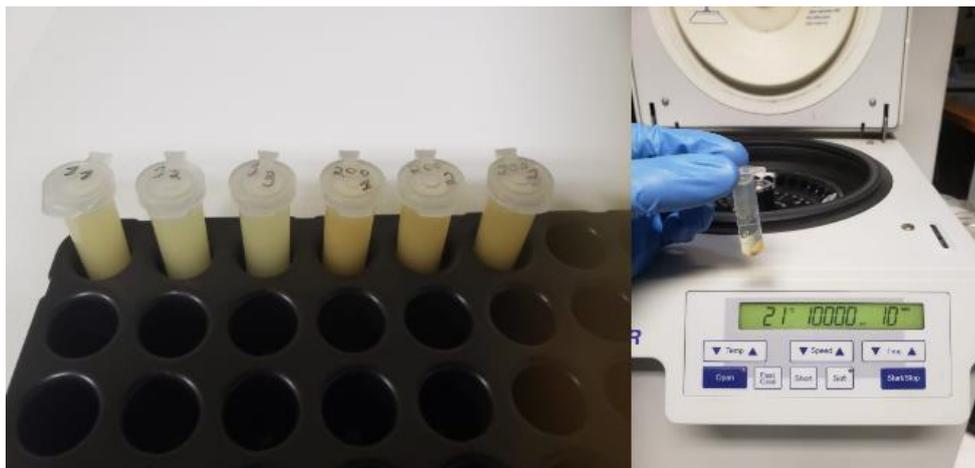


FIGURA 10: MICROTUBOS CONTENDO 2 ML DO CULTIVO APÓS 24 H, OS TUBOS FORAM CENTRIFUGADOS A 10.000 RPM POR 10 MIN, O SOBRENADANTE FOI COLETADO E O PELLET DESCARTADO.

4.1.4. Cultivo em meio CGXII

O primeiro experimento foi realizado no leitor de placas (CLARIOstar), utilizando as placas Kasvi de 12 poços, contendo 2 ml de meio CGXII, sendo destes: 5 poços destinados ao controle positivo (concentração padrão de biotina em 200 $\mu\text{g/L}$); 6 poços destinados ao meio final após depleção de biotina (1 $\mu\text{g/L}$); e 1 poço destinado a um controle negativo, para identificar contaminação dentre os diferentes poços, onde teria apenas o meio de cultura TSB, porém sem nenhum inóculo da cepa. Para evitar contaminação nós utilizamos folha de vedação. Os experimentos subsequentes foram realizados utilizando frascos Erlenmeyer de 500 ml de fundo chato ou contendo vilosidades, chamadas de defletores, como pode ser observado na Figura 11.

a)



b)



FIGURA 11: EM A) FRASCOS ERLERMAYER DE FUNDO CHATO DE 500 ML CONTENDO 200 ML DE MEIO CGXII; EM B) SÃO FRASCOS CONTENDO VILOSIDADES E 50 ML DE MEIO. EM AMBOS OS FRASCOS O RÓTULO DE 1 μg ESTÁ PRESENTE NO MEIO CONTENDO 1 μg DE BIOTINA POR LITRO REPRESENTANDO O MEIO DE CULTIVO FINAL APÓS DEPLEÇÃO, E O RÓTULO DE 200 μg REPRESENTA O CULTIVO CONTROLE CONTENDO A CONCENTRAÇÃO PADRÃO DE BIOTINA DEFINIDA PARA O MEIO CGXII.

O segundo experimento foi realizado em incubadora shaker com rotação de 160 rpm utilizando os frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml de meio CGXII, foram utilizados 4 para o cultivo controle com 200 µg/L de biotina e 4 para o meio final após depleção de biotina com 1 µg/L.

O terceiro experimento foi realizado em triplicata na incubadora shaker com rotação de 160 rpm utilizando os frascos Erlenmeyer com defletores de 500ml, porém nesse cultivo foram utilizados 50 ml de meio em cada frasco.

O último experimento também foi realizado em triplicata e foram utilizados os frascos Erlenmeyer com defletores de 500 ml com 50 ml do meio final, porém foi utilizado 120 rpm na incubadora shaker.

O fluxograma geral do último experimento realizado pode ser observado na Figura 12, as diferentes etapas dele consistem em: um pré-inóculo em meio complexo; inóculo em meio depleção de biotina; transferência para os meios de cultivo final com o controle apresentando a concentração de 200 µg/L de biotina e o meio tratamento com limitação de biotina 1 µg/L de biotina; durante as 24 h de cultivo foram coletadas alíquotas do sobrenadante para realizar as análises extracelulares. As análises foram divididas em 3 categorias: quantificação de glicose; análise de metabólitos e quantificação de aminoácidos.

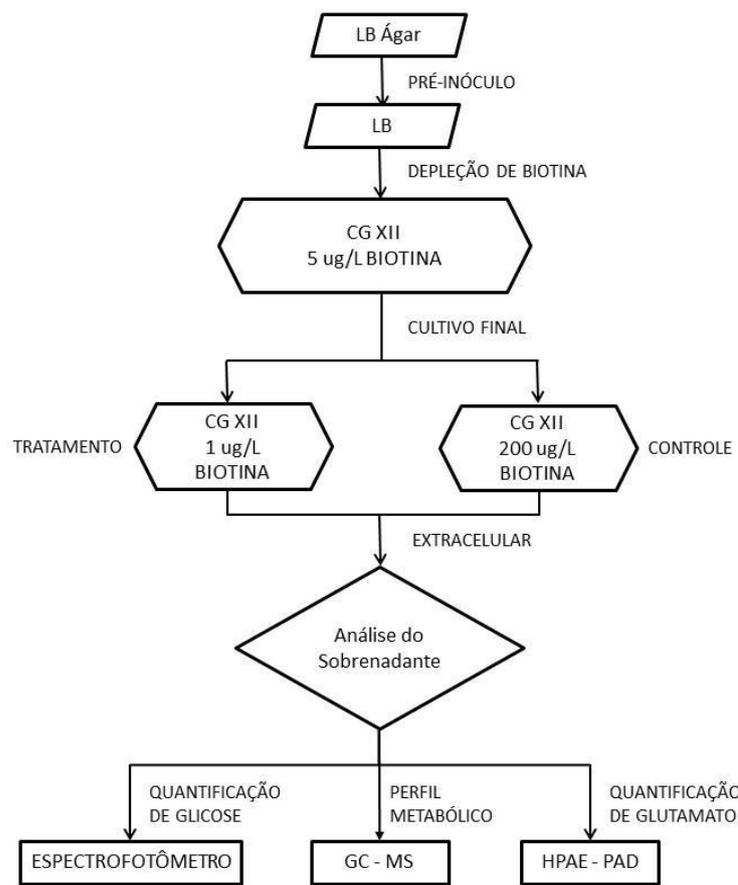


FIGURA 12: FLUXOGRAMA GERAL REPRESENTANDO AS ETAPAS DO ÚLTIMO EXPERIMENTO.

4.2. Curva de crescimento

O primeiro experimento foi realizado direto no leitor e agitador de microplacas, o cultivo durou 48 h e foram realizadas leituras da OD600 a cada ciclo de 30 minutos. No segundo experimento foram coletadas alíquotas de 1ml a cada 2 h até o tempo total de 24h, a partir dessas coletas foram separadas alíquotas menores e diluídas entre 10 e 20 vezes e foram feitas as análises de OD600 em microplacas de 96 poços com 200 µl de amostra no espectrofotômetro. O terceiro experimento foi semelhante ao segundo, com a diferença que as alíquotas foram coletadas a cada 3 h. No último experimento as coletas foram realizadas de 3 em 3 h com alíquotas de 500 µl, realizando diluições que chegaram a 50 vezes.

4.3. Quantificação de glicose

A quantificação de glicose (Glc) foi realizada com as amostras do segundo e do último experimentos, o método utilizado foi o AMARAL et al. (2007) [114], para o preparo foram utilizadas as amostras do sobrenadante do meio de cultura em cada ponto de coleta durante a curva de crescimento, com essas amostras foi realizada uma diluição em 100 vezes para a concentração de glicose coincidir com a faixa obtida na

curva padrão, a partir disso foram coletadas alíquotas de 20µl, às quais foram adicionados 300µl do reagente D-Glucose GOD-POD, contendo as enzimas glicose oxidase (GOD; >12,000 U) e peroxidase (POD; >650 U), 4-aminoantipirina (80 mg) e 50 mM de fenol pH 7,5. Após a adição do reagente à amostra foram esperados cinco minutos a temperatura ambiente para ocorrer a reação. Utilizando o espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm foi possível observar uma proporcionalidade entre a intensidade da cor e à concentração de glicose na amostra. Para a curva padrão foi utilizada uma solução de glicose nas concentrações de 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mg/ml.

4.4. Metabolômica

Foram realizadas análises metabolômica em todos os quatro experimentos seguindo os mesmos protocolos, com exceção do último experimento na qual foi adicionado a amostra uma concentração de 10 mM do aminoácido sintético norleucina como padrão interno (para identificar perdas de amostra durante as etapas de preparo), principalmente entre as diferentes réplicas, e ajudar a realizar a quantificação relativa dos metabolitos no CG-MS. A seguir foram realizadas duas etapas de preparo para separação dos metabolitos com o objetivo de facilitar as análises:

A primeira técnica foi a precipitação metanol/clorofórmio, a temperatura ambiente, de Wessel [115] que é realizada para separar os compostos polares na fração metanol (superior), os apolares na fração clorofórmio (inferior) e as proteínas entre as duas na interface. Para cada amostra foram separadas alíquotas de 200µl (com exceção do último experimento que foram utilizadas apenas 100µl) nestas foram adicionadas quatro partes de metanol (800µl), uma parte de clorofórmio (200µl) e três partes de água (600 µl), em cada uma dessas etapas foi realizada a homogeneização em um agitador de tubos de bancada tipo Vortex por 30 segundos. Após isto a solução foi centrifugada a 21.000 xG durante 10 minutos. Para as análises propostas neste trabalho foram utilizadas apenas a fração metanólica que foi secada em concentrador a vácuo (speed vac) e ressuspendidas em 1 ml de água ultrapura e direcionadas para a técnica a seguir.

A segunda técnica realizada foi uma purificação por via de cromatografia de troca catiônica, utilizando a resina Dowex 50w x8-200 fortemente ácido, realizada para separar dentre os compostos polares aqueles que apresentam carga positiva dos de carga negativa e sem carga. Para o preparo das colunas cromatográficas foram utili-

zadas seringas de 5ml com a ponta fechada utilizando lã de vidro, no primeiro experimento foi realizado um teste inicial para estabelecer qual o melhor volume de matriz a ser utilizada, dessa forma foram testados 0,5 ml e 2 ml, em todos os experimentos subsequentes foi utilizado o volume de 2 ml. As seringas foram acopladas ao Visiprep SPE Vacuum Manifold (Figura 13). A matriz foi lavada com 8ml de água ultrapura, ativada com 2ml de ácido clorídrico 10 mM e lavada com mais 8ml de água ultrapura. As amostras foram acidificadas com HCl 1M até ficarem com o pH dentro da faixa de 3 a 6, a seguir a amostra foi colocada nas seringas contendo a matriz, iniciando assim o processo da cromatografia. foi realizada uma lavagem com 7 ml de água para remover todos os metabólitos que não possuem carga e assim não interagem com a matriz, a seguir foi realizada a eluição utilizando 7 ml de hidróxido de amônio 6 M. Por fim a amostra foi secada em speed vac e ressuspensa em 1 ml de água ultrapura, a seguir foi centrifugado a 21.000 xG para remover resquícios da matriz que podem ter passado pela coluna, por fim o sobrenadante será coletado e direcionado para poderem ser realizadas as análises no HPAE-PAD e no GC-MS.

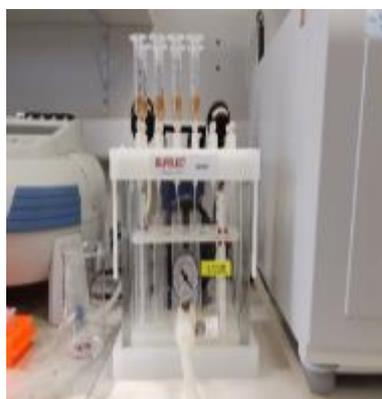


FIGURA 13: CROMATOGRAFIA POR TROCA CATIONICA REALIZADA PARA SEPARAR AS MOLÉCULAS POLARES COM CARGA POSITIVA, COMO OS AMINOÁCIDOS QUANDO SÃO ACIDIFICADOS (PROTONADOS). FORAM UTILIZADOS 2ML DA MATRIZ (STRONGLY ACIDIC DOWEX 50W X8 – 200) EM SERINGAS DE 5ML, E COLOCADOS NO EQUIPAMENTO PARA SUÇÃO A VÁCUO, O ELUENTE UTILIZADO FOI DE 1 M DE HIDRÓXIDO DE AMÔNIO (NH₄OH).

4.4.1. Quantificação de aminoácidos

Para a quantificação dos aminoácidos foram realizadas análises utilizando dois equipamentos de cromatografia de troca aniônica de alto desempenho o Dionex ICS-3000 equipado com uma coluna AminoPac PA10 (250 mm x 4,6 mm) e o Dionex ICS-5000 com coluna AminoPac PA10 (250 mm x 2 mm) ambos com detector amperométrico pulsado (High performance Anion-Exchange with Pulsed Amperometric Detection – HPAE-PAD). As amostras ressuspensas em 1 ml, a partir do preparo anterior, foram diluídas em 20 e 40 vezes utilizando a água ultrapura e adicionadas em 500 ml

nos frascos próprios para o cromatógrafo. 10 µl de amostra foram injetados, o gradiente de eluição utilizado como método era constituído de três fases móveis (A = H₂O, B = NaOH 200 mM e C= Acetato de sódio 1 M), a corrida durou 65 minutos e teve um fluxo constante de 250 µl/min, o eluente seguiu o seguinte perfil: 16% B por 12 min; 32%B por 12 min; 24%B e 40%C por 16 min; 80% B e 0% C por 2 min; 16% B e 84 % A pôr 23 min. Já na segunda análise o perfil do eluente foi: 24% B por 8 minutos; 26% B por 10 minutos; 20% B e 40% C por 3 minutos; 16% B e 40% C por 2 minutos; 16% B e 70% C por 9 minutos; 80% B por 2 minutos; e 24% B por 21 minutos. Para fazer a curva de calibração foram utilizados: na primeira análise um padrão de glutamato e na segunda análise um padrão contendo os 20 aminoácidos a 2,5 nmol/µl, assim a quantificação foi realizada comparando os picos cromatográficos das amostras em relação aos picos da curva padrão.

4.4.2. Análise de perfil metabólico

O perfil metabólico foi analisado utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), porém antes de aplicar as amostras no equipamento foi necessário um preparo inicial da amostra para garantir sua volatilização por meio do reagente N-Trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamida (MSTFA), esse processo é denominado derivatização e será esclarecido a seguir: Dentre as amostras ressuspendidas em 1ml foi separado 50µl e secado no speed vac, após seco foi adicionado 40 µl do solvente piridina e vortexado por 10 s; a seguir colocados para agitar em banho seco por 2 h a 37 °C para a solubilização; centrifugado por 10 segundos para remover alguma condensação que possa ter se formado nas tampas; adicionado 70 µl de MSTFA vortexado por 10 s e agitado em banho seco por 30 minutos a 37 °C; centrifugado para remover condensação das tampas e, por fim, transferido 100 µl para os frascos de vidro do GC-MS. No equipamento a coluna utilizada foi a HP-5MS, 30 m, 0,25 mm diâmetro, 0,25 µm de espessura; foi aplicado 1 µl de amostra no injetor sem divisão 230 °C; temperatura de espera por 5 minutos a 70 °C, aumentando até 350 °C em 5 °C/min e depois 320 °C para 5 minutos; linha de transferência a 250 °C; temperatura do quadrupolo 150 °C e temperatura do detector MS 250 °C. Dados adquiridos em modo scan m/z 60 até 550.

A identificação dos metabolitos foi realizada utilizando o software NIST MS Search, o processamento dos dados foi realizado utilizando o MetAlign. Com a informa-

ção do tempo de retenção e a massa dos principais íons, foi possível realizar a quantificação relativa de cada metabólito fazendo uma relação entre o tratamento com 1 µg/L de biotina dividido pelo controle com 200 µg/L.

4.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas para comparar o perfil metabólico entre a condição com limitação de biotina de 1 µg/L e a condição controle de 200 µg/L, essas análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism. Os dados foram submetidos ao teste One Way Anova e Teste t de Student não paramétrico, todos com níveis de significância $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Primeiro experimento

Inicialmente para a curva de crescimento tínhamos escolhido no primeiro experimento o cultivo em placas, pois embora o cultivo por agitação de frascos Erlenmeyer em incubadoras Shakers ser o método de cultivo mais comum utilizado em laboratórios, ele apresenta um gargalo quanto a reprodutibilidade dentre as diferentes amostras [116]. O espectrofotômetro utilizado chegava a uma medida máxima de OD600 entre 2 e 3 e mesmo assim estes valores estão acima do grau de confiabilidade do equipamento. Porém a bactéria mesmo no menor volume utilizado na placa ela ultrapassou em muito essa OD tornando assim impossível a construção da curva de crescimento sem realizar diluições.

Nas análises dos metabólitos das amostras realizado em CG-MS, tivemos que a produção foi mais abundante no meio com limitação de biotina que no controle, principalmente com o glutamato sendo 74 e o aspartato 11 vezes mais abundante [117]. Esse cálculo foi realizado por meio de quantificação relativa através de uma comparação entre a razão da área dos picos obtidos pelos aminoácidos do meio tratamento com o meio controle, por não ser uma quantificação absoluta não é possível comparar essa produção de Glu com o conhecido pela literatura. Também foi possível observar uma alta concentração de ácido láctico, *C. glutamicum* é um organismo aeróbio facultativo, porém a fermentação é um mecanismo menos eficiente do ponto de vista energético quanto a produção de ATP, e nesses casos os processos bioquímicos de biossíntese são reduzidos, demonstrando assim que a otimização da

aeração durante o crescimento é muito importante, tanto para o crescimento máximo durante a fase logarítmica quanto para a produção de Glu [118].

Em consonância com a literatura o resultado de Glu já era esperado apresentar um aumento, assim foi realizada a análise no HPAE-PAD com o intuito de realizar a quantificação absoluta. Como essa foi a primeira vez tentando realizar a quantificação, os protocolos de diluições da amostra não estavam bem estabelecidos, o que não possibilitou realizar a quantificação, porém foi possível identificar melhor outros aminoácidos e fazer a comparação entre o tratamento e o controle, como pode ser bem representado no Heatmap da Figura 14. Novamente o Glu se destacou com aumento, sendo de: 81 vezes na amostra que passou pela troca catiônica contendo 2 ml de matriz e 74 vezes na amostra que passou na coluna com 0,5 ml de matriz, corroborando que a limitação de biotina apresenta uma produção bem maior. Através da análise estatística foi possível observar que houve diferença entre a coluna contendo 2 ml de matriz com a coluna com 0,5 ml ($p = 0,0214$), indicando assim que possivelmente ocorreu saturação da coluna com 0,5 ml. Além disso, foi observado também um pequeno aumento de duas vezes na concentração de arginina, alanina [119] e leucina.

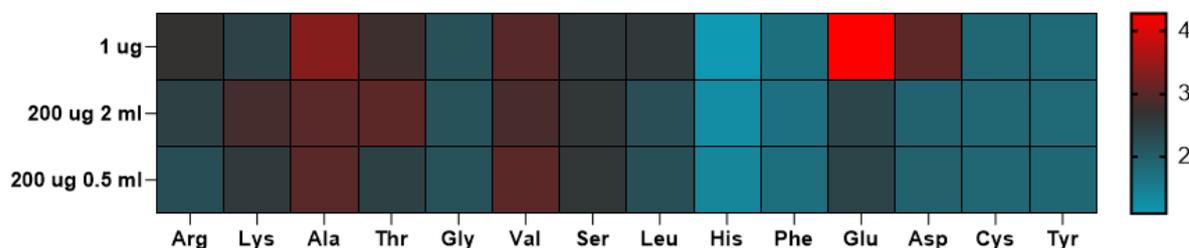


FIGURA 14: HEATMAP REPRESENTANDO OS AMINOÁCIDOS DETECTADOS PELO HPAE-PAD, 200 μ g É A CONCENTRAÇÃO DE BIOTINA PRESENTE NO MEIO CONTROLE, 0.5 ML E 2 ML SÃO OS VOLUMES DE MATRIZ DE TROCA CATIÔNICA TESTADOS, A CORRIDA DA AMOSTRA DE 1 μ g 2 ML NÃO FUNCIONOU.

Já em relação ao Asp geralmente o aumento de sua concentração está relacionado ao cultivo focado em otimizar produção de lisina (em cultivos com maior concentração de biotina) pois o Asp é formado a partir de oxaloacetato e é precursor de outros aminoácidos como a própria lisina [120]. Porém como devido a depleção de biotina a atividade da acetil-coa carboxilase é reduzida, ocorreria uma redução da atividade da piruvato cinase em virtude ao aumento da concentração de acetil-coa, por conseguinte, o fosfoenolpiruvato acumulado poderia por via da fosfoenolpiruvato carboxilase sintetizar oxaloacetato que por sua vez seria utilizado como precursor de Asp [121].

Entretanto essa maior abundância da concentração de Asp não resultou em aumento de lisina e nem de treonina, pelo contrário observamos que no meio controle a concentração desses aminoácidos foi mais abundante, o que de fato justifica o motivo pelo qual a otimização da produção deles requer maiores concentrações de biotina.

Sabe-se que o cultivo de *C. glutamicum* em condições limitantes de biotina tem a atividade do complexo enzimático ODHC reduzido, e que a redução da atividade deste complexo está associada com uma maior produção de Glu [122], porém outros fatores como a presença de transportadores específicos na membrana e até o próprio estado da membrana plasmática influenciam a superprodução e secreção do aminoácido [123, 124].

5.2. Segundo experimento

A partir das informações anteriores, foi realizado o segundo experimento seguindo as mudanças metodológicas com o objetivo de construir a curva de crescimento e correlacionar com o consumo de Glc, como pode ser observado na Figura 15. Neste resultado pode-se observar que a fase estacionária foi alcançada tanto pelo tratamento quanto pelo controle em aproximadamente 18 h de cultivo, alcançando uma OD aproximada de 20 unidades a 600 nm. Essa semelhança entre tratamento e controle destacou-se como não esperado, tendo em vista que para outros autores, a menor concentração de biotina resulta em um menor crescimento da bactéria [22].

A concentração inicial de glicose foi de 45 g/l, porém no fim do cultivo foi observado uma concentração um pouco maior que 10 g/l, geralmente a fase estacionária do crescimento de uma bactéria ocorre quando a disponibilidade de Glc no meio de cultura acaba. Como no experimento, ao alcançar a fase estacionário, ainda foi observada a presença de Glc, podemos pressupor que houve um outro fator limitante para o crescimento.

Um dos possíveis gargalos que pode ter prejudicado o crescimento da bactéria durante o segundo cultivo foi a oxigenação, o que já possuía indícios no primeiro experimento com a presença do ácido láctico. Na análise de CG-MS deste experimento não foi possível observar nenhum aminoácido, apenas a alta concentração de ácido láctico, o que pode sugerir que a fermentação agiu como fator limitante, interrompendo

o crescimento e a produção de Glu. Foram realizados cultivos subsequentes seguindo a mesma metodologia para garantir que os problemas apresentados não tenham ocorrido por erro experimental, porém em todos os mesmos problemas foram encontrados.

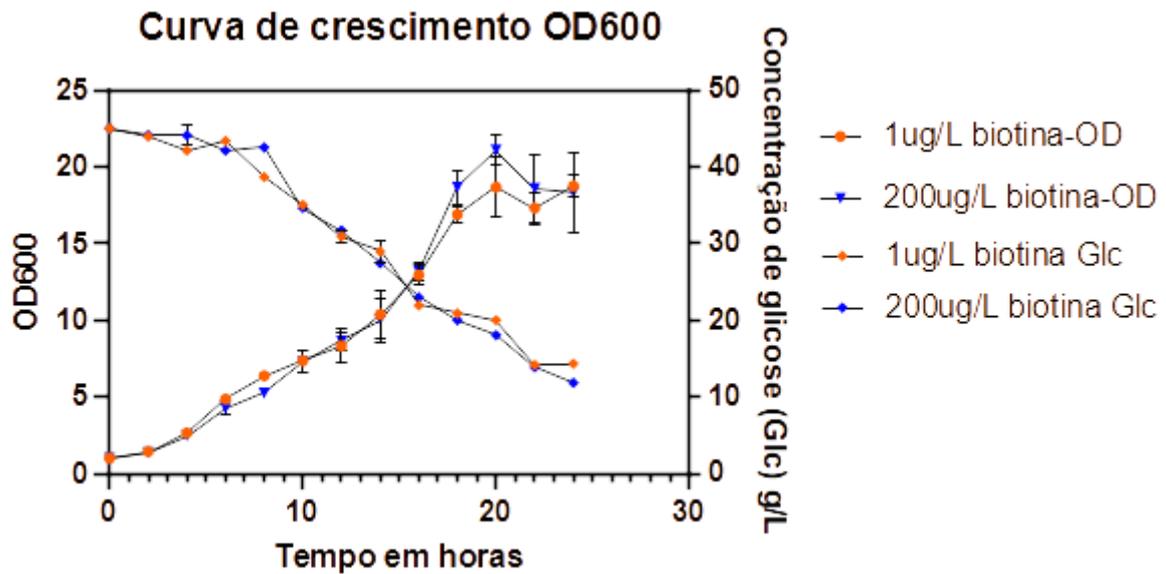


FIGURA 15: GRÁFICO REPRESENTANDO NO EIXO Y A ESQUERDA A CURVA DE CRESCIMENTO ATRAVÉS DA OD600 E NO EIXO Y A DIREITA O CONSUMO DE GLICOSE. O CULTIVO FOI REALIZADO UTILIZANDO ERLNMEYER DE FUNDO CHATO E TSB COMO PRÉ-INÓCULO. AS AMOSTRAS NÃO APRESENTARAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE TRATAMENTO E CONTROLE.

5.3. Terceiro experimento

Para testar a hipótese da fermentação como fator limitante, no cultivo do terceiro experimento, foram utilizados os frascos Erlenmeyer com defletores e realizado uma redução no volume de 200 ml para 50 ml de meio em cada frasco, objetivando assim aumentar a oxigenação do meio. Como pode ser observado na Figura 16 foi observado uma leve diferença entre o crescimento do tratamento em relação ao controle, tendo o tratamento chegado a fase estacionária no valor de OD de 25 enquanto o controle ultrapassou um pouco os 30 de OD. As mudanças metodológicas nesse cultivo demonstraram uma melhora na curva de crescimento, porém ainda não chegou no ideal esperado. E assim como no experimento anterior, não foi possível observar a produção de Glu.

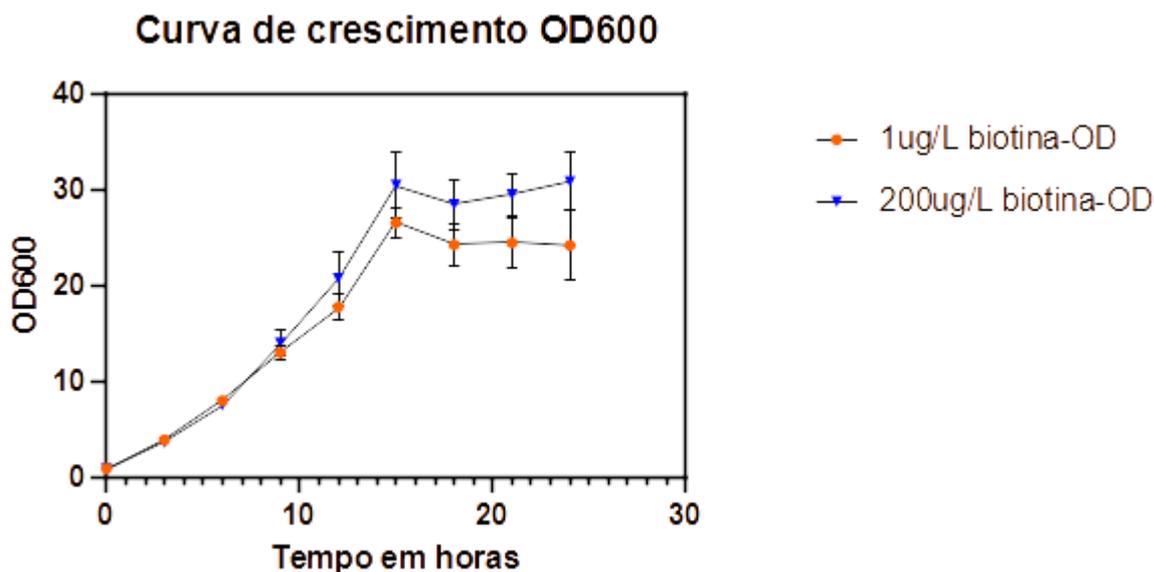


FIGURA 16: CURVA DE CRESCIMENTO REALIZADA UTILIZANDO ERLLENMEYER COM VILOSIDADES PARA OTIMIZAR A OXIGENAÇÃO E TENDO COMO PRÉ INÓCULO O MEIO TSB. NÃO APRESENTOU DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE O TRATAMENTO E O CONTROLE.

5.4. Quarto experimento

Para o último experimento foram realizadas várias mudanças, desde a OD inicial utilizada no procedimento da depleção de biotina como a composição do meio de cultura do pré-inóculo, mas a mudança mais significativa foi a aquisição de uma nova cepa para cultivo, com o intuito de garantir que não ocorreu contaminação ou alguma mutação com a anterior. Como pode ser observado na Figura 17 desta vez as curvas de crescimento seguiram o padrão esperado pela literatura, no controle foi observado uma fase estacionária em 40 de OD e no tratamento 25 de OD. Dessa vez, realmente representado a diferença no crescimento provocada pela pequena concentração de biotina disponível no meio, também é possível observar a diferença entre o consumo de Glc em que no controle o consumo é mais acelerado e acompanha o crescimento, coincidindo assim a fase estacionária com o fim da Glc. Para o tratamento é possível observar que ele alcança a fase estacionária antes de encerrar a concentração de Glc o que indica a biotina como o fator determinante para encerrar o crescimento da bactéria, e após chegar a fase estacionária o consumo de Glc continua até ela acabar, o que possivelmente representa a glicose sendo consumida durante a produção de Glu.

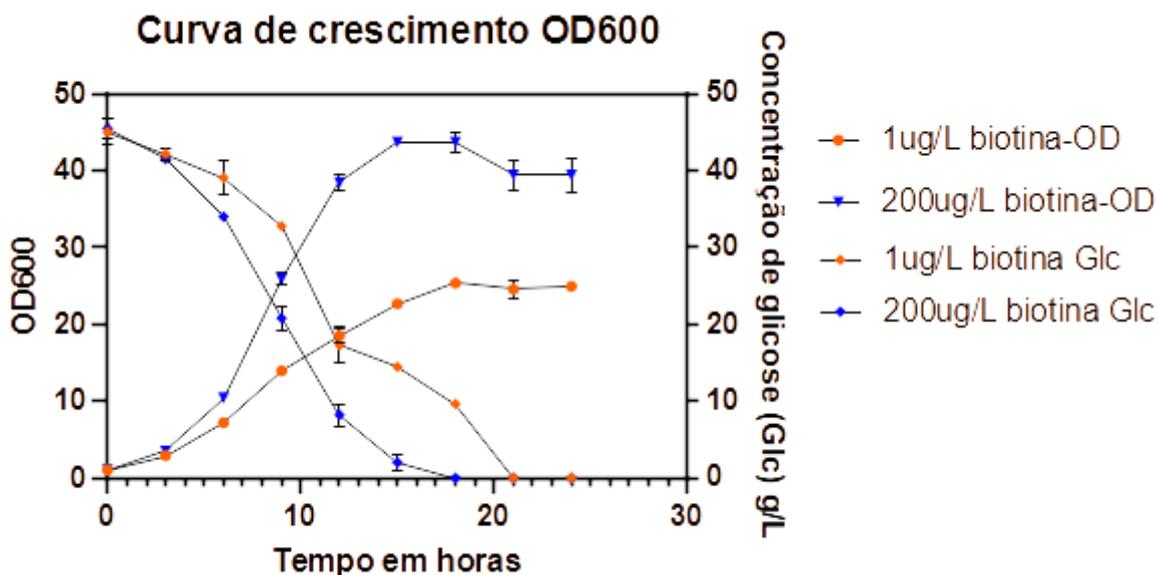


FIGURA 17: GRÁFICO REPRESENTANDO NO EIXO Y A ESQUERDA A CURVA DE CRESCIMENTO ATRAVÉS DA OD600 E NO EIXO Y A DIREITA O CONSUMO DE GLICOSE. FORAM UTILIZADOS OS FRASCOS ERLLENMEYER COM VILOSIDADES, 50 ML DE VOLUME DE MEIO DE CULTURA E LB COMO PRÉ-INÓCULO. FOI OBSERVADA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE A CURVA DE CRESCIMENTO ENTRE O TRATAMENTO E CONTROLE ($P = 0,0336$), PORÉM NÃO TEVE DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE AS CURVAS DE CONSUMO DE GLICOSE.

5.4.1 Quantificação de glutamato

Foram realizadas duas análises em HPAE-PAD para a quantificação do Glu, na primeira análise foi utilizado apenas o Glu como padrão e o cromatograma pode ser observado na Figura 18. O primeiro cromatograma foi o do controle e nele não é observado pico do Glu, porém são observados outros picos no começo do cromatograma que não puderam ser identificados nessa primeira análise pois a curva padrão não apresentava esses aminoácidos. O segundo cromatograma é o do tratamento com depleção de biotina e nele é possível observar o pico referente ao Glu.

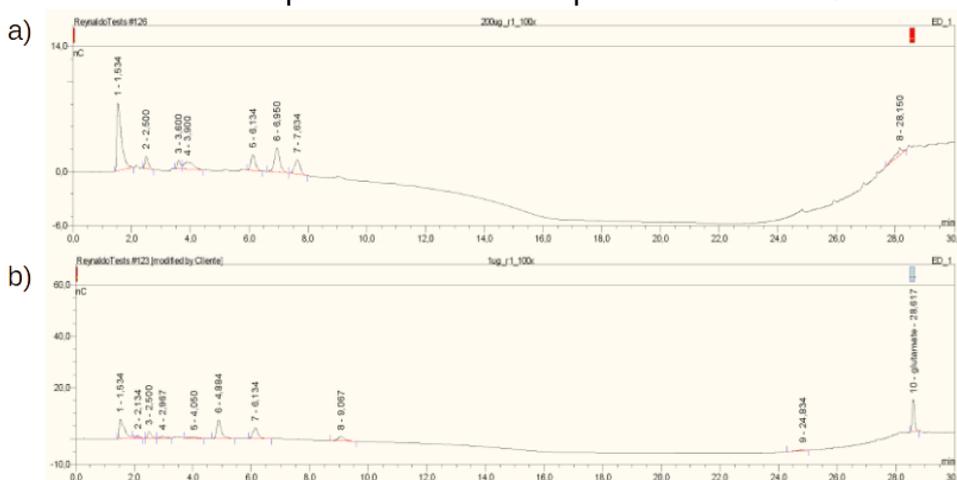


FIGURA 18: CROMATOGRAMAS OBTIDOS ATRAVÉS DE ANÁLISE EM HPAE-PAD, EM A) ESTÁ REPRESENTADA A CORRIDA DO MEIO CONTROLE NA QUAL NÃO FOI OBSERVADO O PICO DO GLU; EM B). PODE SER OBSERVADO O CROMATOGRAMA DO MEIO COM DEPLEÇÃO DE BIOTINA, O ÚLTIMO PICO PRESENTE É O REFERENTE AO GLU.

A partir desse pico foi possível calcular a concentração em gramas e em mols, mais bem representado na Tabela 4, a concentração média ficou em 5,15 mM o que é menor do que o esperado pela literatura que ficaria mais próximo de 50 mM [22], assim como é possível observar diferença significativa entre as réplicas o que pode indicar que ocorreu perda de amostra em alguma etapa do preparo.

TABELA 4: CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMATO EM GRAMAS POR LITRO E EM mM OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE NO HPAE-PAD.

	Diluição	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Média	Erro padrão	Controle 1	Controle 2	Controle 3
gramas	100x	0,63	1,12	0,34	0,70	0,40	n.a.	n.a.	n.a.
	200x	0,78	1,40	0,34	0,84	0,49	n.a.	n.a.	n.a.
mM	100x	4,28	7,62	1,92	4,61	2,66	n.a.	n.a.	n.a.
	200x	5,30	9,54	2,30	5,71	3,30	n.a.	n.a.	n.a.

Para tentar corrigir esses problemas foram refeitas as etapas de preparo da amostra (a precipitação metanol clorofórmio, a cromatografia de troca catiônica, e foi utilizado a norleucina como padrão interno) descritas no material e métodos e novamente analisadas no HPAE-PAD, porém dessa vez foi utilizado um padrão contendo uma mistura com os 20 aminoácidos para identificar melhor os outros picos do cromatograma. Nessa análise, que pode ser observada na Tabela 5, foi possível quantificar 47 mM de Glu, valor bem mais próximo que os 50 mM indicados pela literatura.

TABELA 5: QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE NO HPAE-PAD.

		Glutamato	Valina	Alanina	Glicina
1 µg/L	mM	47,07	2,83	10,64	n.a.
	gramas	6,93	0,33	0,95	n.a.
200 µg/L	mM	n.a.	n.a.	1,50	1,96
	gramas	n.a.	n.a.	0,13	0,15

5.4.2 Análise de metabólitos

Na análise realizada em CG-MS foi possível detectar diferenças entre o meio controle e o tratamento, como pode ser observado na Figura 19, entre aminoácidos corroborando o resultado de quantificações realizadas no HPAE-PAD com a produção e secreção de alanina sendo mais abundante no meio com limitação de biotina, como a sensibilidade do equipamento de cromatografia gasosa é maior que no HPLC, foi possível comparar a diferença entre as produções de glicina (que não apresentou diferença estatística) e valina (que apresentou diferença $p = 0,0154$), sendo no caso desta última a produção no meio controle foi maior. Também foi possível observar uma

maior concentração do glicerol na limitação de biotina ($p = 0,0146$), a produção excedente de glicerol em *C. glutamicum* crescida em glicose [41] é considerada desperdício de carbono tendo em vista que a cepa é incapaz de utilizar esse metabólito produzido [125], uma solução apresentada seria da inibição ou redução da atividade da enzima glicerol-3-fosfatase [126], porém ainda não se sabe qual a possível relação entre a depleção de biotina e esse aumento na produção de glicerol.

Podemos observar o aumento na produção de Asp, aproximadamente 542 vezes maior em relação ao controle, assim como o Glu 3954 vezes maior (ambos com $p < 0,0001$), representando neste último cultivo uma diferença bem maior que a apresentada no primeiro realizado em placa. O principal motivo para essa diferença possivelmente foi o maior número de células alcançado pelo último cultivo devido a otimização da aeração.

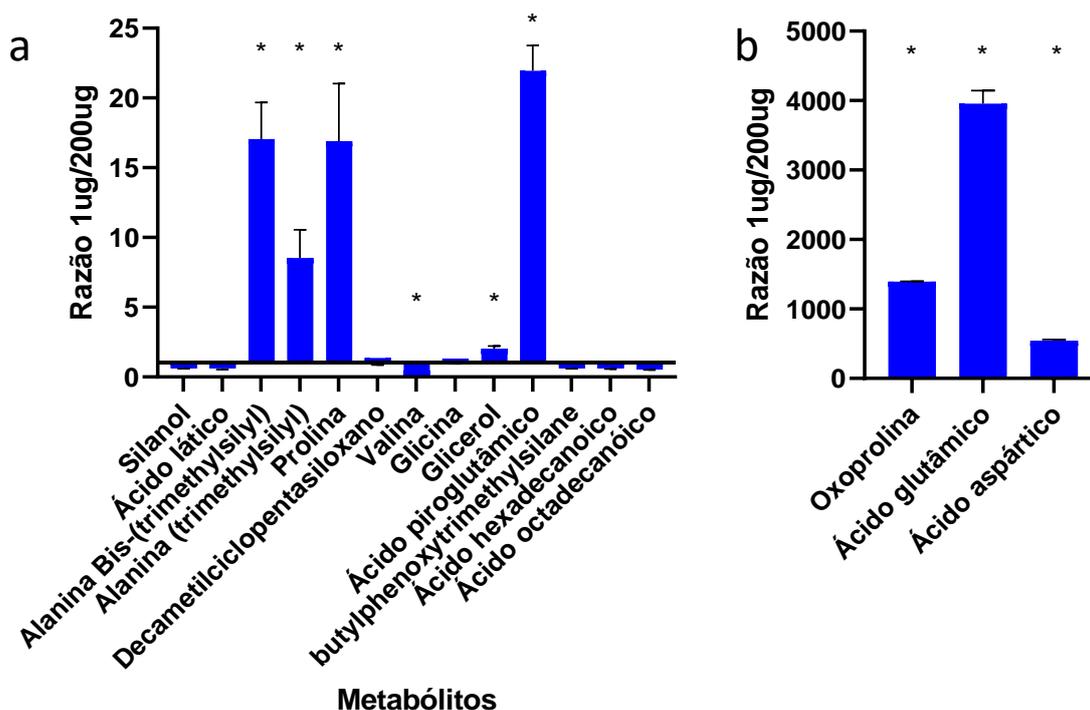


FIGURA 19: AMINOÁCIDOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS IDENTIFICADOS ATRAVÉS DE ANÁLISE FINGERPRINTING EM CG/MS, O GRÁFICO REPRESENTA UMA RAZÃO ENTRE OS PICOS OBTIDOS DO MEIO COM LIMITAÇÃO DE BIOTINA PELOS DO MEIO CONTROLE, VALORES ABAIXO DE 1 INDICAM MENOR CONCENTRAÇÃO NO TRATAMENTO E OS INDICADOS COM ASTERISCO SÃO OS QUE APRESENTAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($p < 0,05$). EM A) ESTÃO REPRESENTADOS OS METABÓLITOS QUE APRESENTARAM UMA MENOR ESCALA; EM B) ESTÃO REPRESENTADOS OS METABÓLITOS COM MAIOR ESCALA, QUE É O CASO DO GLUTAMATO, DA OXOPROLINA, (UMA FORMA CICLIZADA DO GLU FORMADA DURANTE A DERIVATIZAÇÃO) E ASPARTATO, QUE SÃO OS 2 AMINOÁCIDOS QUE REALMENTE APRESENTAM A MAIOR CONCENTRAÇÃO NO MEIO TRATAMENTO.

6. CONCLUSÕES

O último cultivo realizado nas condições de 120 rpm, 50 mL de meio de cultura e em frascos Erlenmeyer com defletores, demonstrou ser o método mais eficiente dentre os testados, apresentando o crescimento máximo esperado pela bactéria tanto no meio tratamento pós depleção de biotina quanto o meio controle, demonstrando que a otimização da aeração foi um fator determinante para a superprodução do Glu, porém não pode ser descartada a hipótese da cepa utilizada nos primeiros experimentos ter sofrido alguma mutação, ou o seu estoque ter sido contaminado.

O Meio de cultura CGXII é constituído de altas concentrações de sais e tampões, o que afeta diretamente as técnicas de separação cromatográficas, desta forma, as diferentes técnicas de preparo da amostra, como a precipitação metanol clorofórmio e a purificação por cromatografia de troca catiônica, utilizadas para propiciar a quantificação de aminoácidos pelo HPLC se revelaram eficientes, assim como utilizar a norleucina como padrão interno no último experimento ajudou a padronizar melhor essas etapas de preparo.

A utilização de cromatografia gasosa para realizar as análises dos metabólitos extracelulares se demonstrou uma técnica eficiente [99], conseguindo identificar vários metabólitos que tiveram suas concentrações afetadas pela depleção de biotina, assim como ajudou a entender os problemas relacionados a baixa aeração nos primeiros cultivos, revelando as maiores quantidades de ácido láctico.

7. PERSPECTIVAS

Os objetivos do projeto de análise do cultivo de *C. glutamicum* através do método da depleção de biotina foram alcançados, conseguindo estabelecer um bom protocolo de cultivo e extração dos metabólitos extracelulares de forma eficiente para as análises de perfil metabólico bem como a quantificação do Glu. Os experimentos realizados trouxeram informações importantes para entender o processo de depleção de biotina, porém as análises extracelulares representam apenas uma parte de todos os processos biológicos que ocorrem durante o crescimento da célula, portanto para uma melhor elucidação das vias reguladoras da biossíntese de aminoácidos são necessários experimentos com os metabólitos intracelulares e o desenvolvimento da análise de fluxo metabólico. Com o desenvolvimento desses experimentos complementares haverá um grande potencial para descobertas de novos mecanismos capazes de

aperfeiçoar a produção de aminoácidos em microrganismos. Desta forma apresento as seguintes perspectivas:

1. Análise do metabolismo de *C. glutamicum* em depleção de biotina durante as diferentes fases do crescimento celular. Identificação comparativa dos principais metabólitos do ciclo de Krebs e da síntese do ácido glutâmico entre o meio de cultivo padrão e o meio depleção de biotina.
2. Análise quantitativa dos fluxos metabólicos responsáveis pela biossíntese de aminoácidos por meio da marcação de isótopos ¹³C (¹³C MFA).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lehmann KBNRO: **Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik**. München: J.F. Lehmann; 1896.
2. Yamada K, Komagata K: **TAXONOMIC STUDIES ON CORYNEFORM BACTERIA**
V. CLASSIFICATION OF CORYNEFORM BACTERIA. *The Journal of General and Applied Microbiology* 1972, **18**(6):417-431.
3. Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H: **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications**: Springer Science & Business Media; 2013.
4. Dworkin MS-VNYI: **The prokaryotes : an evolving electronic resource for the microbiological community**. 1999.
5. Collins MD, Burton RA, Jones D: **Corynebacterium amycolatum sp. nov. a new mycolic acid-less Corynebacterium species from human skin**. *FEMS Microbiology Letters* 1988, **49**(3):349-352.
6. Bergey DHSPHAHJG: **Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2**. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986.
7. COLLINS MD, SMIDA J, DORSCH M, STACKEBRANDT E: **Tsukamurella gen. nov. Harboring Corynebacterium paurometabolum and Rhodococcus aurantiacus**. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1988, **38**(4):385-391.
8. LEVINE ND: **Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E., eds. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams & Wilkins Co.,**

- Baltimore, Md. 21202. xxvi + 1246 pp. \$45.00. *The Journal of Protozoology* 1975, **22**(1):7-7.
9. PASCUAL C, LAWSON PA, FARROW JAE, GIMENEZ MN, COLLINS MD: **Phylogenetic Analysis of the Genus *Corynebacterium* Based on 16S rRNA Gene Sequences.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1995, **45**(4):724-728.
 10. RUIMY R, RIEGEL P, BOIRON P, MONTEIL H, CHRISTEN R: **Phylogeny of the Genus *Corynebacterium* Deduced from Analyses of Small-Subunit Ribosomal DNA Sequences.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1995, **45**(4):740-746.
 11. Bergey DHHJG: **Bergey's manual of determinative bacteriology**; 1994.
 12. Oliveira A, Oliveira LC, Aburjaile F, Benevides L, Tiwari S, Jamal SB, Silva A, Figueiredo HCP, Ghosh P, Portela RW *et al*: **Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertaining the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species.** *Frontiers in Microbiology* 2017, **8**.
 13. Eikmanns BJ, Blombach B: **The pyruvate dehydrogenase complex of *Corynebacterium glutamicum*: An attractive target for metabolic engineering.** *Journal of Biotechnology* 2014, **192**:339-345.
 14. Soares SC, Silva A, Trost E, Blom J, Ramos R, Carneiro A, Ali A, Santos AR, Pinto AC, Diniz C *et al*: **The Pan-Genome of the Animal Pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Reveals Differences in Genome Plasticity between the Biovar *ovis* and *equi* Strains.** *PLOS ONE* 2013, **8**(1):e53818.
 15. Bernard K: **The Genus *Corynebacterium* and Other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria.** *Journal of Clinical Microbiology* 2012, **50**(10):3152-3158.
 16. Seiler H: **Identification of cheese-smear coryneform bacteria.** *Journal of Dairy Research* 2009, **53**(3):439-449.
 17. Collins MD, Hoyles L, Foster G, Sjöden B, Falsen E: ***Corynebacterium capitovis* sp. nov., from a sheep.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, **51**(Pt 3):857-860.
 18. Goyache J, Vela AI, Collins MD, Ballesteros C, Briones V, Moreno J, Yorío P, Domínguez L, Hutson R, Fernández-Garayzabal JF: ***Corynebacterium spheniscorum* sp. nov., isolated from the cloacae of wild penguins.**

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003, **53**(1):43-46.
19. Pascual C, Foster G, Alvarez N, Collins MD: **Corynebacterium phocae sp. nov., isolated from the common seal (Phoca vitulina)**. *International journal of systematic bacteriology* 1998, **48 Pt 2**:601-604.
 20. Brennan NM, Brown R, Goodfellow M, Ward AC, Beresford TP, Simpson PJ, Fox PF, Cogan TM: **Corynebacterium mooreparkense sp. nov. and Corynebacterium casei sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese**. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, **51**(Pt 3):843-852.
 21. Bousfield IJ, Cally AG: **Coryneform bacteria**. London ; New York: Published for the Society for General Microbiology by Academic Press; 1978.
 22. Eggeling L, Bott M: **Handbook of Corynebacterium glutamicum**: CRC press; 2005.
 23. Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K: **Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **69**(1):1-8.
 24. Hermann T: **Industrial production of amino acids by coryneform bacteria**. *J Biotechnol* 2003, **104**(1-3):155-172.
 25. Kinoshita S, Udaka S, Shimono M: **Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms**. *J Gen Appl Microbiol* 2004, **50**(6):331-343.
 26. Dong L, Li Y, Wang P, Feng Z, Ding N: **Cleaner production of monosodium glutamate in China**. *Journal of Cleaner Production* 2018, **190**:452-461.
 27. Thuy LN, Salanta L, Tofana M, Socaci SA, Fărcaș AC, Pop C: **A mini review about monosodium glutamate**. *Bulletin UASVM Food Science and Technology* 2020, **77**(1):1-12.
 28. Ault A: **The Monosodium Glutamate Story: The Commercial Production of MSG and Other Amino Acids**. *Journal of Chemical Education* 2004, **81**(3):347.
 29. Zhang J, Tang L, Zhang H, Yang Y, Mao Z: **A novel and cleaner technological process of extracting l-glutamic acid from fermentation broth by two-stage crystallization**. *Journal of Cleaner Production* 2012, **20**(1):137-144.

30. Singh S, Rekha PD, Arun AB, Huang YM, Shen FT, Young C-C: **Wastewater from monosodium glutamate industry as a low cost fertilizer source for corn (*Zea mays* L.).** *Biomass and Bioenergy* 2011, **35**(9):4001-4007.
31. Stottmeister U: **Biotechnology of amino acid production. Progress in Industrial Microbiology. Vol. 24,** Tokyo: Kodansha; Ltd, Amsterdam: Elsevier Science Publ., 1986, 340 S., 90\$. *Acta Biotechnologica* 1987, **7**(5):408-408.
32. Ikeda M: **Amino acid production processes.** *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2003, **79**:1-35.
33. Leuchtenberger W: **Amino Acids – Technical Production and Use.** In: *Biotechnology.* 1996: 465-502.
34. Becker J, Wittmann C: **Bio-based production of chemicals, materials and fuels – *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory.** *Current Opinion in Biotechnology* 2012, **23**(4):631-640.
35. Ikeda M, Nakagawa S: **The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **62**(2-3):99-109.
36. Wittmann C: **Analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in *Corynebacterium glutamicum*.** *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2010, **120**:21-49.
37. Becker J, Buschke N, Bückner R, Wittmann C: **Systems level engineering of *Corynebacterium glutamicum* – Reprogramming translational efficiency for superior production.** *Engineering in Life Sciences* 2010, **10**(5):430-438.
38. Peters-Wendisch PG, Schiel B, Wendisch VF, Katsoulidis E, Möckel B, Sahm H, Eikmanns BJ: **Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*.** *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2001, **3**(2):295-300.
39. Becker J, Klopprogge C, Schröder H, Wittmann C: **Metabolic engineering of the tricarboxylic acid cycle for improved lysine production by *Corynebacterium glutamicum*.** *Applied and environmental microbiology* 2009, **75**(24):7866-7869.
40. Petersen S, Mack C, de Graaf AA, Riedel C, Eikmanns BJ, Sahm H: **Metabolic consequences of altered phosphoenolpyruvate carboxykinase**

- activity in *Corynebacterium glutamicum* reveal anaplerotic regulation mechanisms in vivo.** *Metab Eng* 2001, **3**(4):344-361.
41. Becker J, Klopprogge C, Zelder O, Heinzle E, Wittmann C: **Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources.** *Applied and environmental microbiology* 2005, **71**(12):8587-8596.
 42. Otten A, Brocker M, Bott M: **Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of itaconate.** *Metabolic Engineering* 2015, **30**:156-165.
 43. Radoš D, Carvalho AL, Wieschalka S, Neves AR, Blombach B, Eikmanns BJ, Santos H: **Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of 2,3-butanediol.** *Microbial Cell Factories* 2015, **14**(1):171.
 44. Lee J, Sim SJ, Bott M, Um Y, Oh M-K, Woo HM: **Succinate production from CO₂-grown microalgal biomass as carbon source using engineered *Corynebacterium glutamicum* through consolidated bioprocessing.** *Scientific Reports* 2014, **4**(1):5819.
 45. Litsanov B, Kabus A, Brocker M, Bott M: **Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*.** *Microbial biotechnology* 2012, **5**(1):116-128.
 46. Aristidou A, Penttilä M: **Metabolic engineering applications to renewable resource utilization.** *Curr Opin Biotechnol* 2000, **11**(2):187-198.
 47. Hoischen C, Krämer R: **Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*.** *Journal of bacteriology* 1990, **172**(6):3409-3416.
 48. Mori M, Shiio I: **Glutamate Transport and Production in *Brevibacterium flavum*.** *Agricultural and Biological Chemistry* 1983, **47**(5):983-990.
 49. Takinami K, Yoshii H, Tsurii H, Okada H: **Biochemical Effects of Fatty Acid and its Derivatives on L-Glutamic Acid Fermentation: Part III. Biotin-Tween 60 Relationship in the Accumulation of L-Glutamic Acid and the Growth of *Brevibacterium lactofermentum*.** *Agricultural and Biological Chemistry* 1965, **29**(4):351-359.
 50. Milner JL, Vink B, Wood JM: **Transmembrane amino acid flux in bacterial cells.** *Critical reviews in biotechnology* 1987, **5**(1):1-47.

51. Krämer R: **Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism.** *FEMS Microbiology Reviews* 1994, **13**(1):75-93.
52. Clement Y, Escoffier B, Trombe MC, Lanéelle G: **Is Glutamate Excreted by its Uptake System in *Corynebacterium glutamicum*? A Working Hypothesis.** *Microbiology* 1984, **130**(10):2589-2594.
53. Kronemeyer W, Peekhaus N, Krämer R, Sahm H, Eggeling L: **Structure of the gluABCD cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*.** *J Bacteriol* 1995, **177**(5):1152-1158.
54. Hoischen C, Krämer R: **Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*.** *Archives of Microbiology* 1989, **151**(4):342-347.
55. Bröer S, Krämer R: **Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 1. Identification of a specific secretion carrier system.** *European journal of biochemistry* 1991, **202**(1):131-135.
56. Zittrich S, Krämer R: **Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*.** *J Bacteriol* 1994, **176**(22):6892-6899.
57. Palmieri L, Berns D, Krämer R, Eikmanns M: **Threonine diffusion and threonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in threonine production.** *Archives of Microbiology* 1996, **165**(1):48-54.
58. Burkovski A, Krämer R: **Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, **58**(3):265-274.
59. Cremer J, Treptow C, Eggeling L, Sahm H: **Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*.** *Journal of general microbiology* 1988, **134**(12):3221-3229.
60. Liebl W, Klamer R, Schleifer K-H: **Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1989, **32**(2):205-210.
61. Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H: **Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the ilvB-ilvN-ilvC operon.** *Journal of Bacteriology* 1993, **175**(17):5595-5603.
62. Schneider J, Peters-Wendisch P, Stansen KC, Götter S, Maximow S, Krämer R, Wendisch VF: **Characterization of the biotin uptake system encoded by**

- the biotin-inducible bioYMN operon of *Corynebacterium glutamicum*.** *BMC Microbiology* 2012, **12**(1):6.
63. Shii I, Otsuka SI, Takahashi M: **Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids.** *Journal of biochemistry* 1962, **51**:56-62.
64. Miwa K, Matsui K, Terabe M, Ito K, Ishida M, Takagi H, Nakamori S, Sano K: **Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for the glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*.** *Gene* 1985, **39**(2-3):281-286.
65. Martín JF, Santamaría R, Sandoval H, del Real G, Mateos LM, Gil JA, Aguilar A: **Cloning Systems in Amino Acid–Producing *Corynebacteria*.** *Bio/Technology* 1987, **5**(2):137-146.
66. Schäfer A, Kalinowski J, Simon R, Seep-Feldhaus AH, Pühler A: **High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria.** *Journal of bacteriology* 1990, **172**(3):1663-1666.
67. Kalinowski J, Bachmann B, Thierbach G, Pühler A: **Aspartokinase genes *lysC* alpha and *lysC* beta overlap and are adjacent to the aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase gene *asd* in *Corynebacterium glutamicum*.** *Molecular & general genetics : MGG* 1990, **224**(3):317-324.
68. Schrupf B, Schwarzer A, Kalinowski J, Pühler A, Eggeling L, Sahm H: **A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*.** *J Bacteriol* 1991, **173**(14):4510-4516.
69. Follettie MT, Shin HK, Sinskey AJ: **Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* and *thrC* loci.** *Molecular Microbiology* 1988, **2**(1):53-62.
70. Bathe B, Kalinowski J, Pühler A: **A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome.** *Molecular & general genetics : MGG* 1996, **252**(3):255-265.
71. Ratledge C, Kristiansen B: **Basic Biotechnology:** Cambridge University Press; 2006.
72. Tauch A, Homann I, Mormann S, Rüberg S, Billault A, Bathe B, Brand S, Brockmann-Gretza O, Rückert C, Schischka N *et al*: **Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a**

- cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *J Biotechnol* 2002, **95**(1):25-38.
73. Mormann S, Lömker A, Rückert C, Gaigalat L, Tauch A, Pühler A, Kalinowski J: **Random mutagenesis in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 using an IS6100-based transposon vector identified the last unknown gene in the histidine biosynthesis pathway.** *BMC genomics* 2006, **7**:205.
74. Krömer JO, Sorgenfrei O, Klopprogge K, Heinzle E, Wittmann C: **In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome.** *J Bacteriol* 2004, **186**(6):1769-1784.
75. Flint DH, Allen RM: **[37] Purification and characterization of biotin synthases.** In: *Methods in enzymology*. vol. 279: Academic Press; 1997: 349-356.
76. Tosaka O, Morioka H, Takinami K: **The Role of Biotin-Dependent Pyruvate Carboxylase in L-Lysine Production.** *Agricultural and Biological Chemistry* 1979, **43**(7):1513-1519.
77. SHIIO I, ÔTSUKA S-I, TAKAHASHI M: **Effect of Biotin on the Bacterial Formation of Glutamic Acid: I. Glutamate Formation and Cellular Permeability of Amino Acids*.** *The Journal of Biochemistry* 1962, **51**(1):56-62.
78. Hatakeyama K, Kohama K, Vertès AA, Kobayashi M, Kurusu Y, Yukawa H: **Analysis of the biotin biosynthesis pathway in coryneform bacteria: cloning and sequencing of the bioB gene from *Brevibacterium flavum*.** *DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping* 1993, **4**(2):87-93.
79. Otsuka AJ, Buoncristiani MR, Howard PK, Flamm J, Johnson C, Yamamoto R, Uchida K, Cook C, Ruppert J, Matsuzaki J: **The *Escherichia coli* biotin biosynthetic enzyme sequences predicted from the nucleotide sequence of the bio operon.** *The Journal of biological chemistry* 1988, **263**(36):19577-19585.
80. Gloeckler R, Ohsawa I, Speck D, Ledoux C, Bernard S, Zinsius M, Villeval D, Kisou T, Kamogawa K, Lemoine Y: **Cloning and characterization of the *Bacillus sphaericus* genes controlling the bioconversion of pimelate into dethiobiotin.** *Gene* 1990, **87**(1):63-70.

81. Ploux O, Soularue P, Marquet A, Gloeckler R, Lemoine Y: **Investigation of the first step of biotin biosynthesis in *Bacillus sphaericus*. Purification and characterization of the pimeloyl-CoA synthase, and uptake of pimelate.** *The Biochemical journal* 1992, **287 (Pt 3)**(Pt 3):685-690.
82. Ploux O, Marquet A: **The 8-amino-7-oxopelargonate synthase from *Bacillus sphaericus*. Purification and preliminary characterization of the cloned enzyme overproduced in *Escherichia coli*.** *Biochemical Journal* 1992, **283**(2):327-331.
83. Stoner GL, Eisenberg MA: **Biosynthesis of 7, 8-diaminopelargonic acid from 7-keto-8-aminopelargonic acid and S-adenosyl-L-methionine. The kinetics of the reaction.** *The Journal of biological chemistry* 1975, **250**(11):4037-4043.
84. Izumi Y, Tani Y, Ogata K: **Microbiological biosynthesis of biotin.** *Methods in enzymology* 1979, **62**:326-338.
85. Krell K, Eisenberg MA: **The purification and properties of dethiobiotin synthetase.** *Journal of Biological Chemistry* 1970, **245**(24):6558-6566.
86. Hatakeyama K, Hohama K, Vertès AA, Kobayashi M, Kurusu Y, Yukawa H: **Genomic organization of the biotin biosynthetic genes of coryneform bacteria: cloning and sequencing of the bioA-bioD genes from *Brevibacterium flavum*.** *DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping* 1993, **4**(3):177-184.
87. Hatakeyama K, Kobayashi M, Yukawa H: **[36] Analysis of biotin biosynthesis pathway in coryneform bacteria: *Brevibacterium flavum*.** In: *Methods in enzymology*. vol. 279: Academic Press; 1997: 339-348.
88. Wendisch VF, Bott M, Kalinowski J, Oldiges M, Wiechert W: **Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology.** *Journal of Biotechnology* 2006, **124**(1):74-92.
89. Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L: **Metabolite profiling for plant functional genomics.** *Nature biotechnology* 2000, **18**(11):1157-1161.
90. Fiehn O: **Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes.** *Plant molecular biology* 2002, **48**(1-2):155-171.

91. Koek MM, Muilwijk B, van der Werf MJ, Hankemeier T: **Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry**. *Analytical chemistry* 2006, **78**(4):1272-1281.
92. Sahm H, Eggeling L, de Graaf AA: **Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum***. *Biological chemistry* 2000, **381**(9-10):899-910.
93. Wittmann C, Heinzle E: **Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*: a novel approach for metabolic flux analysis**. *European journal of biochemistry* 2001, **268**(8):2441-2455.
94. Vallino JJ, Stephanopoulos G: **Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction**. *Biotechnology and bioengineering* 1993, **41**(6):633-646.
95. Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T: **Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry**. *Journal of proteome research* 2003, **2**(5):488-494.
96. Fox A: **Carbohydrate profiling of bacteria by gas chromatography-mass spectrometry and their trace detection in complex matrices by gas chromatography-tandem mass spectrometry**. *Journal of chromatography A* 1999, **843**(1-2):287-300.
97. Buchholz A, Takors R, Wandrey C: **Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques**. *Anal Biochem* 2001, **295**(2):129-137.
98. Strelkov S, von Elstermann M, Schomburg D: **Comprehensive analysis of metabolites in *Corynebacterium glutamicum* by gas chromatography/mass spectrometry**. *Biological chemistry* 2004, **385**(9):853-861.
99. Börner J, Buchinger S, Schomburg D: **A high-throughput method for microbial metabolome analysis using gas chromatography/mass spectrometry**. *Anal Biochem* 2007, **367**(2):143-151.
100. Wittmann C, Hans M, Heinzle E: **In vivo analysis of intracellular amino acid labelings by GC/MS**. *Anal Biochem* 2002, **307**(2):379-382.
101. Marx A, de Graaf AA, Wiechert W, Eggeling L, Sahm H: **Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by**

- nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnology and bioengineering* 1996, **49**(2):111-129.
102. Kelleher JK: **Flux estimation using isotopic tracers: common ground for metabolic physiology and metabolic engineering.** *Metab Eng* 2001, **3**(2):100-110.
103. Szyperski T: **¹³C-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research.** *Quarterly reviews of biophysics* 1998, **31**(1):41-106.
104. Wiechert W, Möllney M, Petersen S, de Graaf AA: **A universal framework for ¹³C metabolic flux analysis.** *Metab Eng* 2001, **3**(3):265-283.
105. Kiefer P, Heinzle E, Zelder O, Wittmann C: **Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose.** *Applied and environmental microbiology* 2004, **70**(1):229-239.
106. Wittmann C, Kiefer P, Zelder O: **Metabolic fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during lysine production with sucrose as carbon source.** *Applied and environmental microbiology* 2004, **70**(12):7277-7287.
107. Wittmann C, Heinzle E: **Metabolic activity profiling by ¹³C tracer experiments and mass spectrometry in *Corynebacterium glutamicum*.** In: *Microbial processes and products*. Springer; 2005: 191-204.
108. Duez P, Kumps A, Mardens Y: **GC-MS profiling of urinary organic acids evaluated as a quantitative method.** *Clinical chemistry* 1996, **42**(10):1609-1615.
109. Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie A: **Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems.** *The Plant cell* 2001, **13**(1):11-29.
110. Soga T, Ueno Y, Naraoka H, Ohashi Y, Tomita M, Nishioka T: **Simultaneous Determination of Anionic Intermediates for *Bacillus subtilis* Metabolic Pathways by Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry.** *Analytical chemistry* 2002, **74**(10):2233-2239.
111. Wittmann C, Kim HM, Heinzle E: **Metabolic network analysis of lysine producing *Corynebacterium glutamicum* at a miniaturized scale.** *Biotechnology and bioengineering* 2004, **87**(1):1-6.

112. Kinoshita S, Nakayama K, Akita S: **Taxonomical Study of Glutamic Acid Accumulating Bacteria, *Micrococcus glutamicus* nov. sp.** *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 1958, **22**(3):176-185.
113. Melo RM: **Proteômica top-down da bactéria produtora de aminoácidos *Corynebacterium glutamicum*.** *Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana)—Universidade de Brasília* 2019:117.
114. Amaral LIVd, Gaspar M, Costa PMF, Aidar MPM, Buckeridge MS: **Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais.** *Hoehnea* 2007, **34** n. 4:425-431.
115. Wessel D, Flügge UI: **A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids.** *Analytical Biochemistry* 1984, **138**(1):141-143.
116. Duetz W, Witholt B: **Oxygen transfer by orbital shaking of square vessels and deepwell microtiter plates of various dimensions.** *Biochemical Engineering Journal* 2004, **17**:181-185.
117. Shiio I, Ozaki H, Ujigawa-Takeda K: **Production of Aspartic Acid and Lysine by Citrate Synthase Mutants of *Brevibacterium flavum*.** *Agricultural and Biological Chemistry* 1982, **46**(1):101-107.
118. Dominguez H, Nezondet C, Lindley ND, Cocaign M: **Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction.** *Biotechnology Letters* 1993, **15**(5):449-454.
119. Jojima T, Fujii M, Mori E, Inui M, Yukawa H: **Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid l-alanine under oxygen deprivation.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010, **87**(1):159-165.
120. Eggeling L, Oberle S, Sahm H: **Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998, **49**(1):24-30.
121. Kornberg HL: **The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*.** *The Biochemical journal* 1966, **99**(1):1-11.
122. Shimizu H, Tanaka H, Nakato A, Nagahisa K, Kimura E, Shioya S: **Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around**

- the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*.** *Bioprocess and biosystems engineering* 2003, **25**(5):291-298.
123. Eggeling L, Sahm H: **I-Glutamate and I-lysine: traditional products with impetuous developments.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, **52**(2):146-153.
124. Hirasawa T, Wachi M, Nagai K: **A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* ItsA gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production.** *Journal of bacteriology* 2000, **182**(10):2696-2701.
125. Rittmann D, Lindner SN, Wendisch VF: **Engineering of a glycerol utilization pathway for amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*.** *Applied and environmental microbiology* 2008, **74**(20):6216-6222.
126. Lindner SN, Meiswinkel TM, Panhorst M, Youn J-W, Wiefel L, Wendisch VF: **Glycerol-3-phosphatase of *Corynebacterium glutamicum*.** *Journal of Biotechnology* 2012, **159**(3):216-224.