



# Universidade de Brasília

**Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas  
Departamento de Biologia Celular**

**CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA INTRACELULAR E EXTRACELULAR DE  
*Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) NA PRESENÇA DE TWEEN 40**

Aluna: Giovanna Alves de Sousa Dutra  
Orientador: Luis Henrique Ferreira do Vale

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana  
Brasília, 2023

Giovanna Alves de Sousa Dutra

CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA INTRACELULAR E EXTRACELULAR DE  
*Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) NA PRESENÇA DE TWEEN 40

Projeto apresentado 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 no programa de mestrado em Biologia Microbiana.

Orientador: Luis Henrique Ferreira do Vale

Brasília, 2023

## **BANCA EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Luis Henrique Ferreira do Vale - UnB  
Departamento de Biologia Celular

**Membro titular interno:** Profa. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima  
Universidade de Brasília

**Membro titular externo:** Prof. Gilvan Caetano Duarte  
Universidade Federal de Uberlândia

**Suplente:** Prof. Carlos André Ornelas Ricart  
Universidade de Brasília

## AGRADECIMENTOS

Em especial agradeço a minha mãe, **Valdete Alves**, que sempre apoiou minhas decisões e possibilitou emocionalmente esse mestrado, me dando forças para continuar realizando um bom trabalho. Ao meu pai, **Nelson Dutra**, que me apoiou e tenho a oportunidade de aprender sempre, além de seu apoio financeiro sem o qual teria sido muito difícil permanecer no mestrado. A minha irmã, **Eduarda Alves**, que mesmo sem entender muito da área, sempre esteve presente e me apoiando.

A todos os que colaboraram com essa pesquisa possibilita a demonstração de que não se faz ciência sozinho, lição árdua que aprendi ao longo dessa etapa da minha vida acadêmica. A todas as amigas que construí no laboratório: Bruna Gomes, Lucas Oliveira, Raphaela Menoli, Anna Fernanda e Farah Murtadha por sempre estarmos nos apoiando, o que tornava o laboratório um ambiente mais agradável de se estar para passar horas e horas. E também ao meu orientador, **Luís Henrique Ferreira do Vale**, o qual tornou tudo isso possível, me apoiando científica e emocionalmente.

A **Reynaldo Melo** que foi meu parceiro de laboratório desde meu primeiro dia de mestrado. Ensinando e passando com maestria todo seu conhecimento, mesmo nos dias mais difíceis e tarde da noite. Uma pessoa excepcional com seu carisma, inteligência emocional, me fazendo rir nos dias que eu queria chorar e desistir, sempre me fazendo olhar o lado bom das coisas. Constantemente esteve disposto a me acompanhar nos experimentos a noite, o qual ao final de um dia bom ou ruim sempre tinha nosso lanchinho especial da madrugada. Esse trabalho não teria sido possível sem sua ajuda e amizade. Hoje, somos grandes amigos e agradeço muito ao mestrado por ter colocado uma pessoa tão especial na minha vida.

Ao nosso técnico **Nuno Manoel**, que fez reparos inimagináveis nos equipamentos, os quais foram essenciais para o andamento de todos os projetos, incluindo o meu. Agradeço imensamente e de forma especial o técnico **Jaques Henrique Miranda**, que mesmo com toda sua implicância comigo, me ajudou sem medir esforços e me ensinar vivências da vida e de laboratório, além de todas as manutenções do LTQ orbitrap Elite.

A todos os professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) por

sempre estarem unidos e se ajudando. Apesar dos vários grupos que compõem o laboratório, não há nenhum grupo que seja 100% independente, o que faz com que trabalhem juntos e sempre ajudando o outro. Além de todas nossas confraternizações, as quais fizeram com que os grupos se aproximassem mais.

A **Paula Goulart**, que me incentivou a seguir no projeto. Mesmo do outro lado do país mentivemos nossa conexão por meio de ligações e mensagens sobre os experimentos e vivências entre laboratórios. A **Fernanda Alexandre**, ao qual sempre me ensinou que: o que não tem solução, solucionado está. E me ajudou a levantar todas as vezes que precisei. Em especial, a **Amanda Jácome**, que tive o prazer de conhecer na graduação e sem palavras agradeço por todo apoio, companherismo, amor, durante dia e noite nessa jornada que foi o mestrado.

A todos aqueles que fizeram parte da minha jornada e que não foi especificado.

## **APOIO FINANCEIRO**

Agradeço ao fomento providenciado pela CAPES, responsável pelo pagamento da minha bolsa. Financiamento feito pela FINEP providenciado para a sala de espectrometria de massa e financiamento da FAPDF que por meio de projetos de Demanda Espontânea (processo 00193.00001484/2021-91) e Pronex fomentou custos variados ao longo do desenvolvimento desse projeto.

*“There are many hypotheses in science that are wrong. That's perfectly alright; it's the aperture to finding out what's right. Science is a self-correcting process. To be accepted, new ideas must survive the most rigorous standards of evidence and scrutiny.”*

*Carl Sagan*

## RESUMO

*Corynebacterium glutamicum* é uma bactéria não patogênica amplamente utilizada na produção industrial de aminoácidos, moléculas que se encontram em terceiro lugar no mundo entre as mais produzidas por meio da fermentação, atingindo milhões de toneladas e com números crescentes no mercado mundial. *C. glutamicum* tem sido amplamente estudada, uma vez que os métodos tradicionais utilizados para produção de aminoácidos demandam um alto custo com isso, com isso, alternativas estão sendo buscadas a fim de diminuir o custo de produção e aumentar a produtividade. Nesse contexto, a proteômica tem desenvolvido papel fundamental para compreender e melhorar a produção de aminoácidos, visto que o entendimento das vias de biossíntese depende da interpretação de análises proteômicas. Isso porquê com a proteômica existe possibilidade de descrição e caracterização do funcionamento das vias metabólicas, sendo capaz a identificação de modificações pós-traducionais (PTMs). Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar proteínas e complexos proteicos que participam das vias da biossíntese de aminoácidos dessa bactéria, sob a influência de Tween 40 para produção de glutamato, analisando o perfil proteico intracelular e extracelular. Na análise de glutamato secretado pela *C. glutamicum* no tempo de 18h de cultivo, alcançou uma concentração de  $0,70 \pm 0,14$  mM, na condição tween 40, enquanto na condição controle foi de  $0,04 \pm 0,02$  mM (Teste t  $p < 0,05$ ). A lise celular não desnaturante foi efetiva, visto que, extraiu bem os complexos e obteve uma diversidade de bandas. Os complexos proteicos separados via eletroforese BN-PAGE, apresentaram complexos proteicos intracelulares variando entre 20kDa e 720kDa. Foram identificadas, por análise *bottom-up*, proteínas pertencentes a esses complexos, sendo importantes para o metabolismo da *C. glutamicum*, como a enolase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, pertencentes a via glicolítica e a glutamina-sintetase, envolvida na biossíntese de glutamato. A análise do perfil proteico extracelular por SDS-PAGE apresentou proteínas entre 10 a 80 kDa, sugerindo diferença na abundância de algumas proteínas entre as condições. Na análise, *bottom-up* por LC-MS/MS do secretoma, foi possível identificar algumas proteínas reguladas mais abundantes na condição com tween 40, como a proteína homóloga da carboxilesterase Culp6, envolvida na manutenção da parede celular, sugerindo que houve distúrbio na parede causada pela add de tween 40, a PEP carboxilase que foi descrita como sendo importante para a produção de glutamato. Tais resultados possibilitam a melhor compreensão do maquinário bioquímico envolvido na produção e secreção de aminoácidos por *Corynebacterium glutamicum*.

**Palavras chaves:** *Corynebacterium*, produção de aminoácidos, proteômica *bottom-up*, glutamato.

## ABSTRACT

*Corynebacterium glutamicum* is a non-pathogenic bacterium widely used in the industrial production of amino acids, molecules that rank third in the world among the most produced through fermentation, reaching millions of tons with increasing numbers in the global market. *C. glutamicum* has been extensively studied, as traditional methods used for amino acid production incur high costs. Therefore, alternatives are being sought to reduce production costs and increase productivity. In this context, proteomics has played a crucial role in understanding and improving amino acid production, as the comprehension of biosynthetic pathways relies on the interpretation of proteomic analyses. This is because proteomics offers the possibility of describing and characterizing the functioning of metabolic pathways, including the identification of post-translational modifications (PTMs). Thus, the present study aimed to identify and characterize proteins and protein complexes involved in the amino acid biosynthesis pathways of this bacterium under the influence of Tween 40 for glutamate production, analyzing intracellular and extracellular protein profiles. In the analysis of glutamate secreted by *C. glutamicum* after 18 hours of cultivation, a concentration of  $0.70 \pm 0.14$  mM was achieved under the Tween 40 condition, while under the control condition it was  $0.04 \pm 0.02$  mM (t-test  $p < 0.05$ ). The non-denaturing cell lysis was effective, as it extracted the complexes well and obtained a diversity of bands. The protein complexes separated via BN-PAGE presented intracellular protein complexes ranging from 20 kDa to 720 kDa. Proteins belonging to these complexes were identified through bottom-up analysis, and they were found to be important for the metabolism of *C. glutamicum*. These proteins include enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, which are part of the glycolytic pathway, and glutamine synthetase, involved in glutamate biosynthesis. The analysis of the extracellular protein profile by SDS-PAGE revealed proteins ranging from 10 to 80 kDa, suggesting differences in the abundance of some proteins between conditions. The bottom-up analysis of the secretome through LC-MS/MS identified some regulated proteins that were more abundant under the Tween 40 condition. These included the homologous protein of carboxylesterase Culp6, involved in cell wall maintenance, suggesting that there was a disturbance in the cell wall caused by the addition of Tween 40. Additionally, PEP carboxylase, described as important for glutamate production, was also identified. Such results provide a better understanding of the biochemical machinery involved in the production and secretion of amino acids by *Corynebacterium glutamicum*.

**Keywords:** *Corynebacterium*, amino acid production, *bottom-up* proteomics, glutamate.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MUDANÇAS NAS QUANTIDADES DE PRODUÇÃO ANUAL MUNDIAL DE AMINOÁCIDOS. .....	15
FIGURA 2. MERCADOS GLOBAIS ESTIMADOS PARA 2016 PARA AMINOÁCIDOS SEGMENTADOS POR APLICAÇÕES. ....	16
FIGURA 3. HISTÓRIA DA FERMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E TECNOLOGIA DE DESENVOLVIMENTO DE CEPAS EM CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM.....	17
FIGURA 4. REDE BIOQUÍMICA DO METABOLISMO CENTRAL DE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM. ....	19
FIGURA 5. MODELO DO ENVELOPE CELULAR DE C. GLUTAMICUM REPRESENTANDO A ORGANIZAÇÃO DE SEUS PRINCIPAIS COMPONENTES.....	22
FIGURA 6. MICROFOTOGRAFIA ELETRÔNICA DE C. GLUTAMICUM ELUCIDANDO SUA MORFOLOGIA.....	23
FIGURA. 7 REDE BIOQUÍMICA DO METABOLISMO CENTRAL DE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM A NÍVEL METABÓLICO. ....	25
FIGURA 8. CONDIÇÕES DAS TRÊS POSSÍVEIS INDUÇÕES PARA SUPERPRODUÇÃO DE GLUTAMATO. .....	28
FIGURA 9. TRÊS PRINCIPAIS PROCESSOS PARA SUPERPRODUÇÃO DE GLUTAMATO.....	30
FIGURA 10. VIA BIOSINTÉTICA DO L-GLUTAMATO EM C. GLUTAMICUM. ....	31
FIGURA 11. VISUALIZAÇÃO DA MUDANÇA DO FLUXO METABÓLICO DO CICLO DO TCA PARA A SÍNTESE DE L-GLUTAMATO.....	32
FIGURA 12. FLUXOGRAMA DE TRABALHO DE UM EXPERIMENTO UTILIZANDO BOTTOM-UP. ....	37
FIGURA 13. ILUSTRAÇÃO DAS ABORDAGENS BOTTOM-UP E TOP-DOWN.....	38
FIGURA 14. CULTIVO DA C. GLUTAMICUM EM PLACA DE PETRI COM MEIO TSA .....	43
FIGURA 15. PROCESSO DE CULTIVO DA C. GLUTAMICUM DESDE O PRÉ-INÓCULO AO CULTIVO EM CGXII. A .....	46
FIGURA 16. ESQUEMA ILUSTRATIVO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR QUBIT.. ....	49
FIGURA 17. FOTO DE ESTRUTURA UTILIZADA PARA REALIZAÇÃO DE GELFREE.....	50
FIGURE 18. DISPOSITIVO MULTIPLEX DE ELETROFORESE PREPARATIVA. ....	51
FIGURA 19. CURVA DE CRESCIMENTO DA BACTÉRIA C. GLUTAMICUM.....	55
FIGURA 20. CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS DETECTADOS NO SOBRENADANTE DE 12H E 18H DE CULTIVO EM CONDIÇÃO CONTROLE E COM TWEEN 40.....	57
FIGURA 21. ANÁLISE DO LISADO CELULAR DE C. GLUTAMICUM POR BN-PAGE (4% A 18%)..	59

FIGURA 22. ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DESNATURANTE POR SDS-PAGE 12% DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR ELETROELUIÇÃO DAS BANDAS SELECIONADAS DOS GÉIS NATIVOS BN-PAGE . .....	61
FIGURA 23. ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DESNATURANTE POR SDS-PAGE 12%. ....	66
FIGURA 24. ANÁLISE DAS ABUNDÂNCIAS DAS PROTEÍNAS. ....	68
FIGURA 25. ANÁLISE RMD (MAHALANOBIS). ....	69
FIGURA 26. VOLCANO PLOT. ....	70

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA TSBE CGXII. ....	44
TABELA 2. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES DAS CONDIÇÕES CONTROLE (I A III) E COM TWEEN 40 (IV A VI). ....	58
TABELA 3. QUANTIFICAÇÃO EXTRACELULAR DAS AMOSTRAS CONTROLES (I A IV) E COM TWEEN 40 (V A VII). ....	58
TABELA 4. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS PELO PEAKS A PARTIR DAS INFORMAÇÕES GERADAS PELO LC MS/MS. ....	63
TABELA 5. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS PELO PEAKS A PARTIR DAS INFORMAÇÕES GERADAS PELO LC MS/MS. ....	65
TABELA 6 PROTEÍNAS ENCONTRADAS EM MAIOR ABUNDÂNCIA OU SOMENTE NA CONDIÇÃO CONTROLE. ....	71
TABELA 7 ACESSOS DAS PROTEÍNAS REGULADAS DA CONDIÇÃO TWEEN 40. ....	74

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. Atividade industrial de <i>C. glutamicum</i> .....	14
1.2. <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	19
1.3. Produção de aminoácidos (glutamato).....	24
1.4. Secreção de proteínas <i>C. glutamicum</i> .....	33
1.5. Cultivo celular.....	34
1.6. Proteômica.....	35
2. JUSTIFICATIVAS .....	41
3. OBJETIVOS GERAIS.....	42
3.1. Objetivos específicos.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	42
4.2. Cultivo bacteriano .....	45
4.3. Curva de Crescimento .....	46
4.4. Análise dos aminoácidos.....	47
4.5. Análise Proteômica .....	48
4.5.1. Precipitação das amostras .....	48
4.5.2. Metodologia de lise celular não-desnaturante.....	48
4.5.3. Quantificação de proteínas.....	49
4.5.4. Gel Free.....	49
4.5.5. BN-PAGE (Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) .....	50
4.5.6. Eletroeluição .....	50
4.5.7. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)...	51
4.5.8. Digestão de proteínas e análise por espectrometria de massas <i>bottom-up</i> .....	51
4.5.9. Análise por espectrometria de massas <i>top-down</i> .....	53
4.5.1. Análise por bioinformática .....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	55
5.1. Crescimento Bacteriano .....	55
5.2. Análise dos aminoácidos.....	56
5.3. Quantificação de proteínas .....	57
5.3.1. Intracelular .....	57

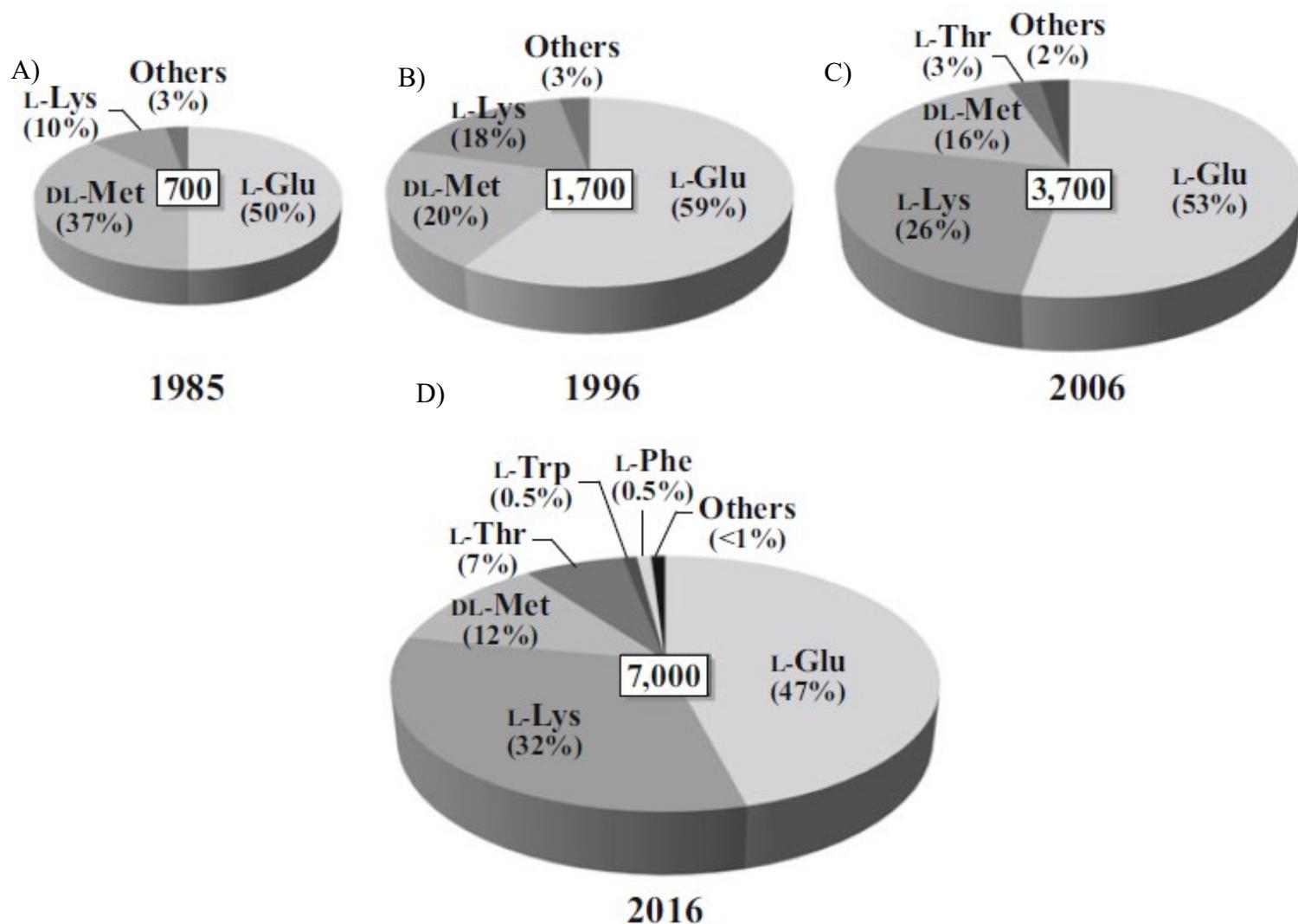
5.3.2. Extracelular .....	58
5.4. Análise proteômica intracelular dos géis .....	59
5.5. Identificação das proteínas de complexos proteicos .....	62
5.6. Análise de proteínas extracelulares por SDS-PAGE.....	66
5.7. Proteômica <i>Bottom-up</i> do extracelular de <i>C. glutamicum</i> com estímulo (tween 40) ou sem estímulo (controle).....	67
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Atividade industrial de *C. glutamicum*

Os aminoácidos têm uma ampla variedade de características em termos de valor nutricional, sabor, ação medicinal e propriedades químicas e, portanto, têm muitos usos potenciais como aditivos alimentares, suplementos alimentares, produtos farmacêuticos, cosméticos, materiais poliméricos e produtos químicos agrícolas. À medida que cada novo uso é desenvolvido, a demanda por esse tipo de aminoácido cresce rapidamente e é acompanhada pelo desenvolvimento da tecnologia de produção em massa desse aminoácido.

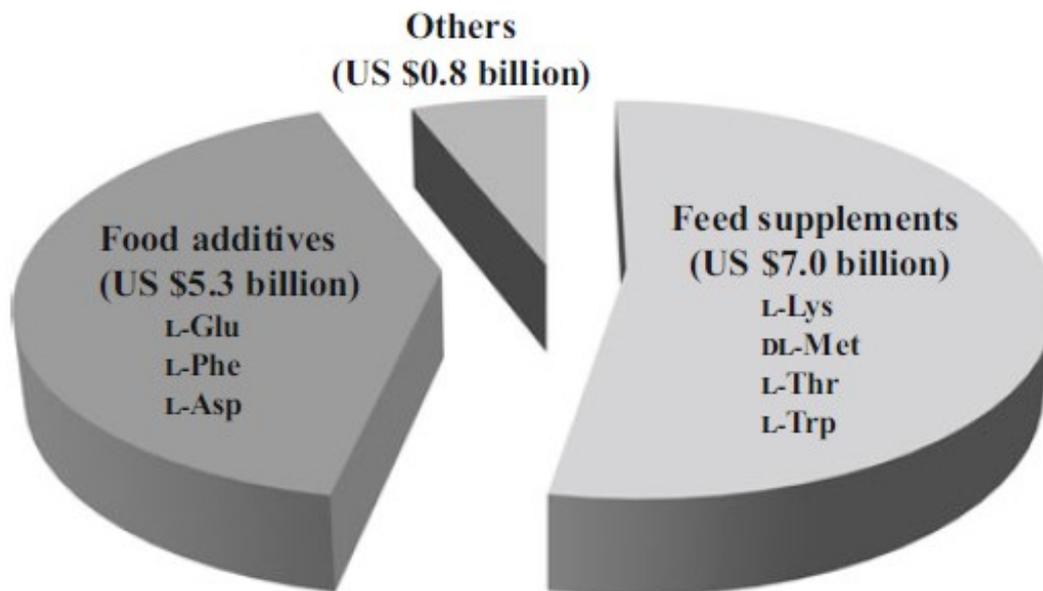
A produção mundial anual de aminoácidos tem aumentado ano a ano (Figura. 1), de 0,7 milhão de toneladas em 1985 para 1,7 milhão de toneladas em 1996, 3,7 milhões de toneladas em 2006 e 7,0 milhões de toneladas em 2016, com perspectiva dez milhões de toneladas em 2022, crescendo a uma taxa CAGR (Taxa Composta de Crescimento Anual) de 5,6% de 2015 a 2022 (IKEDA, M.; NAKAGAWA, 2003; KALINOWSKI *et al.*, 2003; SANCHEZ *et al.*, 2018)



**Figura 1. Mudanças nas quantidades de produção anual mundial de aminoácidos. Os números nos quadrados indicam as quantidades estimadas de aminoácidos produzidos nos anos de 1985 (A), 1996 (B), 2006 (B) e 2016 (D). Nota-se uma demanda crescente de lisina nesses anos, mas a demanda de glutamato sempre me manteve alta nesses anos. (Os números dentro dos quadrados significam 1000 toneladas métricas). (SANCHEZ et al., 2018).**

De acordo com um recente relatório de pesquisa de mercado (WANG *et al.*, 2020) e outras publicações relevantes (SANCHEZ *et al.*, 2018), o mercado global de aminoácidos é estimado em aproximadamente US\$ 13 bilhões em 2016 e está crescendo anualmente a uma taxa de 7%. A Figura 2 mostra os mercados globais estimados para aminoácidos de diferentes aplicações em 2016. Os aminoácidos alimentares, ou seja, lisina, metionina, treonina e triptofano, têm a maior fatia do mercado, gerando US\$ 7,0 bilhões. A segunda maior parcela (US\$ 5,3 bilhões) pertence aos aditivos alimentares, compostos principalmente pelo realçador

de sabor glutamato monossódico e pelos aminoácidos aspartato e fenilalanina, ambos usados como ingredientes do edulcorante peptídeo aspartil fenilalanil metil éster (Aspartame) (FENG; XU; ZHANG, 2018).

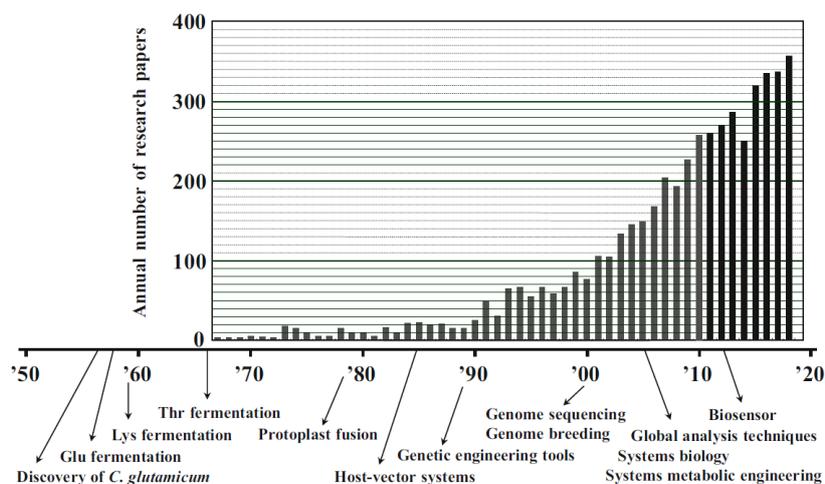


**Figura 2. Mercados globais estimados para 2016 para aminoácidos segmentados por aplicações.** Nota-se uma demanda alta de aditivos alimentares, como glutamato e aspartato, ficando atrás dos suplementos alimentares, como lisina. Mesmo assim a demanda de glutamato continua alta nos mercados globais. (SANCHEZ et al., 2018).

A maioria dos L-aminoácidos são fabricados através de processos bacterianos, principalmente através da fermentação. *Corynebacterium glutamicum*, que desempenha um papel principal na fermentação de aminoácidos. Tem ganhado bastante destaque e cada vez mais sendo altamente importante, conforme demonstrado pelo número crescente de trabalhos de pesquisa relevantes (Figura. 3). A Figura 3 também mostra os principais tópicos da tecnologia de fermentação de aminoácidos e desenvolvimento de cepas durante as décadas desde o início dessa pesquisa. A fermentação de aminoácidos foi desenvolvida principalmente no Japão e se estendeu pelo leste da Ásia e pela Europa, América do Norte e América do Sul (IKEDA, Masato; TAKENO, 2013).

Hoje a fermentação de aminoácidos é uma indústria global observou que a China alcançou uma presença proeminente neste campo, conforme refletido pelo aumento drástico no número de trabalhos de pesquisa relevantes para a produção de aminoácidos (XU et al., 2014;

ZHANG, B. *et al.*, 2020).



**Figura 3. História da fermentação de aminoácidos e tecnologia de desenvolvimento de cepas em *Corynebacterium glutamicum*.** No gráfico também elucidada o número anual de trabalhos de pesquisa relevantes para este microrganismo desde a década de 70 aos anos 2000, mostrando que teve um “boom” nos últimos anos, pela relevância desse microrganismo mundialmente.

A razão para o aumento da demanda de produção de aminoácidos decorre de sua ampla utilização como aditivos alimentares, suplementos alimentares, agentes terapêuticos e precursores para a síntese de peptídeos ou agroquímicos (EGGELING; SAHM, 1999). Com isso, desde a década de 1950, existem numerosos estudos para compreender e melhorar as condições metabólicas que levam à superprodução de aminoácidos (TRYFONA; BUSTARD, 2005).

Aminoácido é o terceiro produto obtido a partir da fermentação industrial, atrás apenas da produção de etanol e antibióticos, respectivamente (LEUCHTENBERGER; HUTHMACHER; DRAUZ, 2005). *C. glutamicum* possui um sistema metabólico amplo e com grande capacidade para produção de biomoléculas de interesse industrial (LEE *et al.*, 2016). Ela já foi utilizada para a produção de diversos aminoácidos (KIM *et al.*, 2009). E nos dias de hoje, existe um progresso impressionante no que diz respeito ao uso biotecnológico de *Corynebacterium glutamicum* e isso diz respeito, muito além, da produção tradicional de L-aminoácido. Esta bactéria foi projetada com sucesso para um amplo portfólio de produtos e seu genoma revela um rico repertório de vias (Figura 4), sugerindo propriedades atrativas para fins de produção industrial (BECKER, J.; WITTMANN, 2012).

Nos últimos anos, a engenharia metabólica contribuiu fortemente para o desempenho de *C. glutamicum* na produção industrial, incluindo modificações no final das vias de produções bem como redirecionamento de fluxo para eliminação de subprodutos indesejáveis ou fornecimento aprimorado de blocos de construção, poder redox ou energia. A integração da biologia de sistemas na engenharia metabólica, mais recentemente, estendeu a engenharia de cepas de *C. glutamicum* em um conceito amplo de sistemas, considerando a otimização de cepas em uma escala mais global (BECKER, J.; WITTMANN, 2012). 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.

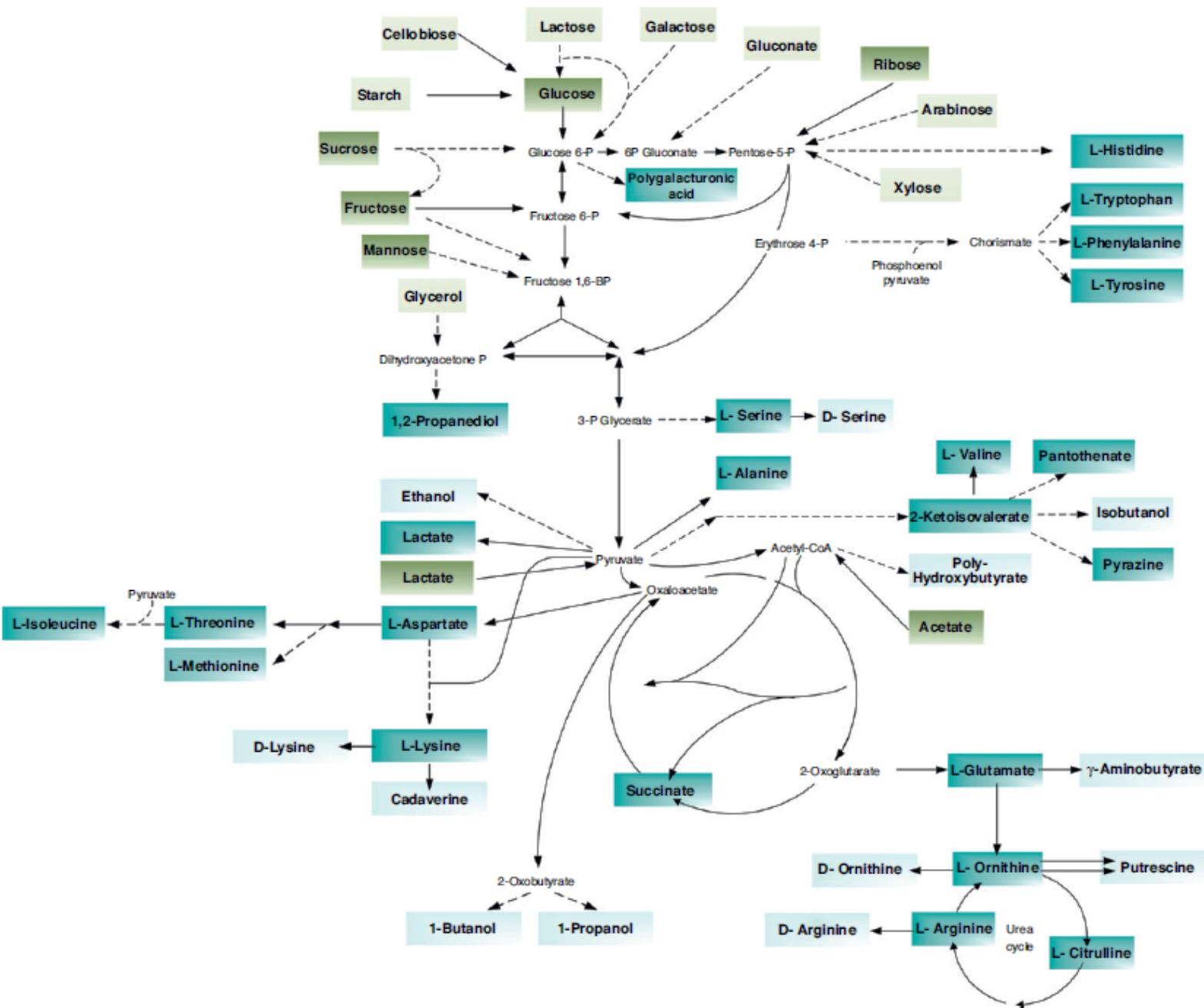


Figura 4. Rede bioquímica do metabolismo central de *Corynebacterium glutamicum*. Incluindo as vias biossintéticas para produtos químicos, materiais e combustíveis implementados e projetados neste microrganismo. Compreende a utilização de substratos naturais (verde escuro) e não naturais (verde claro). Além disso, são indicados produtos naturais (azul escuro) e não naturais (azul claro) (BECKER, J.; WITTMANN, 2012).

## 1.2. *Corynebacterium glutamicum*

Originalmente, o gênero *Corynebacterium* (BERGER *et al.*, 1979) foi criado essencialmente para acomodar o bacilo da difteria e algumas outras espécies animal-patogênicas (BARKSDALE, 1970). Mais tarde, no entanto, uma coleção variada de outras espécies não formadoras de esporos, de coloração irregular, gram-positivas e em forma de bastonete foram atribuídas a esse gênero. Como resultado, o gênero não englobava apenas organismos fenotipicamente muito diversos, mas também incluía espécies animal-patogênicas,

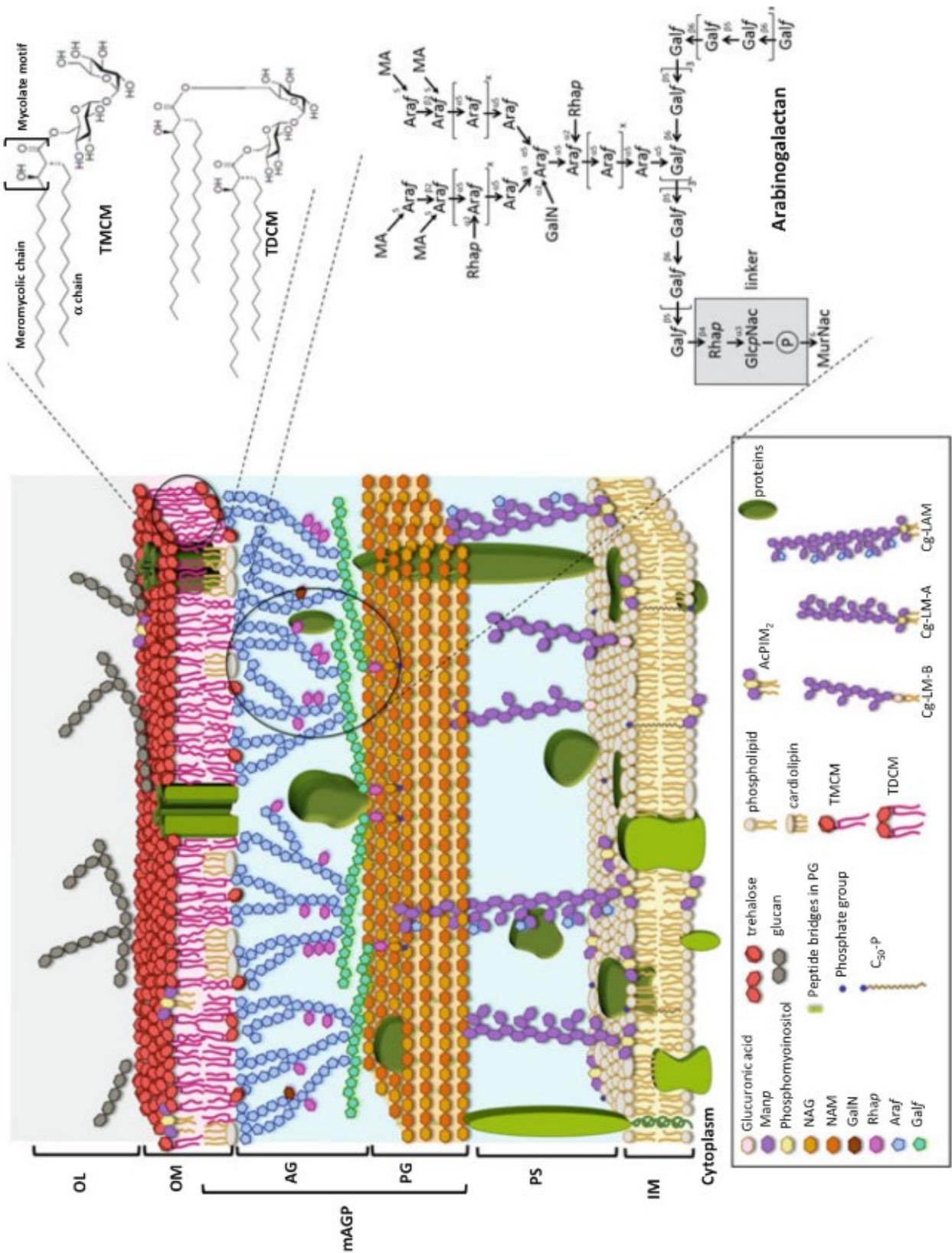
vegetais-patogênicas e saprófitas (COLLINS; KROPPENSTEDT, 1983). Atualmente as abordagens filogenéticas, principalmente análises de sequência de RNA ribossomal 16s (16S rRNA) e o uso de marcadores quimiotaxonômicos (principalmente a composição lipídica, bases de DNA e parede celular) particularmente da década de 1960 até a década de 1980, fez muito para esclarecer a taxonomia das corinebactérias (COLLINS; KROPPENSTEDT, 1983).

O gênero está agora confinado principalmente àquelas espécies que possuem quimiótipo IV de parede celular (ácido mesodiaminopimélico, arabinose e galactose), contém ácidos corinemicólicos (aproximadamente 22 a 36 átomos de carbono), ácidos graxos celulares dos tipos saturados e monoinsaturados de cadeia linear e menaquinonas dihidrogenadas, e possuem teores G+C de aproximadamente 51 a 68 mol% (LIEBL; KLAMER; SCHLEIFER, 1989). Esta definição mais restrita do gênero *Corynebacterium* resultou na transferência de muitas espécies para outros gêneros (por exemplo, os gêneros *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Clavibacter*, *Microbacterium* e *Rhodococcus*), bem como a atribuição de espécies anteriormente colocadas em outro grupo para o gênero *Corynebacterium* (STRELKOV; VON ELSTERMANN; SCHOMBURG, 2004). O gênero *Corynebacterium*, que atualmente conta com mais de 110 espécies validadas, é altamente diversificado, incluindo espécies de relevância médica, veterinária ou biotecnológica (OLIVEIRA *et al.*, 2017). O gênero *Corynebacterium* foi descrito como gram-positivo; sésses; presença de grânulos metacromáticos; geralmente as células exibem arranjo típico em forma de V; não esporulantes; 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; presença de menaquinonas hidrogenadas com oito a nove unidades de isopreno (KEILHAUER; EGGELING; SAHM, 1993).

Embora o gênero *Corynebacterium* compartilhe propriedades muito peculiares da parede celular, como a presença de polissacarídeos complexos específicos da parede celular e uma grande variedade de lipídios não convencionais, todos os membros desse gênero bacteriano têm sido considerados como tendo, uma arquitetura de parede celular monodérmica. Com o aperfeiçoamento das análises bioquímicas e microscópicas, tornou-se progressivamente claro que eles tinham uma organização didérmica atípica: uma membrana citoplasmática fosfolipídica cercada por um exoesqueleto incomum e complexo, covalentemente ligado a uma membrana externa contendo ácido micólico (chamada micomembrana) (PLITZKO *et al.*,

2008). Estes ácidos micólicos, marca registrada de *Corynebacteriales*, são únicos ácidos graxos  $\beta$ -hidroxilados de cadeia longa (C30-C90) ramificados que esterificam frações de trealose ou arabinose de um polímero de arabinose e galactose (o arabinogalactano) (MARRAKCHI; LANÉELLE; DAFFÉ, 2014).

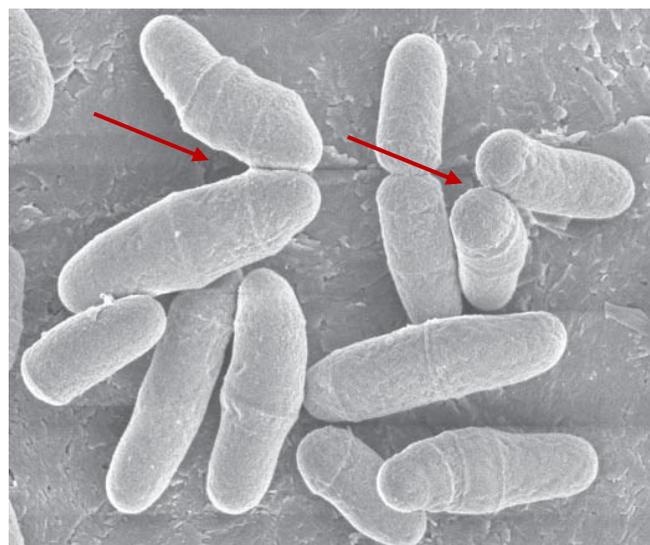
Dentro do gênero, a *Corynebacterium glutamicum* provou ser um modelo cada vez mais importante para representar a organização íntima do envelope celular de *Corynebacteriales*. Uma organização modelo especulativa atualizada do envelope celular de *C. glutamicum* é mostrada na Figura 5. O núcleo específico deste envelope consiste em uma espessa rede de peptidoglicano na qual um número bastante limitado de micolatos esterificados, as cadeias de arabinogalactano, estão associadas por um ligante covalente ramnose-glucosamina. Por sua vez, essas cadeias lipopolissacarídicas fornecem plataformas básicas para a inserção de micolatos de trealose junto com fosfolipídios convencionais para montar a micomembrana. Outros glicolipídios complexos são encontrados na membrana externa da micobactéria, mas estão ausentes em *C. glutamicum* (LAYRE *et al.*, 2014; JACKSON, 2014). Polímeros secundários, como lipoglicanos, são essenciais nessa estrutura, embora sua função exata seja desconhecida. A maioria deles está ancorada na membrana citoplasmática e pode estabilizar a estrutura geral conforme proposto para os ácidos teicóicos em arquiteturas monodérmicas (SWOBODA *et al.*, 2010).



**Figura 5. Modelo do envelope celular de *C. glutamicum* representando a organização de seus principais componentes.** Do citoplasma para o meio externo este envelope contém: (i) uma membrana interna (IM), composta por proteínas e fosfolípidios (principalmente fosfatidil inositol, fosfatidil glicerol e cardiolipina). Um esqueleto da parede celular: o micolol-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) constituído por uma rede de peptidoglicano (PG) ligada ao arabinogalactano (AG) através de um ligante covalente fosforil-glucosamina ramnose, com algumas das terminações AG esterificadas por ácidos micólicos. A estrutura detalhada do mAGP é mostrada no zoom na parte inferior direita da figura. (BIRCH et al. 2009).

Embora a análise proteômica de diferentes frações do envelope celular tenha identificado uma ampla gama de proteínas presentes nesse compartimento (HANSMEIER *et al.*, 2004), apenas algumas delas, ou seja, porinas, foram caracterizadas funcionalmente *in vivo* ou *in vitro* por sua capacidade de formar poros hidrofílicos em bicamadas lipídicas. Mais recentemente, por meio de fracionamento celular, mais de 40 proteínas diferentes demonstraram localizar-se especificamente na micomembrana de *C. glutamicum* (MARCHAND *et al.*, 2012). Suas funções ainda precisam ser determinadas. O envelope de *Corynebacteriales*, devido à sua organização específica e à presença de ácidos micólicos de cadeia longa, é altamente impermeável a pequenos solutos hidrofílicos e compostos antimicrobianos. Isso foi claramente demonstrado em *Mycobacterium smegmatis* (MAILAENDER *et al.*, 2004), mas não é necessariamente verdadeiro para todos os membros de *Corynebacteriales*. A esse respeito, pode ser importante observar que as cepas modificadas de *C. glutamicum* são altamente eficazes na secreção de uma ampla gama de metabólitos e proteínas, indicando que seu envelope pode ter evoluído com suas próprias especificidades e pode ser muito mais permeável do que o envelope de outras do mesmo gênero (LEE *et al.*, 2016).

Com todas essas descobertas, a *Corynebacterium glutamicum*, figura 6, foi isolada em 1956 pela primeira vez por pesquisadores da empresa Kyowa Hakkon no Japão, sendo inicialmente denominada *Micrococcus glutamicus* (YANG; YANG, 2017).



**Figura 6. Microfotografia eletrônica de *C. glutamicum* elucidando sua morfologia.** Observa-se sua morfologia cilíndrica e os frequentes arranjos em pares do tipo v, devido ao “snapping division”, mostrado pelas setas. Sendo uma característica exclusiva para determinação do gênero *Corynebacteriales*. (KALINOWSKI, J., 2005)

Nesse período, a empresa Kyowa Hakko estava em busca de microrganismos selvagens que pudessem produzir aminoácidos, quando ocasionalmente descobriu essa bactéria. Mais adiante, *M. glutamicus* e as outras espécies descobertas como produtoras de aminoácidos tiveram suas identificações alteradas para a espécie *C. glutamicum* (LIU *et al.*, 2017). A descoberta de microrganismos produtores de aminoácidos foi um marco na década de 50, porque até então, a ciência não considerava possível que microrganismos fossem capazes de produzir metabólitos primários em grandes quantidades (SHIRAI *et al.*, 2007).

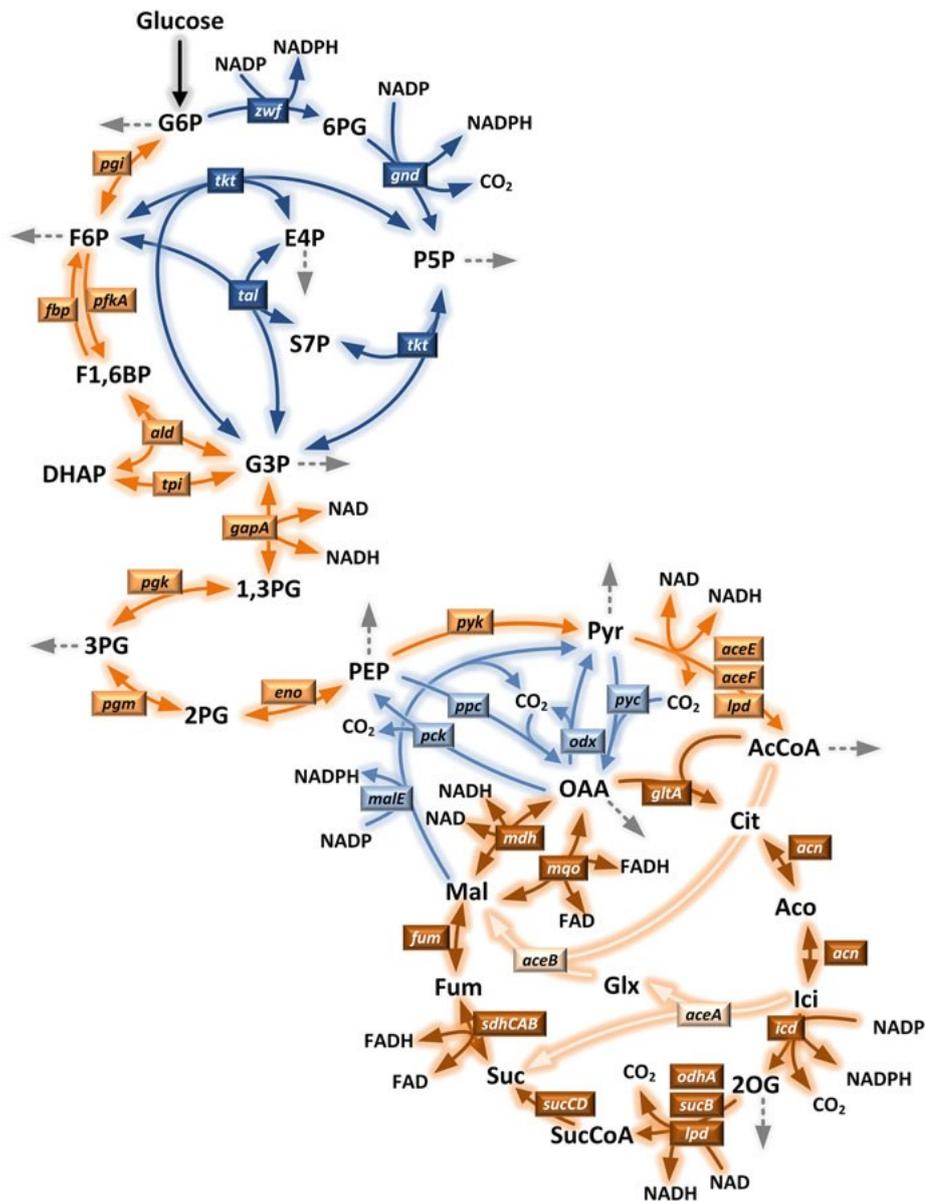
A bactéria *C. glutamicum* se tornou tão promissora no quesito produção de aminoácidos em geral que o sequenciamento de seu genoma se deu por dois grupos concomitantes Kalinowsk *et al.*, (2003) e posteriormente por outro grupo independente para complementar a pesquisa Yukawa *et al.*, (2017).

### **1.3. Produção de aminoácidos (glutamato)**

Geralmente, o metabolismo do esqueleto carbônico compreende uma rede complexa de aproximadamente 100 a 200 reações bioquímicas, que estão intimamente interconectadas. A análise dos fluxos através dessas reações é baseada principalmente em um modelo da rede de reação subjacente. Felizmente, a extensa caracterização bioquímica e fisiológica de *C. glutamicum* durante as últimas décadas fornece uma rica fonte de informações sobre muitas das enzimas e vias presentes neste organismo (KIND; BECKER; WITTMANN, 2013; LI; WADA; YOKOTA, 2007). Há aproximadamente 15 anos, esse conhecimento foi complementado e atualizado com informações de sequenciamento do genoma (GRAF *et al.*, 2019). No entanto, deve-se estar ciente de que o metabolismo central ainda não é totalmente compreendido. Descobrimos continuamente novas características em praticamente todos os microrganismos estudados, que têm impacto substancial para a análise de fluxo, ou seja, em relação à especificidade da enzima (NIKEL *et al.*, 2015) ou mesmo à existência de rotas metabólicas completas (LANGE *et al.*, 2012).

A parte central do metabolismo em *C. glutamicum* parece estar bem compreendida atualmente. A bactéria possui a via das pentoses fosfato (PP), a via Emden-Meyerhof-Parnas (EMP), do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), da ácido glioxílico e um rico conjunto de enzimas, que interconectam os metabólitos C3 da via EMP com metabólitos C4 do ciclo do

TCA (Figura 7) (KIND; BECKER; WITTMANN, 2013; BECKER, M. *et al.*, 2013; WOLF *et al.*, 2021) Os intermediários metabólicos são retirados dessas vias metabólicas centrais para servir como blocos de construção para a formação de biomassa, o que resulta em fluxos anabólicos contínuos nas células em crescimento.



**Figura. 7** Rede bioquímica do metabolismo central de *Corynebacterium glutamicum* a nível metabólico. Mostra as vias das pentoses fosfato (PP), a via *Emden-Meyerhof-Parnas* (EMP), do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), da ácido glioxílico, além das enzimas necessárias para formação da biomassa (WOLF *et al.*, 2021).

*C. glutamicum* requer glicose 6-fosfato, frutose 6-fosfato, ribose 5-fosfato, eritrose 4-fosfato, gliceraldeído 3-fosfato, piruvato, fosfoenolpiruvato, acetilCoA, oxaloacetato e 2-oxoglutarato para a formação de biomassa (Figura 7) (WOLF *et al.*, 2021). Devido à estrutura da parede celular, o diaminopimelato, um precursor direto da L-lisina, é adicionalmente

consumido (IMAO *et al.*, 2017). Além dos precursores de carbono, o NADPH é necessário como poder redutor para a biossíntese. No geral, 16.400  $\mu\text{mol}$  de NADPH são consumidos para formar 1 g de biomassa. Essa quantidade deve ser gerada pelas enzimas fornecedoras de NADPH, glicose 6-fosfato desidrogenase (IKEDA, Masato; TAKENO, 2013) 6-fosfogluconato desidrogenase (LEE *et al.*, 2016) isocitrato desidrogenase (JIANG *et al.*, 2020) e enzima málica (WOLF *et al.*, 2021) (Figura. 7).

Além disso, reações e vias para produtos secretados devem ser consideradas. O mais importante, ao estudar superprodutores, é a via biossintética para o produto alvo. Como exemplo, as vias biossintéticas de L-lisina e L-glutamato começam a partir de oxaloacetato e 2-oxoglutarato, respectivamente, dois intermediários da rede central de carbono e, adicionalmente, demandam NADPH (4 NADPH por L-lisina e 1 NADPH por L- glutamato). Além disso, *C. glutamicum* pode secretar partes menores de subprodutos, como trealose, acetato, lactato, succinato, piruvato, L-alanina, L-glutamato e L-glicina (GRAF *et al.*, 2019; IKEDA, Masato *et al.*, 2006). O espectro do subproduto observado determina qual das vias correspondentes deve ser levada em consideração.

Desde o ano 2000, dados genômicos e outros “ômicos” se acumularam para *C. glutamicum*, modificando profundamente os métodos de desenvolvimento de cepas e fornecendo uma compreensão global da fisiologia, redes regulatórias e funções desconhecidas deste microrganismo, bem como os mecanismos subjacentes à hiperprodução (LEE *et al.*, 2016; NIEBISCH *et al.*, 2006). Como resultado, os alvos da engenharia metabólica se expandiram além das principais vias biossintéticas, levando a aminoácidos de interesse em todo o sistema celular, incluindo sistemas de regeneração de cofatores, sistemas de captação e exportação, metabolismo energético, regulação global e respostas ao estresse. A engenharia metabólica sistemática levou repetidamente a melhorias de rendimento bem-sucedidas para a produção de aminoácidos por *C. glutamicum* (BECKER, J. *et al.*, 2018; IKEDA, Masato *et al.*, 2006; KEILHAUER; EGGELING; SAHM, 1993). Além disso, o espectro de produtos de *C. glutamicum* também foi expandido com isso, a engenharia metabólica e indução de superprodução por fatores externos são aplicados à produção de aminoácidos que anteriormente não podiam ser produzidos de forma eficaz a partir da glicose, como serina, metionina e cisteína.

Desde a descoberta de *C. glutamicum* como produtor do glutamato monossódico aromatizante de alimentos, a produção comercial de glutamato tem sido conduzida usando

exclusivamente este microrganismo. Supõe-se que concentração de glutamato industrial exceda 150 g/L (SANCHEZ *et al.*, 2018). A demanda global por glutamato monossódico totalizou mais de três milhões de toneladas em 2016 (LI, H. *et al.*, 2022; SANCHEZ *et al.*, 2018) deve ultrapassar quatro milhões de toneladas até 2023 (Global market insights 2016). A produção de glutamato por *C. glutamicum* é induzida por limitação de biotina ou por tratamento com certos surfactantes de éster de ácido graxo ou com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos como a penicilina. Embora o tratamento de indução seja a principal tecnologia envolvida nos processos industriais de produção de glutamato, a base molecular da indução da secreção de glutamato era desconhecida há muito tempo.

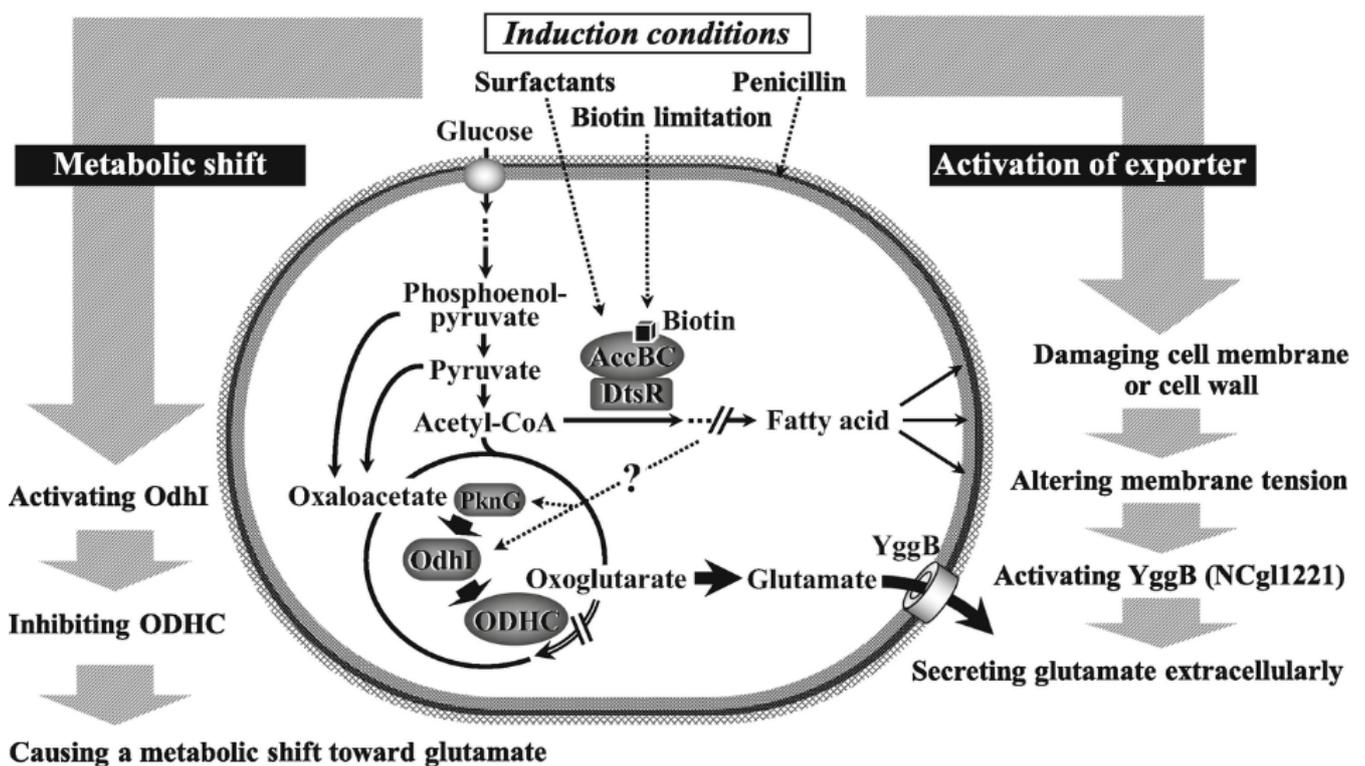
Nos últimos anos, no entanto, uma visão valiosa sobre o mecanismo de secreção foi obtida com a identificação do produto do gene NCgl1221 como um exportador de glutamato (NAKAMURA *et al.*, 2007). Um achado intrigante é que apenas uma mutação pontual específica no gene NCgl1221 resultou na secreção de glutamato sem nenhum tratamento de indução. Também foi demonstrado que a amplificação do gene NCgl1221 de tipo selvagem aumenta a secreção de glutamato enquanto sua interrupção abole substancialmente a secreção acompanhada por um aumento no pool de glutamato intracelular sob as condições de indução mencionadas acima. O gene em questão codifica a proteína YggB, que foi originalmente descrita como um canal mecanossensível putativo (NOTTEBROCK *et al.*, 2003). Estudos eletrofisiológicos posteriores usando uma cepa de *E. coli* ou *Bacillus subtilis* desprovida de canais mecanossensíveis indicaram que o produto do gene NCgl1221 realmente possui a atividade de um canal mecanossensível (HASEGAWA *et al.*, 2008).

Também foi demonstrado que a excreção de glutamato através do canal foi mediada por difusão passiva (KATAOKA *et al.*, 2006), enquanto a secreção de glutamato mediada por carreador em *C. glutamicum* mostrou ser dependente de energia (NAKAYAMA, 2021). Com base nessa possível função como canal mecanossensível, o seguinte mecanismo foi proposto: as condições de indução, alteram a tensão da membrana por inibição da síntese de lipídios ou peptidoglicanos.

A produção de glutamato, especificamente, requer dois processos principais: 1) uma alteração do fluxo metabólico pela inibição do complexo 2-oxoglutarato desidrogenase (ODHC); 2) a abertura de canais mecanossensíveis (IKEDA, Masato; TAKENO, 2013). A mudança na síntese de glutamato pela inibição do complexo 2-oxoglutarato desidrogenase (ODHC) foi estudada exclusivamente no passado, e foi claramente demonstrado que ODHC é

inibido sob condições produtoras de glutamato para alterar o fluxo metabólico em direção à síntese (KATAOKA *et al.*, 2006).

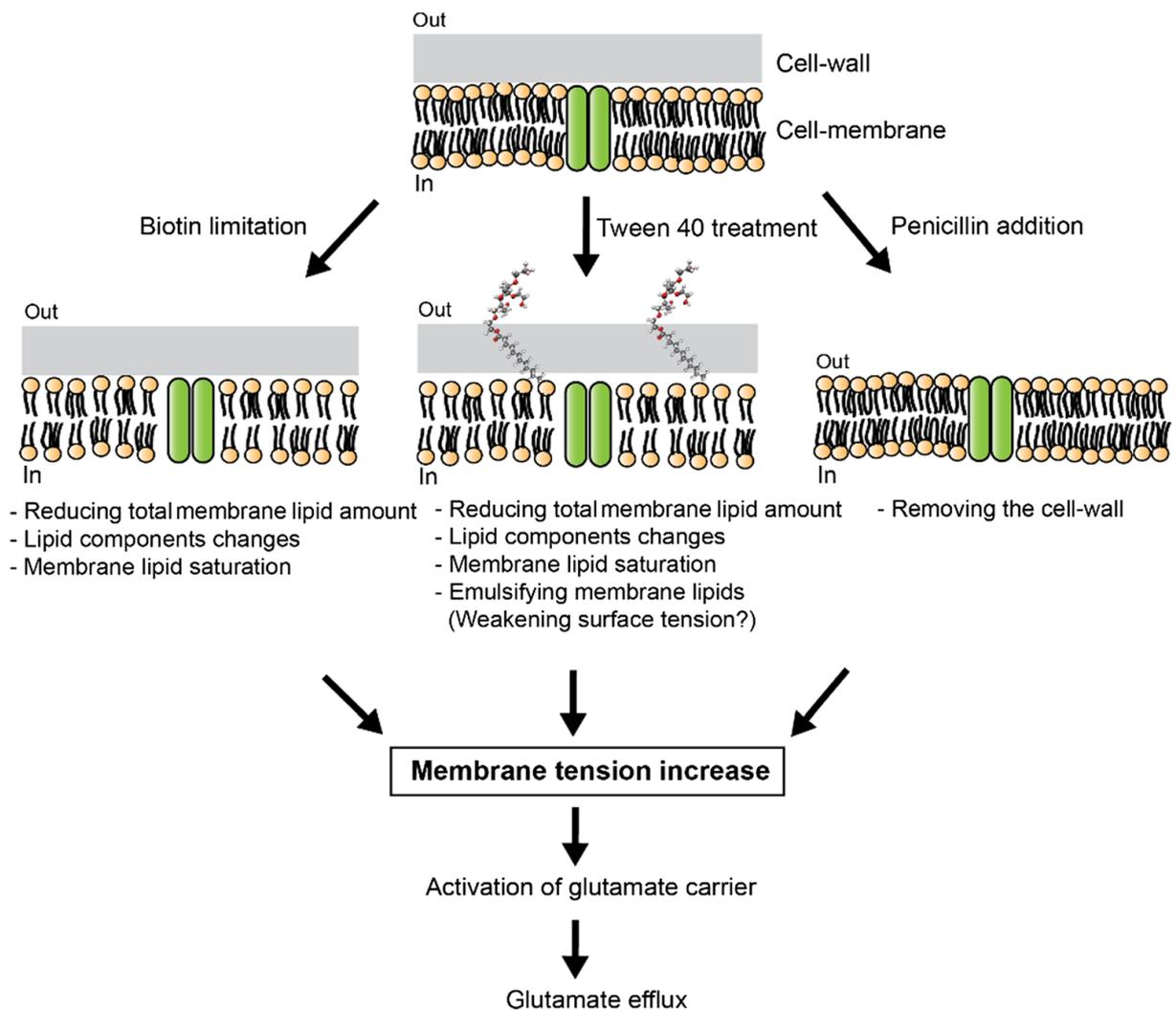
Por outro lado, o mecanismo de secreção de glutamato permaneceu indefinido até que o principal exportador de glutamato em *C. glutamicum* fosse identificado. Isso ocorre porque todos os tratamentos que desencadeiam a secreção de glutamato danificam a estrutura do envelope celular bacteriano. Assim, inicialmente pensou-se que o glutamato simplesmente vazava das células como consequência de membranas danificadas. No entanto, um carreador de glutamato específico foi identificado, o que finalmente encontrou suporte através da descoberta de MscCG (originalmente denominado NCgl1221). Este canal mecanossensível semelhante ao MscS funciona como um grande exportador de glutamato (NAKAMURA *et al.*, 2007). Estudos recentes forneceram mais evidências para o efluxo de glutamato ocorrendo exclusivamente devido à abertura do MscCG (BECKER, M. *et al.*, 2013) como ilustra a figura 8.



**Figura 8. Condições das três possíveis induções para superprodução de glutamato.** Influência sob OdhI, ODHC, principalmente, além da ilustração do canal mecanossensível NCgl1221 para o efluxo de glutamato (IKEDA, 2020).

Os três principais tratamentos específicos que desencadeiam o efluxo de glutamato em *C. glutamicum* são: limitação da biotina, surfactantes de ésteres de ácidos graxos (Tween 40) e antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicilina) que induzem a secreção de glutamato. (NAKAYAMA *et al.*, 2018). A limitação da biotina diminui a quantidade total de lipídios e causa uma mudança no componente lipídico e saturação lipídica. Os surfactantes de ésteres de ácidos graxos, como Tween 40, também são conhecidos por afetar a síntese de ácidos graxos em *C. glutamicum* e a emulsificação dos lipídios da membrana pode alterar a tensão superficial na membrana. Um fato interessante é que apenas Tween 40 e 60, que possuem monopalmitato e monoestearato como tipo de ácido graxo, respectivamente, desencadeiam a secreção de glutamato em *C. glutamicum*, enquanto Tween 20 e 80 não (NAKAYAMA *et al.*, 2018).

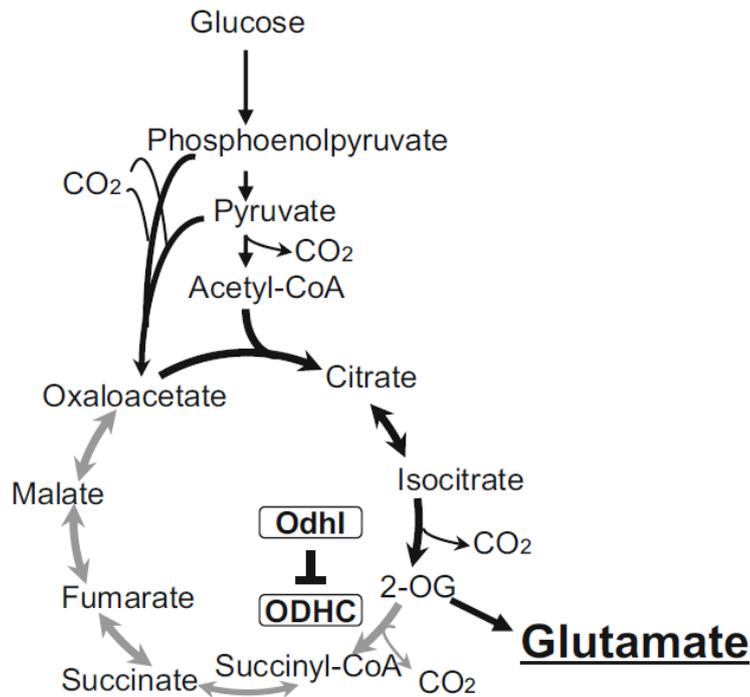
O tratamento com penicilina inibe a síntese da parede celular. Ao contrário de outras bactérias Gram-positivas, *C. glutamicum* possui uma parede celular do tipo micobactéria. Sua estrutura consiste principalmente em três componentes: uma camada de peptidoglicano, uma camada de arabinogalactana e uma camada de ácidos micólicos. A camada de ácido micólico é considerada a barreira de permeabilidade mais externa a solutos e drogas antibacterianas. Esses tratamentos causam um aumento na tensão da membrana, que ativa carreadores específicos para efluxo de glutamato na membrana de *C. glutamicum* (NAKAYAMA *et al.*, 2018) como pode ser observado na figura 9.



**Figura 9. Três principais processos para superprodução de glutamato.** 1) Limitação de biotina em que há uma redução na quantidade total de lipídeos da membrana, aumentando o efluxo de glutamato. 2) Utilização de Tween 40 que altera o fluxo metabólico. 3) Adição de penicilina que remove a parede celular bacteriana, fazendo com que aumente a tensão da membrana também. Todos os três processos ativam carreadores de glutamato fazendo com que haja seu efluxo (SHINFUKU et al., 2009).

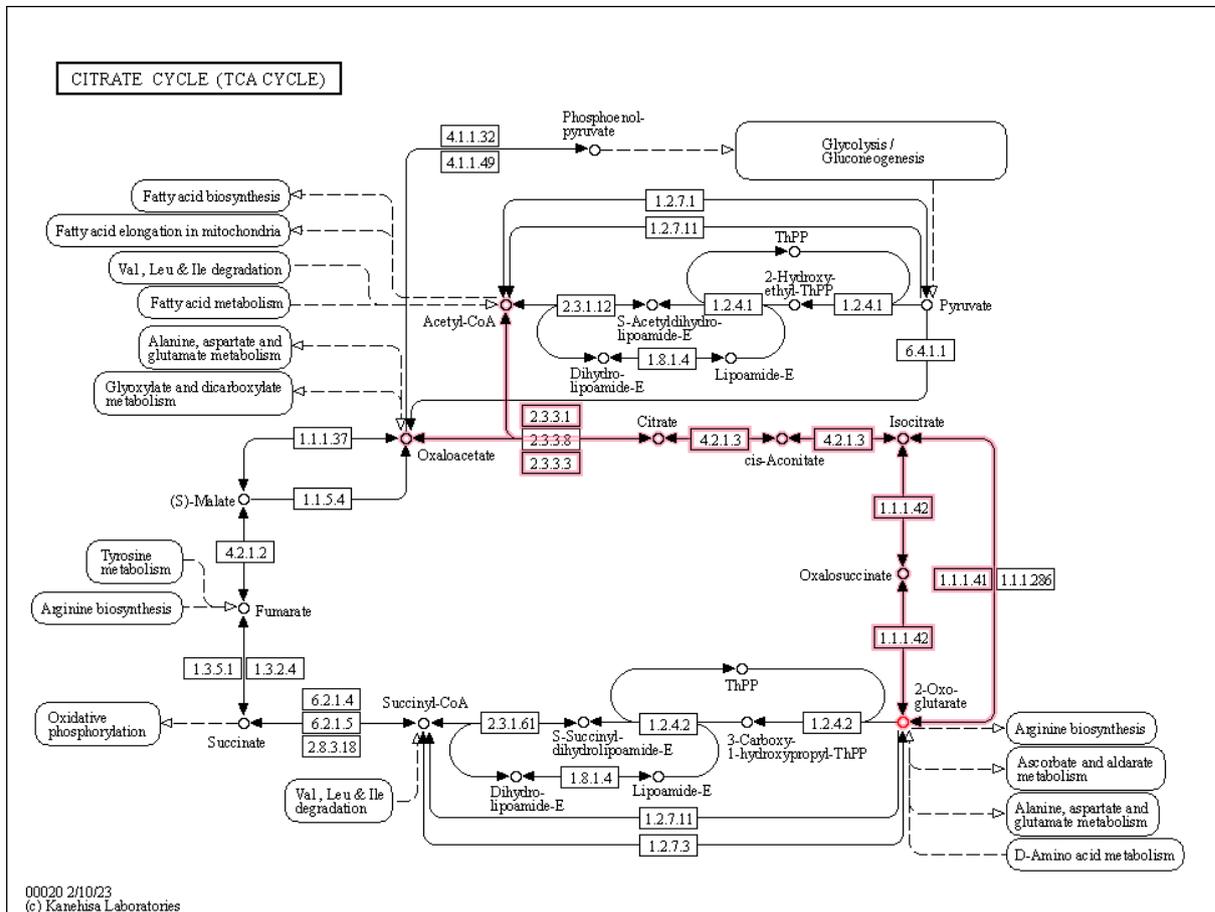
A atividade do complexo 2-oxoglutarato desidrogenase (ODHC) supostamente diminui durante a produção de L-glutamato em resposta à limitação de biotina, surfactantes de éster de ácido graxo e penicilina (SHINFUKU *et al.*, 2009). Como o ODHC está localizado no ponto de divergência entre o ciclo do TCA e a biossíntese de L-glutamato (Figura 10), uma diminuição na atividade do ODHC muda o fluxo metabólico do ciclo do TCA para a síntese de

L-glutamato (Figura 11) (HIRASAWA; SHIMIZU, 2016). ODHC é geralmente composto por três enzimas: 2-oxoglutarato desidrogenase (E1o), di-hidrolipoamida S succiniltransferase (E2o) e di-hidrolipoamida desidrogenase (E3). A interrupção de *odhA* (NCg11084/cg1280), que codifica a subunidade E1o, resulta na secreção de L-glutamato sem indução (ASAKURA *et al.*, 2007).



**Figura 10.** Via biossintética do L-glutamato em *C. glutamicum*. O L-glutamato é sintetizado a partir do 2-oxoglutarato. O complexo 2-oxoglutarato desidrogenase (ODHC) é uma enzima chave para a síntese de L-glutamato. OdhI é uma proteína inibitória para ODHC (MIZUNO *et al.*, 2016).

Adição do tween 40 causa aumento da abundância relativa de algumas enzimas das vias glicolíticas e na inibição de parte do ciclo do ácido cítrico (MIZUNO *et al.*, 2016).



**Figura 11. Visualização da mudança do fluxo metabólico do ciclo do TCA para a síntese de L-glutamato.** Em destaque de vermelho mostra a mudança de fluxo de metabólico que pode acontecer com a indução para produção de glutamato, em que segue a via do citrato, isocitrato, 2-oxoglutarato e a produção de glutamato (SHINFUKU et al., 2009).

Além disso, o mais importante, ao estudar superprodutores, é a via biossintética para o produto alvo. Como exemplo, as vias biossintéticas de L-lisina e L-glutamato começam a partir de oxaloacetato e 2-oxoglutarato, respectivamente, dois intermediários da rede central de carbono e, adicionalmente, demandam NADPH (4 NADPH por L-lisina e 1 NADPH por L-glutamato). *C. glutamicum* pode secretar também partes menores de subprodutos, como trealose, acetato, lactato, succinato, piruvato, L-alanina e L-glicina (BECKER, M. et al., 2013). O espectro do subproduto observado determina qual das vias correspondentes deve ser levada em consideração. Por isso, conhecer o fluxo metabólico que está sendo seguido durante a produção de glutamato, por exemplo, é importante para estabelecer quais são as enzimas e

proteínas diretamente relacionadas ao processo.

#### 1.4. Secreção de proteínas *C. glutamicum*

Secreção de proteínas diretamente no meio de cultura tem várias vantagens sobre um sistema citoplasmático. Não há necessidade de ruptura celular, e a purificação a jusante de uma proteína secretada é mais fácil do que das proteínas citoplasmáticas porque há menos proteínas no meio de cultura em comparação com as do citoplasma (NGUYEN *et al.*, 2015). A falta de atividade proteolítica extracelular detectável e útil para manter a estabilidade das proteínas secretadas em *C. glutamicum* (YUKAWA *et al.*, 2007) que é livre de endotoxinas e é uma cepa geralmente reconhecida como segura (GRAS) (MELBY *et al.*, 2021). Nguyen *et al.*, (2015) demonstraram que menos proteínas endógenas foram secretadas na cultura por *C. glutamicum* em comparação com outros sistemas hospedeiros, embora mais de 140 proteínas tivessem massas moleculares que variaram de 10 a 50 kDa no sobrenadante da cultura (KIM *et al.*, 2011). Devido a essas características, o processo downstream de purificação de proteínas-alvo é simplificado usando *C. glutamicum* como hospedeiro de expressão em comparação com outros hospedeiros (LIU *et al.*, 2017; RAUL *et al.*, 2019; ZHANG, Q. *et al.*, 2018), isso porque, até onde se sabe, poucas proteínas são secretadas pela *C. glutamicum*.

Mesmo assim, *C. glutamicum* é um hospedeiro potencial para a produção secretora de proteínas importantes, como enzimas industriais e proteínas farmacêuticas. Uma variedade de proteínas foi expressa com sucesso em *C. glutamicum*, como transglutaminase, hEGF, amilase, GFP, glutamato descarboxilase, scFv, nitrila hidratase e Fab. CORYNEX (sistema de expressão de *Corynebacterium*) é um novo sistema de expressão de proteína/peptídeo que usa *C. glutamicum* como hospedeiro (TSUGE; MATSUZAWA, 2021).

No entanto, os principais problemas com o sistema de expressão acima são a falta de exemplos de aplicação dessas proteínas secretadas e a baixa quantidade de expressão encontrada. Por isso, há uma grande demanda por estudos sobre a secreção de proteínas em *C. glutamicum* para que ela possa cumprir seu potencial (LI, H. *et al.*, 2022) porque existe uma demanda muito alta conhecida de glutamato, por exemplo, mundialmente.

O transporte de proteínas através da membrana é um processo complexo que inclui a etapas: as proteínas são transportadas para a membrana através da translocase, então os

peptídeos sinal são clivados por peptidases sinal tipo I, e, então as proteínas são liberadas da membrana (FREUDL, 2018).

Existem duas vias principais de translocação em *C. glutamicum*, a via Sec e a via Tat. A via Sec transporta proteínas enoveladas, enquanto a via Tat transporta proteínas desenoveladas. Os peptídeos de sinal das proteínas dependentes de Sec ou dependentes de Tat têm características semelhantes e especificidade própria (LIU *et al.*, 2017).

Antes que as proteínas processadas sejam liberadas da membrana, elas devem ser enoveladas em sua conformação nativa e o peptídeo sinal deve ser clivado, a proteína é transportada pelo canal. Em seguida, as proteínas maduras passam pela parede celular e são finalmente liberadas no meio de cultura. As proteínas podem ser encontradas na membrana, sobrenadante e frações solúveis em extratos celulares (LIU *et al.*, 2017).

## 1.5. Cultivo celular

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, fosfato, enxofre, vitaminas, sais minerais e elementos traços (BENDT *et al.*, 2003). Curiosamente, este meio, também contém grandes quantidades de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), que se mostrou ser benéfico para o crescimento da cepa.

Em 1989 foi descoberto que na ausência de compostos quelantes de ferro, como CaCO<sub>3</sub>, 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 (KALINOWSKI, J., 2005). Posteriormente o meio CGVIII foi substancialmente modificado adicionando o quelante de ferro PCA e trocando o CaCO<sub>3</sub> por quantidades muito baixas de fontes alternativas de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), 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 (KEILHAUER; EGGELING; SAHM, 1993). Desde que CGXII foi formulado, ele se tornou o meio padrão para Engenharia Metabólica e Biologia de Sistemas com *C. glutamicum* até agora.

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 (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Análises bioquímicas demonstraram que o excesso de biotina reduz a permeabilidade celular dos aminoácidos, nesses casos foi observado (SHIMIZU *et al.*, 2003) 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*, principalmente através das construções por vetores de clonagem (MIWA *et al.*, 1985). Devido à grande importância industrial deste microrganismo, existem extensas pesquisas focadas no melhoramento de cepas utilizando técnicas como: mutagênese aleatória; técnicas de DNA recombinante ou por meio dos transposons, o que permite a criação de grandes bibliotecas com cepas recombinantes para maior rendimento na secreção de aminoácidos (MUSTAFAI *et al.*, 2014).

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.

## **1.6. Proteômica**

Devido à sua importância para a biotecnologia industrial, *C. glutamicum* tem sido amplamente estudada, e sua sequência genômica está disponível juntamente com seus dados de transcriptoma, metaboloma e fluxoma (KRÖMER *et al.*, 2004). A primeira análise proteômica de *C. glutamicum* foi realizada através da criação de um mapa de referência

baseado em eletroforese em gel bidimensional (VOGES *et al.*, 2015).

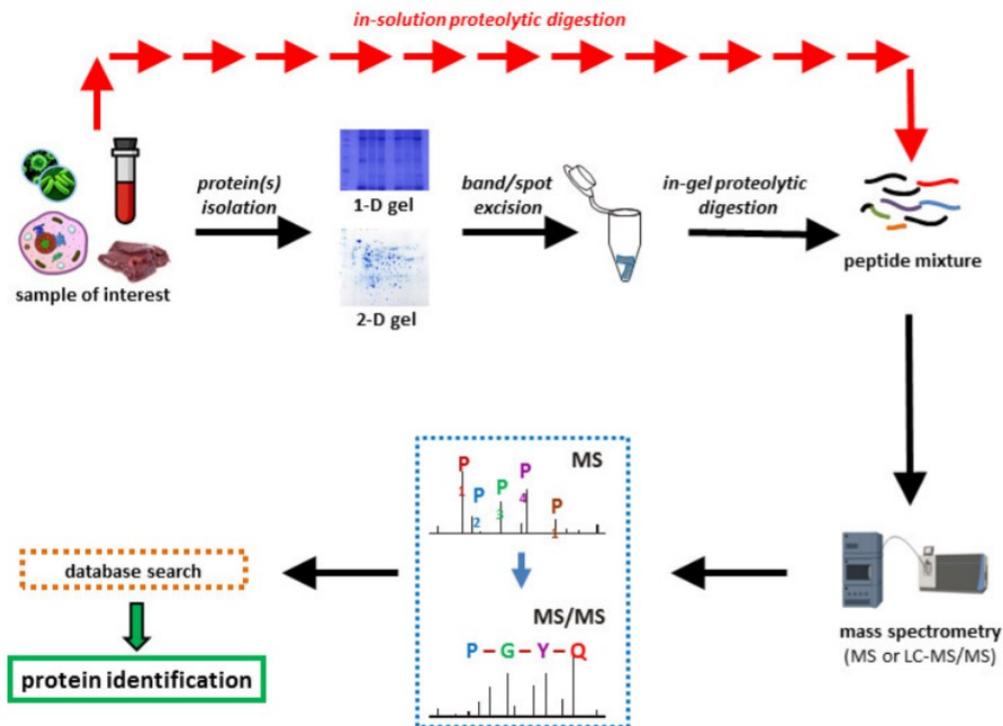
Nos últimos anos, abordagens sem gel têm sido usadas para estudar o impacto de fatores como estresse externo causado pela mudança de pH e pressão osmótica no proteoma de *C. glutamicum*. Além disso, os efeitos de diferentes fontes de carbono e *turnover* de proteínas foram investigados (SHINFUKU *et al.*, 2009). Essas investigações estabeleceram uma ampla base de conhecimento, tornando *C. glutamicum* um organismo modelo para sistema biológico. As primeiras redes metabólicas em todo o genoma estão atualmente disponíveis, permitindo assim a elucidação das capacidades metabólicas e limitações deste organismo para aplicações específicas (KJELDSEN; NIELSEN, 2009). Com isso, a obtenção de um entendimento mais profundo em nível de sistema que requer a integração de redes metabólicas com redes de regulação do genoma e o proteoma de interconexão é necessária para *C. glutamicum*. Nos últimos anos, vários métodos para a quantificação absoluta de proteínas por espectrometria de massa têm sido apresentados (VOGES *et al.*, 2015).

A proteômica é o campo de estudo que inclui a análise de proteínas. As proteínas podem ser investigadas por sua abundância, variedade de proteoformas devido às modificações pós-traducionais (PTMs) e suas interações proteína-proteína estáveis ou transitórias (DUPREE *et al.*, 2020). A importância de estudar proteínas diretamente é clara pelo fato delas serem as biomoléculas efetoras primárias das células, além disso, o simples nível de mRNAs presente em uma amostra não pode ser correlacionado diretamente a quantidade de proteínas, já que o processo de tradução pode sofrer algum tipo de regulação e a proteína pode, já de início, sofrer regulação proteolítica. (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014).

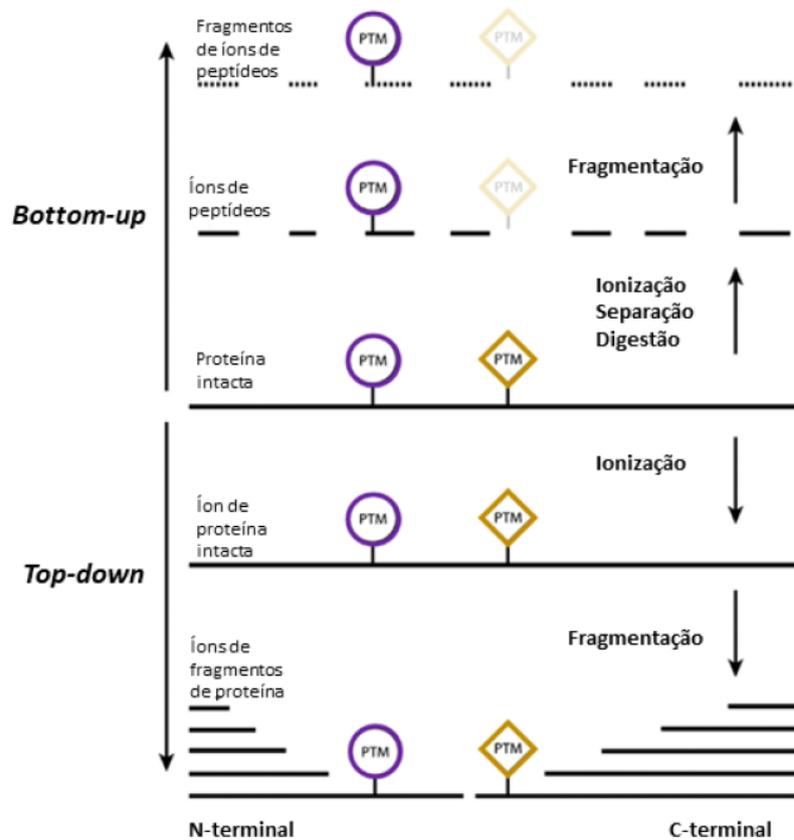
A proteômica baseada em espectrometria de massa (MS) tem levado à possibilidade de caracterizar e quantificar o perfil proteico de espécimes biológicos, bem como à possibilidade de descobrir suas complexas interações envolvidas em várias patologias específicas (DUPREE *et al.*, 2020).

Atualmente existem duas principais abordagens para análises proteômicas por MS, uma chamada de *bottom-up* e outra de *top-down*. Um fluxo de trabalho proteômico de *bottom-up* típico, como ilustra a figura 12, consiste em várias etapas principais: (i) isolamento da mistura de proteínas da amostra biológica estudada, seguido por (ii) quantificação das concentrações de proteínas isoladas, então (iii) fracionamento de proteínas por métodos de eletroforese em gel ou cromatografia líquida. Após o fracionamento, (iv) as proteínas são clivadas

proteoliticamente por enzimas (geralmente tripsina); seguido por (v) uma medição espectrométrica de massa dos peptídeos resultantes e (vi) uma pesquisa de banco de dados para identificação de proteínas (DUPREE *et al.*, 2020). Ao analisar a proteína intacta, a detecção anterior a fragmentação sempre vai informar a massa da proteína com todas as suas modificações presentes no momento, como acontece na técnica *bottom-up*. Já para a abordagem *top-down*, as proteínas serão ionizadas intactas e sofrerão fragmentação em espectrômetro de massa (CHAIT, 2006) e essa abordagem é favorecida quando se trata da análise de PTMs (figura 13). A abordagem *bottom-up* está mais bem estabelecida atualmente e possui maior variedade de recursos quando comparada à *top-down*, isso se deve à limitações técnicas de espectrômetros para analisarem moléculas grandes, como proteínas intactas, no início do desenvolvimento de proteômica por espectrometria de massa (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014).



**Figura 12. Fluxograma de trabalho de um experimento utilizando bottom-up.** A abordagem *bottom-up* segue algumas etapas principais como isolamento da proteína da amostra de interesse, quantificação destas, fracionamento das proteínas para análise em gel, digestão e análise dos peptídeos no espectrômetro de massas juntamente com uma pesquisa no banco de dados (DUPREE *et al.*, 2020)



**Figura 13. Ilustração das abordagens bottom-up e top-down.** Na abordagem bottom-up pode ocorrer a perda de informação sobre modificações pós traducionais (PTMs) e na top-down existe a permanência desta. Adaptado de KELLEHER et al., 2014.

Atualmente, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) é uma técnica analítica comum e indispensável para investigação proteômica. Este acoplamento iniciou o desenvolvimento de novos métodos de ionização e levou a uma ampla gama de interfaces destinadas a separar várias misturas de complexos biológicos (WOLTERS; WASHBURN; YATES, 2001).

Com o acoplamento foi possível a realização de algumas análises, como por exemplo, as análises de acetiloma e succiniloma de *C. glutamicum* produtora de glutamato sugeriram que a acetilação e a succinilação de proteínas estão envolvidas na produção de glutamato por meio do controle pós-traducional de enzimas-chave, como fosfoenolpiruvato carboxilase (PPC) e ODHC (MIZUNO *et al.*, 2016). Foi demonstrado que a acetilação do PPC na lisina 653 causou diminuição da atividade enzimática, resultando na redução da produção de glutamato (SHIRAI *et al.*, 2007). Pelo contrário, a desacetilação do resíduo de lisina foi

sugerida para melhorar a produção de glutamato por meio da ativação do PPC porque o aumento da atividade do PPC durante a produção de glutamato foi cancelado pelo defeito das desacetilases (SHIRAI *et al.*, 2007). Todas essas descobertas foram possíveis graças à espectrometria de massas.

A análise transcriptômica do genoma completo ajuda a entender melhor os mecanismos de regulação da transcrição de *C. glutamicum*. Essa abordagem começou a ser utilizada para aumentar a tolerância a ambientes extremos, melhorar o crescimento celular e aumentar a síntese do produto alvo em *C. glutamicum* (MA, Q. *et al.*, 2020). Além disso, por meio do método proteômico, pode-se analisar a abundância de expressão de proteínas. Já uma análise metabólica abrangente pode ser usada ao mesmo tempo para revelar quaisquer alterações nas quantidades dos compostos que afetam as vias metabólicas relevantes para a síntese de glutamato, por exemplo, como produtos gênicos envolvidos no metabolismo central do carbono e no metabolismo de aminoácidos (MA, Y. *et al.*, 2019). No geral, uma combinação de análises transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas contribui para conhecer as características metabólicas celulares com base nas mudanças na transcrição gênica, expressão proteica e níveis de metabólitos intracelulares.

A solubilidade da proteína representa um grande desafio na proteômica baseada em MS de *top-down*, especialmente para proteínas de membrana e proteínas da matriz extracelular (ECM) que são difíceis de extrair e solubilizar de tecidos e células, mas desempenham papéis biológicos significativos. Apesar do sucesso de vários estudos importantes de proteômica *bottom-up* de proteínas de membrana, as preparações demoradas e trabalhos intensivos antes da análise de MS deixam espaço significativo para melhorias tecnológicas nessa área. Além disso, os primeiros trabalhos geralmente se concentravam em direcionar uma proteína específica de interesse ou o subproteoma da membrana mitocondrial. Os surfactantes (também conhecidos como detergentes) são normalmente usados em tampões de extração de proteínas para solubilizar efetivamente as proteínas das células e tecidos (NAKAYAMA *et al.*, 2018a). No entanto, surfactantes convencionais que são capazes de solubilizar e desnaturar proteínas com alta eficiência, como dodecil sulfato de sódio (SDS), não são compatíveis com a análise de MS a jusante devido à supressão de sinal de proteínas e, portanto, requerem limpeza extensa que pode resultar em perda de proteína e irreprodutibilidade. Embora surfactantes não iônicos, como dodecil  $\beta$ -D-maltosídeo (DDM) e octil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo (OG), sejam compatíveis com MS quando usados em concentrações mais baixas, eles são surfactantes relativamente

suaves com capacidade de solubilização limitada.

Os surfactantes cliváveis por ácido foram desenvolvidos anteriormente para proteômica *bottom-up* para permitir a solubilização de proteínas e melhorar eficiência da digestão em gel ou em solução. No entanto, nenhum desses surfactantes é diretamente compatível com a proteômica top-down baseada em MS (VELLAICHAMY *et al.*, 2010).

Apesar das vantagens da metodologia *bottom-up*, a análise de proteínas intactas vem se tornando cada vez mais robusta com os avanços tecnológicos, aumento de acurácia e resolução dos espectrômetros de massa e melhorias em técnicas que antecedem a etapa de espectrometria de massa, como o GELFrEE (Gel-eluted liquid fraction entrapment electrophoresis), o sSEC (serial Size Exclusion Chromatography) e o CZE (Capillary Zone Electrophoresis). Esses métodos são tipos de fracionamento, que causam a divisão de amostras iniciais em frações menos complexas. Esses procedimentos são importantes para a análise de proteínas por MS, justamente pela redução da complexidade das amostras, o que melhora a proporção de sinal/ruído e a cobertura de identificação e quantificação, principalmente de peptídeos e proteínas em pequenas quantidades na amostra (MOSTOVENKO *et al.*, 2013).

O GELFrEE é uma técnica utilizada para fracionar amostras complexas de proteínas baseada nos tamanhos dessas moléculas. Esse fracionamento pode ser feito de maneira desnaturante, utilizando um detergente para carregar e desnaturar as proteínas (geralmente SDS), quanto não desnaturante, empregando moléculas que não deturpam a conformação das proteínas para carregá-las, como Coomassie. Essa metodologia é baseada na aplicação de corrente elétrica em polos de cargas positiva e negativa, com um gel de poliacrilamida tubular entre eles. A carga das proteínas é uniformizada pela adição de alguma molécula com carga negativa, seja ela SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ou Coomassie blue-G e aplicadas no topo do gel de poliacrilamida. Ao aplicar a corrente, as proteínas migram pelo gel de acordo com o seu tamanho e são coletadas ao final do tubo em uma câmara de coleta (SKINNER *et al.*, 2016).

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* com o fim de melhorar os processos atualmente estabelecidos assim como criar novos (ROESSNER *et al.*, 2016).

## 2. JUSTIFICATIVAS

Diante a importância da bactéria *Corynebacterium glutamicum* na biotecnologia branca (processos industriais), visto o vasto número de estudos relacionadas a esta nos últimos anos (BECKER, J.; WITTMANN, 2012) e o número de patentes relacionados a esta bactéria (LEE *et al.*, 2016), ainda existe uma necessidade de uma melhor compreensão sobre os mecanismos de funcionamento das vias metabólicas, pois mesmo com tantas publicações e estudos, a caracterização de seu proteoma continua incompleta (LUBITZ; WENDISCH, 2016).

A fim de melhorar a eficiência da produção de aminoácidos por *C. glutamicum*, é imprescindível o entendimento e regulação das vias metabólicas que levam a esses produtos industrialmente importantes. Assim, faz-se necessário a identificação de proteínas e complexos multiproteicos envolvidos nas vias de síntese e consequente caracterização de seu proteoma.

Além disso, sabe-se que o aumento da produção de glutamato por *C. glutamicum* pode ser estimulado por diversos mecanismos, dentre eles a depleção de biotina, que é necessária para o crescimento celular; adição de surfactantes de ésteres de ácidos graxos no meio de cultura (Tween 40); e adição de antibióticos como a penicilina (IKEDA, 2013). Dessa maneira, a comparação do proteoma nativo intracelular sem estimulante e do proteoma com a adição de um estimulante torna-se interessante para determinar qualitativamente e quantitativamente o grau de impacto das mudanças nas atividades enzimáticas das vias de interesse e, assim, melhorar o entendimento das vias metabólicas.

Além disso, até o momento presente não tem estudos para a análise extracelular do cultivo bacteriano com ou sem estímulo, gerando mais um pontapé de estudo para melhor entendimento do proteoma da *C. glutamicum* e quais as mudanças visuais e analíticas podem ser observadas.

Essa pesquisa visa utilizar a proteômica *bottom-up* para caracterizar proteoformas e complexos proteicos de *C. glutamicum*, principalmente, aminoácidos secretados durante o cultivo. Além de buscar uma comparação entre proteínas intracelulares e extracelulares, para o melhor entendimento das vias metabólicas voltadas para produção de aminoácidos de interesse industrial, como glutamato.

### 3. OBJETIVOS GERAIS

Caracterização do proteoma da bactéria *C. glutamicum* e identificação de proteínas e complexos multiproteicos (tanto de forma nativa quanto extracelular ) reguladores da via de biossíntese de aminoácidos

#### 3.1. Objetivos específicos

- Caracterização de proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos presentes no secretoma e proteoma intracelular e extracelular de *C. glutamicum* em meio CGXII.
- Identificação das proteínas presentes em *C. glutamicum* sob condições de estímulo por tween 40 na produção de aminoácidos em análise *bottom-up*.
- Identificação de proteínas reguladoras na produção de aminoácidos em *C. glutamicum*, visando a produção de glutamato.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Microrganismo e meio de cultivo

A bactéria *Corynebacterium glutamicum* (cepa ATCC 13032) foi adquirida a partir da Coleção de culturas Tropicais da Fundação André Tosello ([http://fat.org.br/colec\\_culturas/](http://fat.org.br/colec_culturas/), Campinas, SP). Foi realizado um cultivo da *Corynebacterium glutamicum* em placa de petri, com meio TSA (figura 14), em que posteriormente foi escolhida uma única colônia isolada e inoculada em meio TSB.



**Figura 14. Cultivo da *C. glutamicum* em placa de petri com meio TSA.** Mostra-se a placa depois de 24h de cultivo, em que se pode observar as colônias isoladas, das quais uma foi inoculada no pré-inóculo e dado sequência ao cultivo nos inóculos com meio CGXII.

Os meios de cultura utilizados foram o meio TSB (Meio a base de trépticos de soja), proveniente da empresa MERCK, preparado de acordo com protocolo do fabricante e o meio de cultura CGXII (Tabela 1) utilizado para a análise proteômica e de aminoácidos (KEILHAUER; EGGELING; SAHM, 1993). A solução de sais foi utilizada para lavar as amostras após o pré-inóculo para que pudesse ser inoculada.

**Tabela 1. Composição dos meios de cultura TSB e CGXII.** O meio CGXII para o cultivo das 24h, sendo este o meio próprio desenvolvido para *C. glutamicum* e o meio de cultura TSB foi utilizado para cultivo do pré-inóculo.

<b>Meio TSB, pH=7.3</b>	
Peptona de caseína	17g/L
Peptona de soja	3g/L
Glicose	2,5g/L
Cloreto de sódio	5g/L
Fosfato dipotássico	2,5g/L

<b>Meio CGXII, pH=7.0</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20g/L
Ureia	5g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25g/L
3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)	42g/L
CaCl <sub>2</sub>	10mg/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10mg/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10mg/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1mg/L
CuSO <sub>4</sub>	0,2mg/L
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02mg/L
Biotina	0,005mg/L
Glicose	40g/L
Ácido protocatechuico (PCA)	0,03mg/L

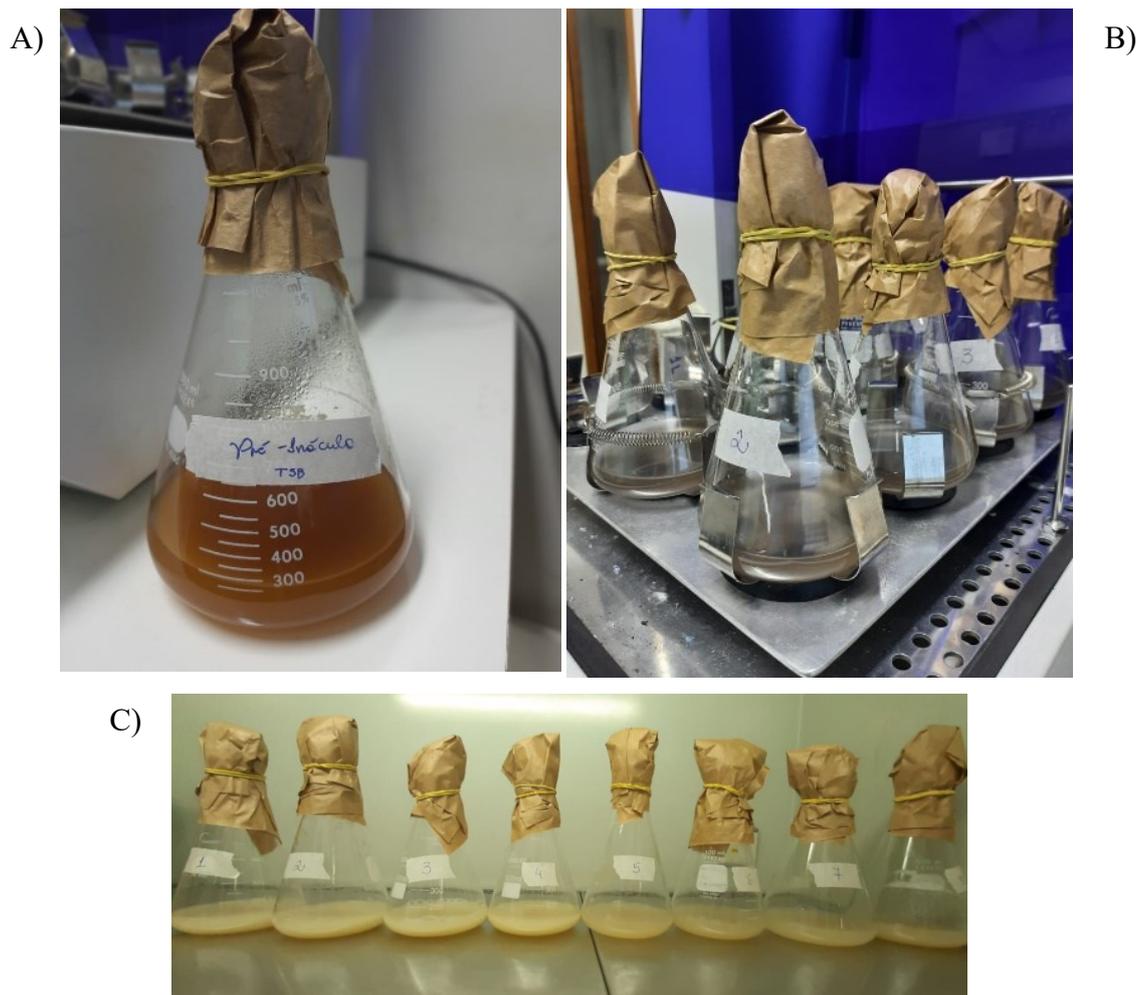
  

<b>Solução de Sais (Vf=900mL)</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20g
Ureia	5g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25g
3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)	42g

## 4.2. Cultivo bacteriano

Para análise intracelular nativa, a bactéria *C. glutamicum* foi pré-inoculada em 300mL de meio TSB durante 18hs sob temperatura de 30°C e agitação de 170 RPM (4 RCF) utilizando shaker de incubação (Tecnal, Brasil). Em seguida, foi medida a densidade óptica do pré-inóculo e calculado o volume necessário para inóculo com OD inicial igual a 1 em seis Erlenmeyers contendo 100mL de meio de cultura mínimo CGXII suplementado com glicose. 30mL do pré-inóculo foram coletados e adicionados a cada Erlenmeyer, que foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 23°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado utilizando-se solução de sais. Após homogeneização, os tubos foram novamente centrifugados nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado foi ressuspensionado no meio CGXII, processo realizado nos 6 Erlenmeyers. A bactéria foi cultivada durante 24h sob temperatura de 30°C e agitação de 170 RPM utilizando shaker de incubação (Tecnal, Brasil). Após 6h de crescimento, foi adicionado ao cultivo 370µL de Tween 40 (Sigma, Alemanha), concentração de 4mg/mL, nos Erlenmeyers IV, V e VI, triplicata biológica com o Tween 40, enquanto os Erlenmeyers I, II e III foram relativos à triplicata do cultivo sem adição de Tween 40. Foi coletado 1mL de cada réplica nos tempos 0h, 6h, 12h, 18h e 24h de cultivo, que foram posteriormente centrifugados e armazenados os sobrenadantes para análise dos aminoácidos.

Para análise extracelular de proteínas, a *C. glutamicum* foi submetida a um cultivo nas mesmas condições descritas anteriormente. O cultivo foi feito em quadruplicata, em que foi medida a densidade óptica do pré-inóculo (figura 15, A) e calculado o volume necessário para inóculo com OD inicial igual a 1 em oito Erlenmeyers contendo 100mL de meio de cultura mínimo CGXII, com isso foram adicionados 26,17mL (figura 15, B) (centrifugado e lavado 4 vezes com solução de sais) do pré-inóculo em cada Erlenmeyer. Após 6h de cultivo, tween 40 foi adicionado nos Erlenmeyers V, VI, VII e VIII. O cultivo teve duração de 24h, sendo coletados 5 mL de cada réplica nos tempos 0h, 6h, 12h, 18h e 24h de cultivo, que foram posteriormente centrifugados e armazenados os sobrenadantes para análise das proteínas secretadas.



**Figura 15. Processo de cultivo da *C. glutamicum* desde o Pré-inóculo ao cultivo em CGXII.** A) Cultivo celular no pré-inóculo com 300mL de meio TSB durante 18h sob agitação de 170RPM a uma temperatura de 30 °C. B) Erlenmeyers com 100mL de meio CGXII em que 30mL do pré-inoculo foram inoculados em cada erlenmeyer. C) Cultivo dos 8 frascos após 24h.

### 4.3. Curva de Crescimento

Para a construção da curva de crescimento da fração intracelular, alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos de incubação de 0h, 6h, 12h, 18h e 24h. As leituras de absorbância foram medidas a 600 nm em espectrofotômetro e foram feitas em triplicata para cada uma das réplicas biológicas nas condições sem Tween 40 (I, II, III) e com Tween 40 (IV, V e VI) para acompanhamento do crescimento. O mesmo se deu para as frações extracelulares, assim as leituras de absorbância foram medidas a 660 nm em espectrofotômetro e foram feitas em triplicatas para cada uma das réplicas biológicas nas condições sem Tween 40 (I, II, III, IV) e com Tween 40 (V, VI, VII e VIII). Foram utilizados os valores referentes às médias de absorbância em cada triplicata biológica para construção do gráfico.

#### 4.4. Análise dos aminoácidos

Os sobrenadantes coletados nos tempos 12h e 18 h foram analisados para quantidade de aminoácidos. O preparo para a análise de aminoácidos passou por duas etapas: precipitação em metanol/clorofórmio/água (WESSEL; FLÜGGE, 1984) e troca catiônica. Brevemente, ao volume de 200 µL de cada réplica biológica foram adicionados 800 µL de metanol, 200 µL de clorofórmio e 600 µL de água, com homogeneização de 30 s em vortex entre cada adição. A solução foi então submetida a centrifugação a 21.000 x g e a fase polar foi coletada para passar por troca catiônica. Para o preparo da coluna de troca catiônica, realizada em resina *strongly acidic dowex 50w x8-200*, foram utilizadas ponteiras T-1000-B (Axygen) fechada com algodão de vidro em sua ponta.

Para ativar a resina foram adicionados 2 volumes de HCl 4M e a suspensão resultante foi aquecida em banho maria a 100°C por 1 h. A resina foi, então, lavada com água até o pH da lavagem se igualar ao da água utilizada. Após as lavagens com água, foram adicionados 2 volumes de NaOH 10% (p/v), em seguida a resina foi aquecida e lavada como descrito anteriormente e armazenada em HCl 2M até ser utilizada. Todos os procedimentos de remoção de solução da resina são feitos após a decantação da mesma em frasco de vidro, subsequentemente o líquido é vertido, evitando a saída da resina. Para realizar a troca catiônica a fase polar coletada da precipitação metanol/água/clorofórmio foi acidificada (pH = 2-3) carregada em 500 µL de coluna com resina ativada e eluída com 2 mL de NH<sub>4</sub>OH 1 M.

A quantificação e determinação dos aminoácidos livres secretados pelas bactérias foi realizada em cromatógrafo de troca catiônica de alta eficiência acoplado a detector amperométrico pulsátil (*High Performance Anion-Exchange with Pulsed Amperometric Detection* – HPAE-PAD) ICS-5000 (Dionex) com coluna cromatográfica AminoPAC PA10 de 2 mm X 250 mm. As amostras eluídas da coluna de troca catiônica foram diluídas em proporção 1:5 em água Milli-Q e aplicadas em triplicatas de 10 µL. O gradiente utilizado foi baseado em três fases móveis (A = H<sub>2</sub>O, B = Acetato e C= NaOH), montado da seguinte forma em uma corrida de 72 minutos, com fluxo constante de 250 µL/min: 24%B por 2 min; 36%B por 9 min; 90%B e 10%C por 6 min; 16% B e 40% C por 2 min; 16% B e 70 % C por 19,1 min; 80% B por 2,1 min; 24% B por 24,8 min.

## **4.5. Análise Proteômica**

### **4.5.1. Precipitação das amostras**

As amostras foram precipitadas a partir da metodologia de metanol clorofórmio, em que 3 mL de cada réplica biológica foram precipitados. Nessa metodologia, adiciona-se 4 vezes o volume inicial de metanol, coloca no vórtex por 30s, adiciona-se 1 volume de clorofórmio, depois mais 30s no vórtex. Após, adiciona-se 3 vezes o volume de água milli Q e mais 30s de vórtex. Centrifugar por 10 minutos a 1400 RPM (241 RCF). Após a centrifugação se observam duas camadas: a fração água/metanol acima e a fração clorofórmio abaixo. As proteínas estão flutuando na interface. Caso não seja possível ver as proteínas, tem menos de 5 µg de amostra.

Removeu-se a fração superior com cuidado para não remover também as proteínas na interface. Após, adicionou-se 3 volumes de metanol e misturou bem com petelecos (não pode usar vórtex), tomando cuidado para não romper o precipitado. Centrifugou por mais 10 minutos a 14000 RPM. Removeu o sobrenadante, deixando cerca de 10 µL de líquido. E o solvente residual evaporou em fluxo laminar por cerca de 20 minutos e depois de seco, as amostras foram ressuspensas em SDS 1% e TRIS 50mM.

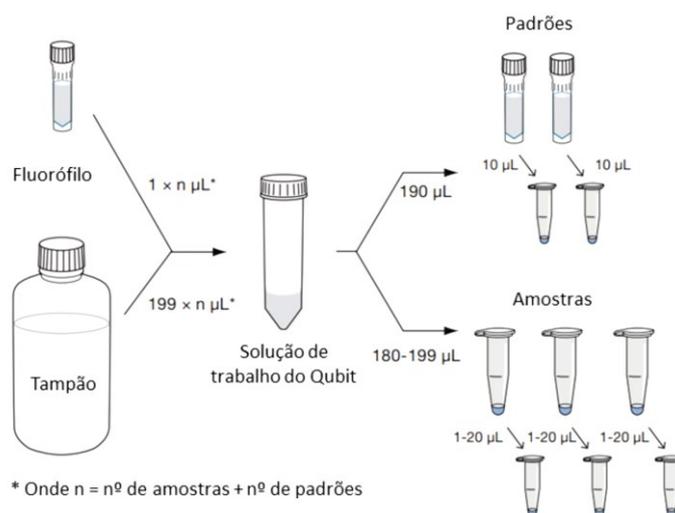
### **4.5.2. Metodologia de lise celular não-desnaturante**

A lise das células de *C. glutamicum* foi realizada 18hs após o inóculo em CGXII, pois é quando está no ápice do crescimento, consequentemente mais bactérias. Foram coletados 5mL do meio cultivado de cada réplica biológica nas duas condições propostas e centrifugados a 10000 RPM (123 RCF), sob temperatura de 30 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com solução de sais, que, após homogeneização foi novamente centrifugado nas mesmas condições. Em seguida, foram adicionados ao pellet 500µL de tampão de lise não-desnaturante (Sacarose 250 mM, Tris-HCl 10 mM, EGTA 0,1 mM suplementado com inibidor de protease) para homogeneização. O procedimento de lise se deu por esferas ou “beads” disruptoras de 0.1mm de diâmetro (Scientific Industries, Inc.). O protocolo foi adaptado de “Scientific Industries Disruptor Beads™” para otimização da lise não-desnaturante. Brevemente, 250µL (1/3 do volume da suspensão de células) de “beads” foram adicionados à solução contendo o homogeneizado de células. Foram realizados intervalos de 1 min com amostra no equipamento (Bead Beater) e 1 min com a suspensão mantida no gelo, em um total de sete repetições nas mesmas condições. Posteriormente, os

microtubos contendo o lisado celular foram centrifugados a 12000 g, 4°C por 20 min. O sobrenadante foi coletado e utilizado na etapa posterior.

### 4.5.3. Quantificação de proteínas

A quantificação das amostras resultantes da lise celular foi realizada a partir da medida de fluorescência pela técnica de Qubit (Invitrogen). Inicialmente, o reagente foi preparado pela junção do tampão e do fluoróforo, ambos vendidos comercialmente pela marca, na proporção de 1:200. Em seguida, alíquotas de 5 µL de amostra diluídas em água milli-Q (1:50) foram adicionadas ao reagente, obtendo-se volume final de 200 µL. As misturas foram incubadas por 15 minutos e analisadas no equipamento Qubit. A concentração final de proteínas foi obtida multiplicando-se o valor da leitura de cada amostra pelo fator de diluição.



**Figura 16. Esquema ilustrativo de quantificação de proteínas por Qubit.** A quantificação das proteínas se dá pela técnica de Qubit, em que a concentração ocorre pela medida de fluorescência. Adaptado de Invitrogen®.

### 4.5.4. Gel Free

A partir da quantificação proteica, 500 µg foram reduzidos e alquilados em tampão de amostra desnaturante (4% SDS, 20% glicerol, 0,05 M DTT, 0,004 % azul de bromofenol, 0,125 M Tris HCl) (DEHART *et al.*, 2017). Em seguida, essas foram fracionadas usando sistema GELFrEE, protótipo em teflon (Figura 17), como descrito anteriormente (TRAN; DOUCETTE, 2008). Brevemente, tubos preenchidos com acrilamida 12% (500 uL de volume) para o gel de separação e 4% para o gel concentrador (300 uL de volume) são acoplados ao

sistema GELFrEE, onde as câmaras são completamente preenchidas com tampão de corrida (0,192 M glicina, 0,025 M Tris e 0,1% SDS). Nesse sistema foi aplicada corrente elétrica constante de 10 mA para a separação e as frações foram coletadas após a saída da frente azul do tampão de amostra da malha do gel (0 min, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 7 min, 9 min, 11 min, 13 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 120 min). Em seguida, as frações foram submetidas a SDS-PAGE para aferimento da massa e a precipitação utilizando metanol/clorofórmio/água para remoção do SDS.



**Figura 17. Foto de estrutura utilizada para realização de GELFrEE.** As câmaras de carga são as próximas aos fios preto e vermelho, a câmara de coleta é indicada pelo número 5 e a frente de corrida é a linha em azul no tubo transparente.

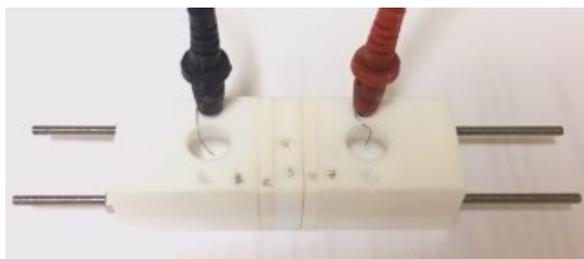
#### **4.5.5. BN-PAGE (Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)**

As amostras proteicas intracelulares obtidas pela lise não-desnaturante foram separadas pelo método de eletroforese não-desnaturante BN-PAGE (WITTIG; BRAUN; SCHÄGGER, 2006). As amostras foram injetadas por quantidade de 30 $\mu$ g cada. A malha do gel utilizada foi preparada por gradiente de 4% a 18%. A eletroforese foi realizada com uma corrente constante de 15 mA. Após o término da corrida, a revelação foi feita pelo corante Coomassie Brilliant Blue G-250.

#### **4.5.6. Eletroeluição**

Depois da eletroforese não-desnaturante por BN-PAGE, bandas de interesse obtidas no gel foram cortadas em segmentos menores, de forma que as bandas da mesma altura e da mesma triplicata biológica foram juntadas. Assim, a porção correspondente a essas bandas foi

transferida ao dispositivo multiplex de eletroforese preparativa. Brevemente, foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão de corrida na câmara de coleta, mesmo compartimento contendo as bandas cortadas. A eletroeluição se deu por 20 minutos a 10 mV em tampão de corrida 1x (Tris 250 mM, glicina 2.5M, SDS 1% para tampão 10x). O conteúdo das proteínas eletroeluídas foram, posteriormente, submetidas a separação por SDS-PAGE.



**Figure 18. Dispositivo multiplex de eletroforese preparativa.** Para eletroeluição, inicialmente adiciona-se membranas de diálise em ambas as extremidades laterais da peça correspondente à câmara de coleta, ao centro. Em seguida, o tampão de corrida é adicionado nas câmaras maiores e a amostra (banda digerida) é inserida junta ao tampão de corrida na câmara de coleta. Aplicado à uma fonte de alimentação constante, as proteínas contidas nas bandas são eletroeluídas e passarão para meio líquido, encontrando-se na câmara de coleta.

#### **4.5.7. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)**

No gel SDS foram aplicadas 10  $\mu$ g das frações obtidas na eletroeluição foram adicionadas a 1:4 de tampão de amostra desnaturante 4x (cálculo feito individualmente para cada amostra baseada na quantificação) e injetadas em malha de gel SDS-PAGE com concentração de acrilamida/bis-acrilamida (28.5%/1.5%) em concentração final de 12% para separação eletroforética a 15mV. A revelação se deu por nitrato de prata.

#### **4.5.8. Digestão de proteínas e análise por espectrometria de massas *bottom-up***

A preparação das amostras para análise por espectrometria de massas *bottom-up* foi realizada por digestão em gel das bandas de interesse do SDS-PAGE. O protocolo de digestão foi adaptado de acordo com o disponível pela *Nature Protocols* (SHEVCHENKO *et al.*, 2007). Brevemente, foram selecionadas 40 bandas de proteínas no BN-PAGE. As bandas selecionadas foram cortadas e transferidas para eppendorfs. A solução descorante de nitrato de prata utilizada foi de TEAB 0.02M, Ferrocianeto de Potássio 15mM e Tioissulfato de Sódio 50mM.

Posteriormente, as amostras foram dessalinizadas utilizando-se ponteira de pipeta ZipTip com resina C18. Inicialmente, as ponteiras foram hidratadas com solução contendo 50% ACN em um processo de 3 repetições de adição e descarte de 10  $\mu$ L de solução. Em seguida, as amostras contendo os peptídeos foram ligadas à resina aspirando e dispensando o conteúdo por repetições de 7 a 10 ciclos. A lavagem após a ligação foi feita utilizando-se 0.1% TFA. A eluição foi realizada com solução contendo 50% ACN e 0.1% TFA. A amostra foi aspirada e dispensada em eppendorfs, a partir da ponteira, com 5  $\mu$ L de solução de eluição.

As amostras dessalinizadas foram submetidas à análise por espectrometria de massa do tipo LC-MS/MS foram realizadas em Nano-UHPLC (Ultra high performance liquid chromatography) Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific™) acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (espectrômetro de massa iontrap-orbitrap híbrido, ThermoFisher Scientific™). A fase móvel utilizada foi 80% acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B) e 0,1% ácido fórmico (A) em corridas de 48 min com fluxo constante de 0,230  $\mu$ L/min. O gradiente utilizado nas análises das frações foi o seguinte: 1% B por 0.1 min, 10,3% B por 22,9 min, 42,3% B por 1 min, 99% B por 4 min e por último 1% B por 20 min.

Os espectros de massa serão adquiridos no modo positivo aplicando-se “data dependent acquisition” e aquisição de espectros de massas em tandem (MS/MS). Cada MS scan no Orbitrap (amplitude de massa: m/z 300-1650 e resolução: 120.000) será seguido por MS/MS dos quinze íons mais intensos também no Orbitrap com resolução de 15.000. A fragmentação ocorrerá por colisão de alta energia (HCD) com NCE de 50 e threshold de 5.000 e as seqüências de íons selecionados serão excluídas dinamicamente por 90 segundos com janela de massa de mais ou menos 10 m/z. Serão excluídos da fragmentação íons com carga +1 e com carga indefinida.

Foi utilizado um nano-UHPLC Dionex ultimate 3000 acoplado ao espectrômetro de massa Orbitrap Elite™ (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). A cromatografia foi realizada usando uma coluna analítica (75  $\mu$ m  $\times$  30 cm) empacotada com Reprosil-Pur 120 Å poro C-18 de 5  $\mu$ m (Dr. Maich, Ammerbuch, Alemanha), e uma coluna armadilha (100  $\mu$ m  $\times$  3 cm) embalado com Reprosil-Pur 120 Å poro C-18 de 3  $\mu$ m (Dr. Maich, Ammerbuch, Alemanha). A eluição dos peptídeos foi realizada utilizando solvente LC A (ácido fórmico 0,1%) e solvente LC B (ACN, ácido fórmico 0,1%), sob vazão de 0,230  $\mu$ L/min, durante 116 min. O gradiente usado foi o seguinte: 0-10 min 5% de solvente B, 10-17,5 min 9% de solvente B, 17,5-65 min 25% de solvente B, 65-90 min 45% de solvente B, 90-91 min 85% de solvente B, 91-96 min

85% de solvente B, 91-96 min 2% de solvente B, 96-116 min 2% de solvente B.

A aquisição dos dados de MS foi realizada durante 106 min. Foi utilizada uma estratégia de aquisição dependente de dados com duração de exclusão dinâmica de 90 s e janela de isolamento de 2 m/z. O tipo de ativação foi dissociação de colisão de alta energia (HDC) com energia normalizada de 35 nos 15 picos mais abundantes de cada MS1. As resoluções usadas foram 120.000 FWHM e 15.000 FWHM para MS1 e MS2, respectivamente bioinformática.

#### **4.5.9. Análise por espectrometria de massas *top-down***

Inicialmente as amostras foram submetidas a procedimento de remoção do SDS conforme já descrito previamente (WESSEL; FLUGGE, 1984). Em estudos de proteínas nativas após eletroeluição ou GELFrEE nativos as remoções do CHAPS das frações coletadas serão realizadas via “spin column” específicas para remoção de detergentes. A metodologia para cromatografia líquida capilar (“capillary-LC”) foi recentemente descrita pelo grupo do Professor Neil L. Kelleher (KELLIE *et al.*, 2010). Em resumo, 10 µL de amostras limpas serão injetadas em uma coluna capilar de 10 cm × 75 µm PLRP-S (partícula de 5 µm de tamanho) (New Objective, Woburn, MA, USA) equipada com uma coluna armazenadora (trap column) de 2cm × 150 µm (partículas do mesmo tamanho). Um fluxo de 300 nL/min a partir de um sistema Eksigent 1D Plus (Eksigent, Dublin, CA, USA) será usado sob o seguinte gradiente: 0 min, 5% B (ACN+0.2% ácido fórmico); 5 min, 20% B; 50 min, 55% B, 55 min, 85% B, 60 min, 5% B. As amostras serão analisadas em um espectrômetro de massas Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Os parâmetros de MS a serem usados para as frações coletadas contendo proteínas com peso molecular abaixo de 25 KDa serão similares a aqueles já descrito por Kellie e colaboradores em 2010. Para frações contendo proteínas acima de 25 KDa, serão usados parâmetros de MS recentemente trabalhados por Vellaichamy e colaboradores que utiliza fragmentação tipo “nozzle-skimmer dissociation” (NSD) (VELLAICHAMY *et al.*, 2010).

#### **4.5.1. Análise por bioinformática**

A identificação e quantificação de proteínas foi feita usando o software MetaMorpheus (Solntsev, Shortreed, Frey, & Smith, 2018). Resumidamente, arquivos brutos foram carregados com proteoma de referência de *Corynebacterium glutamicum* (cepa ATCC 13032 / DSM

20300 / BCRC 11384 / JCM 1318 / LMG 3730 / NCIMB 10025) de uniprot no MetaMorpheus. Um arquivo de possíveis contaminantes também foi usado para a pesquisa. A primeira etapa do processamento foi a calibração dos espectros, com parâmetros padrão, seguida pela Descoberta de modificação pós-traducional aprimorada global (G-PTM-D), em busca de PTMs biológicos comuns. A última etapa foi a busca e quantificação de peptídeos e proteínas usando os espectros calibrados e PTMs criados em banco de dados descobertos por G-PTM-D. A quantificação foi realizada pelo FlashLFQ, dentro do MetaMorpheus (Millikin, Solntsev, Shortreed, & Smith, 2018), usando match between runs (MBR).

A interpretação das identificações e análise estatística da quantificação de proteínas foi realizada no RStudio (RStudio Team, 2021), usando a linguagem de programação R (R Core Team, 2022), especificamente, usando o pacote psmR para controle de qualidade e análise estatística de dados proteômicos (STRATTON *et al.*, 2019).

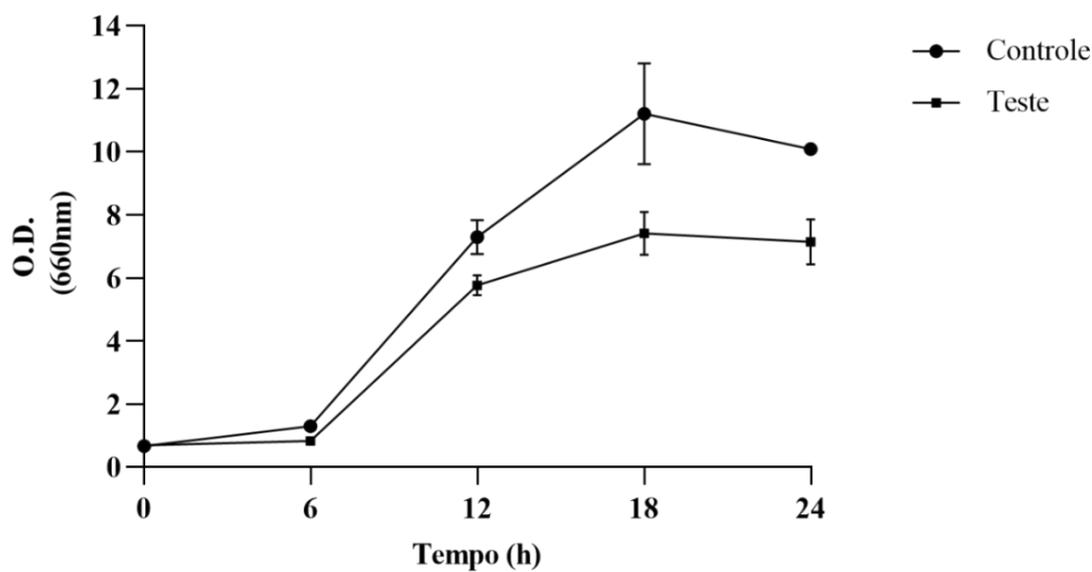
A análise dos dados *raw* gerados por abordagem BU também foi realizada no programa MetaMorpheus (STRATTON *et al.*, 2019), que para identificação de peptídeos utiliza uma versão modificada do Morpheus (MILLER *et al.*, 2019), e para quantificação *label-free* usa o FlashLFQ (Millikin, Solntsev, Shortreed, & Smith, 2018). Resumidamente, os arquivos *.raw* e o proteoma de referência do UniProt de *C. glutamicum* ATCC 13032 (UP000000582) em formato *xml* foram carregados no MetaMorpheus. A partir desses, foi feita uma calibração dos espectros com parâmetros *default*. Em seguida, foram feitas buscas de PTMs não anotadas nos proteomas de referências usando a abordagem G-PTM-D, que buscou as modificações biológicas comuns, artefatos comuns e adutos metálicos nos espectros. Então foi feita a identificação permitindo duas perdas de clivagens, duas modificações por peptídeo, e tamanho mínimo de 7. Além disso, carbamidometilação de cisteína e selenocisteína foram classificadas como modificações fixas, e oxidação de metionina como variável. Parcimônia de proteínas foi aplicada na identificação, requerendo pelo menos dois peptídeos por *protein group*. No caso da abordagem BU quantitativa, o algoritmo FlashLFQ foi utilizado para quantificação baseado em MS1, usando MBR (*Match Between Runs*). *Peptide Spectrum Matches* (PSMs) foram considerados válidos se o q-valor < 0.01 e a pontuação do MetaMorpheus > 5.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes One Way Anova e Tukey's Pairwise Comparisons, todos com níveis de significância  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Crescimento Bacteriano

O crescimento foi avaliado sob duas condições de crescimento para células de *Corynebacterium glutamicum*: com adição de Tween 40 e sem a adição do emulsionante (Figura 19).



**Figura 19. Curva de crescimento da bactéria *C. glutamicum*.** Se encontra em duas condições de crescimento: com Tween 40 e condição controle, sem Tween 40. Relação entre o crescimento da absorbância observada em espectrofotômetro incubador (EPOCH) e o tempo de cultivo da bactéria *C. glutamicum* em meio CGXII em que Aliquotas de 1mL foram coletadas nos tempos 0h, 6h, 12h, 18h e 24h e as leituras de absorbância foram medidas a 660 nm em espectrofotômetro do meio.. Os valores para construção da curva são referentes às médias de absorbância obtidas pela triplicata de ambas condições.

A característica única da bactéria *C. glutamicum* é sua capacidade de superproduzir glutamato apenas quando o envelope celular (membrana celular e parede celular) é influenciado por tratamentos específicos, como limitação de biotina, adição de surfactantes de éster de ácido graxo ou antibióticos que inibem a síntese da parede celular (NAKAYAMA *et al.*, 2018).

Analisando a curva de crescimento, nota-se um maior crescimento bacteriano na condição controle. Essa diminuição do crescimento na condição teste (Tween 40) ocorreu pela possível alteração do fluxo metabólico, isso porque, como citado anteriormente, o ODHC está localizado no ponto de divergência entre o ciclo do TCA e a biossíntese de L-glutamato, uma

diminuição na atividade do ODHC faz com que haja uma mudança no fluxo metabólico do ciclo do TCA para a síntese de L-glutamato (HIRASAWA; SHIMIZU, 2016). E essa condição de mudança de fluxo de glutamato em *C. glutamicum* é possível com a adição de surfactantes não iônicos (Tween 40 e Tween 60) (TAKINAMI; YAMADA; OKADA, 1966). Quando os mesmos são adicionados, *C. glutamicum* diminui o crescimento e começa a sintetizar e secretar glutamato de forma semelhante à condição de limitação de biotina (NAKAYAMA *et al.*, 2018a). Os detergentes supracitados mudam a tensão superficial da bicamada lipídica reduzindo a tensão interfacial entre a água e os lipídios de membrana (TAKINAMI; YAMADA; OKADA, 1966).

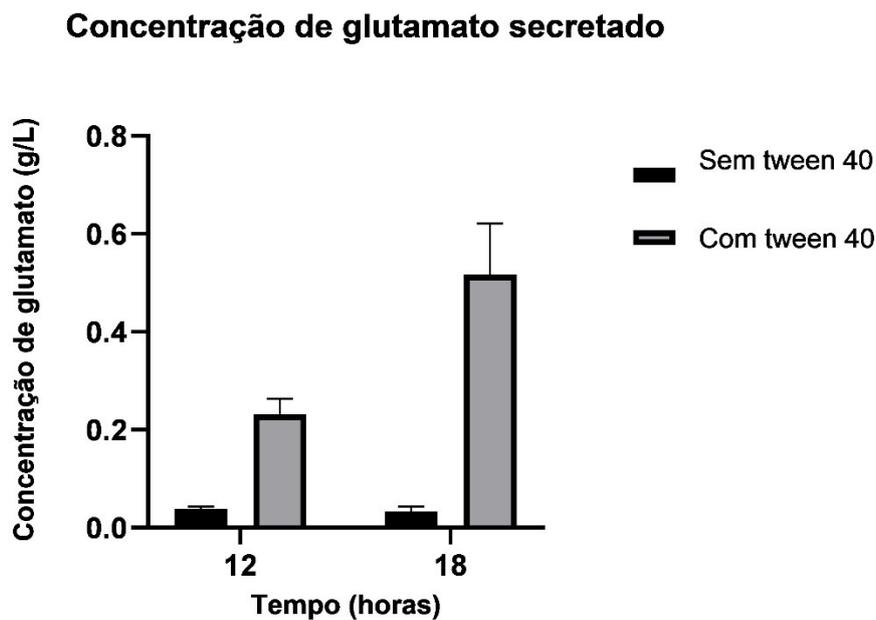
Foi observado uma maior multiplicação de *C. glutamicum* nas 18h iniciais de cultivo, tanto na condição controle quanto na condição com tween 40. Após esse período, inicia-se a fase estacionária da bactéria em ambas as condições. Essa parada no crescimento pode ser devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos, mas também pelo esgotamento de  $O_2$ , isso porque foi demonstrado que, em condições de privação de oxigênio, *C. glutamicum* converte glicose em l-glutamato e succinato sem crescer (KOEK *et al.*, 2006).

## 5.2. Análise dos aminoácidos

Na análise dos aminoácidos não foi possível detectar com clareza os demais aminoácidos a não ser glutamato, produzido em maior quantidade que os demais. *C. glutamicum* é um organismo aeróbio, 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 glutamato (DOMINGUEZ *et al.*, 1993). Embora o cultivo por agitação de frascos *Erlenmeyer* em incubadoras *Shakers* seja o método de cultivo mais comum utilizado em laboratórios, esse método apresenta um gargalo quanto a reprodutibilidade dentre as diferentes amostras (DOMINGUEZ *et al.*, 1993), sendo uma hipótese da diferença da quantidade de aminoácidos secretados por essa bactéria.

Com isso, o tempo escolhido para análise inicial foi de 12h e 18h, pois em 6h começou a fase exponencial, como podemos observar na figura 20 e em 18h seria o  $\mu_{m\acute{a}x}$  (pico de crescimento antes da fase estacionária). A concentração de glutamato em 18h foi de  $0,70 \pm 0,14$  mM na condição tween 40, enquanto que na condição controle foi de  $0,04 \pm 0,02$  mM.

Como esperado, foi produzido mais glutamato sob efeito de tween 40 quando comparada à produção na condição controle. O resultado final da concentração de glutamato foi de 0,51g/L com adição de tween 40 em 18h e 0,033 g/L na condição controle em 18h, como mostra a figura 20, tendo diferença significativa entre as médias comparadas em ambas condições (Teste t  $p < 0,05$ ).



**Figura 20. Concentração de aminoácidos detectados no sobrenadante de 12h e 18h de cultivo em condição controle e com tween 40.** Comparação da quantidade dos aminoácidos detectados entre as condições controle e com tween 40 com 12h e 18h de cultivo. O cálculo da concentração de aminoácido de cada condição foi feito considerando a média das replicatas biológicas. O desvio padrão desses aferimentos está ilustrado pela barra preta.

A maior presença de glutamato na condição sob efeito de tween 40 (SCHULTZ *et al.*, 2007) corrobora o funcionamento dessa metodologia para estimular a produção desse aminoácido, como já descrito em outros estudos (KIM *et al.*, 2009).

### 5.3. Quantificação de proteínas

#### 5.3.1. Intracelular

**Tabela 2.** Quantificação de proteínas intracelulares das condições controle (I a III) e com tween 40 (IV a VI).

Réplicas	Quantificação ug/uL
I	16,9
II	16,6
III	13,2
IV	15,1
V	13,2
VI	14,5

Analisando os resultados da quantificação das amostras intracelulares, é possível determinar que não há uma diferença estatística significativa entre ambas as condições, sendo  $p > 0,05$ .

### 5.3.2. Extracelular

**Tabela 3.** Quantificação extracelular das amostras controles (I a IV) e com tween 40 (V a VII).

Réplicas	Quantificação ug/uL
I	0,8
II	0,96
III	0,95
IV	0,85
V	1,56
VI	1,83
VII	1,58
VIII	1,59

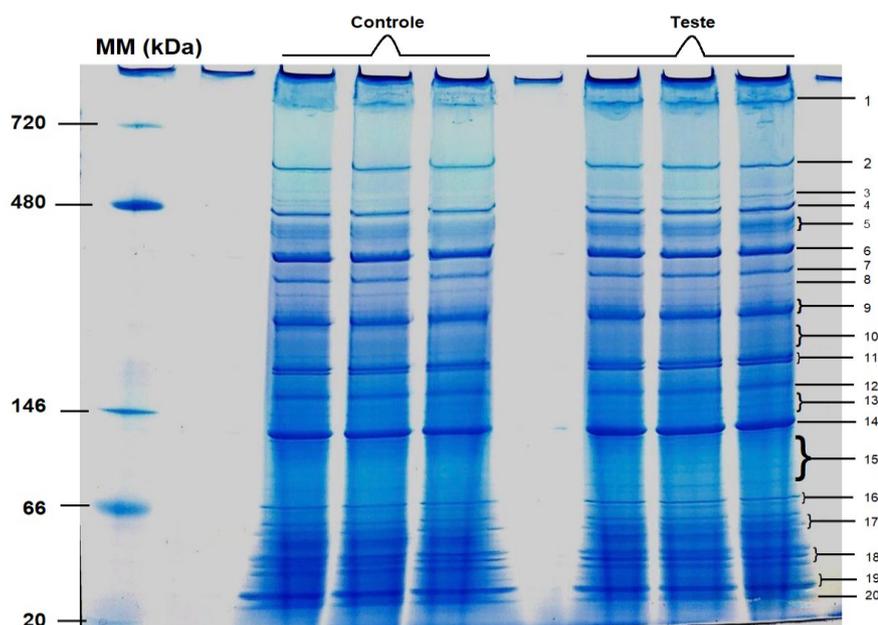
Analisando os resultados da quantificação extracelular nota-se que as amostras com tween 40 (representadas de V a VIII), contém praticamente o dobro de proteínas em relação ao controle. A mudança no fluxo metabólico celular causado pelo tween descrita em outros estudos (IKEDA; TAKENO, 2013; KATAOKA) pode ocasionar em aumento da secreção de proteínas, como observado.

A análise de ambas as tabelas (2 e 3) estabelece que existe diferença significativa na concentração de proteínas secretadas e intracelulares, entre as condições (Teste t,  $p < 0,05$ ).

#### 5.4. Análise proteômica intracelular dos géis

A separação das amostras por BN-PAGE (*Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) para análise dos complexos multiproteicos do lisado celular mostrou-se eficiente ao ser possível a observação de bandas nítidas presentes nas três replicatas (Figura 21).

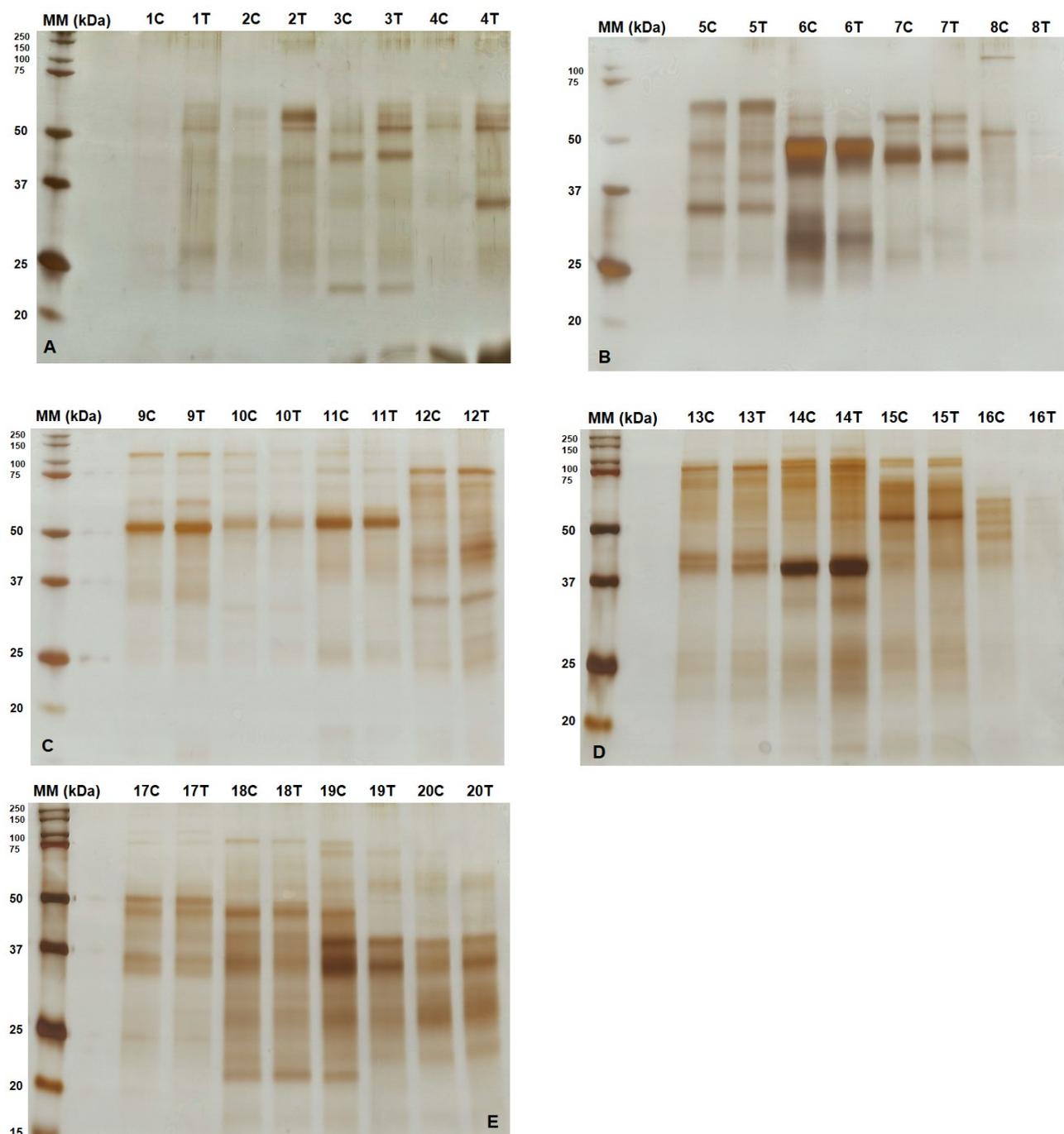
Ao ser possível observar as bandas nítidas no gel, mostra eficiência na lise não desnaturante, o que é uma boa alternativa para manter a conformação da maioria das proteínas. Como este procedimento mantém a conformação das proteínas, é importante lembrar que células são repletas de proteases. A proteólise protéica é evitada através do uso de inibidores de proteases no tampão de lise e todo o processo de lise deve ser realizado no gelo.



**Figura 21. Análise do lisado celular de *C. glutamicum* por BN-PAGE (4% a 18%).** São mostradas as amostras em triplicata, após a lise celular, referentes ao cultivo bacteriano nas condições controle (sem adição de Tween 40) e teste (com adição de Tween 40). As bandas selecionadas para eletroeluição são mostradas na direita da imagem do gel com seus respectivos números. Legenda: M.M (marcador de peso molecular); 1 a 20 (bandas selecionadas, em triplicata e em ambas as condições, para posterior eletroeluição).

A análise do gel BN-PAGE (Figura 21) permitiu a observação de proteínas e/ou complexos proteicos de aproximadamente 20kDa a maiores que 720kDa. As bandas mais evidentes foram selecionadas para serem fracionadas e subdivididas em seus componentes individuais por eletroeluição. Como foi possível observar reprodutibilidade nas amostras a partir da análise pelo BN-PAGE, bandas do mesmo tamanho e condição foram agrupadas, por triplicata, e o processo de eletroeluição foi realizado para cada condição separadamente.

Ao analisar o gel, nota-se que nas amostras com tween 40 (teste) aparecem bandas que não são possíveis observar ou aparecem em menor intensidade no controle, como exemplo as frações 3 e 5. As frações obtidas de cada eletroeluição foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12% para análise das subunidades individuais (Figura 22).



**Figura 22. Análise do perfil proteico desnaturante por SDS-PAGE 12% das frações obtidas por eletroeluição das bandas selecionadas dos géis nativos BN-PAGE.** São mostradas as 40 frações obtidas pela eletroeluição das 20 bandas da triplicata com Tween 40 e 20 bandas da triplicata controle observadas no gel BN-PAGE. Na Fig. A são mostradas as frações referentes às bandas 1 a 4 do gel BN-PAGE, a Fig. B mostra as frações obtidas a partir das bandas 5 a 8, a Fig. C mostra as frações referentes às bandas 9 a 12, a Fig. D referente às bandas 13 a 16 e, por fim, a Fig. E mostra as frações obtidas a partir das bandas 17 a 20. Legenda: M.M (marcador de peso molecular); 1 a 20 (amostras referentes às bandas selecionadas no BN-PAGE para eletroeluição); C e T (se referem à condição controle e à adição de Tween controle no cultivo celular - condição teste -, respectivamente).

Os resultados das eletroforeses em gel SDS-PAGE sugeriram a presença de proteínas com peso aproximado entre 15 e 250kDa algumas prováveis subunidades dos complexos intracelulares observados no gel BN-PAGE (Figura 21).

A análise dos resultados dos geis SDS-PAGE, mostram a diferença entre algumas bandas das condições. Essa diferença pode ser observada mais visivelmente nas bandas 1C, 2C, 3C, 4C, 8C, 16C em que as amostras do controle têm bandas menos intensas que as amostras com tween, como pode ser observado na figura 22.

### **5.5. Identificação das proteínas de complexos proteicos**

As informações geradas pelo LC MS/MS foram analisadas pelo software PEAKS e foi possível a identificação de dez proteínas, nas três réplicas biológicas (Tabela 4): Glutamina Sintetase, *Detergent sensitivity rescuer* (dtsR2), Enolase, Glutamato desidrogenase NAPD dependente, Componente E1 de piruvato desidrogenase, Fumarato hidratase classe II, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, Serina hidroximetiltransferase, Fator de alongação TU e Cisteína Sintase, com suas respectivas bandas mostradas no BN-PAGE.

**Tabela 4. Proteínas identificadas pelo PEAKS a partir das informações geradas pelo LC MS/MS.** Na tabela são mostradas as proteínas que foram identificadas em triplicata e em ambas as condições submetidas (controle e teste, com adição de Tween 40). Também são mostrados a banda correspondente a cada proteína no BN-PAGE (Fig. 21 ), a maior porcentagem de cobertura da sequência de proteína encontrada na triplicata, a massa molecular em kDa (lembrando que a massa apresentada é somente da proteína em questão e não da banda total do BN-PAGE. Para resultar na massa da banda no BN-PAGE é preciso fazer o match das proteínas encontradas para dar a massa molecular observada no BN-PAGE) e o processo biológico em que a proteína está envolvido. Dados obtidos do UniProt. A cobertura representa a proporção de peptídeos identificados em relação ao total de peptídeos críticos à proteína.

<b>Proteína</b>	<b>Banda no BN-PAGE</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Processo Biológico ou molecular</b>
Glutamina-sintetase	2	70	53,301	Biossíntese de glutamina
<i>detergent sensitivity rescuer</i> (dtsR2)	5	58	57,997	Degradação de propanoil CoA I
Enolase	6	93	44,949	Processo glicolítico
Glutamato desidrogenase NADP dependente	7	92	48,998	Biossíntese de glutamato
Componente E1 da piruvato desidrogenase	9	69	102,826	Processo glicolítico
Fumarato hidratase classe II	11	86	50,244	Ciclo de Krebs
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	14	93	36,046	Processo glicolítico
Acetil-CoA hidrolase	16	18	55,946	Processo metabólico do acetado, acetilcoA, propionato e ciclo do metilcitrato
Serina hidroximetiltransferase	17	56	46,541	Biossíntese de glicina a partir de serina
Fator de alongação TU	18	69	43,852	Tradução
Cisteína Sintase	20	85	32,518	Biossíntese de cisteína

Dentre as proteínas e complexos identificados, quatro são proteínas envolvidas nas vias de biossíntese de aminoácidos: glutamina-sintetase, glutamato desidrogenase NADP dependente, serina hidroximetiltransferase e cisteína sintase. Essas proteínas foram identificados em ambas as condições, sugerindo a ativação da via biossintético de glutamato.

Foram identificadas, em ambas as condições, duas proteínas da via glicolítica: a enolase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Além disso, foi identificada uma proteína pertencente ao ciclo de Krebs, a fumarato hidratase classe II. A via glicolítica e o ciclo de Krebs são importantes para a geração de energia para as células e para fornecerem intermediários precursores da biossíntese de aminoácidos em bactérias, como o precursor 3-fosfoglicerato, intermediário da glicólise e precursor da serina. A serina, semelhantemente, funciona como precursora para a síntese de cisteína e glicina (sintetizada a partir da cisteína sintase e da serina hidroximetiltransferase, respectivamente, enzimas que também foram identificadas).

Além das proteínas identificadas por triplicata nas duas condições submetidas, também foi possível a identificação, em duplicata ou triplicata, de proteínas presentes em apenas uma das condições (Tabela 5).

**Tabela 5. Proteínas identificadas pelo PEAKS a partir das informações geradas pelo LC MS/MS.** Na tabela são mostradas as proteínas que foram identificadas em triplicata ou duplicata em apenas uma condição submetida (controle ou teste). Também são mostrados a banda correspondente a cada proteína no BN-PAGE (Fig. 21), a maior porcentagem de cobertura da sequência de proteína encontrada na triplicata/duplicata, a massa molecular em kDa e o processo biológico em que a proteína está envolvido. Os dados foram obtidos do UniProt.

<b>Proteína</b>	<b>Banda no BN-PAGE</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Processo Biológico</b>
3-oxoacil- (proteína-carreadora-acil) sintase	0C e 1C	21 (0C); 30 (1C)	315,128	Biossíntese de ácidos graxos
Proteína ribossomal 30S S7	0T	14	17,471	Tradução
Subunidade beta da RNA polimerase dirigida por DNA	3C	23	147,295	Transcrição
Ferritina	3T e 4T	41 (3T); 64 (4T)	18,066	Transporte de íons de ferro
Fosfoenolpiruvato carboxilase	10C	47	103,198	Ciclo de Krebs
Aconitase hidratase A	10T	41	101,726	Ciclo de Krebs
Acil coenzima A carboxilase	12C e 15C	50 (12C); 55 (15C)	63,420	Síntese e degradação de ácidos graxos
5-metiltetrahidropteriltriglutamato - homocisteína metiltransferase	12T	45	81,313	Biossíntese de metionina
1,4-alfa-glucano fosforilase	15T	46	92,101	Processo metabólico de carboidratos
Frutose-bisfosfato aldolase	19C	12	37,214	Processo glicolítico

A banda 0C e 0T, foram escolhidas a partir de uma análise feita no gel que teria uma banda acima da demarcada como 1, então uma banda acima da 1 foi cortada para análise também. Apesar de terem sido identificadas em duplicata/triplicata em apenas uma condição e algumas em mais de uma banda, a caracterização dessas proteínas é de alta importância para o entendimento de outras vias biossintéticas de aminoácidos. A identificação em duplicata, para algumas amostras, e o aparecimento das proteínas em apenas uma condição sugere análises

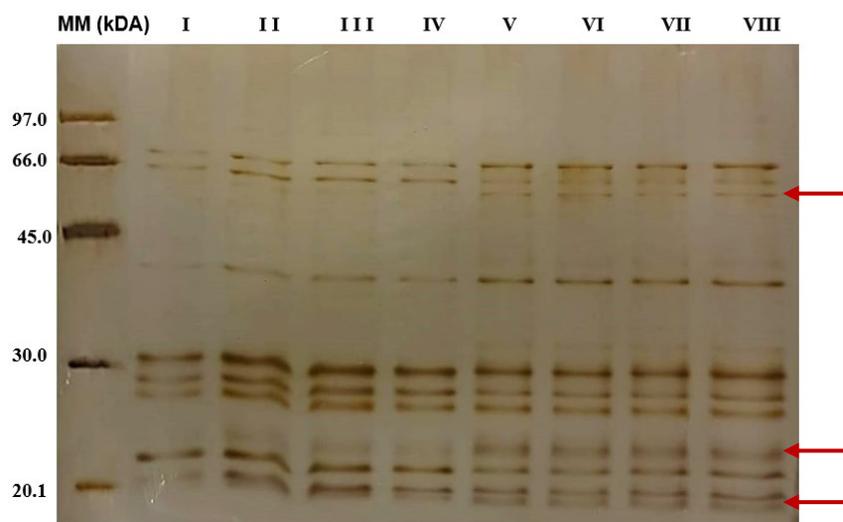
adicionais para confirmação dos resultados, mas garante a presença dessas proteínas no intracelular dessa bactéria. Dessa forma, também contribui para a caracterização do proteoma e para o entendimento das vias metabólicas, principalmente as vias de biossíntese de aminoácidos. Como exemplo, a presença da 5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína metiltransferase apenas na condição teste sugere a maior ativação dessa enzima nessa via de biossíntese da metionina.

Foram identificadas diversas proteínas em cada banda, com isso não foi possível determinar os complexos proteicos observados no BN-PAGE de maneira clara, porque não foi possível determinar o que seriam as proteínas dos complexos de fato.

### 5.6. Análise de proteínas extracelulares por SDS-PAGE

Como as amostras extracelulares tiveram que passar por um processo de precipitação logo no início das análises, essas amostras foram aplicadas em gel SDS 12%.

As amostras extracelulares foram precipitadas para remoção de contaminantes e ressuspensas em Tampão de precipitação (descrito no item 4.5.1.1), com dodecil sulfato de sódio (SDS), conhecido também como lauril sulfato de sódio. O SDS foi utilizado por ser um detergente com forte efeito de desnaturação de proteínas que se liga ao esqueleto da proteína em uma proporção molar constante, facilitando a solubilização das proteínas precipitadas.



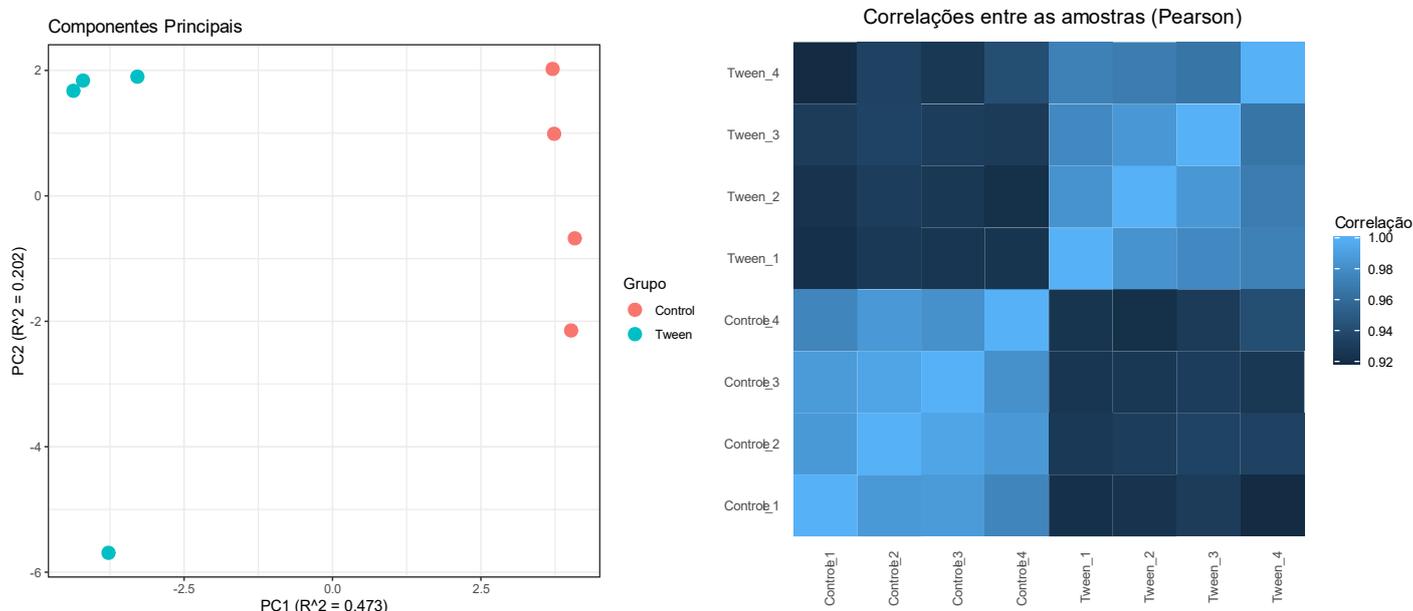
**Figura 23. Análise do perfil proteico desnaturante por SDS-PAGE 12%.** No gel SDS são mostradas as 2 condições (controle e tween 40), sendo as amostras de I a IV réplicas do controle e de V a VIII réplicas biológicas da condição com tween 40. As amostras se dispõem em bandas de 97 kDa a um pouco menor que 20 kDa, como observado em relação ao marcador molecular Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis.

A análise do gel SDS 12% sugere diferenças entre as condições. Sendo elas, bandas que ficam mais intensas nas condições com tween 40, na altura de 18, 25 e 60 kDa (figura 23), como indicam as setas. A figura também mostra que o cultivo de ambas condições foram bem sucedidas e que o perfil proteico foi mantido em todas as réplicas biológicas.

De acordo Kim et al (2011), no sobrenadante do cultivo de *C. glutamicum* foram encontradas proteínas variando de 10 a 50 kDa, o que pode ser observado no gel SDS-PAGE, tendo até algumas proteínas na faixa de 70 kDa.

### **5.7. Proteômica *Bottom-up* do extracelular de *C. glutamicum* com estímulo (tween 40) ou sem estímulo (controle)**

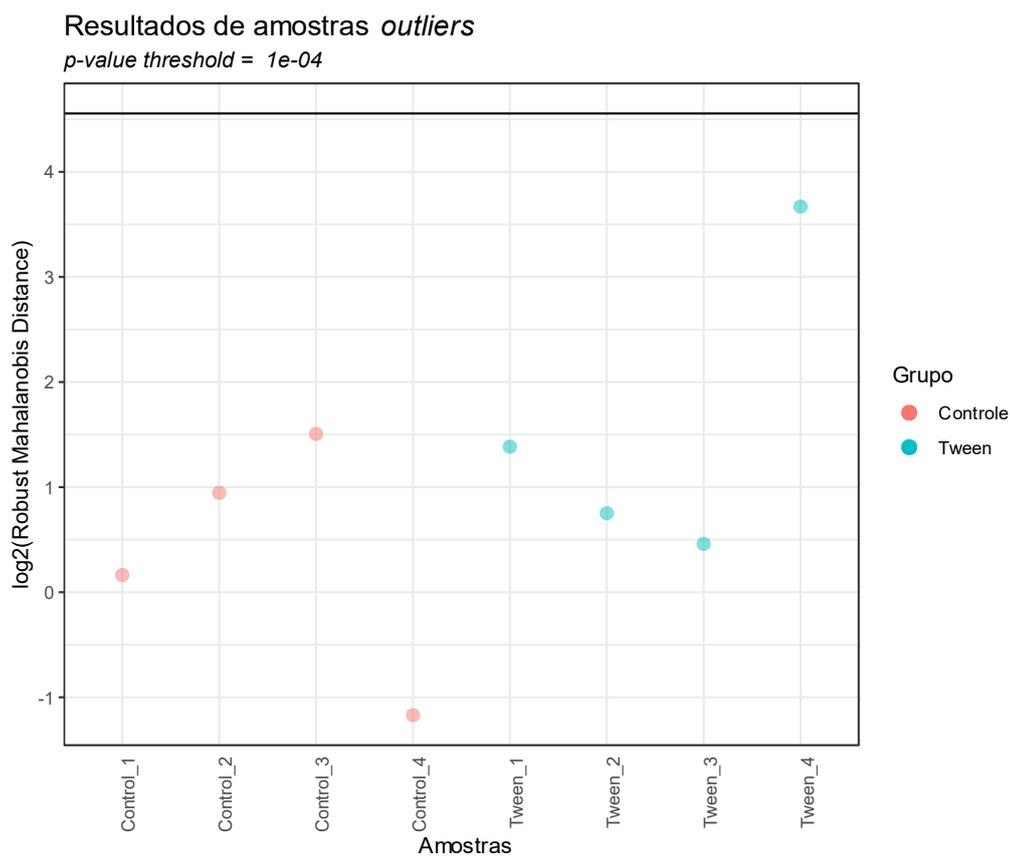
Na análise proteômica *Bottom-up* foram identificadas 257 proteínas (Tabela suplementar 1) com pelo menos um peptídeo único, nas condições tween 40 e controle. Dessas proteínas foram identificados termos enriquecidos (analisados no STRING) para processos biológicos como organização, processo de biossíntese e construção de peptídeo glicano da parede celular. Para componente celular foram identificadas proteínas relacionadas a membrana celular externa, envelope, região extracelular, translocação e exportação de proteínas. E dessas 257 proteínas, 60% apresentaram peptídeo sinal, sugerindo que são proteínas destinadas a serem secretadas (Tabela suplementar 2).



**Figura 24. Análise das abundâncias das proteínas.** A) Gráfico PCA, em que as proteínas que têm o perfil de abundância parecido foram agrupadas. B) Gráfico *Heatmap* (Pearson) mostra a correlação de cada réplica entre si e entre as condições (controle e tween).

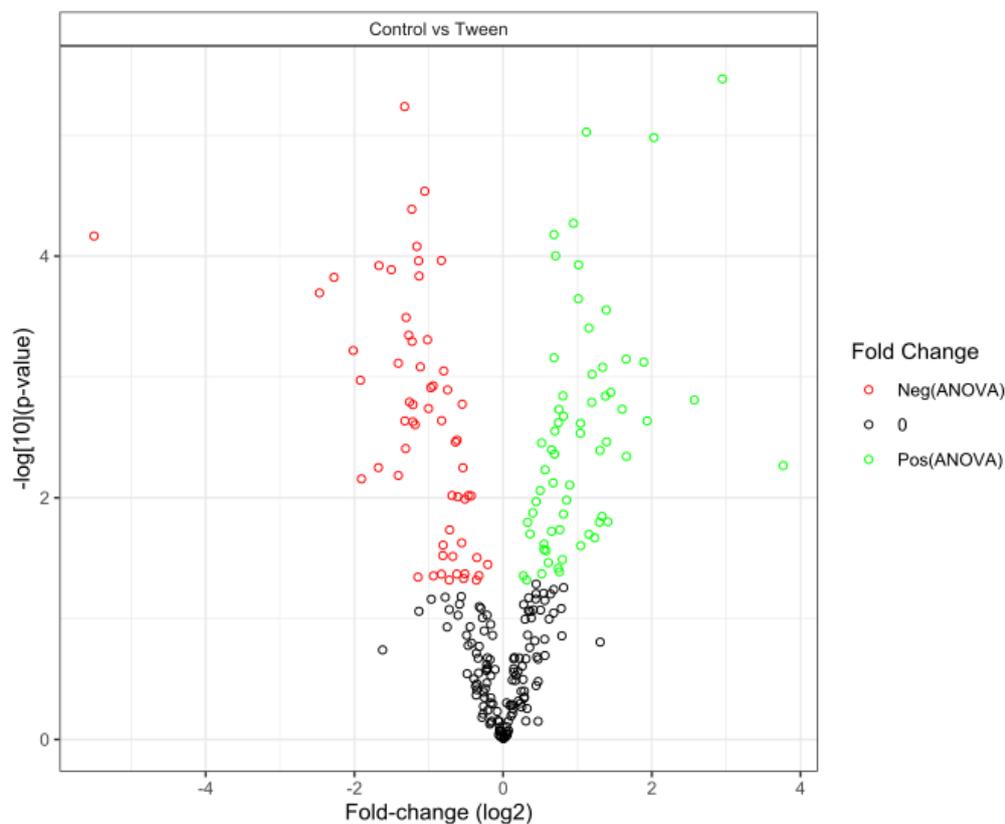
Na análise da abundância das proteínas (figura 24), pode-se observar que no gráfico PCA (fig 24, A), mostra que o eixo X está variando de uma maneira semelhante em todo o gráfico, ou seja, as condições estão bem divididas entre controle e tween no eixo X, tendo uma representatividade grande da amostra ( $R^2 = 0.473$ ). A análise das abundâncias por PCA consegue demonstrar que as réplicas das condições estão bem agrupadas entre si e as duas condições estão bem separadas. Mesmo que as amostras tenham sido agrupadas de forma efetiva, é possível observar que uma réplica da condição tween ficou distante das suas réplicas, tendo como referencial PC2.

O gráfico de Pearson (Figura 24, B) indica a mesma conclusão. No *heatmap* mostram essa relação que as réplicas das condições são mais semelhantes entre si do que do teste. Entre as amostras tween 4 com controle 1, há uma correlação de aproximadamente 0,92 mostrando que as amostras não são tão correlacionadas quando há uma comparação, por exemplo, entre o controle 3 e o controle 4, o que já mostra uma correlação de 0,98. Determinando, então, que as amostras do controle estão mais correlacionadas entre si do que com as do tween. E as que amostras do tween estão mais correlacionadas entre si do que com as controle, ou seja, existe mais diferença entre as condições do que entre as réplicas. Corroborando mais uma vez, o sucesso do cultivo em ambas condições.



**Figura 25. Análise RMD (Mahalanobis).** Para fazer a análise de RMD de outliers considera dados de MAD - median absolute deviation, correlação, assimetria e proporção de *missing values*

A análise do gráfico de RMD (Figura 25) mostra que apesar de ter uma diferença um uma réplica do PCA (figura 24), nenhuma das réplicas analisadas foi considerada como um outlier extremo (extremidade mostrada na parte superior do gráfico demarcado por uma linha na horizontal). Por isso, analisando os gráficos de PCA, *heatmap* e RMD nenhuma réplica foi tirada, pois nenhuma amostra foi considerada um outlier extremo, sendo assim não interferiu as análises subsequentes.



**Figura 26. Volcano Plot.** Gráfico de dispersão em que se observa as proteínas reguladas com maior abundância em cada uma das condições.

Na análise do gráfico de dispersão (Volcano Plot), observa-se as proteínas reguladas (tem mais em uma condição que na outra). Com isso, 123 proteínas apresentaram diferença significativa entre as condições. Dessas proteínas, 63 estavam reguladas mais abundantes na condição tween e 60 estavam mais abundantes na condição controle.

## 5.8. Identificação das proteínas extracelulares

Após as análises estatísticas das amostras, foram determinados acessos das proteínas identificadas em ambas condições. Na tabela 6, das 60 proteínas reguladas na condição controle, 31 foram mais relevantes das análises, baseado no nível de  $\log_2$  fold change ( $-1 < FC < +1$ ). Essas 31 proteínas foram reconhecidas pelo UniProt e KEGG, a partir do seu acesso, tendo sua nomenclatura e função deduzida descritos.

**Tabela 6.**

**Proteínas encontradas em maior abundância ou somente na condição controle.** Códigos de acesso do Uniprot e descrição fornecidas pelo KEGG das proteínas relacionadas ao metabolismo de *C. glutamicum* com suas respectivas nomenclaturas e função deduzida.

<b>Acesso</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Produto gênico ou função deduzida</b>
Q8NUC6	Subunidade A da DNA girase	Superenrola negativamente o DNA circular fechado de fita dupla
Q8NS85	Proteína contendo repetição LGFP	Envolvido na biossíntese de peptidoglicano
Q8NT42	Proteína de membrana hipotética	Não definida
Q8NRT5	Proteína contendo domínio de ligação ao cálcio	Ligante de Ca <sup>2+</sup> , importante em uma variedade de funções celulares
Q8NTG3	ATPases envolvidas no particionamento cromossômico	ATPases envolvidas no particionamento cromossômico
Q8NQW0	Proteína secretada	Não definida
Q8NTB9	Proteína de membrana hipotética	Não definida
Q8NUA6	Proteína hipotética	Não definida
Q8NU23	Proteína hipotética de membrana	Não definida
Q8NMJ8	Proteína de ligação ao fosfato PstS	Parte do complexo transportador ABC PstSACB envolvido na importação de fosfato.
Q8NMV7	Fosfatase alcalina	Catálise da reação: um monoéster ortofosfórico + H <sub>2</sub> O = um álcool + fosfato, com um pH alcalino ótimo.
Q8NQC1	Polipoproteína Lppl	Componente da parede celular
Q8NQN2	Proteína secretada	Não definida
Q8NSC0	Lipoproteína LpqB	Componente da membrana celular
Q8NPK6	Proteína contendo o domínio DUF2188	Reposta SOS
Q8NMQ6	Proteína quinase serina/treonina	Catalisa a fosforilação de resíduos de serina ou treonina nas proteínas
Q8NM31	Proteína de membrana hipotética	Não definida
Q9X713	Pantotenato sintetase	Catalisa a condensação de pantoato com beta-alanina
Q8NT00	Proteína ribossômica 50S L16	Liga-se ao rRNA 23S e também é visto fazendo contatos com os tRNAs do sítio A
Q8NLE5	Proteína hipotética	Não definida
Q8NNZ3	Sinal de peptidase I	Clivagem de sinal N-terminal hidrofóbico ou sequências líderes de proteínas secretadas e periplasmáticas
Q8NPH2	Proteína contendo repetição LGFP	Integridade da parede celular
Q8NLN8	Regulador transcripcional	Não definida
Q8NRC4	Proteína secretada	Não definida
Q8NPJ9	Lipoproteína	Componente da parede celular
Q8NMA5	Proteína contendo o domínio DUF4236	Não definida
Q8NPT9	Proteína hipotética	Não definida
Q8NRM7	Proteína de membrana	Não definida
Q8NNQ6	Proteína hipotética	Não definida

De acordo com a identificação das proteínas da tabela 6, pode-se observar proteínas que são encontradas no metabolismo da *C. glutamicum*.

Esta repetição de 54 aminoácidos (acesso: Q8NS85) é encontrada em muitas proteínas hipotéticas. Várias proteínas hipotéticas de *Corynebacterium glutamicum* juntamente com a

proteína PS1 contém esta região repetida. A região N-terminal do PS1 contém um domínio esterase que transfere o ácido corinocólico. A região C-terminal consiste em 4 repetições LGFP seguidas. Supõe-se que as proteínas PS1 em *Corynebacterium*, quando associadas à parede celular, podem ser ancoradas por meio das repetições LGFP em sequência que podem ser importantes para manter a integridade da parede celular (NAKAYAMA *et al.*, 2018). A deleção da proteína Q01377 (Precursor da proteína PS1) resulta em um aumento de 10 vezes no volume celular do organismo e infere o envolvimento correspondente da proteína na formação da forma celular. Prevê-se que a estrutura secundária de cada repetição inclua duas cadeias  $\beta$  e uma  $\alpha$ -hélice (MIZUNO *et al.*, 2016).

Estudos sugerem que a *pknA* (acesso: Q8NMQ6) ou *pknB* é necessário para o crescimento da *C. glutamicum* (NIEBISCH *et al.*, 2006). *C. glutamicum* possui quatro quinases do tipo Hanks (*PknA*, *PknB*, *PknG* e *PknL*) e uma única fosfoserina/fosfotreonina fosfatase (*Ppp*). *PknA* (cg0059/NCgl0041), *PknB* (cg0057/NCgl0040), *PknL* (cg2388/NCgl2095) e *Ppp* (cg0062/NCgl0044) contêm uma única hélice transmembranar, indicando que são proteínas integrais da membrana, enquanto *PknG* (cg3046/NCgl2655) não contém e é previsto que seja uma quinase solúvel (STANCIK *et al.*, 2018).

Os domínios quinase de *PknA*, *PknB* e *PknL* demonstraram possuir atividade de autoquinase (proteína quinase dependente de autofosforilação) (BOULAHYA *et al.*, 2010). Existem relatos conflitantes sobre a autofosforilação de *PknG*: Fiuza *et al.*, relataram que tanto o domínio completo quanto o domínio quinase de *PknG* recombinante não exibiram atividade de autofosforilação e sugeriram que *PknG* requer fosforilação dependente de *PknA* para sua ativação. Em contraste, Schultz *et al.*, (2007) relataram que *PknG* purificado de um *C. glutamicum* com *pknA* deletado exibiu atividade de autofosforilação e foi capaz de fosforilar *OdhI*, sugerindo fortemente que *PknG* é uma autoquinase autêntica.

Schultz *et al.*, (2007) analisaram a deleção de *pknG* em *C. glutamicum* e determinaram que houve um efeito positivo da deleção de *pknG* na produção de glutamato e provavelmente foi devido a um nível aumentado de *OdhI* não fosforilado que inibe a atividade de *ODH*, mas pode não ser verdade para todas as condições. Especula-se que as outras quinases (*PknA*, *PknB* e *PknL*) sejam responsáveis pela fosforilação de *OdhI* e/ou a atividade da fosfatase *Ppp* contra *OdhI* varia dependendo das condições de indução.

Em *C. glutamicum*, as ATPases (acesso: Q8NTG3) *ParA* e *PldPsão* proteínas

importantes na divisão celular (SZARDENINGS; GUYMER; GERDES, 2011). PldP localiza-se no local da futura divisão celular, enquanto sua exclusão causa alteração no posicionamento dos septos da divisão. No entanto, o mecanismo subjacente ainda não foi investigado.

O domínio DUF2188 (acesso: Q8NPK6) representa uma proteína associada ao ribossomo prevista para mediar a inibição da tradução juntamente com o reparo de dano ou restrição do DNA em contextos de conflito (KATAOKA *et al.*, 2006), nesse contexto, sugere sua aparição pois o cultivo de *C. glutamicum* em condição com tween é um meio de estresse para a bactéria.

Na análise das proteínas mais abundantes na condição tween 40 foram identificadas 32 proteínas relacionadas ao metabolismo da *C. glutamicum* na produção de glutamato.

Tabela 7 Acessos das proteínas reguladas da condição tween 40, com sua nomenclatura e função deduzida obtida pelo UniProt ou juntamente com KEGG.

<b>Acesso</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Produto gênico ou função deduzida</b>
Q79VC8	Porina	Passagem de solutos hidrofílicos
Q8NLN7	Lipoproteína (LppX LprAFG lipoprotein)	Translocação de lipídios complexos para a membrana externa
Q8NSY5	Proteína hipotética	Não definida
Q8NSQ0	Proteína hipotética	Não definida
Q8NRF2	Proteína secretada putativa	Não definida
Q8NQ16	Proteína de membrana prevista	Transportador ativo primário
Q8NS10	Proteases de serina	Endopeptidase do tipo serina
Q8NTB5	Proteína de membrana	Resposta SOS
Q8NR75	Hidrolases ou aciltransferases previstas	
Q8NT19	Fator de alongamento G	Catalisa a etapa de translocação ribossomal dependente de GTP
Q8NTS3	Proteína contendo domínio semelhante a CsbD	proteína bacteriana de resposta ao estresse geral.
Q8NSY0	Proteína Hipotética	
Q8NLL9	Fosfohidrolase	Catálise da reação: um monoéster ortofosfórico + H <sub>2</sub> O = um álcool + fosfato, com um pH ácido ótimo.
Q8NRS2	Proteína contendo o domínio SLT da transglicosilase	Não definida
Q8NL74	Sistemas de transporte de Fe <sup>3+</sup> -sideróforos do tipo ABC	Transporte de ferro através da membrana
Q8NS88	Tripsina	Hidrólise de proteínas em polipeptídeos
Q8NRR0	Proteína secretada	Não definida
Q8NNT2	Proteína secretada	Não definida
Q8NSL7	Lipoproteína	Composição membrana
Q8NLR4	Proteína contendo o domínio DUF732	Não definida
Q8NLC7	Proteína de membrana	Não definida
Q01651	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Catalisa a fosforilação oxidativa do gliceraldeído 3-fosfato (G3P) a 1,3-bifosfoglicerato (BPG) usando o cofator NAD
Q8NQN5	Esterase do tipo hidrolase SGNH	
Q8NTX7	Proteína de choque frio	Proteínas de ligação de RNA/DNA multifuncionais, caracterizadas pela presença de um ou mais domínios de choque frio
Q8NRS3	Porina B	Forma um canal polar com uma superfície externa apolar
Q8NLR5	Homólogo da carboxilesterase Culp6	Esterase envolvida na biossíntese e/ou manutenção da parede celular
Q8NN96	Proteína contendo o domínio DUF4352	Não definida
Q8NU01	Serina Hidrolase	Hidrólise de substratos
Q8NP51	Proteína contendo domínio AMIN	Papel previsto na localização de diversos complexos de proteínas periplásmicas
Q8NLR1	Trehalose O-micoliltransferase	Síntese da parede celular, transporte de glicolipídios da parede celular e armazenamento de energia
P12880	Fosfoenolpiruvato carboxilase	PEP + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → oxaloacetato + Pi

De acordo com a tabela 7, foram identificadas proteínas importantes na produção de glutamato. A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (acesso: Q01651), por exemplo, é indispensável para o crescimento da bactéria em glicose (OMUMASABA *et al.*, 2005), sendo uma enzima essencial na via da glicólise e da gliconeogênese. Como o NADH é gerado principalmente pelo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) na glicólise devido à diminuição da atividade do ciclo do TCA em condições de privação de oxigênio e a atividade da GAPDH demonstrou ser inibida sob maior razão NADH/NAD<sup>+</sup> (DOMINGUEZ *et al.*, 1993) tendo a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase regulada na condição com tween sugere que a produção de NDH-2 diminui a relação NADH/NAD<sup>+</sup>, aliviando a inibição da atividade da GAPDH e, conseqüentemente, aumentando o consumo de glicose.

A porina B (acesso: Q8NRS3), uma das quatro porinas distintas em *C. glutamicum*, é conhecida para ser localizado na camada de ácido micólico da parede celular como uma forma pentamérica e desempenha um papel fundamental na formação do canal ânion-seletivo da parede celular (AN; YIM; JEONG, 2013). Anteriormente, devido à sua localização na parede celular, PorB era usado como motivo de ancoragem para exibição da superfície celular em *C. glutamicum* (MAILAENDER *et al.*, 2004).

A enzima trehalose O-micoliltransferase (acesso: Q8NLR1) catalisa a troca de ácido micólico entre trealose, trealose micolato e trealose bismicolato, responsável pela formação da complexa parede celular de *C. glutamicum* (KOEK *et al.*, 2006; LI, H. *et al.*, 2022).

Para produção de glutamato, a adição de tween 40 pode alterar a tensão da membrana celular ou a abertura do canal mecanossensível, bem como levar à redução da atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase (acesso: Q8NRC3) que, por sua vez, afeta o fluxo do ciclo do TCA (HIRASAWA *et al.*, 2012). Embora os eventos moleculares associados a esses fenótipos não sejam totalmente compreendidos, a produção de glutamato em *C. glutamicum* está relacionado com a estrutura da superfície celular (membrana celular) e com o fluxo metabólico (principalmente através do ciclo do TCA), uma vez que estes estão profundamente envolvidos na energética celular (LEDERER, 1971; MARRAKCHI; LANÉELLE; DAFFÉ, 2014).

Na cadeia respiratória aeróbica de *C. glutamicum*, várias desidrogenases primárias, incluindo NADH desidrogenase tipo II e sistemas de reoxidação de NADH dependentes de quinona oxidoreductase e lactato desidrogenase, funcionam doando elétrons de cada substrato para a menaquinona, e o menaquinol resultante é oxidado pelo supercomplexo citocromo bcc-

aa3 e citocromo bd oxidase. O supercomplexo bcc-aa3 e a bd oxidase geram força próton motriz, razão H<sup>+</sup>/O de 6 e 2, respectivamente (GRAVOUIL *et al.*, 2017).

As análises de acetiloma e succiniloma de *C. glutamicum* produtoras de glutamato sugeriram que a acetilação e a succinilação de proteínas estão envolvidas na produção de glutamato por meio do controle pós-traducional de enzimas-chave, como fosfoenolpiruvato carboxilase (PPC) e ODHC (MIZUNO *et al.*, 2016).

Durante a produção de L-glutamato, quantidades significativas do intermediário do ciclo TCA 2-oxoglutarato são retiradas, resultando na necessidade de reposição anaplerótica (KIM *et al.*, 2009; SHIRAI *et al.*, 2007). A fim de apoiar a carboxilação anaplerótica, a enzima glicolítica central do piruvato, a quinase, foi deletada no tipo selvagem de *C. glutamicum*, o que melhorou a produção de L-glutamato sob condições limitadas de biotina (NAKAYAMA *et al.*, 2018a). A expressão adicional de uma PEP (acesso: P12880) carboxilase desregulada por feedback foi especialmente benéfica para a produção de L-glutamato (LI, L.; WADA; YOKOTA, 2007). Isso está de acordo com descobertas anteriores, que mostraram que a PEP carboxilase é indispensável para a produção de L-glutamato e carrega o maior fluxo anaplerótico nessas condições (KIM *et al.*, 2009).

A proteína homóloga da carboxilesterase Culp6 (Q8NLR5, que está envolvida na biossíntese e ou manutenção da parede celular, sugere que houve distúrbio na parede causada pela adição de tween 40.

Além disso, foi possível observar várias proteínas com peptídeos sinal, ou seja, que foram secretadas. Outras que são relacionadas a composição da membrana, divergindo das da composição encontrada na condição controle, sugerindo diferenças na composição da membrana quando estimulada por tween 40. E várias proteínas de resposta SOS, sugerindo que a adição de tween 40 torna o meio estressante para bactéria e pode estar envolvido na manutenção da parede e membrana da *C. glutamicum*. E algumas são proteínas secretadas pela bactéria que não tiveram sua função estabelecidas ainda, mas que têm potencial relevante para pesquisa. Todas essas identificações mostram a importância de analisar o proteoma da *C. glutamicum* para compreender melhor quais proteínas estão mais ou menos envolvidas na síntese de aminoácidos de interesse.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como visto em outros estudos (SCHULTZ *et al.*, 2007), a maior quantidade de glutamato presente nas réplicas com adição de tween 40, demonstra a eficácia da metodologia para produção desse aminoácido tão importante mundialmente.

A análise do gel BN-PAGE, figura 21, demonstrou eficácia na metodologia de lise não desnaturante, em que pôde-se visualizar os complexos proteicos da *C. glutamicum* e posteriormente as subunidades dos complexos, demonstrados na figura 22.

Foi observado também, tanto no SDS-PAGE do proteoma intracelular quanto no SDS-PAGE extracelular, que existem diferenças no perfil proteico entre as condições. Nas réplicas com tween 40, existem mais proteínas do que nas réplicas controle, isso porque existe uma mudança no fluxo metabólico celular causada pelo tween que pode ocasionar em aumento da secreção de proteínas (YUKAWA *et al.*, 2007).

A utilização de abordagem proteômica *Bottom-up* em *C. glutamicum* permitiu a identificação de proteínas que sugerem regulação metabólica na mesma e estão ligadas diretamente com a produção de glutamato nesse organismo. Como exemplo, a PEP carboxilase, proteína regulada na condição com tween 40, que está diretamente ligada a produção de glutamato.

O presente trabalho contribui, então, para o melhor entendimento da biologia de *C. glutamicum*, pois foi mostrado que desde o ano 2000, dados genômicos e outros “ômicos” foram sendo melhores estudados para *C. glutamicum*, modificando profundamente os métodos de desenvolvimento de cepas e fornecendo uma compreensão global da fisiologia, redes regulatórias e funções desconhecidas desse organismo, bem como os mecanismos subjacentes à hiperprodução de aminoácidos, que antes julgava não ser possível produzir de forma eficaz (BECKER, M. *et al.*, 2013; YUKAWA *et al.*, 2007). Como resultado, os alvos da engenharia metabólica se expandiram além das principais vias biossintéticas que levam a aminoácidos de interesse em sistemas celulares inteiros, incluindo sistemas de regeneração de cofatores, sistemas de captação e exportação, metabolismo energético, regulação global e respostas ao estresse (OHNISHI *et al.*, 2002).

Os objetivos de identificação das proteínas, do proteoma e secretoma, da *C. glutamicum*

foram alcançados, juntamente com a relação dessas proteínas no metabolismo de glutamato. Tais conquistas trazem a necessidade de validações por metodologias complementares a espectrometria de massa e o desenvolvimento de novas hipóteses. Com isso, apresento como perspectivas:

- Testar métodos de preparo para proteômica *top-down* para eliminação completa do tween nas amostras e não haver supressão de sinal , complementando, assim, a análise *bottom-up* e ter mais resultados sobre as modificações pós-traducionais na produção de glutamato e outros aminoácidos.

- Fazer gel 2D para conseguir separa de maneira mais eficiente as subunidades proteicas dos complexos.

- Realizar uma comparação dos outros métodos de produção de glutamato (depleção de biotina, adição de penicilina) julgando qual seria mais efetivo para produção de glutamato e outros aminoácidos secretados por *C. glutamicum*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, Seul Ji; YIM, Sung Sun; JEONG, Ki Jun. Development of a secretion system for the production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using the Porin B signal peptide. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 251–257, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.04.003>

ASAKURA, Yoko *et al.* Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 1308–1319, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01867-06>

BARKSDALE, L. *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. **Bacteriological reviews**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 378–422, 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/membr.34.4.378-422.1970>

BECKER, Judith *et al.* Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of cis, cis-muconic acid from lignin. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0963-2>

BECKER, Judith; WITTMANN, Christoph. **Bio-based production of chemicals, materials and fuels - *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory**. [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.012>

BECKER, Michael *et al.* Glutamate efflux mediated by *Corynebacterium glutamicum* MscCG, *Escherichia coli* MscS, and their derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1828, n. 4, p. 1230–1240, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.01.001>

BENDT, Anne K. *et al.* Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum*. *In:* , 2003. **Proteomics**. [S. l.: s. n.], 2003. p. 1637–1646. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.200300494>

BERGER, Ch *et al.* Jet analysis of the  $Y\{hooked\}(9.46)$  decay into charged hadrons. **Physics Letters B**, [s. l.], v. 82, n. 3–4, p. 449–455, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/0370->

BOULAHYA, Kenza Amel *et al.* OdhI dephosphorylation kinetics during different glutamate production processes involving *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 1867–1874, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2599-y>

CATHERMAN, Adam D.; SKINNER, Owen S.; KELLEHER, Neil L. Top Down proteomics: Facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 445, n. 4, p. 683–693, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.041>

CHAIT, Brian T. Mass spectrometry: Bottom-up or top-down? **Science**, [s. l.], v. 314, n. 5796, p. 65–66, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1133987>

COLLINS, Matthew D.; KROPPESTEDT, Reiner M. Lipid Composition as a Guide to the Classification of Some Coryneform Bacteria-containing an A 4  $\alpha$  Type Peptidoglycan (Schleifer and Kandler). **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 95–104, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80037-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80037-X)

DEHART, Caroline J. *et al.* Bioinformatics analysis of top-down mass spectrometry data with proSight lite. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 1558, p. 381–394, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6783-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6783-4_18)

DOMINGUEZ, H. *et al.* Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 449–454, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00129316>

DUPREE, Emmalyn J. *et al.* A critical review of bottom-up proteomics: The good, the bad, and the future of this field. **Proteomes**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 1–26, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/proteomes8030014>

EGGELING, L.; SAHM, H. L-glutamate and L-lysine: Traditional products with impetuous developments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 146–153, 1999.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002530051501>

FENG, Li Yan; XU, Jian Zhong; ZHANG, Wei Guo. Improved L-leucine production in *Corynebacterium glutamicum* by optimizing the aminotransferases. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23092102>

FREUDL, Roland. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0901-3>

GRAF, Michaela *et al.* Continuous Adaptive Evolution of a Fast-Growing *Corynebacterium glutamicum* Strain Independent of Protocatechuate. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. August, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01648>

GRAVOUIL, Kévin *et al.* Transcriptomics and Lipidomics of the Environmental Strain *Rhodococcus ruber* Point out Consumption Pathways and Potential Metabolic Bottlenecks for Polyethylene Degradation. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 51, n. 9, p. 5172–5181, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00846>

HANSMEIER, Nicole *et al.* Classification of hyper-variable *Corynebacterium glutamicum* surface-layer proteins by sequence analyses and atomic force microscopy. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 112, n. 1–2, p. 177–193, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.03.020>

HASEGAWA, Takuo *et al.* Changes in enzyme activities at the pyruvate node in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 12–19, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1263/jbb.105.12>

HIRASAWA, Takashi *et al.* Molecular mechanisms and metabolic engineering of glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. **Subcellular Biochemistry**, [s. l.], v. 64, p. 261–281, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5055-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5055-5_13)

HIRASAWA, Takashi; SHIMIZU, Hiroshi. Glutamic acid fermentation: Discovery of glutamic acid-producing microorganisms, analysis of the production mechanism, metabolic

engineering, and industrial production process. **Industrial Biotechnology: Products and Processes**, [s. l.], p. 339–360, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9783527807833>

IKEDA, M.; NAKAGAWA, S. **The Corynebacterium glutamicum genome: Features and impacts on biotechnological processes**. [S. l.: s. n.], 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1328-1>

IKEDA, Masato *et al.* A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 610–615, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0104-5>

IKEDA, Masato; TAKENO, Seiki. Amino Acid Production by *Corynebacterium glutamicum*. *In*: [S. l.: s. n.], 2013. p. 107–147. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-29857-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29857-8_4)

IMAO, Kenta *et al.* 1,5-Diaminopentane production from xylooligosaccharides using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* displaying beta-xylosidase on the cell surface. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 245, p. 1684–1691, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.135>

JACKSON, Mary. The mycobacterial cell envelope-lipids. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021105>

JIANG, Yan *et al.* Proteome analysis guided genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum* S9114 for tween 40-triggered improvement in l-ornithine production. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1272-0>

KALINOWSKI, J. The genomes of amino acid-producing corynebacteria. **Handbook of Corynebacterium Glutamicum**, [s. l.], n. May, p. 37–56, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781420039696.pt3>

KALINOWSKI, Jörn *et al.* The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 104, n. 1–3, p. 5–25, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00154-8)

KATAOKA, M. *et al.* Gene expression of *Corynebacterium glutamicum* in response to the conditions inducing glutamate overproduction. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 471–476, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01905.x>

KEILHAUER, C.; EGGELING, L.; SAHM, H. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 175, n. 17, p. 5595–5603, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.175.17.5595-5603.1993>

KELLIE, John F. *et al.* The emerging process of Top Down mass spectrometry for protein analysis: Biomarkers, protein-therapeutics, and achieving high throughput. **Molecular BioSystems**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 1532–1539, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c000896f>

KIM, Jongpill *et al.* Effect of *odhA* overexpression and *odhA* antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 81, n. 6, p. 1097–1106, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1743-4>

KIM, Jongpill *et al.* Investigation of phosphorylation status of OdhI protein during penicillin- and Tween 40-triggered glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 143–151, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3275-6>

KIND, Stefanie; BECKER, Judith; WITTMANN, Christoph. Increased lysine production by flux coupling of the tricarboxylic acid cycle and the lysine biosynthetic pathway-Metabolic engineering of the availability of succinyl-CoA in *Corynebacterium glutamicum*. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 184–195, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.005>

KJELDSEN, Kjeld Raunkjær; NIELSEN, Jens. In silico genome-scale reconstruction and validation of the corynebacterium glutamicum metabolic network. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 583–597, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.22067>

KOEK, Maud M. *et al.* Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 1272–1281, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac051683+>

KRÖMER, Jens Olaf *et al.* In-Depth Profiling of Lysine-Producing Corynebacterium glutamicum by Combined Analysis of the Transcriptome, Metabolome, and Fluxome. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 186, n. 6, p. 1769–1784, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.186.6.1769-1784.2004>

LANGE, Christian *et al.* Lrp of Corynebacterium glutamicum controls expression of the brnFE operon encoding the export system for l-methionine and branched-chain amino acids. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 158, n. 4, p. 231–241, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.003>

LAYRE, Emilie *et al.* Molecular profiling of Mycobacterium tuberculosis identifies tuberculosinyl nucleoside products of the virulence-associated enzyme Rv3378c. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 111, n. 8, p. 2978–2983, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1315883111>

LEDERER, Edgar. The mycobacterial cell wall. **Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 135–166, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1351/pac197125010135>

LEE, Joo Young *et al.* **The actinobacterium Corynebacterium glutamicum, an industrial workhorse**. [S. l.]: Korean Society for Microbiolog and Biotechnology, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4014/jmb.1601.01053>

LEUCHTENBERGER, Wolfgang; HUTHMACHER, Klaus; DRAUZ, Karlheinz. Biotechnological production of amino acids and derivatives: Current status and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 1–8, 2005. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00253-005-0155-y>

LI, Hedan *et al.* **Preventing mycolic acid reduction in *Corynebacterium glutamicum* can efficiently increase L-glutamate production.** [*S. l.: s. n.*], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108255>

LI, Liyuan; WADA, Masaru; YOKOTA, Atsushi. A comparative proteomic approach to understand the adaptations of an H<sup>+</sup>-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 to energy deficiencies. **Proteomics**, [*s. l.*], v. 7, n. 18, p. 3348–3357, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.200700287>

LIEBL, Wolfgang; KLAMER, Rosemarie; SCHLEIFER, Karl Heinz. Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [*s. l.*], v. 32, n. 2, p. 205–210, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00165889>

LIU, Xiuxia *et al.* Protein secretion in *Corynebacterium glutamicum*. **Critical Reviews in Biotechnology**, [*s. l.*], v. 37, n. 4, p. 541–551, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1206059>

LUBITZ, Dorit; WENDISCH, Volker F. Ciprofloxacin triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. **BMC Microbiology**, [*s. l.*], v. 16, n. 1, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0857-6>

MA, Qian *et al.* Comparative metabolomic analysis reveals different evolutionary mechanisms for branched-chain amino acids production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [*s. l.*], v. 43, n. 1, p. 85–95, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02207-5>

MA, Yuechao *et al.* Transcriptomic and metabolomics analyses reveal metabolic characteristics of L-leucine- and L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum* mutants. **Annals of Microbiology**, [*s. l.*], v. 69, n. 5, p. 457–468, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1431-2>

MAILAENDER, Claudia *et al.* The MspA porin promotes growth and increases antibiotic

susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, [s. l.], v. 150, n. 4, p. 853–864, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.26902-0>

MARCHAND, Christophe H. *et al.* Biochemical disclosure of the mycolate outer membrane of *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 194, n. 3, p. 587–597, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.06138-11>

MARRAKCHI, Hedia; LANÉELLE, Marie Antoinette; DAFFÉ, Mamadou. Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond. **Chemistry and Biology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 67–85, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.011>

MELBY, Jake A. *et al.* Novel Strategies to Address the Challenges in Top-Down Proteomics. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1278–1294, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jasms.1c00099>

MILLER, Rachel M. *et al.* Improved Protein Inference from Multiple Protease Bottom-Up Mass Spectrometry Data. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 3429–3438, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00330>

MIWA, K *et al.* Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for the glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**, [s. l.], v. 39, n. 2–3, p. 281–286, 1985. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4092934>

MIZUNO, Yuta *et al.* Altered acetylation and succinylation profiles in *Corynebacterium glutamicum* in response to conditions inducing glutamate overproduction. **MicrobiologyOpen**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 152–173, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mbo3.320>

MOSTOVENKO, Ekaterina *et al.* Comparison of peptide and protein fractionation methods in proteomics. **EuPA Open Proteomics**, [s. l.], v. 1, p. 30–37, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2013.09.001>

MUSTAFI, Nuriye *et al.* Application of a genetically encoded biosensor for live cell imaging

of L-valine production in pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085731>

NAKAMURA, Jun *et al.* Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 14, p. 4491–4498, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02446-06>

NAKAYAMA, Yoshitaka. *Corynebacterium glutamicum* mechanosensing: From osmoregulation to L-Glutamate secretion for the avian microbiota-gut-brain axis. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–19, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010201>

NAKAYAMA, Yoshitaka *et al.* ***Corynebacterium glutamicum* mechanosensitive channels: towards unpuzzling “glutamate efflux” for amino acid production.** [S. l.]: Springer Verlag, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0452-1>

NAKAYAMA, Yoshitaka *et al.* Evolutionary specialization of MscCG, an MscS-like mechanosensitive channel, in amino acid transport in *Corynebacterium glutamicum*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31219-6>

NGUYEN, Anh Q.D. *et al.* Fermentative production of the diamine Putrescine: System metabolic engineering of *corynebacterium glutamicum*. **Metabolites**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 211–231, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/metabo5020211>

NIEBISCH, Axel *et al.* Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 18, p. 12300–12307, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M512515200>

NIKEL, Pablo I. *et al.* *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, embden-meyerhof-parnas, and pentose

phosphate pathways. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 290, n. 43, p. 25920–25932, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.687749>

NOTTEBROCK, Daniel *et al.* Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 218, n. 2, p. 305–309, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2003.tb11533.x>

OHNISHI, J. *et al.* A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 217–223, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0883-6>

OLIVEIRA, Alberto *et al.* Insight of genus *Corynebacterium*: Ascertaining the role of pathogenic and non-pathogenic species. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. OCT, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01937>

OMUMASABA, Crispinus A. *et al.* *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 91–103, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000084564>

PLITZKO, M *et al.* Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 10, p. 3963–3967, 2008.

RAUL, João *et al.* Revisão. [s. l.], v. 42, n. 5, p. 546–559, 2019.

ROESSNER, Ute *et al.* Metabolic Profiling Allows Comprehensive Phenotyping of Genetically or Environmentally Modified Plant Systems Published by : American Society of Plant Biologists ( ASPB ) Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3871150> REFERENCES Linked references are av. [s. l.], v. 13, n. 1, p. 11–29, 2016.

SANCHEZ, Sergio *et al.* Our microbes not only produce antibiotics, they also overproduce amino acids. **Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 26–36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ja.2017.142>

SCHNEIDER, Jens *et al.* Characterization of the biotin uptake system encoded by the biotin-inducible bioYMN operon of *Corynebacterium glutamicum*. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-6>

SCHULTZ, Christian *et al.* Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: Dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 691–700, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0933-9>

SHEVCHENKO, Andrej *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>

SHIMIZU, H. *et al.* 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**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 291–298, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-002-0307-8>

SHINFUKU, Yohei *et al.* Development and experimental verification of a genome-scale metabolic model for *Corynebacterium glutamicum*. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 8, p. 1–15, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-43>

SHIRAI, Tomokazu *et al.* Study on roles of anaplerotic pathways in glutamate overproduction of *Corynebacterium glutamicum* by metabolic flux analysis. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 6, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-19>

SKINNER, Owen S. *et al.* An informatic framework for decoding protein complexes by top-down mass spectrometry. **Nature Methods**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 237–240, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3731>

STANCIK, Ivan Andreas *et al.* Serine/Threonine Protein Kinases from Bacteria, Archaea and Eukarya Share a Common Evolutionary Origin Deeply Rooted in the Tree of Life. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 430, n. 1, p. 27–32, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.11.004>

STRATTON, Kelly G. *et al.* PmartR: Quality Control and Statistics for Mass Spectrometry-Based Biological Data. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 1418–1425, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00760>

STRELKOV, Sergey; VON ELSTERMANN, Mirko; SCHOMBURG, Dietmer. Comprehensive analysis of metabolites in *Corynebacterium glutamicum* by gas chromatography/mass spectrometry. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 385, n. 9, p. 853–861, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/BC.2004.111>

SWOBODA, Jonathan G. *et al.* Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. **ChemBioChem**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 35–45, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbic.200900557>

SZARDENINGS, Florian; GUYMER, David; GERDES, Kenn. ParA ATPases can move and position DNA and subcellular structures. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 712–718, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.09.008>

TAKINAMI, Koichi; YAMADA, Yasutsugu; OKADA, Hiroshi. Biochemical Effects of Fatty Acid and its Derivatives on L-Glutamic Acid Fermentation: Part IV Biotin Content of Growing Cells of *Brevibacterium lactofermentum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 674–682, 1966. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb1961.30.674>

TRYFONA, Theodora; BUSTARD, Mark T. Fermentative production of lysine by *Corynebacterium glutamicum*: Transmembrane transport and metabolic flux analysis. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 499–508, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.037>

TSUGE, Yota; MATSUZAWA, Hiroki. Recent progress in production of amino acid-derived chemicals using *Corynebacterium glutamicum*. **World Journal of Microbiology and**

**Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03007-4>

VELLAICHAMY, Adaikkalam *et al.* Size-sorting combined with improved nanocapillary liquid chromatography-mass spectrometry for identification of intact proteins up to 80 kda. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 1234–1244, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac9021083>

VOGES, Raphael *et al.* Absolute quantification of *Corynebacterium glutamicum* glycolytic and anaplerotic enzymes by QconCAT. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 113, p. 366–377, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.10.008>

WANG, Ying Yu *et al.* Rational modification of the carbon metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to enhance l-leucine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 47, n. 6–7, p. 485–495, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02282-8>

WESSEL, D; FL~GGE, U I. **A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids**ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. [S. l.: s. n.], 1984.

WITTIG, Ilka; BRAUN, Hans Peter; SCHÄGGGER, Hermann. Blue native PAGE. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 418–428, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.62>

WOLF, Sabrina *et al.* Advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to produce high-value active ingredients for food, feed, human health, and well-being. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 197–212, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/EBC20200134>

WOLTERS, D. A.; WASHBURN, M. P.; YATES, J. R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 73, n. 23, p. 5683–5690, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac010617e>

XU, Yong Jiang *et al.* Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 56, p. 37–48, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.009>

YANG, Junjie; YANG, Sheng. Comparative analysis of *Corynebacterium glutamicum* genomes: A new perspective for the industrial production of amino acids. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 18, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3255-4>

YUKAWA, Hideaki *et al.* Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. **Microbiology**, [s. l.], v. 153, n. 4, p. 1042–1058, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003657-0>

ZHANG, Bin *et al.* Recent Progress on Chemical Production From Non-food Renewable Feedstocks Using *Corynebacterium glutamicum*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. December, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.606047>

ZHANG, Qiongqiong *et al.* Comprehensive optimization of the metabolomic methodology for metabolite profiling of *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 16, p. 7113–7121, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9095-1>