

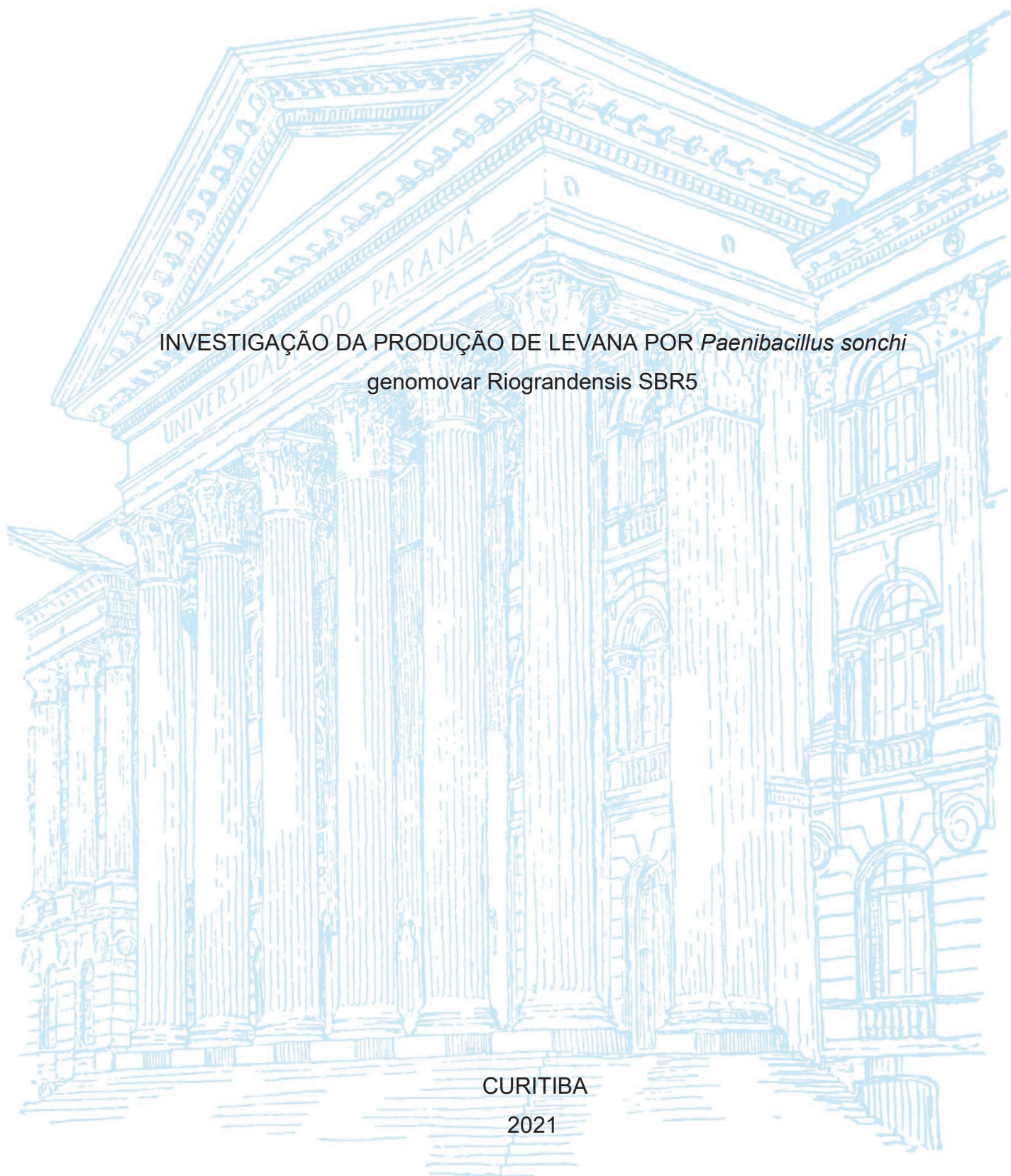
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MANOELLA RIBAS CARVALHO

INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LEVANA POR *Paenibacillus sonchi*
genomovar Riograndensis SBR5

CURITIBA

2021



MANOELLA RIBAS CARVALHO

INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LEVANA POR *Paenibacillus sonchi*
genomovar Riograndensis SBR5

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre ao curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof. Dr. Diogo R. Bazan Ducatti
Coorientador(a): Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá.

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Carvalho, Manoella Ribas.

Investigação da produção de levana por *Paenibacillus Sonchi* genomovar
Riograndensis SBR5. / Manoella Ribas Carvalho. – Curitiba, 2021.
105 f. : il.

Orientador: Diogo R. Bazan Ducatti.

Coorientador: Miguel Daniel Nosedá.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências –
Bioquímica.

1. Polissacarídeos. 2. Polímeros. 3. Bioinformática. 4. *Paenibacillus*. I.
Título. II. Ducatti, Diogo R. Bazan. III. Nosedá, Miguel Daniel. IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 660.63



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MANOELLA RIBAS CARVALHO** intitulada: **Investigação da produção de levana por *Paenibacillus Sonchi* genomovar *Riograndensis* SBR5**, sob orientação do Prof. Dr. DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho' são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 11 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

27/08/2021 18:10:39.0

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 10:51:13.0

ALAN GUILHERME GONÇALVES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/08/2021 13:50:09.0

RODRIGO VASSOLER SERRATO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Olorun e a todas as entidades de luz que me acompanham e me ajudam sempre. Agradeço por toda ajuda que recebi na casa TULO, sem esse auxílio eu não teria chegado até aqui.

Agradeço aos professores Diogo Ducatti e Miguel Nosedá, por todos os ensinamentos durante esse projeto.

Agradeço à minha amiga Marion (em memória) por sempre me incentivar e não me deixar desistir do Mestrado. Agradeço pelo ombro amigo: Luiz Henrique, Barbara, Agnes, Carol, Tati e Larissa, obrigada por sempre ouvir meus lamentos e me animar quando necessário. Agradeço pela parceria, por todos os bons momentos que viraram namoro, obrigada Gui por sempre estar ao meu lado.

Agradeço ao meu primo Tiago por ser uma inspiração como profissional, por ter me ensinado a ler e escrever e a ter disciplina nos estudos para chegar até aqui.

Agradeço ao centro de RMN, HPSEC pelas análises realizadas, ao CNPq pelo auxílio financeiro e ao auxílio financeiro da CAPES

Tí èyàn yoo bá huwa kan Eni ó ko Ranti esan kan ola

(Antes de um ato de hoje, deve-se considerar o resultado de amanhã)

(Ditado Yoruba)

RESUMO

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros naturais secretados no meio de cultivo que apresentam uma ampla variedade de estruturas e que são produzidos por bactérias e outros microrganismos. Como consequência, os EPS possuem uma grande aplicabilidade na indústria e grande potencial biotecnológico. Um desses EPS de grande apelo comercial é a levana, composta por unidades de frutofuranose com ligação β -(2 \rightarrow 6), obtida pela reação de transfrutossilacção pela ação da enzima levanasacarase durante a fermentação realizada por diferentes microrganismos. Estudos de bioinformática realizados com o genoma do *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis demonstraram que essa espécie possui 4 classes diferentes de Cazymes, sendo que uma dessas classes engloba uma enzima potencial produtora de levana, pertencente à família glicosil hidrolase 68 (GH68). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a possível produção de levana obtida pelo cultivo dessa cepa e avaliar a atividade de levanasacarase no sobrenadante do meio de cultura. Após as conclusões observadas nos estudos de bioinformática, o microrganismo *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 foi cultivado em quatro meios de cultura distintos. O crescimento celular foi avaliado mediante as composições de sais nos meios de cultura, apresentando desde uma composição pobre (M2), rico (M4), intermediário em nutrientes (M5) e por fim a avaliação de meio de cultura M4 contendo extrato de levedura e duas razões diferentes de C/N (M13). Após o cultivo, a biomassa bacteriana foi separada por centrifugação e as frações sobrenadantes obtidas foram analisadas por meio de cromatografia em camada delgada, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN) e cromatografia de exclusão de tamanho de alta pressão (HPSEC). As análises mostraram que as amostras continham apenas sacarose proveniente do meio de cultivo, sem a produção de EPS. Posteriormente, a atividade da levanasacarase foi estudada a partir do isolamento de frações proteicas do sobrenadante do meio de cultivo por precipitação com sulfato de amônio. Esse estudo também revelou que as frações de proteínas isoladas não continham atividade de levanasacarase. Assim, mesmo *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 contendo os genes que codificam enzimas da família GH68 onde são encontradas as levanasacarases, o microrganismo não apresentou a capacidade de produzir a levana nos diferentes meios testados contendo sacarose como fonte de carbono. Muitas das Cazymes encontradas na espécie de *P. sonchi* genomovar Riograndensis, possuem potenciais aplicações na área da saúde, nutrição e biotecnologia, dando margem para estudos futuros das enzimas pertencentes a essa espécie. Ainda existem muitos parâmetros do meio de cultura que devem ser estudados e otimizados para verificar a eficiência desses meios de cultura na produção de EPS ou levana. Os estudos de atividade enzimática revelaram uma possível de aldose β -D-frutossiltransferases (EC 2.4.1.162), que pode pertencer a GH68, uma atividade diferente do que se espera. Mais estudos são necessários para confirmação dessa possível atividade.

Palavras-chave: Exopolissacarídeo; *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis; Levana; Levanasacarase; Bioinformática.

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are natural polymers secreted into the culture medium that have a wide variety of structures and are produced by bacteria and other microorganisms. As a result, EPS have great applicability in industry and great biotechnological potential. One of these EPS of great commercial appeal is levan, which is composed of fructofuranose units with β -(2 \rightarrow 6) bonds, obtained by the transfructosylation reaction by the action of the enzyme levansucrase during the fermentation of microorganisms. Bioinformatics studies performed with the genome of *Paenibacillus sonchi* genomovar *Riograndensis* revealed that this species has 4 different classes of Cazymes, one of which includes a potential levan producing enzyme, belonging to the glucosyl hydrolase 68 (GH68) family. Thus, the objective of this work was to evaluate the possible production of levan obtained by the cultivation of this strain and to investigate the activity of levansucrose in the culture media. After the conclusions observed in bioinformatics studies, *P. sonchi* genomovar *Riograndensis* SBR5 was cultivated in four different culture media. Cell growth was evaluated by the composition of salts in the culture media, presenting from a poor composition (M2), intermediate (M4), rich in nutrients (M5) and finally the evaluation of M4 culture medium containing yeast extract and two different C/N ratios (M13). After cultivation, the bacterial biomass was separated by centrifugation and the supernatant fractions obtained were analyzed by thin layer chromatography, ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) and high pressure size exclusion chromatography (HPSEC). The analyzes showed that the samples presented only sucrose from the culture medium, without the production of EPS. Subsequently, levansucrase activity was studied from the isolation of protein fractions from the supernatant by ammonium sulfate precipitation. This study also revealed that the isolated protein fractions did not contain levansucrase activity. Thus, even though *P. sonchi* genomovar *Riograndensis* SBR5 contains genes that codify enzymes of GH68 family where levansucrases are found, the microorganism did not show the capacity to produce levan in the different tested media containing sucrose as carbon source. Many of the Cazymes found in the species of *P. sonchi* genomovar *Riograndensis* have potential applications in the areas of health, nutrition and biotechnology, giving room for future studies of enzymes belonging to this species. There are still many culture medium parameters that must be studied and optimized to verify the efficiency of these culture media in the production of EPS or levan. Enzyme activity studies revealed a possible aldose of β -D-fructosyltransferases (EC 2.4.1.162), which may belong to GH68, a different activity than expected. More studies are needed to confirm this possible activity.

Keywords: Exopolysaccharide; *Paenibacillus sonchi* genomovar *Riograndensis*; Levan; Levansucrase; Bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FORMAÇÃO DE LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS PELA AÇÃO DAS GLICOSILTRANSFERASES.....	21
FIGURA 2 - MECANISMO GERAL DE CATALISE ÁCIDA EXERCIDO PELAS GLICOSIL HIDROLASES.....	23
FIGURA 3 - MECANISMO DE β -ELIMINAÇÃO DAS POLISSACARÍDEO LIASES ..	25
FIGURA 4 - ESTRUTURA DA LEVANA.....	37
FIGURA 5 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DOS FOS E LEVANAS	39
FIGURA 6 - ATIVAÇÃO DA CEPA E INOCULAÇÃO NO MEIO	44
FIGURA 7 - OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES	45
FIGURA 8 - GRÁFICO DE VENN OBTIDO APÓS ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE <i>PAENIBACCILUS SONCHI GENOMOVAR RIOGRANDENSIS</i> NO SERVIDOR DBCAN.....	50
FIGURA 9 - ESTRUTURA EM ALTA RESOLUÇÃO DA LEVANASACARASE DE <i>B. SUBTILIS</i>	54
FIGURA 10 - ALINHAMENTO DE PSRSACB (WP_020434349.1) DE <i>P. SONCHI GENOMOVAR RIOGRANDENSIS</i> , COM BS-SACB E BM-SACB DE <i>B. MEGATERIUM</i> E <i>B. SUBTILIS</i> , RESPECTIVAMENTE.....	57
FIGURA 11 - ANÁLISE DE PEPTÍDEO SINAL PARA PSRSACB	59
FIGURA 12 - CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>P. SONCHI GENOMOVAR RIOGRANDENSIS</i> EM DIFERENTES MEIOS: M2, M4, M5, M13CN15 E M13CN30.....	61
FIGURA 13 - DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES (A), PROTEÍNAS (B) E AÇÚCARES TOTAIS (C) DAS FRAÇÕES M4-3, M4-4, M5-2, M5-3, M13CN15 E M13CN30.	66
FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO M2-2 (AZUL) M4-3 (VERMELHO) E M5-2 (VERDE)	69
FIGURA 15 – $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC DA FRAÇÃO OBTIDA DO CULTIVO DO MEIO M2-2..	70
FIGURA 16 - - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA, DAS FRAÇÕES M2-2, M4-3, M5-2 e M5-3.....	70
FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H de M13CN15 e M2-2.....	72
FIGURA 18 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA, REALIZADA NAS FRAÇÕES OBTIDAS, APÓS HIDROLISE.M13CN15	73

FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE 1H M13CN15D.....	74
FIGURA 20 - 1H/13C HSQC DA FRAÇÃO OBTIDA DO CULTIVO DO MEIO M13CN15 DIALISADA, 70°C, 400 MHZ. SOLVENTE D2O, ACETONA COMO PADRÃO INTERNO EM 2,208 PPM E 32,69 PPM PARA 1H E 13C.	74
FIGURA 21 - PERFIS DE ELUIÇÃO DE M13CN5 OBTIDOS POR HPSEC-MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO.	75
FIGURA 22 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE P.1 E P.2....	77
FIGURA 23 - REAÇÃO DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DE GLICOSIDASES GH68 (EC 2.4.1.10 E EC 2.4.1.162).....	79
FIGURA 24 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE P.1 E P.2 EM 24 HORAS DE INCUBAÇÃO A 37°C.....	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE EPS'S BACTERIANOS E SUAS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS	30
TABELA 2 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO PELO GÊNERO <i>Paenibacillus</i> e <i>Bacillus</i>	32
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA SINTÉTICOS M2, M4, M5 e M13.....	42
TABELA 4 - CAZYMES DE <i>P. SONCHI GENOMOVAR RIOGRANDENSIS</i> ENCONTRADAS PELO SERVIDOR DBCAN	51
TABELA 5 - DENSIDADE ÓTICA, RENDIMENTO E TEMPO DE CULTIVO DAS DIFERENTES FRAÇÕES GERADAS.....	63
TABELA 6 RENDIMENTO E TEOR DE PROTEÍNA DOS PRECIPITADOS P.1 E P.2	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

dbCAN	- <i>Carbohydrate-active enzyme ANnotation</i>
CAZymes	- <i>Carbohydrate-Active Enzymes</i>
CBMs	- Módulos de ligação de carboidratos
PLs	- Polissacarídeo liases
CEs	- Carboidrato esterases
GHs	- Glicosil hidrolases
GTs	- Glicosil transferases
FOS	- Fruto-oligossacarídeos
GlcA	- Ácido glucurônico
UDP-Gal	- Difosfato de uridina galactose
GDP-Man	- Guanosina difosfato manose
CMP-NeuAc	- Citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico
TLC	- <i>Thin layer chromatography</i>
CCD	- Cromatografia em camada delgada
PBS	- Tampão fosfato
EPS	- Exopolissacarídeo
AA	- Proteínas auxiliares
CBM	- Módulos de ligação a carboidratos
GH	- Glicosil hidrolases
GT	- Glicosil transferases
PL	- Polissacarídeo liases
CE	- Carboidrato esterases
®	- marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	17
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivos específicos.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS	18
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CAZYMES EM FAMÍLIAS	19
2.2.1 Glicosiltransferases	19
2.2.2 Glicosil hidrolases	21
2.2.3 Polissacarídeos Liases.....	24
2.2.4 Proteínas auxiliares	25
2.2.5 Carboidrato esterases (CEs).....	26
2.2.6 Módulos de ligação de carboidratos (CBMs).....	26
2.3 EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)	27
2.3.1 Produção de EPS por espécies do gênero <i>Paenibacillus</i>	31
2.4 <i>PAENIBACILLUS SONCHI</i> GENOMOVAR RIOGRANDENSIS SBR5	34
2.4 Produção de Levanas por Levansacarase	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 REATIVAÇÃO DE <i>P. SONCHI</i> GENOMOVAR RIOGRANDENSIS SBR5	41
3.2 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	42
3.3 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO	42
3.3.1 Condições de cultivo de <i>P. sonchi</i> genomovar Riograndensis SBR5 nos meios M2, M4, M5 e M13.	44
3.3.2 Procedimento de precipitação dos sobrenadantes de cultivos de <i>P. sonchi</i> genomovar Riograndensis SBR5 nos meios M2, M4, M5 e M13	44
3.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LEVANASACARASE	45
3.4.1 Purificação das proteínas do sobrenadante do meio M13CN15.	45
3.4.2 Teste da atividade da enzima levansacarase em P.1 e P.2	46
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NAS ANÁLISES DAS FRAÇÕES	47
3.5.1 Determinação do teor de proteínas, carboidratos totais, açúcar redutores.	47
3.5.2 Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	48
3.5.3 Hidrolise	48

3.5.4 Cromatografia em camada delgada	48
3.5.5 Análise cromatográfica de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulo e índice de refração (HPSEC-MALLS-RI)	

[48](#)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
---------------------------------------	---------------------------

4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS PROVÁVEIS ENZIMAS ATIVAS EM CARBOIDRATOS (CAZYMES) EM <i>PAENIBACILLUS SONCHI</i> GENOMOVAR RIOGRANDENSIS	
---	--

SBR5 [49](#)

4.2 INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LEVANA E FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS) POR <i>P. SONCHI</i> GENOMOVAR RIOGRANDENSIS SBR5 EM MEIOS DE CULTURA SINTÉTICOS	59
--	--------------------

4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTIVO NO MEIO M13CN15 E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LEVANASACARASE	77
---	----

4.3.1 Purificação das proteínas no sobrenadante do meio de cultivo M13CN15	77
--	----

4.3.2 Avaliação da atividade enzimática de P.1 e P.2	78
--	----

CONCLUSÕES	83
-------------------------	-----------

REFERÊNCIAS	84
--------------------------	-----------

APÊNDICE 1 – CAZYMES IDENTIFICADAS <i>PAENIBACILLUS SONCHI</i> GENOMOVAR RIOGRANDENSIS SBR5 PELO DBCAN.	95
---	-----------

APÊNDICE 2 – ALINHAMENTO DAS GH68 WP_020434349.1 DE <i>PAENIBACILLUS SONCHI</i> GENOMOVAR RIOGRANDENSIS SBR5 E A LEVANASACARASE DE <i>PAENIBACILLUS POLYMIXA</i>	16
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos são polímeros naturais. Por serem produzidos por uma gama de diferentes microrganismos, os exopolissacarídeos (EPSs) podem apresentar uma variedade de estruturas e massa molar e, como consequência, apresentam uma ampla variabilidade de aplicações. No ramo alimentício e cosmético, polissacarídeos como a xantana, curdulana, levana e gelana vêm sendo utilizados como estabilizadores, emulsificantes, antioxidantes e aditivos reológicos (ÖNER, et al, 2016; ROSALAM & ENGLAND, 2006; STEPHEN, et al., 2006). No setor agrícola, a xantana tem sido usada como um aditivo para aprimorar a aderência e a permanência de pesticidas, devido suas propriedades reológicas (NWODO, et al., 2012).

Na área médica, os EPS vêm sendo estudados quanto a sua atividade antitumoral, antiviral, antioxidante e imunoestimuladora, podendo ainda ter potencial para servir como agentes usados na liberação de medicamento (RAVEENDRAN et al., 2013). Já no âmbito ambiental, os exopolissacarídeos têm sido utilizados como biofloculantes, bioabsorventes e agente de remoção de metais pesados (WANG et al., 2008) (WANG, et al, 2008).

É notável o crescente interesse do mercado por materiais menos agressivos ao meio ambiente. Dessa forma os polissacarídeos mostram-se relevantes aos olhos de pesquisadores e indústrias, visto que são bons exemplos de eco-materiais por serem biodegradáveis e provirem de fontes naturais, tais como plantas, algas e bactérias (RÜTERING et al., 2016).

Rüuterling et al. (2016) relataram que apesar de cerca de 89 espécies de *Paenibacillus* serem conhecidas, existem poucos trabalhos que exploraram os EPSs produzidos por estes microrganismos, deixando lacunas para novos estudos utilizarem esse gênero que contém espécies com grande potencial biotecnológico, como *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis SBR5.

Existe uma carência de trabalhos que abordem o estudo do EPS secretados pelo espécie *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5.

Além disso, a descoberta e o estudo apurado da estrutura de novos polissacarídeos bacterianos entrega novas alternativas para o mercado de polímeros naturais. Sendo assim o(s) exopolissacarídeo(s) produzido(s) pela bactéria *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 pode(m) ser mais uma opção biodegradável, proveniente de fonte natural para ser utilizada na indústria, pois sabe-se que o

mercado de polímeros naturais movimenta na faixa de bilhões de dólares por ano. No ano de 2018 o mercado de hidrocolóides, onde estão inclusos os exopolissacarídeos comerciais, movimentou cerca de 8,8 bilhões. Para o ano de 2023, espera-se um crescimento nesse valor, atingindo cerca de 11,4 bilhões de faturamento (Markets and markets, 2018). A pesquisa e as publicações a respeito da estrutura química fina dos EPS's secretados por essa espécie abrem possibilidades para o estudo de novas aplicações industriais e biotecnológicas dessas biomacromoléculas.

1.1 JUSTIFICATIVA

A produção de diversos EPS's, em particular as levanas, com relevância no mercado de polímeros naturais e grande potencial biotecnológico produzidos por espécies do gênero *Paenibacillus* é objeto de estudo em diversas áreas. *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 apresenta em seu genoma genes que codificam enzimas que podem produzir estes exopolissacarídeos, como por exemplo, uma glicosil hidrolase, que apresenta atividade de transferase, pertencente à família GH68 e potencial produtora de levana ou FOS. Ainda, a adição de diferentes fontes de carbono ao meio de cultivo pode produzir diferentes EPS. No entanto, não há estudos científicos sobre exopolissacarídeo produzidos por *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5. Além disso, existe uma carência no conhecimento sobre estruturas químicas finas dos possíveis EPS produzidos tanto pelo gênero *Paenibacillus*, quanto pela espécie *P. sonchi* genomovar Riograndensis (CCGB 1313).

1.2 OBJETIVOS

Verificar se o cultivo de *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 utilizando sacarose como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio, pode levar a produção de levana e/ou FOS a partir da expressão de levanasacarase no meio de cultivo.

1.2.1 Objetivos específicos

- 1 Análise das Cazymes no genoma de *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis SBR5, potenciais enzimas candidatas na produção de EPS;

- 2 Cultivar *P. sonchi* em meios de cultura contendo sacarose como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio como sulfato de amônio e cloreto de amônio;
- 3 Isolar e purificar e caracterizar por métodos químicos e espectroscópicos o EPS produzido nos cultivos;
- 4 Avaliar a atividade enzimática de levansacarase em frações proteicas obtidas a partir do sobrenadante de cultivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

As enzimas conhecidas como enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) são protagonistas na catálise da síntese e da clivagem de glicanos e gliconjugados sendo classificadas em diversas classes. A síntese proteica dessas moléculas pode envolver

de 1 a 5% dos genes de um organismo vivo. Os carboidratos apresentam uma variedade estereoquímica e diversas funções biológicas, e por consequência as CAZymes apresentam inúmeras aplicações na área da saúde, nutrição e biotecnologia. Essas enzimas vêm sendo estudadas por um longo período, a α -amilase e invertase foram isoladas na segunda metade do século 19, já a lisozima foi a primeira CAZyme que teve sua estrutura tridimensional determinada (GARRON & HENRISSAT, 2019; LOMBARD et al., 2014). Polímeros e oligômeros de carboidratos, resultantes da catálise dessas enzimas são úteis a quase todos os organismos vivos, com múltiplas finalidades, como para fins energéticos, estruturais e participando de cascatas de sinalização intra e intercelular, incluindo interações patógeno-hospedeiro (LOMBARD et al., 2010, 2014).

As CAZymes são classificadas em famílias. No grupo das enzimas envolvidas na síntese de carboidratos estão as Glicosiltransferases (GT), e no grupo das que degradam carboidratos encontram-se as glicosídeo hidrolases (GH), polissacarídeos liases (PL) e as esterases de carboidratos (CE) (GARRON & HENRISSAT, 2019; LOMBARD et al., 2014). As proteínas são classificadas em famílias de acordo com a sequência de aminoácidos similares a pelo menos uma enzima bioquimicamente já caracterizada pertencente ao grupo, isto porque as sequências que exibem baixa similaridade não são incluídas na família e nem utilizadas para compor prováveis famílias, uma vez que parentes distantes de CAZymes podem ter funções diferentes (HENRISSAT, 1991; LEVASSEUR et al., 2013; LOMBARD et al., 2010).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CAZYMES EM FAMÍLIAS

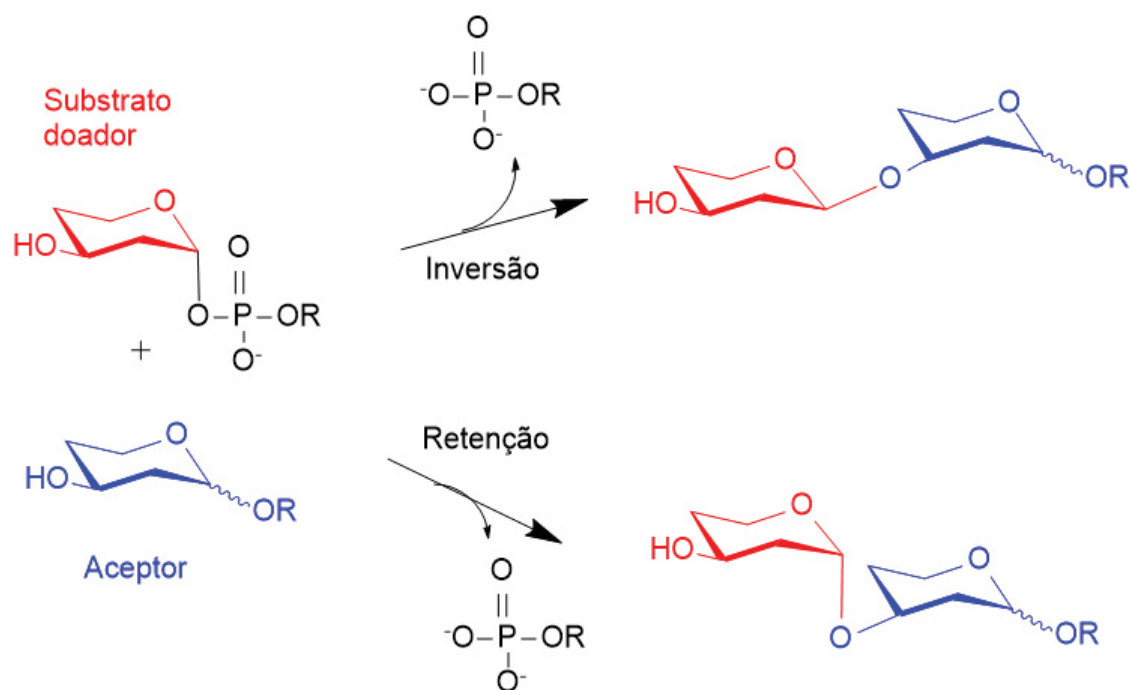
2.2.1 Glicosiltransferases

As glicosiltransferases estão classificadas em 114 famílias com base na sua estrutura já caracterizada. As glicosiltransferases comumente utilizam açúcares como substratos aceptores, no entanto, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos antibióticos ou outras moléculas menores também podem ser utilizadas. A transferência de glicosil ocorre, geralmente para o oxigênio nucleofílico de uma hidroxila do aceptor, mas ela

também pode ocorrer para o nitrogênio, podendo formar ligações *N*-glicosídicas, para o enxofre, formando um tioglicosídeo em plantas, e ainda para um carbono, formando um *C*-glicosídeo (<http://www.cazy.org>, CAZy, n.d.; LAIRSON et al., 2008) .

A biossíntese de dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos é dependente da ação das glicosiltransferases (GTs) (EC 2.4. xy). Esse grupo de enzimas utilizam um doador glicosil como substrato, catalisando a transferência do monossacarídeo para moléculas aceptoras específicas, originando uma ligação glicosídica (Figura 1). Os doadores glicosil, geralmente são encontrados na forma de difosfato de nucleosídeo, como UDP-Gal, GDP-Man. Entretanto, monofosfato de nucleosídeo (CMP-NeuAc), fosfatos lipídicos (dolicol oligossacarídeos de fosfato) e glicosil fosfatos também podem ser utilizados (LAIRSON et al., 2008). A reação catalisada por essas enzimas ocorre de maneira geral como uma substituição nucleofílica no carbono anomérico, podendo ocorrer retenção ou inversão da configuração anomérica (SINNOTT, 1990). De acordo com a estereoquímica dos substratos e dos produtos que estão envolvidos na catálise, essas enzimas podem ser classificadas como enzimas de retenção ou de inversão de configuração, ou seja, a configuração do novo produto pode ser retido ou invertido em relação ao substrato doador (LAIRSON et al., 2008; SINNOTT, 1990).

FIGURA 1 - FORMAÇÃO DE LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS PELA AÇÃO DAS GLICOSILTRANSFERASES



Fonte: O autor, 2021.

2.2.2 Glicosil hidrolases

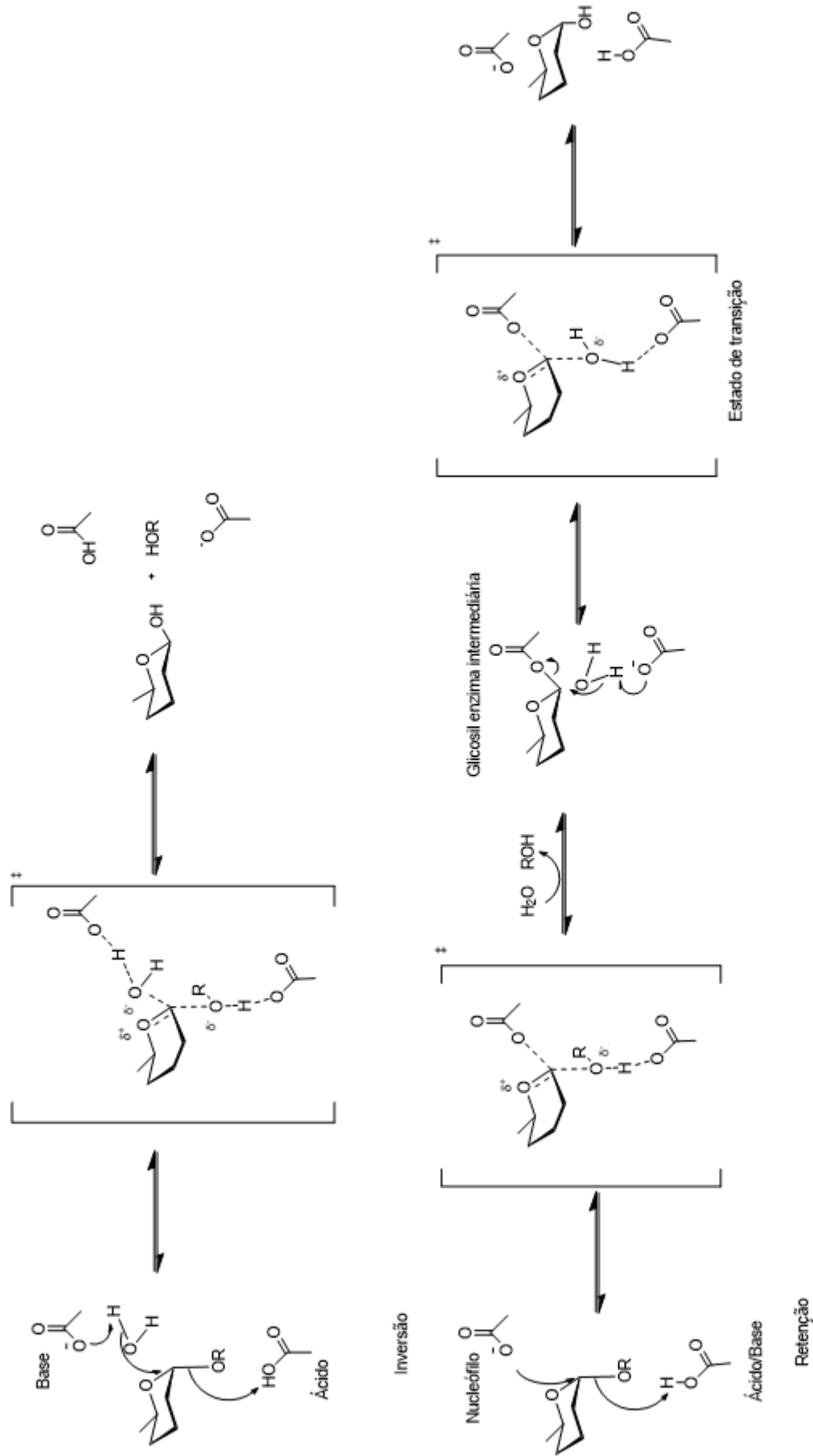
O grupo das Glicosil hidrolases é composto até o momento por 171 famílias (<http://www.cazy.org>, CAZy). São enzimas que atuam nas quebras das ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre o carboidrato e uma porção que não é considerada carboidrato. Seus membros podem ser encontrados nos três principais reinos: arqueobactérias, eubactérias e eucariotos (HENRISSAT, 1991).

Sabe-se que as glicosil hidrolases atuam por meio de um mecanismo geral de catálise ácida, onde duas unidades de aminoácidos participam de uma reação de deslocamento único ou duplo deslocamento, podendo resultar, respectivamente, em uma inversão ou uma retenção da configuração no carbono anomérico (Figura 2) (HENRISSAT, 1991). As glicosidases, atuantes na transformação em açúcares com a mesma configuração anomérica do substrato, tendem a catalisar a reação utilizando duas etapas envolvendo um aminoácido nucleófilo, seguido de um deslocamento nucleofílico pela água (PHILLIPS, 1966). Os primeiros mecanismos para enzimas de

retenção e inversão foram propostos para o grupo das glicosil hidrolases, sendo que o primeiro mecanismo de inversão foi proposto primeiramente por Koshland (1953). Segundo o autor, a inversão da configuração é primordial para o deslocamento biomolecular em centros de carbono saturado. As enzimas retenção de configuração anomérica funcionam por meio de um mecanismo duplo de deslocamento envolvendo um aminoácido nucleofílico, onde um intermediário glicosil-enzima é formado e então hidrolisado com apoio de outro aminoácido catalítico ácido/base, via estados de transição semelhantes a íons oxocarbênio. Já o mecanismo de inversão acontece em uma etapa, onde ocorre o deslocamento de um glicosil, envolvendo um ataque do nucleófilo, podendo ser uma molécula de água ou fosfato, ao carbono anomérico, gerando um deslocamento direto. Um dos grupos carboxilato no sítio ativo serve como base catalítica e outro grupo carboxílico atua como um catalisador ácido, protonando o oxigênio glicosídico, que sai juntamente com a quebra da ligação (SINNOTT, 1990; WITHERS, 1995; YIP & WITHERS, 2012).

Além das atividades de hidrolases (EC 3.2.1.X, mais abundante), também já foram observados nesta classe de enzimas, algumas atividades de transferase (EC: 2.4.1.X), liase (4.2.2.x) e até mesmo isomerases (EC 5.4.99.x) (<http://www.cazy.org>). (KITAOKA, 2015; STAM, et al., 2006).

FIGURA 2 - MECANISMO GERAL DE CATALISE ÁCIDA EXERCIDO PELAS GLICOSIL HIDROLASES



2.2.3 Polissacarídeos Liases

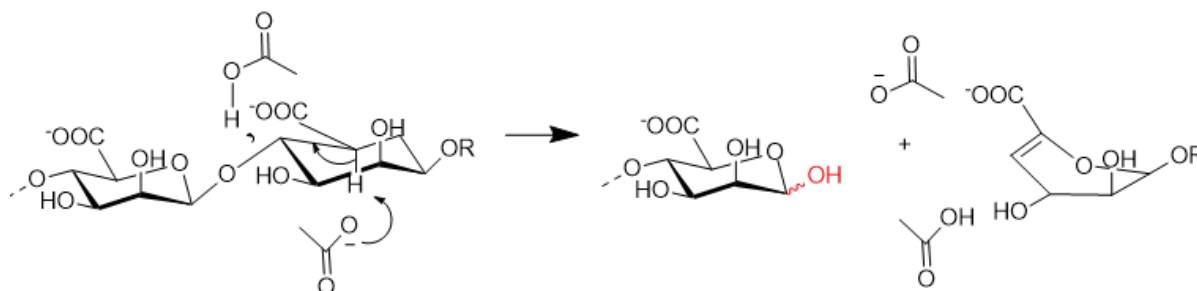
O grupo das polissacarídeos liases (PLs) (EC 4.2.2.x), possui até o momento, 41 famílias (<http://www.cazy.org>, CAZy), e atuam na clivagem de ligações glicosídicas em polissacarídeos que contém ácido urônico por meio do mecanismo de eliminação β , gerando unidade de ácido hexenurônico insaturado e uma nova extremidade redutora no ponto de clivagem. As enzimas dessa classe podem ser encontradas em bacteriófagos, arqueias, eubactérias e eucariotos superiores (fungos, algas, mamíferos e plantas) (LOMBARD et al., 2010). Muitas das enzimas dessa classe são de origem microbiana, no entanto seus substratos podem ser encontrados tanto no grupo dos eucariotos quanto no grupo dos procariontes. De maneira geral, os produtos finais são oligossacarídeos de variados graus de polimerização, podendo também resultar em monossacarídeos (SUTHERLAND, 1995).

Seu papel é complementar a atividade das glicosídeo hidrolases. As PLs atuam auxiliando a degradação de polissacarídeos e a clivagem catalítica promovida por estas liases ocorre sem intervenção da água. É importante ressaltar que não é possível observar nenhum tipo de transglicosilação durante a sua ação, um ponto que pode diferenciar a classe das glicosídeo hidrolases. As enzimas que promovem clivagem de polissacarídeos aniônicos apresentam uma característica notável de clivagem, catalisada por base e β -eliminação (Figura 3) em ligações β -(1 \rightarrow 4) ou α -(1 \rightarrow 4) (LOMBARD et al., 2010; MACDONALD & BERGER, 2014; SUTHERLAND, 1995). Para as alginato-liases, por exemplo foi proposto um mecanismo de ação em três etapas. Primeiramente ocorre a remoção da carga negativa no ânion carboxilato, seguida da remoção de um próton de C-5, com catalise básica, e por fim, uma eliminação da ligação 4-O-glicosídica (SUTHERLAND, 1995).

A presença de polissacarídeos liases pode ser notada em diversos processos bioquímicos, tais como a reciclagem de matriz de tecido e patogenia. Na indústria é possível ressaltar seu uso nos setores alimentícios e médicos, com o uso de ácidos poliurônicos, o que torna as PLs bons catalisadores para modificação de substratos como as pectinas, alginatos e heparinas para aplicação biotecnológica (SUTHERLAND, 1995).

FIGURA 3 - MECANISMO DE β -ELIMINAÇÃO DAS POLISSACARÍDEO LIASES

Fonte: O autor, 2021.



2.2.4 Proteínas auxiliares

A classe proteínas auxiliares (AA), agrupa 16 famílias de enzimas lignolíticas e 7 famílias monooxigenases de polissacarídeo lítico (<http://www.cazy.org>, CAZy). As enzimas AA não atuam diretamente na catálise dos carboidratos, no entanto estão presentes auxiliando nos processos de despolimerases polissacarídicas clássicas. A descoberta de membros da família CBM33 e GH61 identificados como monooxigenases polissacarídicas líticas (LPMO), levaram a uma nova classificação, dada como atividades auxiliares (AA) (LEVASSEUR et al., 2013).

Assim como as lignolíticas, as monooxigenases também auxiliam enzimas clássicas, neste caso, na degradação de celulose, catalisando a clivagem oxidativa da celulose, utilizando agentes redutores de baixo peso molecular como o ascorbato, galato, glutatona reduzida e até a lignina (LEVASSEUR et al., 2013).

Essa cooperação entre enzimas específicas na ação de carboidratos se dá pela associação dos carboidratos à lignina e celulose presentes nas paredes celulares das plantas. De maneira geral as “atividades auxiliares” são um grande grupo de módulos catalíticos envolvidos na degradação da parede celular das plantas. Para ser integrada a essa categoria, o critério consiste na capacidade de auxiliar enzimas agrupadas nas outras classes (GH, PL e CE), para que estas possam acessar os carboidratos incrustados nas paredes celulares das plantas. Portanto, os membros dessa categoria (AA) não estão atrelados a um único tipo de mecanismo de reação, tampouco ligados a um substrato específico (HENRIKSSON et al., 2000; LANGSTON et al., 2012).

2.2.5 Carboidrato esterases (CEs)

A classe dos CEs possuem 18 famílias (<http://www.cazy.org>, CAZy). As carboidrato esterases catalisam -O ou -N desacetilação em carboidratos. Consideram-se duas classes de carboidrato esterases: uma em que o açúcar se apresenta como ácido, como nos ésteres metílicos de pectina, e outra que o açúcar se comporta como álcool, como em xilanos acetilados. O mecanismo mais comum para essa classe é a desacetilação catalisada pela tríade catalítica Ser-His-Asp. Esse tipo de mecanismo é muito semelhante ao realizado por serinas proteases e lipases. Vale ressaltar que o mecanismo de desacetilação catalisada por Zn^{2+} também pode ser realizado pelas esterases (NAKAMURA et al., 2017).

Sabe-se que grande parte das CEs tem importância como biocatalisadores em diversos bioprocessos industriais, no entanto grande parte dessas enzimas ainda não teve seu mecanismo de ação desvendado nem tampouco suas estruturas tridimensionais determinadas e analisadas (NAKAMURA et al., 2017). É comum a presença de enzimas que catalisam a remoção de modificações baseadas em ésteres de mono-, oligo- e polissacarídeos, estarem presentes nas famílias de CEs. Dessa forma, a remoção das porções aciladas dos polissacarídeos pode acelerar a sua degradação, facilitando o acesso das glicosil hidrolases e auxiliando também na sacarificação da biomassa. Esse processo pode propiciar a possibilidade de várias aplicações biológicas e biotecnológicas principalmente no setor de biocombustíveis, na área de produção de materiais sustentáveis e produtos produzidos a partir da biomassa (CHRISTOV & PRIOR, 1993; GUPTA & VERMA, 2015). Além disso, as famílias CE1, CE4, CE7, CE11 e CE14, contém enzimas alvo no estudo de design de drogas e com grande potencial para aplicações biomédicas (NAKAMURA et al., 2017).

2.2.6 Módulos de ligação de carboidratos (CBMs)

A classe dos CBMs possui 88 famílias (<http://www.cazy.org>, CAZy). É comum que as enzimas de carboidratos possuam uma estrutura modular contendo módulos não catalíticos que se apresentam anexados às enzimas já citadas. Os módulos de ligação de carboidratos apresentam-se como uma sequência de aminoácidos anexado a uma CAZyme, esta por sua vez apresenta uma dobra discreta onde está contido esse módulo, o qual tem sua atividade ligada aos carboidratos. Existem

exceções de CBMs em proteínas de ancoragem celulosomal e poucos são os casos de CBMs putativos independentes. O fato dos módulos de ligação se apresentarem como módulos contidos de enzimas maiores, resume essa classe como a parte das demais classes de proteínas de ligação de carboidratos, como lectinas e proteínas de transporte de açúcar (GILKES, et al., 1988; TOMME et al., 1988).

Muitas glicosil hidrolases que utilizam substratos insolúveis, tais como polissacarídeos, são classificadas como modulares, pois compreendem módulos catalíticos conjuntos como uma CBM. Isso ocorre porque a reação de degradação realizada pelas GHs se torna muitas vezes ineficiente, uma vez que seus substratos alvos podem possuir suas ligações glicosídicas, alvo inacessíveis para o sítio ativo da enzima. As CBMs promovem este acesso a enzima (BORASTON et al., 2004).

2.3 EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

Os polímeros de carboidratos encontrados no exterior das células são chamados de EPS e podem conter estruturas variadas, com composição química e propriedades físicas diversas, podendo ser produzidos tanto por células procarióticas em diferentes grupos de bactérias, quanto eucarióticas, como fungos, leveduras protozoários e algas unicelulares (SUTHERLAND, 1980).

Bactérias podem produzir diversos polissacarídeos, que estão associados com diferentes funções fisiológicas, como estrutural (peptideoglicano) e proteção ao ambiente (exopolissacarídeos e polissacarídeos capsulares) (WHITFIELD, et al., 2017).

Além das condições de cultivo é importante ressaltar que a presença de sais de amônio e sais inorgânicos, que contribuem com íons para o meio de cultura e como cofatores enzimáticos na síntese dos polissacarídeos, são de grande importância na formulação do meio de cultivo. Podemos dividir esses sais em macronutrientes como: fósforo (KH_2PO_4), potássio (KCl), magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou MgSO_4), cálcio (CaCl_2), sódio (NaCl ou $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e em micronutrientes como: ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), zinco (ZnO ou $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), molibdênio ($\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), iodo (KI) e cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (SUTHERLAND, 1993). Além da importância de macro e micronutrientes, Ernandes (2006) e BELAICH e SENEZ (1965) relatam a relevância da relação carbono/nitrogênio para a produção de EPS como a levana, pois

grandes quantidades de nitrogênio podem acarretar prejuízos na produção da levana, para o gênero *Bacillus*, por exemplo.

Os polissacarídeos capsulares (CPS's) e exopolissacarídeos (EPS's), são polímeros extracelulares. No entanto, os CPS's são formadores de uma camada hidrofílica, chamada cápsula que permanecem associados com a superfície celular. Sua capacidade de retenção na superfície celular varia de espécie a espécie e raramente é conhecida. Alguns mecanismos conhecidos envolvem a interação do CPS com a superfície celular através de ligações covalentes ao peptidoglicano ou glicolipídios presentes na membrana. Interações não covalentes baseadas na interação eletrostática do CPS com outros componentes da membrana externa também são relatadas. Os EPS's, diferentemente dos CPS's, após serem secretados mantêm uma associação limitada com a superfície celular. São comuns em muitos tipos de patógenos e simbioses de plantas, podendo ser encontrados tanto em superfície de tecidos quanto em superfícies não biológicas, como tubulações e implantes médicos, formando biofilmes (WHITFIELD, et al., 2017)

A função de CPS e EPS varia de acordo com o ambiente que o microrganismo está inserido. Muitos desses polímeros estão associados a prevenção do dessecação da célula, uma vez que apresentam propriedades hidratantes. Em patógenos, os CPS's previnem a fagocitose e apresentam a capacidade de camuflar os receptores subjacentes para bacteriófagos, dificultando a ação desses vírus. No entanto, os anticorpos específicos para CPS's superam essas limitações, tornando esse tipo de polissacarídeo um ótimo candidato para o desenvolvimento de vacinas, tais como a Pevnar[®] e Pneumovax[®] utilizadas contra pneumococos (WHITFIELD, et al., 2017).

É possível citar quatro mecanismos de produção para os CPS's e EPS's: a) rota dependente de Wzx/Wzy, proteínas com atividade de sintase e flipase; b) rota dependente de transportador ABC; c) Rota dependente de sintase e d) síntese extracelular dependente de enzima com atividade de sacarase (SCHMID et al., 2015). Uma parte dos CPS's é formado por uma via, relacionada somente com bactérias Gram-negativas, que envolve um transportador ABC, no entanto, a grande maioria dos CPS's de cadeia mais complexa e ramificada tanto em Gram-positivas quanto em Gram-negativas são sintetizados pela via que requer uma proteína polimerase (Wzy). Os EPS produzidos por bactérias Gram-positivas utilizam a via dependente de Wzx/Wzy. Uma terceira via dependente de sintase pode ser citada, e é observada

tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas. Para estas, ainda existe um tipo de síntese externa, a qual se utiliza de uma ponte periplasmática que liga a sintase a um canal proteico da membrana externa (WHITFIELD, et al., , 2017).

Os EPS desempenham diversas funções para a célula. A função de adesão celular pode ser conferida às bactérias pela ação dos EPS, originando um aglomerado celular com várias camadas hidratadas pelo exopolissacarídeo (biofilme), assim essa matriz organizada possui a capacidade de aderência em superfícies, ajudando também na proteção celular (COSTERTON et al., 1995). Por serem sintetizados por uma gama de diferentes bactérias, dentre outros organismos, e por apresentarem uma variedade de estruturas e massa molar, exibem uma ampla variabilidade de aplicações (CHRISTENSEN, 1989; ROSALAM & ENGLAND, 2006).

As propriedades químicas e reológicas permitem aos exopolissacarídeos diversas aplicações comerciais que podem ser observadas na Tabela 1. Por exemplo, na indústria alimentícia, a goma xantana, curdulana, alginato e gelana são comumente usados como estabilizantes de suspensões e emulsões, melhorando a textura dos alimentos (ROSALAM & ENGLAND, 2006). Na indústria cosmética, a levana é utilizada como surfactante para xampus e condicionadores (ÖNER et al., 2016), enquanto no setor farmacêutico, a xantana é utilizada como estabilizante de suspensões e o alginato é utilizado como matriz para comprimidos (MOSCOVICI, 2015).

No ramo alimentício e cosmético, polissacarídeos como a xantana, curdulana, levana e gelana vêm sendo utilizados como estabilizantes, emulsificantes, antioxidantes e aditivos reológicos (CHRISTENSEN, 1989; HADDAR et al., 2021; ÖNER et al., 2016; ROSALAM & ENGLAND, 2006). No setor agrícola, a xantana tem sido usada como um aditivo para aprimorar a aderência e a permanência de pesticidas, devido suas propriedades reológicas (KUPPANAN et al., 2021; NWODO et al., 2012). Ainda, na área médica, os EPS vêm sendo estudados em relação a atividade antitumoral, antiviral, antioxidante e imunoestimuladora, podendo ainda ter potencial para servir como agentes usados na liberação controlada de medicamentos (RAVEENDRAN et al., 2013). Já no âmbito ambiental, os exopolissacarídeos têm sido utilizados como biofloculantes, bioabsorventes e agente de remoção de metais pesados (WANG et al., 2008). Desta forma, os EPS's apresentam grande potencial biotecnológico.

Por serem hidrofílicos, os EPS's possuem a capacidade de reter água mesmo permanecendo insolúveis, o que os tornam bons transportadores de drogas. As misturas de alginato com outros polímeros sintéticos ou naturais, mostram propriedades de aprisionamento e liberação de medicamentos (MOSCOVICI, 2015). A celulose bacteriana, por exemplo, possui resistência mecânica, alta cristalinidade e permeabilidade seletiva, bloqueando a passagem de microrganismos, mas permitindo a passagem de vapor d'água, tornando-se uma boa fonte para produção de curativos oclusivos (RAFIGH et al., 2014; SOUZA, 2013). Já a gelana vem sendo utilizada como gel formador de matriz para liberação de fármacos anticancerígenos, além disso apresenta ação antitumoral. Estudos demonstram o uso de nano-hidrogéis deste polímero para atingir o alvo de dois fármacos anti-câncer e anti-inflamatório, pouco solúveis em água, o paclitaxel fisicamente aprisionado e prednisolona quimicamente ligada (MOSCOVICI, 2015). Além disso, estudos demonstraram que a levana sintetizada por *Bacillus subtilis* AF17, apresentou propriedades antioxidantes relevantes fundamentais para a criação de um novo composto (HADDAR et al., 2021). A tabela 1 apresenta as aplicações de alguns EPS's obtidos de diferentes espécies bacterianas (FREITAS et al., 2011; MOSCOVICI, 2015).

EPS	Bactéria	Composição	Aplicação industrial
Alginato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acetobacter vinelandii</i>	GulA, ManA	Alimentos, medicamentos
Celulose	<i>Acetobacter</i> spp.	Glc	Alimentos, medicamentos e acústica.
Levana	<i>Bacillus</i> spp., <i>Rahnella</i> spp., <i>Aerobacter</i> spp., <i>Erwinia</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Zymomonas</i> spp.	Fru	Alimentos, alimentos para animais, medicamentos, cosméticos, indústria, cola.
Curdulana	<i>Rhizobium meliloti</i> e <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Glc	Alimentos, cosméticos, medicamentos, química da construção.
Goma xantana	<i>Xanthomonas</i> spp.	Glc, Man, GlcA	Alimentos, perfuração de petróleo
Gelana	<i>Sphingomonas elodea</i>	Glc, Rha, GlcA	Química da construção, alimentos, alimentos para animais
Dextrana	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Glc	Alimentos, farmacêutica
Ácido hialurônico	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	GlcA, GlcNAc	Farmacêutica, alimentos para animais

Fonte: O autor, 2021.

2.3.1 Produção de EPS por espécies do gênero *Paenibacillus*

A produção do EPS está atrelada ao crescimento celular da bactéria, e por isso as condições de cultivo são importantes. Para tanto valores ótimos de pH, temperatura, agitação e fontes de carbono, nitrogênio e a composição geral do meio de cultura são de grande relevância para a otimização da produção de EPS (LIANG & WANG, 2015). Rütering (2016), verificou que a obtenção de EPS's com características físico-químicas específicas é dependente da fonte de carbono e nitrogênio utilizada no meio de cultura para uma mesma espécie de *Paenibacillus* sp. Os autores, constataram que o uso de glicerol, glucose e peptona na fermentação de *Paenibacillus* sp. 2H2, proporcionou a produção de um heteropolissacarídeo composto de glucose, manose, galactose e ácido glucurônico. Em um segundo momento os autores utilizaram a sacarose e NaNO₃ ou peptona como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, obtendo uma levana.

A grande maioria dos meios de cultivo para obtenção do EPS oriundos das espécies do gênero *Paenibacillus* presentes na literatura, fazem uso do extrato de levedura em suas composições (ERNANDES, 2006; HAN & CLARKE, 1990; JUNG et al., 2007; LIU et al., 2010a; H. XU et al., 2018). No entanto, a presença de tais compostos no meio de cultivo pode dificultar a caracterização dos EPS, uma vez que cerca de 45 a 55% da composição do extrato de leveduras é carboidratos (BATTISTI, et al., 1985).

Os EPS's mais comuns secretados pelo gênero *Paenibacillus* são a levana e a curdulana, apesar de outros já serem relatados, como as glucanas e a goma xantana (LIANG & WANG, 2015; XU et al., 2018). A tabela 2 mostra alguns EPS's produzidos por bactérias do gênero *Paenibacillus*.

Bactéria	Fonte de carbono/ temperatura de cultivo (°C) / pH	Técnicas usadas na caracterização	Polissacarídeo extraído	Referências
<i>Bacillus subtilis</i>	Sacarose/ 30 °C/ pH 7	RMN ¹³ C, FTIR, análise de metilação método de Hakomori, HPLC e GLC	Levana	HAN CLARK, 1990
<i>P. polymyxa</i>	Sacarose/ 30 °C / pH 7	FTIR, RMN ¹ H e ¹³ C, TLC e GPC	Glucana	JUNG, et al., 2007
<i>P. mucilaginosus</i>	Sacarose/ 30 °C / pH 7	RMN ¹ H e ¹³ C, GC/MC e HPLC	Goma Xantana	XU, et al., 2018
<i>P. bovinis sp.</i>	Sacarose/ 30 °C / pH 6,8	FTIR, RMN ¹ H e ¹³ C, HPSEC e microscopia eletrônica	Levana	XU, et al., 2016

Fonte: O autor, 2021.

A levana é produzida extracelularmente, a partir da ação da levanasacarase. A atividade dessa enzima está intimamente relacionada com a presença da sacarose em meio de cultura, que é a fonte de carbono mais comum para produção desses EPS's (RAFIGH et al., 2014; WANG et al., 2011). É importante ressaltar que mesmo quando utilizada a mesma fonte de carbono (sacarose) em diferentes espécies de *Paenibacillus*, o produto resultante nem sempre será uma levana, como pode-se constatar na tabela 2.

Sabe-se que o EPS produzido pode ser liberado no meio reacional ou estar atrelada a superfície celular (ÖNER et al., 2016; STEINMETZ et al., 1985). É possível, portanto, que a enzima seja isolada a partir do sobrenadante do cultivo contendo sacarose (CHAMBERT & GONZY-TREBOUL, 1976; TOSHIO TANAKA, Susumu, 1978).

O valor de pH ótimo para cultivo de *Paenibacillus* spp. está na faixa entre 6,5 e 7,2 (AGUILERA et al., 2008; LI et al., 2013b; RAFIGH et al., 2014; WANG et al., 2011). A temperatura de incubação também é um fator crítico para a produção do EPS e para o crescimento celular. Grande parte dos autores relatam a temperatura ótima na faixa dos 30°C para o bom desenvolvimento dessa classe de bactérias, e a posterior produção do EPS (LIANG & WANG, 2015). No âmbito das condições de cultivo também é importante ressaltar que as condições anaeróbicas podem resultar em um decréscimo da produção de EPS, ao passo que o aumento da aeração pela ação da agitação pode trazer benefícios para o crescimento microbiano e para produção de EPS, nos gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* (LIANG & WANG, 2015).

2.4 *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis SBR5

Originalmente as espécies do gênero *Paenibacillus* se encontravam compreendidas no gênero *Bacillus*, que em geral, é composto por bactérias que possuem forma de bastonete, são aeróbicas ou aeróbicas facultativas, Gram-positivas e com capacidade de formação de endósporos. Tais características adotadas para agrupar as espécies em um único grupo tornaram-se inadequadas. Em 1991, o estudo baseado na sequência de RNA ribossômico 16S permitiu uma associação filogenética das bactérias que compunham o grupo *Bacillus*, chegando à conclusão que o grupo poderia ser disperso em, pelo menos, outros 5 grupos distintos. Em estudos posteriores novos gêneros, com espécies antes pertencentes ao gênero *Bacillus*, foram criados: *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Halobacillus*, *Gracilibacillus*, *Geobacillus*, *Marinibacillus*, *Filobacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Ureibacillus*, *Virgibacillus* e *Lysinibacillus*. (PRIEST et al., 1988; RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

A bactéria *Paenibacillus riograndensis* foi isolada a partir da rizosfera da espécie de trigo (*Triticum aestivum*), cultivada no Rio Grande do Sul, Brasil. A bactéria usada nesta dissertação foi obtida a partir da coleção de culturas do gênero *Bacillus* e correlatos da FIOCRUZ – Rio de Janeiro - número de registros: CCGB 1313 e código de origem SB-R5T (BENEDUZI et al., 2010; BRITO et al., 2015). Em um estudo subsequente, *P. riograndensis* SB-R5T foi reclassificada como a espécie *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5. Em 2010, as espécies *Paenibacillus riograndensis* (BENEDUZI et al., 2010) e *Paenibacillus sonchi* (HONG et al., 2009) foram descritas

na literatura em um intervalo de apenas 9 dias. Foram realizadas análises fenotípicas, genômicas e genotípicas comparativas entre as espécies, indicando que *P. riograndensis* SBR5T apresentava uma identidade média de nucleotídeos de 96,28%, identidade média de nucleotídeo de todo o genoma de 97,31% e hibridização digital de DNA-DNA de 73,2%. Concluiu-se que a espécie *Paenibacillus riograndensis* pode ser considerada como um sinônimo heteronímico da espécie *Paenibacillus sonchi*, sendo assim seu nome foi redefinido para *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis SBR5.

Os EPS obtidos do gênero *Paenibacillus* têm apresentado ampla aplicabilidade e grande potencial biotecnológico. Foram relatadas atividades antioxidante e antitumoral para a glucana obtida de *Paenibacillus* sp. TKU023 e para a levana obtida da *P. polymyxa* EJS-3 (WANG, et al., 2011 e LIU, LUO, ZENG, 2012), o uso em biorremediação de água residuais para a xantana produzida por *P. jamilae* (AGUILERA et al., 2008; LI et al., 2013a), atividade imunológica para a levana de *P. bovis* (X. XU et al., 2016) e capacidade de geleificação para a xantana obtida de *P. mucilaginosus* (H. XU et al., 2018).

Os trabalhos publicados a respeito da espécie *P. sonchi* genomovar Riograndensis, exploraram a sua capacidade de fixação de nitrogênio (BENEDUZI et al., 2010; FERNANDES et al., 2014). Por este motivo, esta bactéria teve o seu genoma sequenciado (BENEDUZI et al., 2011; BRITO et al., 2015; FERNANDES et al., 2014). Quanto aos estudos dos EPS's secretado pela espécie, só foi encontrado um trabalho publicado que, no entanto, não realizou uma caracterização estrutural do polissacarídeo utilizando técnicas que permitissem concluir a estrutura do polímero produzido pela bactéria (PARIKH, 2018).

Neste trabalho a bactéria foi isolada da rizosfera da planta *Momordia charantia*, em Mehsana, Gujarat, Índia, utilizando 3 meios seletivos para bactérias diazotróficas. Para realizar a fermentação para a produção do EPS, os autores utilizaram o meio Löwensteins Jensen, contendo: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura, variando a fonte de carbono (sacarose, glucose, arabinose, maltose, manitol, galactose, lactose, frutose, xilose e dextrose), o pH (3, 5, 7, 9 e 11), temperatura (20, 25, 30, 35, 40 e 45°C), fonte de nitrogênio orgânico (grão de soja, extrato de carne, caseína, extrato de levedura, peptona, licor de milho, extrato de malte) e nitrogênio inorgânico $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Segundo os autores as melhores condições de produção do EPS foram observadas utilizando: sacarose

como fonte de carbono, caseína com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, pH 7, agitação de 100 rpm e 35 °C de temperatura. Os autores relataram ter obtido alginato nessas condições, no entanto, foram utilizadas apenas as técnicas de FTIR e análise de homogeneidade por HPLC para caracterizar a fração obtida. Com base apenas nessas análises não é possível confirmar a presença de alginato no extrato. Portanto, ainda é uma incógnita qual EPS essa espécie secreta.

2.4 Produção de Levanas por Levansacarase

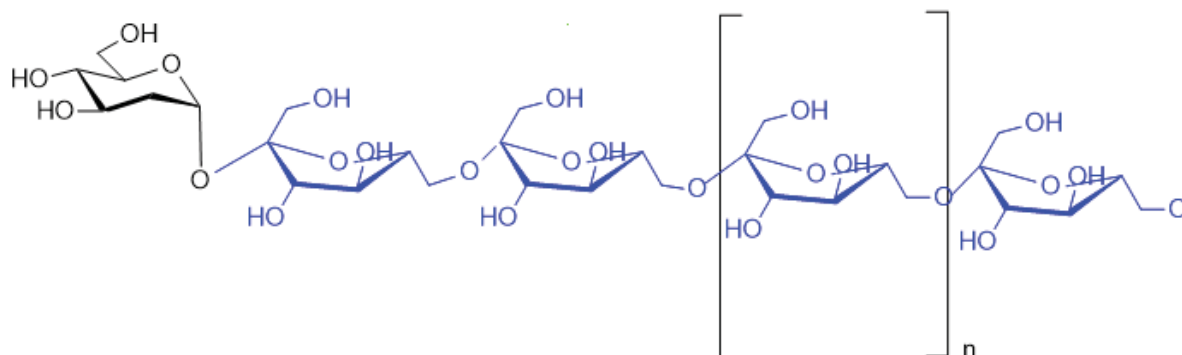
As frutanasacarases, são glicosiltransferases que atuam catalisando a síntese de polímeros contendo frutose a partir da sacarose e são classificadas dependendo do polímero produzido, como levansacarases (EC 2.4.1.10) ou inulases (EC 2.4.1.9) (MENG & FÜTTERER, 2003).

Levanas são exopolissacarídeos compostos por unidades de frutose com ligação β -(2 \rightarrow 6), obtidas pela reação de transfrutossilacção ocorrida durante a fermentação de microrganismos (Figura 4). Sua produção depende de um substrato a base de sacarose e levansacarases extracelulares (EC 2.4.1.10) (BAE et al., 2008). Para a formação dessa frutana a sacarose é clivada, liberando a glucose.

Muitas espécies de *Bacillus subtilis* se encontram no solo e são capazes de colonizar as raízes das plantas, fazendo parte do grupo das rizobactérias. Sabe-se que a sacarose secretada pelas raízes de plantas pode provocar o prevailecimento da colonização das raízes por cepas de *Bacillus subtilis*. A motilidade sobre superfície sólida desses microrganismos se mostrou favorecida pela presença do dissacarídeo decorrente do início de uma cascata de sinalização, que tem como sua primeira etapa a produção de levana, que em seguida favorece a hiper-flagelação das células de *B. subtilis*. É possível dizer que bactérias portadoras de *sacB* associadas às raízes também são capazes de produzir levana, devido ao fornecimento de sacarose como fonte de carbono pelas plantas (TIAN et al., 2021).

A energia proveniente dessa clivagem é utilizada para realizar a união das frutoses, monômeros também resultantes da clivagem do substrato, originando progressivamente a cadeia polissacarídica (JAKOB et al., 2012). A levana microbiana possui muitas funções fisiológicas para os microrganismos que a produzem, tais como a adesão de células no ambiente, proteção térmica e contra a desidratação (NAKAPONG et al., 2013).

FIGURA 4 - ESTRUTURA DA LEVANA



Fonte: O autor, 2021.

Em plantas, a produção da levana não depende somente da levanasacarase e resulta em cadeias de levanas de pequeno peso molecular já as levanas bacterianas, são produzidas por uma enzima isolada, a levanasacarase pertencente à família GH68, a qual é capaz de produzir polímeros de diferentes tamanhos, podendo produzir oligossacarídeos de peso molecular muito baixo ($DP = 2$) a polímeros maiores ($DP > 50.000$), sendo dependente das condições reacionais (NAKAPONG et al., 2013).

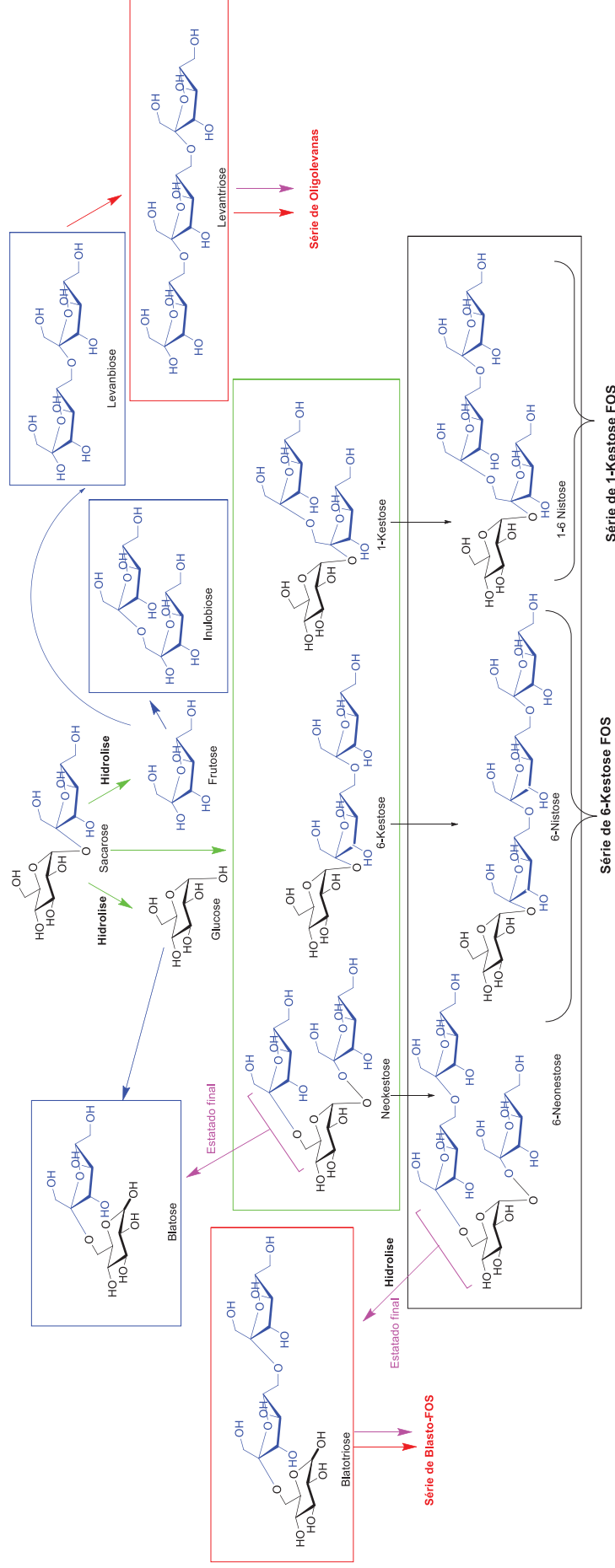
Em sua grande maioria, as espécies de bactérias possuem somente um gene de levanasacarase, o qual constitui o primeiro componente de um operon. Em *Bacillus subtilis*, o gene da levanasacarase é controlado por um mecanismo de antiterminação, induzível por sacarose. De maneira geral a sacarose tem um papel importante na indução da transcrição da levanasacarase em gêneros como: *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Geobacillus* (CRUTZ et al., 1990; Inthanavong et al., 2013).

O domínio catalítico de levanasacarase de *Bacillus sp.* exibe dobras de β -hélice de cinco pás que envolvem a tríade catalítica, formada por 2 ácidos aspárticos e um ácido glutâmico, formando uma bolsa carregada negativamente onde a sacarose e outros oligossacarídeos se ligam (NAKAPONG et al., 2013). Seu mecanismo de ação se dá pela quebra da ligação glicosídica e a doação de um frutossil, proveniente de uma sacarose, gerando um intermediário frutossil-enzima covalente e na liberação de uma glucose. Em seguida a porção frutossil é transferida da enzima para uma molécula aceptora, resultando no alongamento do aceptor, portanto a síntese da levana ocorre, em resumo, pela transferência de uma fração de frutossil doado pela sacarose em meio

reacional (CHEETHAM et al., 1989). A frutose é liberada no meio reacional quando uma molécula de água atua como aceptora do frutosil (PORRAS-DOMÍNGUEZ et al., 2015).

Durante o processo de síntese de frutanas de alta e baixa massa molar, inicialmente, a porção frutosil é transferida para outra sacarose, formando um trissacarídeo denominado 6-kestose (Figura 5). Este então é alongado para formar um fruto-oligossacarídeo (FOS) ou subsequentemente a levana. Assim, o processo de síntese de levana é dividida em três partes: inicial, tardia e de depleção de sacarose. Essas fases são correlacionadas tanto com a concentração da sacarose, como com a ordem em que os produtos são produzidos durante a reação. A hidrólise da sacarose e a síntese de produtos como a neokestose, o 6-kestose e 1-kestose, podem ser observados na fase inicial. Em um segundo momento esses produtos, com exceção da frutose e glucose, são alongados dando origem a 6-neocestose, 6-nistose e ao 1,6-nistose, respectivamente. A levanasacarase atua alongando esses intermediários primários para que atinjam níveis baixos ou elevados de peso molecular. Durante a fase tardia a glucose e a frutose, que não sofreram alongamento, são utilizados como aceptores, sintetizando principalmente blastose, levanabiose e inulobiose. O alongamento desses oligossacarídeos resulta em intermediários secundários. Na fase de esgotamento da sacarose, fase final da reação, neokestose e 6-neokestose são hidrolisados e seus produtos unidos e direcionados a uma via sintética que resulta em blasto-FOS, como ilustrado na figura 5 (ORTIZ-SOTO et al., 2019; PORRAS-DOMÍNGUEZ et al., 2015).

FIGURA 5 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DOS FOS E LEVANAS



Fonte: Baseado: ORTIZ-SOLO, et al., 2019.

Verde: Primeiro estágio do mecanismo

Vermelho: Quarto estágio do mecanismo

Preto: Segundo estágio do mecanismo

Rosa: Estágio final

Azul: Terceiro estágio do mecanismo

Desta forma, produtos poliméricos de alto ($2,3 \times 10^6$ g/mol) e de baixo peso molecular ($7,2 \times 10^3$ g/mol) podem ser obtidos. A levana é um dos principais produtos da ação da levanasacarases, no entanto, fruto-oligossacarídeos (FOS) também podem ser formados. Esse processo de alongamento gera uma série de moléculas de levanas, na sua maioria, ainda não estudadas (RAGA-CARBAJAL et al., 2018)

A levana é raramente encontrada em plantas dicotiledôneas, no entanto as enzimas envolvidas na síntese de levana são abundantes em bactérias dos gêneros: *Paenibacillus*, *Gluconobacter*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Novosphingobium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Burkholderia*. A levana é considerada um importante componente estrutural de biofilmes bacterianos em diferentes habitats. Para a espécie de solo, como a *Bacillus subtilis*, a levana presente no biofilme, serve como proteção contra a dessecação, dependendo do nível de água presente, além de auxiliar na aderência das células em ambientes favoráveis, protegendo a comunidade bacteriana de organismos predatórios. Já em espécies como *Erwinia amylovora* e *Pseudomonas*, a presença da levana no biofilme contribui para a virulência desses fitopatógenos (KOCZAN et al., 2009; MEHMOOD et al., 2015; TIAN et al., 2021). Para *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a levana no biofilme atua como uma barreira difusional de oxigênio, auxiliando a permanência de um ambiente microanaeróbico, importante para a fixação de nitrogênio (HERNÁNDEZ et al., 2000).

Levanas derivadas da fermentação de microrganismos distintos tem atividades biológicas diferentes, podendo ter uma vasta aplicabilidade (ARVIDSON et al., 2006). Frutanas provenientes de fontes naturais são amplamente utilizadas na produção industrial de colas, revestimentos, plásticos biodegradáveis e detergentes (BANGELA, 2003). Existe uma ampla aplicabilidade das levanas na indústria em geral, podendo ser utilizada na produção produtos biodegradáveis, produtos de higiene pessoal, cosméticos, como clareador cutâneo e fixador em produtos para o cabelo, em produtos alimentícios, e ainda pode ser utilizada na produção de produtos com relevância medicinal. Filmes finos a base de levana vem sendo pesquisados pela sua capacidade de cicatrização. O fato das levanas possuírem papel na ativação de metaloproteinasas, faz com que os filmes feitos a partir de levana se destaquem em relação a outros filmes (ÖNER et al., 2016). Toda essa gama de opções se torna possível boa parte por sua boa eficiência em testes de segurança como Teste de Insulto Repetido Humano (HRIPT), Ensaio Vascular de Membrana Corioalantóica (CAMVA) e testes de citotoxicidade. Apesar dos inúmeros usos para as levanas

relatados ao longo dos anos, a sua disponibilidade, em termos de quantidade, ainda deixa a desejar quando o processo é em escala industrial. Os processos envolvidos na produção da levana em larga escala também apresentam limitações. Neste caso, pode-se citar a despolimerização que ocorre ao fim da fermentação caso a enzima não seja devidamente inibida, resultando na degradação da levana e menor rendimento (KAZAK SARILMISER et al., 2015).

Após os avanços nas técnicas de produção em larga escala, por meio da ação da levanasacarases, a indústria vem demonstrando grande interesse pelos homopolímeros de frutose, sendo amplamente produzidos por empresas tais como a RealBiotech Co, Chungnam e também a Coréia e Advance Co, Ltd (KANG et al., 2009). No entanto, o cenário atual de nossa sociedade necessita de alternativas mais plausíveis no âmbito ambiental e econômico, desta forma existe uma crescente demanda por matérias-primas renováveis e seguras. Nesse ponto, a levana se destaca uma vez que dentre suas propriedades estão sua baixa viscosidade intrínseca e alta resistência adesiva (ÖNER et al., 2016).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REATIVAÇÃO DE *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5

A bactéria usada neste trabalho foi obtida da Coleção de Cultura do Gênero *Bacillus* e correlatos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro - RJ,

sob o nome de *Paenibacillus riograndensis* SBR5^T LFB-FIOCRUZ 1313 e número de acesso da Coleção LFB-FIOCRUZ 1313. O microrganismo foi obtido em forma de esporos, impregnados em papel filtro. Estes foram manuseadas assepticamente, em fluxo laminar. Com ajuda de uma pinça de ponta fina estéril as tiras foram transferidas para o meio de cultivo Caldo Nutriente, incubadas a 33 °C por 48 h. Após este período, foi feito o repique de uma alçada para o mesmo tipo de meio, na forma sólida e inclinada, contido em 6 tubos de 10 mL, os mesmos foram bem fechados e incubados de 3-4 dias a 33 °C (RABINOVITCH, OLIVEIRA, 2015). A bactéria crescida em meio líquido foi armazenada a -70 °C em 1 mL de glicerol 20% mais 1 mL do meio de cultura no qual a bactéria foi reativada.

3.2 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

O *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 teve seu genoma sequenciado pelo grupo de Brito e colaboradores (2015). A sequência fasta das proteínas anotadas foi adquirida no banco de dados do PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em seguida essas sequências foram utilizadas para identificar potenciais enzimas envolvidas na síntese e clivagem de glicanas e gliconjugados ou Cazymes, para isso foi utilizado o servidor dbCAN (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>) (ZHANG et al., 2018). Em seguida, a sequência da proteína WP_020434349 de *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 foi comparada com outras sequências presentes no banco de dados BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), disponível no servidor NCBI. A sequência de WP_020434349 foi comparada com proteínas disponíveis *Protein Data Bank*.

Posteriormente foi realizado o alinhamento de sequência de WP_020434349, e as enzimas *Bs-SacB* (Uniprot P05655) e *Bm-SacB* (Uniprot D5DC07) de *Bacillus subtilis* e *B. megaterium*, respectivamente, utilizando o Clustal Ômega 12.1 (<http://www.clustal.org/>). Por fim, foi realizada uma análise de peptídeo sinal, utilizando o servidor SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

3.3 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO

Foram propostos 4 meios de cultura baseados na literatura (Tabela 3):

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA SINTÉTICOS M2, M4, M5 e M13.

Meio de cultura	Composição comum dos meios (g/L)	Fonte de carbono	Referência
M2	Extrato de levedura (2 g), NaCl (5 g), pH 7	Sacarose 30 g/L	ERNADES 2006
M4	K ₂ HPO ₄ (4,09 g), NaH ₂ PO ₄ (1,39 g), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2,11 g), biotina (0,1 mg) e 1ml de <u>solução elementar (g/L)</u> : 5,56 g FeSO ₄ ; 0,0227 g CuCl ₂ .H ₂ O; 0,736 g CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,04 g CoCl ₂ .6H ₂ O; 9,90 g, MnCl ₂ .4H ₂ O; 0,288 g ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,048 g Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O; 0,031 g H ₃ BO ₃ pH 7	Sacarose 80 g/L	BRITO, et al, 2017.
M5	KH ₂ PO ₄ (3 g), Na ₂ HPO ₄ (6 g), NaCl (0,5 g), NH ₄ Cl (1 g), 1 mL MgSO ₄ (1 M); 10 mL CaCl ₂ (0,01 M); 1 mL FeCl ₃ .6H ₂ O (2 µM) pH 7	Sacarose 80 g/L	SPERB, et al, 2016.
M13CN15	K ₂ HPO ₄ (4,09 g), NaH ₂ PO ₄ (1,39 g), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2,11 g), biotina (0,1 mg) e 1ml de <u>solução elementar (g/L)</u> : 5,56 g FeSO ₄ ; 0,0227 g CuCl ₂ .H ₂ O; 0,736 g CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,04 g CoCl ₂ .6H ₂ O; 9,90 g, MnCl ₂ .4H ₂ O; 0,288 g ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,048 g Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O; 0,031 g H ₃ BO ₃ , 18g de extrato de levedura pH 7	Sacarose 80 g/L	BRITO, et al, 2017.
M13CN30	K ₂ HPO ₄ (4,09 g), NaH ₂ PO ₄ (1,39 g), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2,11 g), biotina (0,1 mg) e 1ml de <u>solução elementar (g/L)</u> : 5,56 g FeSO ₄ ; 0,0227 g CuCl ₂ .H ₂ O; 0,736 g CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,04 g CoCl ₂ .6H ₂ O; 9,90 g, MnCl ₂ .4H ₂ O; 0,288 g ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,048 g Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O; 0,031 g H ₃ BO ₃ , 6,6g extrato de levedura pH 7	Sacarose 80 g/L	BRITO, et al, 2017.
M13CN15E	K ₂ HPO ₄ (4,09 g), NaH ₂ PO ₄ (1,39 g), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2,11 g), biotina (0,1 mg) e 1ml de <u>solução elementar (g/L)</u> : 5,56 g FeSO ₄ ; 0,0227 g CuCl ₂ .H ₂ O; 0,736 g CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,04 g CoCl ₂ .6H ₂ O; 9,90 g, MnCl ₂ .4H ₂ O; 0,288 g ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,048 g Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O; 0,031 g H ₃ BO ₃ , 18g de extrato de levedura, 10 ml de Etanol pH 7	Sacarose 80 g/L	BRITO, et al, 2017.
M13CN15	K ₂ HPO ₄ (4,09 g), NaH ₂ PO ₄ (1,39 g), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2,11 g), biotina (0,1 mg) e 1ml de <u>solução elementar (g/L)</u> : 5,56 g FeSO ₄ ; 0,0227 g CuCl ₂ .H ₂ O; 0,736 g CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,04 g CoCl ₂ .6H ₂ O; 9,90 g, MnCl ₂ .4H ₂ O; 0,288 g ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,048 g Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O; 0,031 g H ₃ BO ₃ , 18g extrato de levedura, cultivado com AirLock pH 7	Sacarose 80 g/L	BRITO, et al, 2017.

Fonte: O autor, 2021.

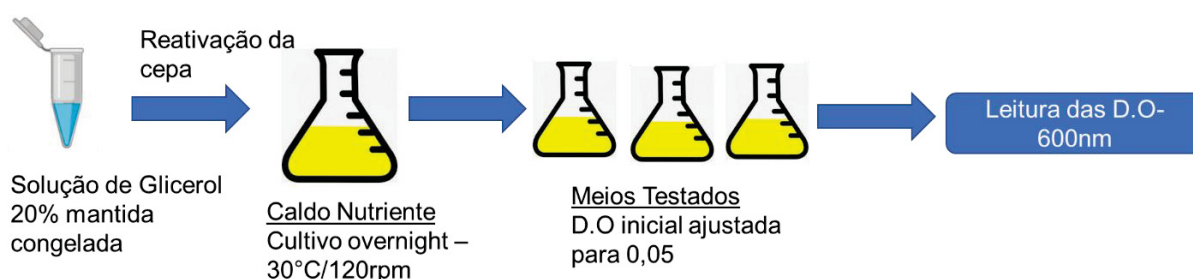
Os meios foram preparados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio, em triplicata, o pH do meio de cultura foi ajustado utilizando tiras de pH (MARCHEREY-NAGEL®) para o valor de 7. Os meios foram autoclavados por 20 min a 120°C.

3.3.1 Condições de cultivo de *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 nos meios M2, M4, M5 e M13.

O estoque da bactéria em glicerol (50 µl) foi inoculado em 100 mL de Caldo Nutriente (KASVI®) e incubado em incubadora *shaker* (Cienlab, mod CE720) com incubadora a 120 rpm e 30 °C durante 24 h. A densidade óptica foi medida (D.O₆₀₀). O meio M13, foi cultivado em 3 triplicatas, sendo elas com 3 Erlenmeyer com *Airlock*, para cultivo em condição de anaerobiose, 3 Erlenmeyer contendo etanol e 3 Erlenmeyer cultivados nas condições anteriores, aerobiose e sem etanol. O cultivo foi inoculado com o pré-inóculo, com a D.O₆₀₀ inicial ajustada para 0,05, e cultivado a 30°C, 120 rpm em incubadora *shaker* (Cienlab, mod. CE720), por 118 h.

M2, M4 e M5 foram inoculados com o pré-inóculo com D.O₆₀₀ inicial ajustada para 0,05, e cultivado a 30°C, 120 rpm.

FIGURA 6 - ATIVAÇÃO DA CEPA E INOCULAÇÃO NO MEIO



Fonte: O autor, 2021.

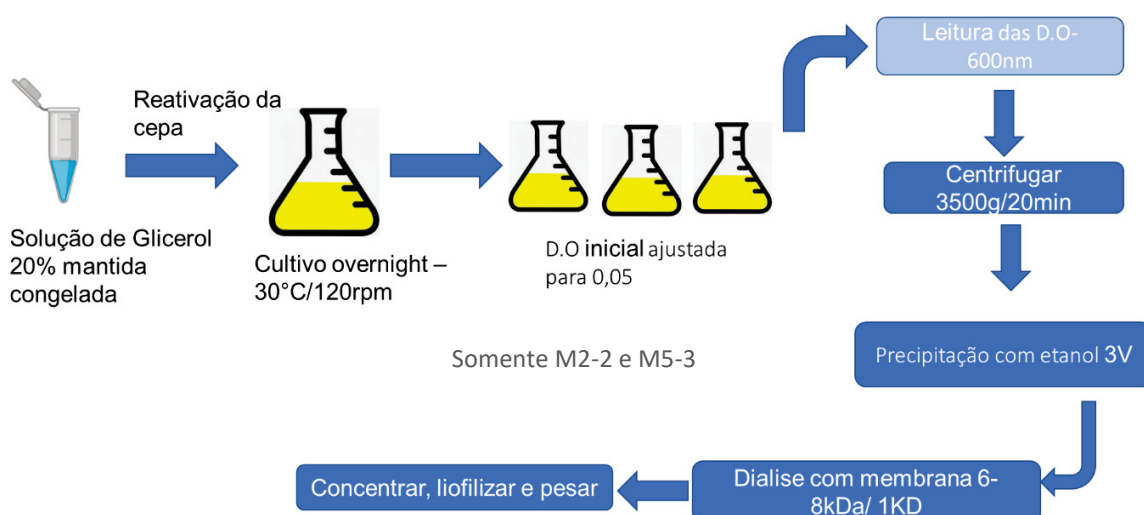
O cultivo foi realizado nas mesmas condições do pré-inóculo por diferentes tempos de cultivo (24, 32, 52 e 118 h).

3.3.2 Procedimento de precipitação dos sobrenadantes de cultivos de *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 nos meios M2, M4, M5 e M13

Após o cultivo, o meio de cultura foi centrifugado (Novatecnica, mod. NT825) a 3500 rpm por 20 min, a 0 °C, e em seguida o sobrenadante foi coletado para todos os meios testados.

Os sobrenadantes de M2-2, M5-2 foram precipitados com 3 volumes de etanol e em seguida dialisados com membranas de 6-8 kDa, concentrado em rotoaevaporador e liofilizado, no entanto não foi observado nenhum tipo de precipitação, sendo assim, os sobrenadantes de M4-3, M4-4 e M5-3 foram dialisados com membranas de 6-8 kDa, concentrados e liofilizados, sem serem precipitados, a precipitação voltou a ser realizado somente com o meio M13. Os sobrenadantes derivados de M13 foram precipitados com 3 volumes de etanol, centrifugados e os materiais recolhidos foram liofilizados. Em um segundo momento, as frações geradas foram então dialisadas com membranas de 1 kDa, para então serem liofilizadas e pesadas.

FIGURA 7 - OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES



Fonte: O autor, 2021.

3.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LEVANASACARASE

3.4.1 Purificação das proteínas do sobrenadante do meio M13CN15.

A bactéria foi cultivada em meio M13CN15 (três Erlenmeyers totalizando 900 mL), em incubadora *shaker* (Cienlab, mod. CE720), a 37 °C/120 rpm, por 24 h (D.O final de 1,216).

A precipitação de proteínas foi baseado no procedimento descrito por Dedonder (1966). O meio foi centrifugado por 30 min (3500 g – 10 °C) e o sobrenadante foi deixado na geladeira por 2 h. Em seguida, foi adicionado sulfato de amônio ao sobrenadante em banho de gelo, ate atingir a concentração de 65% (g/v). A solução resultante foi deixada em geladeira por 1 h, centrifugada a 3500rpm 2°C e o

precipitado foi ressuspenso em 12 mL tampão fosfato 50 mM, pH = 6, dialisado contra tampão fosfato (50 mM, pH = 6) em membrana de 6-8 kDa. A solução retida pela membrana de dialise gerou a fração P.1. Ao sobrenadante residual, foi adicionado sulfato de amônio em banho de gelo, até atingir a concentração de 95% (g/v). A solução resultante foi deixada em geladeira por 1 h, centrifugada a 3500rpm 2°C ° e o precipitado foi ressuspenso em 12 ml tampão fosfato 50 mM, pH = 6. P.1, dialisado contra tampão fosfato (50 mM, pH = 6) em membrana de 6-8 kDa. A solução retida pela membrana de dialise gerou a fração P.2.

3.4.2 Teste da atividade da enzima levanasacarase em P.1 e P.2

O experimento para avaliação da atividade enzimática teve como base a estratégia experimental relatada por Dedonder (1966).

Foram preparados 6 tubos de reação em eppendorfs de 2,0 mL:

QUADRO 1 - SOLUÇÕES E PREPARO DOS TUBOS PARA O ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Tubo	Composição dos tubos e soluções utilizadas
TB1 (Branco)	500 µl tampão PBS 50 mmol/L, pH = 6
TB2 (Controle)	250 µl sacarose 0,5 mol/L em PBS + 250 µl tampão PBS 50 mmol/L, pH = 6
TB3 (Controle)	400 µl tampão PBS 50 mmol/L, pH = 6 + 100µl P.1 ou P.2
TB4 (Tubo teste)	150 µl Tampão PBS 50 mmol/L, pH = 6 + 250 µl sacarose 0,5 mol/L em PBS + 100 µl P.1 ou P.2
TB5 (Tubo teste)	250 µl galactose 0,5 mol/L em PBS + 150 µl de PBS com sacarose + 100 µl P.1 ou P.2
TB6 (Controle para TB5)	250 µl de PBS com galactose + 150 µl sacarose 0,5 mol/L em PBS + 100 µl PBS 50 mmol/L, pH = 6

Soluções de sacarose e galactose foram preparadas em tampão PBS 50 mmol/L, pH = 6

Fonte: O autor, 2021.

As reações foram incubadas por 24 h em banho seco (KASVI, mod. K80-DO1) a 37°C. O teor de glucose nos tubos foi determinado usando o kit de glucose oxidase (LABTEST®- Glicose Liquiform), conforme bula. Assim, 10 µl das reações foram adicionados a 1 mL do reagente 1 do kit (contendo glucose oxidase, tampão e enzimas para formação do cromógeno) e incubados por 10 min ou 2 h a 37 °C. Para

quantificar a glucose, foram realizadas medidas de absorvância a 505 nm. Foi utilizado padrão de glucose 100 mg/dL para quantificação da glucose presente nas amostras:

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NAS ANÁLISES DAS FRAÇÕES

3.5.1 Determinação do teor de proteínas, carboidratos totais, açúcar redutores.

Para a determinação de carboidratos totais foi utilizado o método descrito por Dubois et al. (1956), a determinação de açúcares redutores foi realizado segundo o método descrito por Miller (1959). O método de Lowry et al. (1951) foi utilizado para determinar o teor de proteína.

3.5.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

As amostras foram preparadas em D_2O em tubos de 5 mm de diâmetro. Para obtenção dos espectros foi utilizado o espectrômetro Bruker Avance DRX 400, sendo a frequência de análise 400 MHz e 100 MHz para os núcleos de ^1H e ^{13}C , respectivamente. Os espectros foram analisados pelo programa TOPSPIN 4.0.3. e os deslocamentos foram calibrados com acetona ($\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C) (VAN de VELD, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMAN, 2004).

Os experimentos de correlação heteronuclear de ^1H e ^{13}C (HSQC) foram adquiridos conforme manual da Bruker.

3.5.3 Hidrólise

Para análise dos monossacarídeos em cromatografia de camada delgada (TLC), as frações obtidas foram hidrolisadas utilizando TFA 2 M a 100°C por 8 h (USOV, ELASHVILI, 1991)

3.5.4 Cromatografia em camada delgada

As amostras foram analisadas por TLC em placas de alumínio revestidas com sílica gel. As amostras foram diluídas em água destilada, em concentração de 1 mg/mL, e aplicadas na placa. O solvente de corrida utilizado foi acetato de etila: ácido acético: 1-propanol: água 4:2:2:1 v/v/v/v). Para a análise de fruto-oligossacarídeos as amostras foram preparadas com água destilada na concentração de 5 mg/mL e aplicadas na placa. O solvente de corrida utilizado foi o mesmo. Somente a amostra M13CN15 sofreu hidrólise para a análise por TLC, para a análise dos monossacarídeos componentes dessa fração.

3.5.5 Análise cromatográfica de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulo e índice de refração (HPSEC-MALLS-RI)

A análise por cromatografia de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser multiângulo foi utilizada para determinação de

homogeneidade das amostras. Para realização da análise foi utilizado o cromatógrafo modelo Waters 2410 acoplado aos detectores IR/MALLS. A fase móvel utilizada foi uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 100 ppm/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min, pressão ~800 psi a 25 °C, controladas por bomba WATERS 515. Os cromatogramas foram registrados e analisados usando software ASTRA versão 450. As amostras foram preparadas com a fase móvel (NaNO_2 contendo NaN_3), na concentração de 1 mg/mL e filtradas em membrana de nitrocelulose (Hexis Cientifica S/A) com poros de 0,2 μm .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

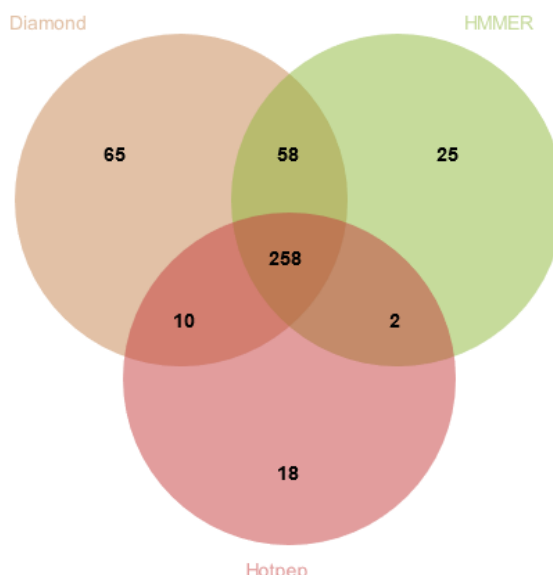
4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS PROVÁVEIS ENZIMAS ATIVAS EM CARBOIDRATOS (CAZYMES) EM *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis SBR5

As análises de bioinformática foram realizadas utilizando o servidor web dbCAN, o qual permite a anotação de prováveis enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos (CAZymes). O servidor integra três ferramentas para realizar a anotação das enzimas ativas em carboidratos que combinadas melhoram o

desempenho das previsões das anotações realizadas (ZHANG et al., 2018). Além disso, esta ferramenta também indica se a proteína possui algum peptídeo sinal. As ferramentas são:

- a Pesquisa pelo HMMER no banco de dados dbCAN HMM (modelo Markov oculto);
- b Pesquisa DIAMOND no banco de dados de sequência CAZyme pré-anotado por CAZy;
- c Pesquisa Hotpep no banco de dados de peptídeos curtos CAZyme conservado.

FIGURA 8 - GRÁFICO DE VENN OBTIDO APÓS ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE *PAENIBACCILUS SONCHI* GENOMOVAR *RIOGRANDENSIS* NO SERVIDOR DBCAN.



Fonte: O autor, 2020.

Para a realização da análise, a sequência das proteínas pertencentes a espécie de *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 foi obtida no formato FASTA na base de dados Pubmed central, conforme a publicado por Brito, et al. (2015). As sequências foram submetidas no servidor dbCAN e após análise, foram encontradas 436 proteínas anotadas dessas, 258 foram reconhecidas pelas três ferramentas como CAZymes (Figura 8). Nesse grupo de 258 enzimas foram reconhecidas 4 classes enzimáticas: Carboidrato Esterase (CE), Glicosídeos Hidrolase (GH), Glicosil Transferase (GT) e Polissacarídeo Liase (PL). Foi identificado também proteínas classificadas como Módulos de Ligação de Carboidratos (CBM).

TABELA 4 - CAZYMES DE *P. SONCHI GENOMOVAR RIOGRANDENSIS* ENCONTRADAS PELO SERVIDOR DBCAN

Classe	Número de proteínas encontradas	Número de famílias
CBMs - Módulos de ligação a carboidratos	22	13
CEs - Esterases de carboidratos	17	8
GHs – Glicosil Hidrolases	179	57
GTs- Glicosil Transferases	34	10
PLs- Polissacarídeo Liases	6	5
TOTAL	258	93

Fonte: O autor, 2021.

No CBMs foram encontradas 22 proteínas pertencentes a 13 famílias distintas (Tabela 4), destacando-se famílias CBM21 e CBM35 com a maior quantidade de proteínas. Os módulos da família 21 podem se ligar a oligossacarídeos derivados do amido ou que contenham glucose com ligação α -1,4 ou α -1,6 (CHOU et al., 2006). A atividade da proteína fosfatase-1s (PP1s) que controla o metabolismo de glicogênio em eucariotos, por exemplo é dependente da ação dos moduladores CBM21, que auxiliam a ligação de PP1s ao glicogênio (LIU, et al., 2007).

Os CBM35 têm como alvo preferencial açúcares neutros, podendo se ligar por exemplo, a regiões internas de mananas com ligação β -(1→4). Alguns tipos de CBM35 se ligam podem fazer o reconhecimento das unidades de 4-desoxi- α -D-galacto-4-enuronosil, enquanto outros CBM35 podem se ligar tanto ao terminal insaturado quanto às unidades de ácido glucurônico (GlcA) (MONTANIER et al., 2009).

Na classe das esterases de carboidratos (CEs), foram encontradas 17 proteínas pertencentes a 8 famílias (Tabela 4), sendo a CE4 a com maior número de enzimas. Tem sido relatado nesta família a *N*- ou *O*-desacetilação de xilanas, quitinas e peptídeoglicanos. Na CE14 foi observada a ação de desacetilação de unidades de *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) e *N'*-diacetilquitobiose (GlcNAc₂), que são os produtos

finais da ação de endo- e exoquitinase (TANAKA et al., 2004). A espécie *M. tuberculosis* possui uma enzima da família CE14, que atua na produção de micotiol, produto que pode ser utilizado na produção de medicamentos anti-tuberculose (NAKAMURA et al., 2017).

No grupo das glicosil transferases (GTs), foram encontradas 10 famílias com 34 membros ao todo (Tabela 4). Dentre elas estão a GT2 e GT4, duas famílias comuns em genomas bacterianos, que codificam enzimas com mecanismos de inversão (GT2) e retenção (GT4) de configuração (ÖNER et al., 2016; RUANE et al., 2008). As enzimas da família GT2 estão envolvidas na síntese de vários polissacarídeos com ligação do tipo β , como a celulose, quitina e ácido hialurônico (LAIRSON et al., 2008).

Na classe das Polissacarídeo liases (PLs), 5 famílias foram encontradas com 6 proteínas ao todo (Tabela 4). Dentre as 6 enzimas PLs, 2 são classificadas na família PL9. A principal atividade já caracterizada para esta família é de pectato-liase, (JENKINS et al., 2004). As enzimas desse grupo agem clivando a ligação a α -(1 \rightarrow 4) envolvendo unidades de ácido D-galacturônico não metil-esterificado por meio de um mecanismo de eliminação β (JENKINS et al., 2004). Essa reação depende de um cátion divalente, como o Ca^{2+} , o que facilita a abstração do próton H5 das unidades de ácido D-galacturônico, liberando um fragmento (oligo)-polissacarídico contendo unidades de 4-desoxi- α -D-galacto-4-enuronosil no terminal não redutor (JENKINS et al., 2004).

Na classe das Glicosídeos hidrolases (GHs), foram encontradas 57 famílias com 179 membros (Tabela 4). Dentre as famílias com mais membros destacaram-se: GH2, GH3, GH13, GH32, GH43, GH65 e GH130. Outra família que nos chamou a atenção mesmo contendo apenas uma proteína foi a GH68, devido a sua potencial atividade na produção de levana.

Na família GH2 algumas das atividades já encontradas são: β -galactosidases, β -glucuronosidases e β -manosidases. Em sua grande maioria, as enzimas desse grupo se encontram nas bactérias. Uma das mais estudadas é a β -galactosidase (lacZ) de *E.coli*, sendo essa um componente do operon lac, este permite que as bactérias degradando a lactose em glucose e galactose, a transformando em fonte de energia (FOWLER, A. V.; ZABIN, 1978).

Grande parte das enzimas presentes na classe GH3 são β -D-glucosidases, embora outras atividades tenham sido relatadas. Enzimas desta família possuem

grande importância, pois participam de vários processos biotecnológicos, como a degradação de celulose, por exemplo (PYEON, H. M.; LEE, Y. S.; CHOI, 2019).

Na família GH13 são relatadas atividades de hidrolase, transglicosidase e isomerases, como, por exemplo, na conversão de sacarose em 6-O- α -D-glucopiranosil-D-fructofuranose. Além disso o grupo de enzimas mais importante para a degradação do amido, α -amilases também pertence à família GH13 (MACGREGOR, E. A.; JANECEK, S.; SVENSSON, 2001).

A atividade de inversão de sacarose pode ser observada nas enzimas da família GH32, além disso, possuem também hidrolases capazes de hidrolisar polissacarídeos que contêm frutose. Apresentam ainda enzimas do tipo levanases, exo-inulinases (KOSHLAND, D. E.; STEIN, 1954).

Outra classe detentora de muitas hidrolases é a GH65, algumas enzimas desse grupo podem atuar em substratos que contêm ligações α -glicosídicas, além disso o grupo conta também com fosforilases, maltose fosforilase, trealose fosforilase, trealose 6-fosfato fosforilase. A reação de fosfólise catalisada pelas enzimas da GH65 são seguidas por uma inversão da configuração anomérica, esse mecanismo envolve o ataque nucleófilo direto por fosfato no carbono anomérico, envolvendo também a protonação do oxigênio glicosídico (FITTING; DOUDOROFF, 1952).

A classe GH130 também é composta de enzimas do tipo fosforilases e glicosídeo hidrolases que atuam em β -manosídeos (TAGUCHI, et al., 2020). Outras atividades que podem ser notadas na família são: β -1,4-mano-oligossacarídeo fosforilase, 1,4- β -manosil-N-acetilglucosamina fosforilase, 2- β -oligomanana fosforilase e ainda a β -1,2-manobiose fosforilase e β -1,2-manosidase (CHIKU et al., 2014). As enzimas dessa família fosforilam ligações do tipo β -manosídicas na extremidade não redutora do substrato, com inversão anomérica, tendo como produto a α -manose-1-fosfato (SENOURA et al., 2011).

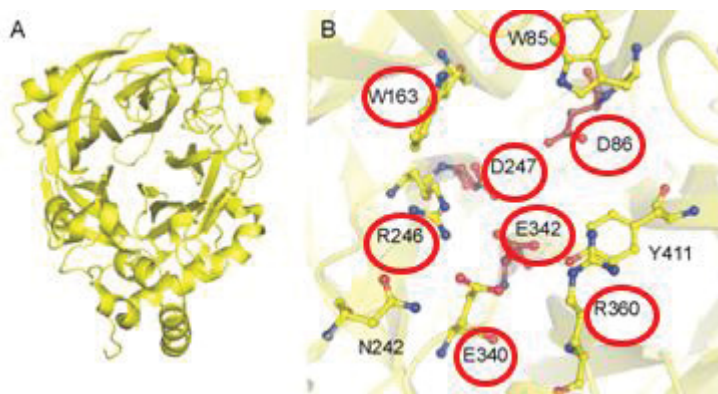
Na classe GH43 as atividades de α -L-arabinofuranosídeses, endo- α -L-arabinases e β -D-xilosídeses já foram descritas (FLIPPHI et al., 1993). Nesse grupo podemos observar tanto enzimas monofuncionais com atividade de arabinases, xilanases, α -1,2-L-arabinofuranosídeses, quanto enzimas com propriedades multifuncionais, como as exo-xilanase, β -1,4-xilosídeses, α -1,5-arabinofur-(pir)-anosídeses e α -1,4-glucosídeses, entre outras. Enzimas multifuncionais podem conter duas ou mais atividades enzimáticas, que catalisam etapas consecutivas de uma via metabólica, localizadas na mesma cadeia polipeptídica. As glicosídeo hidrolases da espécie

Paenibacillus curdlanolyticus (GH43B6) exibem propriedades multifuncionais, incluindo a atividade de exo- β -xilosidase, endo-xilanase e α -L-arabinofuranosidase, ou seja apresentou tanto endo e exo atividade enzimática, bem como atividade de desramificação xilanolítica (WONGRATPANYA et al., 2015). Uma aplicação biotecnológica notável de algumas enzimas desse grupo é a degradação de xilanas, realizando a liberação de suas cadeias laterais, resultando em uma hidrólise completa pelas endo-xilanases, fazendo possível a utilização da biomassa hemicelulósica nas biorrefinarias (WONGRATPANYA, et al., 2015).

As enzimas da família GH68 possuem um mecanismo com retenção de configuração, abrigando enzimas com atividade de transferase e hidrolases, tais como levanasacarases (E.C. 2.4.1.10), β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) e inulosacarase (E.C. 2.4.1.9). Estas enzimas podem produzir levana, inulina ou ainda diversos fruto-oligosacarídeos (FOS) (CHAMBE et al., 1974). A presença de uma enzima pertencente a GH68 em *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 com código de referência WP_020434349 chamou atenção, uma vez que levanasacarases desta família apresentam grande importância para a produção da levana, EPS de interesse industrial e biotecnológico (BEZZATE et al., 2000; ÖNER, E.T.; HERNÁNDEZ L.; COMBIE, 2016).

Em 1980 aconteceram as primeiras tentativas de caracterizar a levanasacarase proveniente do *Bacillus subtilis* (LEBRUN, VANRAPENBUSCH, 1980). Mais tarde MENG e FÜTTERER (2003) apresentaram a primeira estrutura de alta resolução (1,5 Å) da levanasacarase (Figura 9 A), ressaltando os aminoácidos mais importantes para garantir sua atividade (Figura 9 B) abrindo um horizonte para o entendimento do mecanismo de degradação da sacarose e da síntese de levana (LAMMENS, W.; LE ROY, K.; SCHROEVEN, L.; VAN LAERE, A.; RABIJNS, A.; VAN DEN ENDE, 2009; MENG, G.; FÜTTERER, 2003). Em 2005 foi determinada a estrutura 3D da levanasacarase produzida pela bactéria gram-negativa *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 (PDB ID: 1W18) (LAMMENS et al., 2009; MARTINEZ-FLEITES et al., 2005).

FIGURA 9 - ESTRUTURA EM ALTA RESOLUÇÃO DA LEVANASACARASE DE *B. SUBTILIS*.



Fonte: Modificado de LAMMENS, et al, 2009; MENG e FÜTTERER, 2003.

Bacillus subtilis levansaccharase (PDB: 1OYG) (A) e seu sítio ativo (B). Os aminoácidos demarcados são de grande importância para a atividade da enzima, foram encontrados no alinhamento realizado pelo Clustal Omega (Figura 10 -Alinhamento).

Em relação a atividade, a levansaccharase na presença de baixas concentrações de sacarose atua como uma hidrolase, utilizando a água como acceptor glicosil. Já em altas concentrações desse dissacarídeo, ela pode adicionar resíduos de frutossil a uma gama de aceptores, como a própria sacarose, a glucose e frutanas, apresentando atividade de transferase (CHAMBERT et al., 2006).

As enzimas GH68 atuam através de um mecanismo de pingue-pongue, ou deslocamento duplo, que consiste na formação de um intermediário covalente enzima-frutossil, seguida da hidrólise ou transferência. No produto de reação, observa-se a conservação da configuração anomérica da unidade frutossil, indicando um mecanismo com retenção de configuração (ÖNER et al., 2016).

A reação catalisada pela enzima levansaccharase acontece em duas etapas que envolvem um intermediário enzimático covalente glicosil. As unidades no sítio ativo responsáveis pela catalise foram identificados como aspartato, atuando como nucleófilo e um glutamato que atua como ácido/base (MENG & FÜTTERER, 2003). Na grande maioria dos casos, as enzimas da família utilizam sacarose como substrato doador glicosil, no entanto, em alguns casos onde há ausência de sacarose ou uma alta razão de frutana/sacarose, as enzimas dessa família podem utilizar a própria frutana como substrato doador (CHAMBERT et al., 1974).

Ainda não se sabe se a levansaccharase tem a necessidade de um cofator metálico para a catálise, no entanto a espécie *Bacillus subtilis*, por exemplo, apresenta um local de ligação de Ca^{2+} de baixa afinidade. O resíduo de Asp339, foi identificado como

essencial para a coordenação de íons de Ca^{2+} na estrutura dessa enzima (MENG; FÜTTERER, 2003). Foi possível observar usando o alinhamento das sequências das GH68, pertencentes a espécies Gram-positivas, que os resíduos envolvidos na ligação do cálcio são conservados na maioria dessas espécies, mas estão ausentes nas Gram-negativas, nesse caso uma ponte de dissulfeto assume o papel desses resíduos ausentes (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006).

Após realizada a anotação utilizando da sequência FASTA do *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 utilizando o servidor dbCAN, foi identificado uma provável enzima do tipo sacB na família GH68 contendo 493 aminoácidos, com código de referência WP_020434349. A partir de agora, chamaremos essa proteína de **PsrSacB**. Em seguida, foi realizada uma busca de alinhamento com outras proteínas utilizando o BLAST do servidor NCBI. Nesta busca, optou-se pela comparação com proteínas conhecidas presentes no banco de dados do *Protein Data Bank*, que em geral abriga proteínas que já tiveram sua estrutura tridimensional caracterizada. De acordo com a análise realizada, as proteínas com maior semelhança para **PsrSacB** foram as *Bs-SacB* e *Bm-SacB* de *B. subtilis* e *B. megaterium*, respectivamente, com cobertura acima de 90% (92% e 99% respectivamente) Os valores de *E value* para as duas espécies foram de zero, sendo considerado esse, um valor ótimo, uma vez que o valor de E (valor de expectativa) representa o número de vezes de falsos positivos entre os resultados de similaridades encontrados (VERLI, 2014). Já os valores de identidade (percentual de aminoácidos idênticos entre as sequências) ficaram por volta de 72% em relação aos dois *Bacillus*.

Em seguida, foi realizado o alinhamento de *PsrSacB* com *Bs-SacB* (Uniprot P05655) e *Bm-SacB* (Uniprot D5DC07) com o uso do servidor Clustal-omega 12.1 (Figura 10), indicando uma percentagem de identidade de 74% para *Bs-SacB* e 72% para *Bm-SacB*. Quando comparamos a *PsrSacB*, com uma levanasacarase já caracterizada de *Paenibacillus polymixa* (Uniprot Q9Z5E5) (BEZZATE et al., 2000), foi observado uma similaridade de 66,87% (Apêndice 2).

FIGURA 10 - ALINHAMENTO DE PSRSACB (WP_020434349.1) DE *P. SONCHI GENOMOVAR RIOGRANDENSIS*, COM BS-SACB E BM-SACB DE *B. MEGATERIUM* E *B. SUBTILIS*, RESPECTIVAMENTE.

WP_020434349.1	MNKKMARQAAAVTFATALLAGGGASALAKGNNNGDYKGNNSGDYKESYGFSHITREDML	60
tr D5DC07 D5DC07_BACMD	MKMKRVAKHTTAATLAAALLVGGGYQTFAGKND-----SKDFNNSYGISHITRDNMV	52
sp P05655 SACB_BACSU	MNKKFAKQATVLTFTTALLAGGATQAFKATN-----QKPYKETYGISHITRDHML	52
	*:	
WP_020434349.1	KIPEQQKSGQFQVPAFNAASIQNISSAKGSDQWGNALDLDVWDSWPLQADGTVAEYNGY	120
tr D5DC07 D5DC07_BACMD	KIPQQNSDQFKVPAFDESTIKNIASAKGKNASGNTIDLVDWDSWPLQADGTVAHYHG	112
sp P05655 SACB_BACSU	QIPEQQKNEKYQVPEFDSSTIKNISSAKG-----LDVWDSWPLQADGTVAHYHG	103
	:*:	
WP_020434349.1	HIVFALAGDPKKGWDTFIYMFYQKVGDTSIDSWKNAGRVFKDSDKYVPNDPILNKQAEW	180
tr D5DC07 D5DC07_BACMD	QIVFALAGDPKDSNDTSVYLFYKAGDKSIDSWKNAGRVFKDSDKVPNDPHLNQQTQEW	172
sp P05655 SACB_BACSU	HIVFALAGDPKNADTSIYMFYQKVGETSIDSWKNAGRVFKDSDKFDANDSILKQQTQEW	163
	:*****:	
WP_020434349.1	SGSATLTKDQKQVRLFYTNRQGWDPAGHGFQKQLTTAQVNVSKPDADTLKVDGVEDFKSV	240
tr D5DC07 D5DC07_BACMD	SGSGTLTKDQKQVRLFYTDYSG----KQYQKQLTTAQVNVMSQPNNDTLKVDGVEDYKSI	227
sp P05655 SACB_BACSU	SGSATFTSDGKIRLFYTDYSG----KHYGKQLTTAQVNVSA--SDSSLNINGVEDYKSI	217
	**:	
WP_020434349.1	FDGDGKQVNDQAFGGGDY--ADNHTLRDPHYVEDNGRKYLVFESNTGTETGYQGEESL	298
tr D5DC07 D5DC07_BACMD	FDGDGKIYQTVQQFIDEGGYDTGDNHTLRDPHYIEDNGHKYLVFEANTGTEDGYQGEDSL	287
sp P05655 SACB_BACSU	FDGDGKTYQVNDQAFIDEGNYSGDNHTLRDPHYVEDKQKHYLVFEANTGTEDGYQGEESL	277
	*****:	
WP_020434349.1	YNRSFYEGSKVFFENEKLLSGPKKSLAALANGSLGIEELNDDYTLKVMKPLIASNTV	358
tr D5DC07 D5DC07_BACMD	YNRAYYGGNPPFFQSEKKLLEGSNKEKASLANGALGIEELNDDYTLKVMKPLIANTSNTV	347
sp P05655 SACB_BACSU	FNKAYYGKSTSFRRQESQKLLQSDKRTAELANGALGIEELNDDYTLKVMKPLIASNTV	337
	:*:	
WP_020434349.1	TDEIERANVFEMNGKWLFTDSRGSKMTIDGIGANDVYMLGYVADSLTGPYKPLNGSLV	418
tr D5DC07 D5DC07_BACMD	TDEIERANIFKKGKWLFTDSRGSKMTIDGIGQDDVYMLGYVSNLTGKYKPLNDTGLV	407
sp P05655 SACB_BACSU	TDEIERANVFKMNGKWLFTDSRGSKMTIDGITSNDIYMLGYVSNLTGKYKPLNKTLV	397
	*****:	
WP_020434349.1	LHMNLDPNDLTWTYSHFAIPQAEQGNVIVITSYMTNRGLYAEQHSFAPSFLVNIKGSKTS	478
tr D5DC07 D5DC07_BACMD	LHMNLDPNDKFTYSHFAVPQTKGDNVIVITSYMTNRGFYEDNHSFAPSFLVNIKGSKTS	467
sp P05655 SACB_BACSU	LKMNLDPNVDTFTYSHFAVPQAKGNVIVITSYMTNRGFYADKQSTFAPSFLVNIKGSKTS	457
	*:	

● W85 Triptofano	● E342 Ácido Glutâmico	WP_020434349.1 PsrsacB
● D86 Ácido Aspártico	● E262 Ácido Glutâmico	tr D5DC07 D5DC07BACMD Bm-SacB
● W163 Triptofano	● S164 Serina	sp P05655 SACB_BACSU Bs-SacB
● R246 Arginina	● S412 Serina	
● D247 Ácido Aspártico	● D339 Ácido Aspártico	
● E340 Ácido Glutâmico	● R360 Arginina	

Fonte: O autor 2020.

Para a espécie de *Bacillus subtilis* a Arg360 é essencial para a polimerização da levana, ainda que não participe do mecanismo de reação. Esse aminoácido pode modular a especificidade e a eficiência do processo de transfructosilação. Em levanasacaras de bactérias Gram-positivas essa unidade de arginina é conservada, já em Gram-negativas ele pode ser substituído por uma histidina encontrada na mesma posição. Se essa arginina for substituída, utilizando mutagênese sitio dirigida

por exemplo, por lisina, serina ou leucina a capacidade de sintetizar levana usando sacarose, pode ser prejudicada (LAMMENS et al., 2009).

É importante notar que a arginina 360 (R360) é conservada em *Bm-SacB* e *PsrSacB*, como mostra a figura 10. Os aminoácidos W85 24 de *Bs-sacB* (Figura 10) são totalmente conservados *Bm-SacB* e *PsrSacB*. Estas unidades são responsáveis pela ligação da sacarose e mutações nestas posições podem afetar a atividade da enzima. O ácido aspártico (D86) que participa ativamente do mecanismo de reação no sítio ativo é conservado para todas as enzimas (ORTIZ-SOTO et al., 2019). Tais aminoácidos de relevância são encontrados em destaque na estrutura descrita por Meng e Futterer (2003) (Figura 9 B).

Modificações presentes nas posições W85, W163 e R246, podem trazer complicações especialmente para a capacidade de polimerização das enzimas GH68 de *Bacillus*, o que pode resultar em taxas de transfructosilação baixas, sintetizando somente produtos pequenos como os FOS ketoses e nistoses (LI, et al., 2011). Nas posições 164 e 412, somente os aminoácidos alanina ou serina podem ser encontrados nas enzimas GH68, ambas espécies participantes do alinhamento apresentam serina nas posições citadas. Quando o aminoácido presente é a serina, sua cadeia lateral pode estabelecer ligações de hidrogênio com a sacarose. As posições 339 e 340, ocupadas pelo ácido aspártico e pela isoleucina, respectivamente, também são características das glicosilhidrolases do grupo 68 (ORTIZ-SOLO, et al., 2019), ambas as posições foram confirmadas, tanto para as GH68 dos *Bacillus*, quanto para a *PsrSacB*.

Além da atividade catalítica depender do resíduo D86, ainda é importante ressaltar a presença da unidade de ácido glutâmico (E262), que colabora para a orientação correta do resíduo R246 em relação a sacarose, pois este ajuda a estabilizar o substrato no sítio ativo. Esses locais também permanecem conservados nas três espécies alinhadas (MARDO et al., 2014). Dessa forma, nota-se que aminoácidos importantes para a atividade enzimática permanecem conservadas em *PsrSacB*, sugerindo que esta enzima poderia ser ativa em *P. sonchi* genomovar *Riograndensis* SBR5.

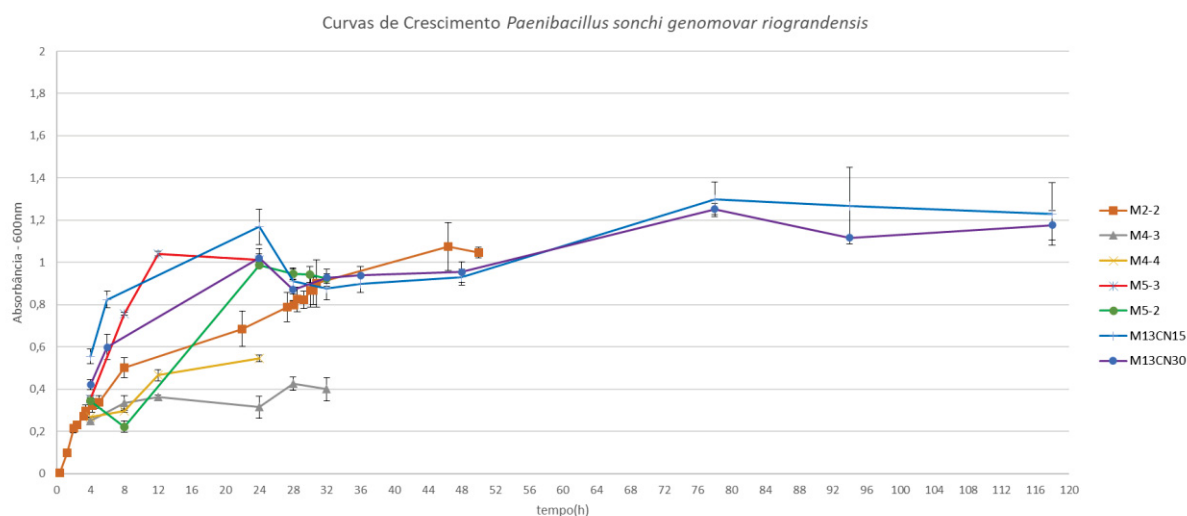
Segundo análises feitas pelo servidor SignalP 5.0, *PsrSacB* apresenta peptídeo sinal com probabilidade de ser do tipo Sec/SPI (94.63%). O seu sítio de clivagem se localiza entre os aminoácidos 29 e 30. A probabilidade de a sequência não apresentar nenhum peptídeo sinal é baixa, de 5,37% (Figura 11). Dessa forma, *PsrSacB* pode

GH68, com provável capacidade de produzir o EPS levana ou FOS. Sendo assim todos os meios de cultivo testados foram pensados para obtenção de levana. A sacarose foi escolhida como fonte de carbono para todos os meios. Esse açúcar pode ser utilizado como fonte de carbono tanto para obtenção da levana por meio do próprio cultivo, quanto pela obtenção do EPS por meio da enzima isolada (JAKOB et al., 2013). A produção de levana foi observada em várias espécies do gênero *Paenibacillus* e *Bacillus*, quando utilizada a sacarose como fonte de carbono (HAN & CLARKE, 1990; LIU et al., 2010; SPERB et al., 2016; WU et al., 2013; H. XU et al., 2018).

Segundo Ernandes (2006), em um primeiro momento do cultivo, a presença da sacarose serve como um estímulo para o crescimento da bactéria no meio, e em um segundo momento, o dissacarídeo induz a produção de levana. Desta forma, um bom crescimento do microrganismo não resulta necessariamente em uma boa produção de levana. Ainda é importante ressaltar que a composição do meio se mostra um limitador em termos de bom desempenho na produção do EPS. A produtividade do exopolissacarídeo pode ser afetada por parâmetros como pH, temperatura, aeração e pela composição do meio de cultivo (KAWAI et al., 1992). Sendo assim foram escolhidas diferentes composições de meios a fim de fornecer diferentes graus de riqueza de sais para o microrganismo. Os meios escolhidos foram o Meio 2, considerado pobre em sais, baseado no trabalho de Ernandes (ERNANDES, 2006), um meio mediano em termos de sais, Meio 4, baseado no trabalho de Brito e colaboradores (2015) e, por fim, um meio rico em sais, Meio 5, baseado no trabalho de Sperb e colaboradores (2016). Ainda foi preparado o meio M13, baseado também nos estudos conduzidos por Brito (2015), no entanto, adicionamos extrato de levedura, em duas razões de C/N diferentes, sendo elas razão de 15 e 30 (Tabela 3).

A cepa do *P. sonchi* genomovar *Riograndensis* SBR5 foi cultivada mantendo as mesmas condições de temperatura (30°C), pH (7) e agitação (120 rpm) para todos os meios de cultivos.

FIGURA 12 - CURVA DE CRESCIMENTO DA *P. SONCHI GENOMOVAR RIOGRANDENSIS* EM DIFERENTES MEIOS: M2, M4, M5, M13CN15 E M13CN30



Fonte: O autor, 2021.

Composição dos meios (g/L):

M2 (laranja escuro – 2° cultivo realizado com essa composição): Extrato de levedura (2 g), NaCl (5 g), 30 g de sacarose

M4 (cinza - 3° cultivo realizado com essa composição e amarelo - 4° cultivo realizado com essa composição): K₂HPO₄ (4,09 g), NaH₂PO₄ (1,39 g), (NH₄)₂SO₄ (2,11 g), biotina (0,1 mg) e 1 ml de solução elementar (g/L): 5,56 g FeSO₄; 0,0227 g CuCl₂.H₂O; 0,736 g CaCl₂.2H₂O; 0,04 g CoCl₂.6H₂O; 9,90 g, MnCl₂.4H₂O; 0,288 g ZnSO₄.7H₂O; 0,048 g Na₂MoO₄.2H₂O; 0,031 g H₃BO₃, 80 g de sacarose.

M5 (verde - 2° cultivo realizado com essa composição e vermelho - 3° cultivo realizado com essa composição): KH₂PO₄ (3 g), Na₂HPO₄ (6 g), NaCl (0,5 g), NH₄Cl (1 g), 1 mL MgSO₄ (1 M); 10 mL CaCl₂ (0,01 M); 1 mL FeCl₃.6H₂O (2 μM), 80 g de sacarose.

M13 (azul razão - 15 de C/N e roxo – razão 30 de C/N): Mesma composição do meio 4, com adição de Extrato de levedura, em duas razões de C/N e 80 g de sacarose:

M13CN15: 18 g de extrato de levedura + 80 g de sacarose (g/L)

M13CN30: 6,6 g de extrato de levedura + 80 g de sacarose (g/L).

Como podemos observar no gráfico (Figura 12), o microrganismo apresentou um crescimento favorável em todos os meios propostos, tanto em 3% de sacarose quanto em 8%, mesmo em tempos de cultivo diferentes. Dentre as curvas apresentadas no gráfico podemos observar que no tempo de 24 h de cultivo, o M4 teve um desempenho mais baixo em termos de crescimento do microrganismo, em comparação com M2 e M5, no entanto quando enriquecido com extrato de levedura, nas duas razões de C/N de 15 e 30 (M13CN15 e M13CN30), sua curva de crescimento apresentou um aumento na densidade óptica.

É importante ressaltar que o M2 mesmo contendo extrato de levedura apresentou D.O. um pouco mais baixa ou igual aos cultivos de M13, nesse mesmo tempo de 24 h, demonstrando que um meio mais rico em sais, acompanhado do extrato pode ajudar a alavancar o crescimento da bactéria. O maior valor de D.O. alcançado foi com o meio 13 (D.O. = 1,4 – Figura 12) em 118 h de cultivo, sendo esse considerado o meio mais adequado para o cultivo do *P. sonchi* genovar Riograndensis SBR5, entre os meios testados com sacarose. De maneira geral, a partir de 12 h de cultivo, o crescimento bacteriano iniciou sua estabilização, dando início a fase estacionária próximo das 20 h de cultivo. Alguns polissacarídeos são produzidos tardiamente durante a fase exponencial do crescimento bacteriano, portanto quanto maior o número de células em suspensão no cultivo, melhor o rendimento (SUTHERLAND, 1988).

Os tempos relatados variam de horas a dias de cultivo (Figura 12). A produção de levana é observada em diferentes tempos relatados na literatura. Cultivos de 72 h utilizando a bactéria *B. subtilis*, 10 dias para *B. polymyxa*, e diferentes tempos para *Paenibacillus spp.*, 60 h (LIU et al., 2009, 2010b, 2012), 72 h (AGUILERA et al., 2008; JUNG et al., 2007), e 96 h (RAFIGH et al., 2014), foram relatados, com rendimentos que variaram de 4,2 a 35 g/L.

Seguida das leituras das D.O. para verificação do crescimento do microrganismo, o meio cultivado foi então centrifugado (3500 g por 20 min), dialisado (membrana de 6-8 kDa) e finalmente liofilizado e pesado, gerando as frações: M2-2 (3% de sacarose), M4-3, M4-4, M5-2, M5-3, M13CN15 e M13CN30 (os demais meios com 8% de sacarose) (Tabela 5). Os meios M2-2 e M5-2 foram precipitados com 3 volumes de etanol, no entanto não foi observada nenhum tipo de precipitação, mesmo após deixar o sobrenadante com etanol em geladeira *overnight*. O sobrenadante contendo etanol foi então concentrado em rotaevaporador a 50°C, dialisado (membrana de 6-8 kDa) e liofilizado para ser quantificado.

TABELA 5 - DENSIDADE ÓTICA, RENDIMENTO E TEMPO DE CULTIVO DAS DIFERENTES FRAÇÕES GERADAS.

Meio de cultivo	Fração gerada	Rendimento (g/L)	Tempo de cultivo (h)	D.O.
Meio 2	M2-2	0,20	52	1,214
Meio 4	M4-3	0,07	32	0,399
	M4-4	x	24	0,544
Meio 5	M5-2	0,17	32	0,924
	M5-3	x	24	0,678
Meio 13	M13CN15	10,6	118	1,230
	M13CN30	7,74	118	1,177
Observação	Essas mesmas frações do meio M13 foram dialisadas			
Rendimentos após a dialise				
	M13CN15D	0,10	118	1,230
	M13CN30D	0,05	118	1,177
Novo cultivo				
Meio13	M13CN15A	5,63	118	1,410
	M13CN15E	2,85	118	1,370
Observação	Essas mesmas frações foram dialisadas			
Rendimentos após a dialise				
Meio13	M13CN15AD	0,587	118	1,410
	M13CN15ED	0,327	118	1,370

Fonte: O autor, 2021.

Dentre os primeiros meios testados, M2-2 teve o maior rendimento (0,20 g/L) e maior D.O. (1,214), em comparação ao M4 (0,07 g/L, D.O. = 0,399 para M4-3 e 0,588 para M4-4) e M5 (0,17 g/L; D.O. = 0,924 para M5-2 e 0,678 para M5-3), importante lembrar que diferente dos meios M4 e M5, o meio M2 continha extrato de levedura (Tabela 5). Dentre os muitos componentes do meio de cultura que podem causar limitações para o crescimento celular e produção de EPS, o nitrogênio é um fator fundamental. Há relatos que o uso de fontes de nitrogênio inorgânicos, como NH_4Cl , NaNO_3 podem causar uma regressão em termos de crescimento e produção de EPS, quando comparados com uma fonte de nitrogênio orgânica, como é o caso

do extrato de carne ou extrato de levedura. Os meios M4 e M5 continham em suas composições somente NH_4Cl como fonte de nitrogênio. Para esses cultivos foram observados rendimentos que não ultrapassaram 0,20 g/L. Uma hipótese para esse menor rendimento para as frações obtidas do M4 e M5 pode ser devido ao fato de que certos aminoácidos essenciais não conseguem ser sintetizados a partir de compostos de nitrogênio inorgânicos, assim devido a supressão do metabolismo, o EPS produzido pode ser degradado pelo microrganismo (RAZACK, VIJAYAGOPAL VELAYUTHAM, 2013).

O meio M13CN15 foi cultivado ainda em condições de stress, com adição de etanol, resultando frações de nome M13CN15E e cultivado também em condição de anaerobiose com o uso do *AirLock*, resultando nas frações de nome M13CN15A (Tabela 5). No entanto, a mesma situação foi observada, o meio cultivado foi centrifugado (3500 g/20 min), precipitado com 3 volumes de etanol, e mais uma vez foi observado uma grande quantidade de material precipitado (5,63 g/L para M13CN15A e 2,85 g/L para M13CN15E). Após a diálise, foram obtidos frações com baixos rendimentos tanto para o meio com etanol, quanto para o meio cultivado em condições anaeróbias, 0,327 e 0,587 g/L, respectivamente (Tabela 5). Apesar do baixo rendimento, os experimentos são reprodutíveis, uma vez que o perfil de crescimento da cepa se manteve em diferentes condições de cultivo (Figura 12).

Um parâmetro da composição que pode ser decisivo para uma boa produção de EPS é a quantidade de sacarose, nos meios foram utilizados 30 e 80 g/L de sacarose, no entanto há relatos de que um aumento de 100 para 400 g/L de sacarose pode melhorar a produção de EPS, no entanto o aumento exacerbado dessa concentração pode dificultar a ação da enzima, pois pode aumentar a viscosidade do meio (XU et al., 2021). Portanto, a quantidade de sacarose deve ser considerada juntamente com os demais parâmetros do cultivo, pH, temperatura e tempo de cultivo, para que o meio de cultura seja otimizado da melhor forma possível.

Han & Clarke (1990), relataram a produção de 36 g/L de exopolissacarídeo quando empregado uma quantidade de 4-16% de sacarose no meio de cultura. Segundo os autores, quando utilizado 8% de sacarose como fonte de carbono, assim como nas composições dos meios M4, M5 e M13 avaliados neste estudo, foi possível obter 3,6 g de levana a cada 100 ml de cultivo, para a espécie de *B. polymyxa* (NRRL B-18475) (HAN & CLARKE, 1990). Um meio contendo 3,5% de sacarose pode produzir 9,5 g/L de exopolissacarídeo, a partir do cultivo da espécie *P. mucilaginosus*

WL412, porcentagem próxima da utilizada na composição do meio M2 (3% de sacarose). Mesmo com valores ainda menores de sacarose, como o uso de 2%, pode-se observar a produção de 10 g/L de EPS, para *P. polymyxa* JB115 (JUNG et al., 2007).

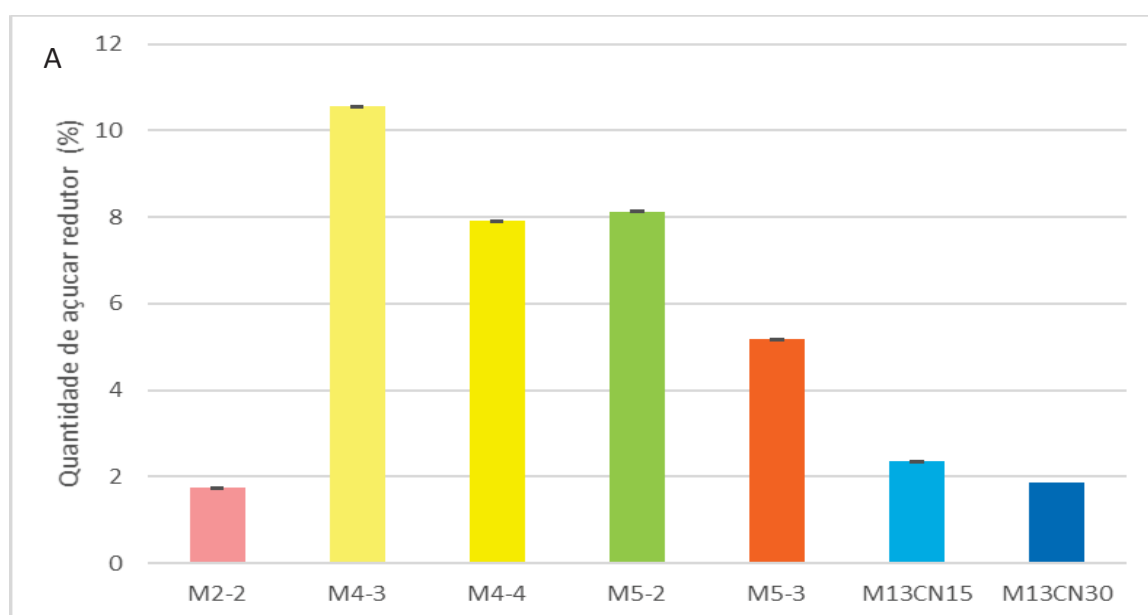
O tempo de cultivo não refletiu diretamente em uma melhora do rendimento observado, mesmo com tempos variando de 24 a 118 h, os rendimentos se mantiveram baixos. O cultivo dos gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* é relatado utilizando diferentes fontes de carbono, em diferentes tempos de cultivo, com obtenção de um bom rendimento de levana, entre 3,46 a 41,25 g/L (LIANG & WANG, 2015).

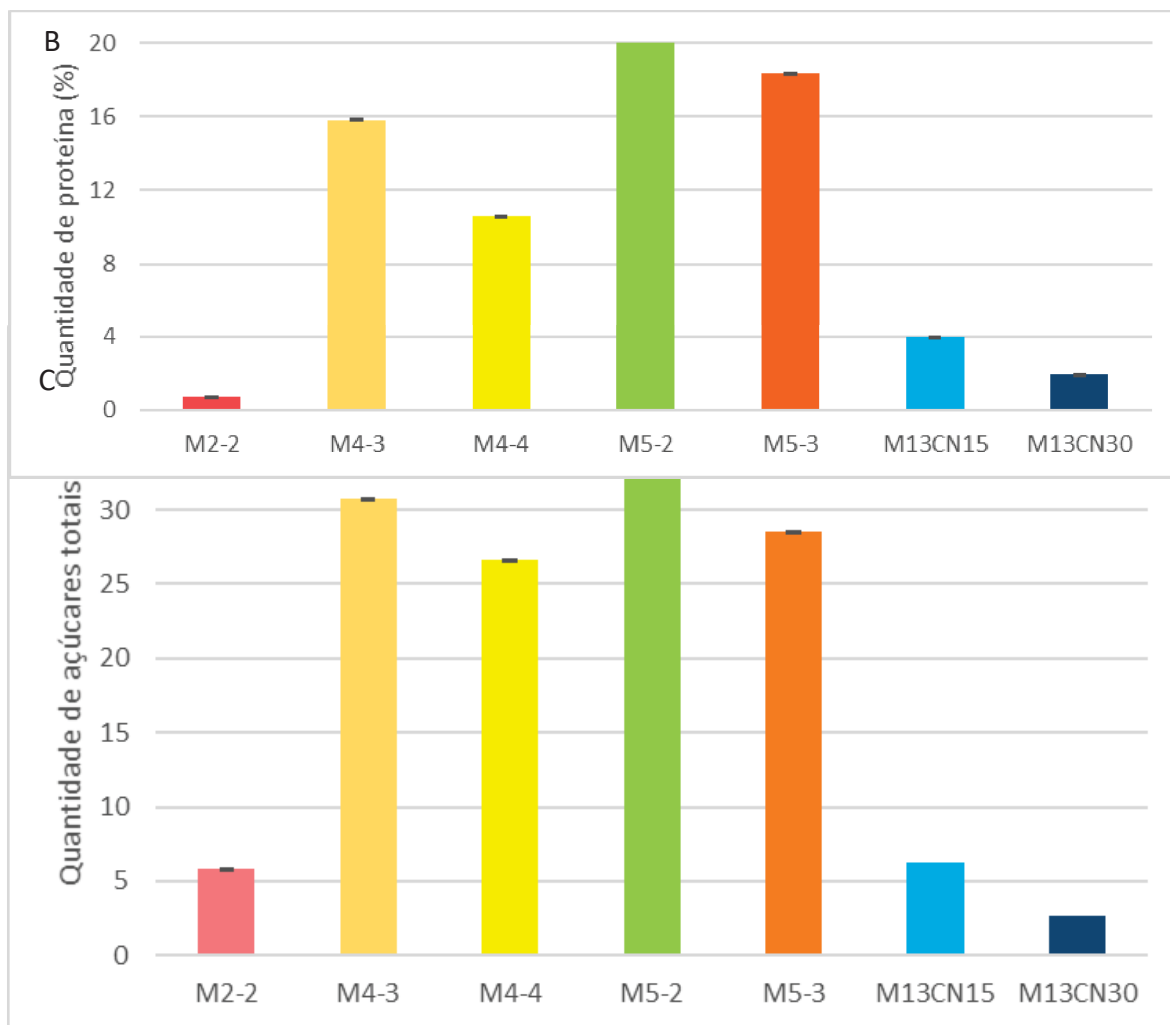
Segundo Ernandes (2006), o aumento na massa celular é provocada pelo aumento proporcional de fonte de carbono no meio de cultivo, no entanto, esse fato não reflete diretamente no rendimento da produção de exopolissacarídeo. Ao comparar dois meios de cultivo diferentes para *B. subtilis*, contendo o primeiro meio extrato de levedura, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ e citrato de ferro III, e um segundo meio com extrato de levedura, KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$ e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, com adição de sacarose (10, 20, 30, 40 e 50 g/L), notou-se que, houve um aumento no crescimento celular, mas não necessariamente um impacto direto na produção de levana. No primeiro meio observou-se um aumento proporcional no crescimento celular, de 1,1 a 1,4 g/L, apesar do aumento no crescimento não houve produção de levana. Na segunda proposta de meio, observou-se que houve também um aumento no crescimento (de 0,9 a 1,6 g/L de massa celular), acompanhado da produção de levana. O uso de meio de cultivo contendo 5% de sacarose favoreceu a produção 2 g/L de levana. Esse fato foi observado não só para a espécie de *Bacillus*, como também para uma espécie de *Zymomonas mobilis* CTT 4494 (ERNANDES, 2006), ainda utilizando 5% de sacarose, foi relatada a produção de 22 g/L de levana por cepas de *Bacillus sp.* (HADDAR et al., 2021). O aumento gradativo da quantidade de sacarose não afetou diretamente a produção de levana proporcionalmente como afetou o crescimento celular, para ambas as espécies. Quantidades ainda superiores, 10% de sacarose empregada no meio, tiveram produção de 38,4 g/L de EPS por cepas de *Paenibacillus polymyxa* 92 (GRINEV et al., 2020), enquanto que 2,85 g/L de levana pode ser produzida nessa mesma concentração de fonte de carbono por *B. subtilis* AF17 (HADDAR et al., 2021).

Assim, no presente trabalho, mesmo fornecendo o ambiente químico necessário para a produção de FOS e EPS nos meios de cultivo de *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5, foram recuperadas frações com baixo rendimento: M2-2: 0,2 g/L; M4-3: 0,0713 g/L e M5-2: 0,176 g/L.

Foi observado que as dosagens de açúcar redutores, totais e proteínas das frações M4-3, M4-4, M5-2, M5-3, M13CN15 E M13CN30, notamos que a maior fração obtida em termos de carboidratos totais e proteínas foi M5-2 (20 e 34%, respectivamente – Figura 13). Os valores encontrados para todas as frações foram considerados baixos comparados ao esperado para um extrato de polissacarídeo, onde espera-se atingir pelo menos uma somatória de 90% entre carboidratos e proteínas. É interessante ressaltar que com exceção do meio M2, todas as dosagens de proteínas foram superiores às dosagens de carboidratos redutores e totais. No entanto, os valores apresentados para as dosagens de proteínas podem ter sido influenciados pela presença da sacarose nas frações obtidas, pois a presença desse carboidrato influencia na cor produzida pela reação da albumina no método utilizado (HARTREE, 1972). Entende-se pelas outras análises que os açúcares totais e redutores presentes nas frações são provenientes na sacarose restante do meio de cultura e da sua hidrólise.

FIGURA 13 - DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES (A), PROTEÍNAS (B) E AÇÚCARES TOTAIS (C) DAS FRAÇÕES M4-3, M4-4, M5-2, M5-3, M13CN15 E M13CN30.





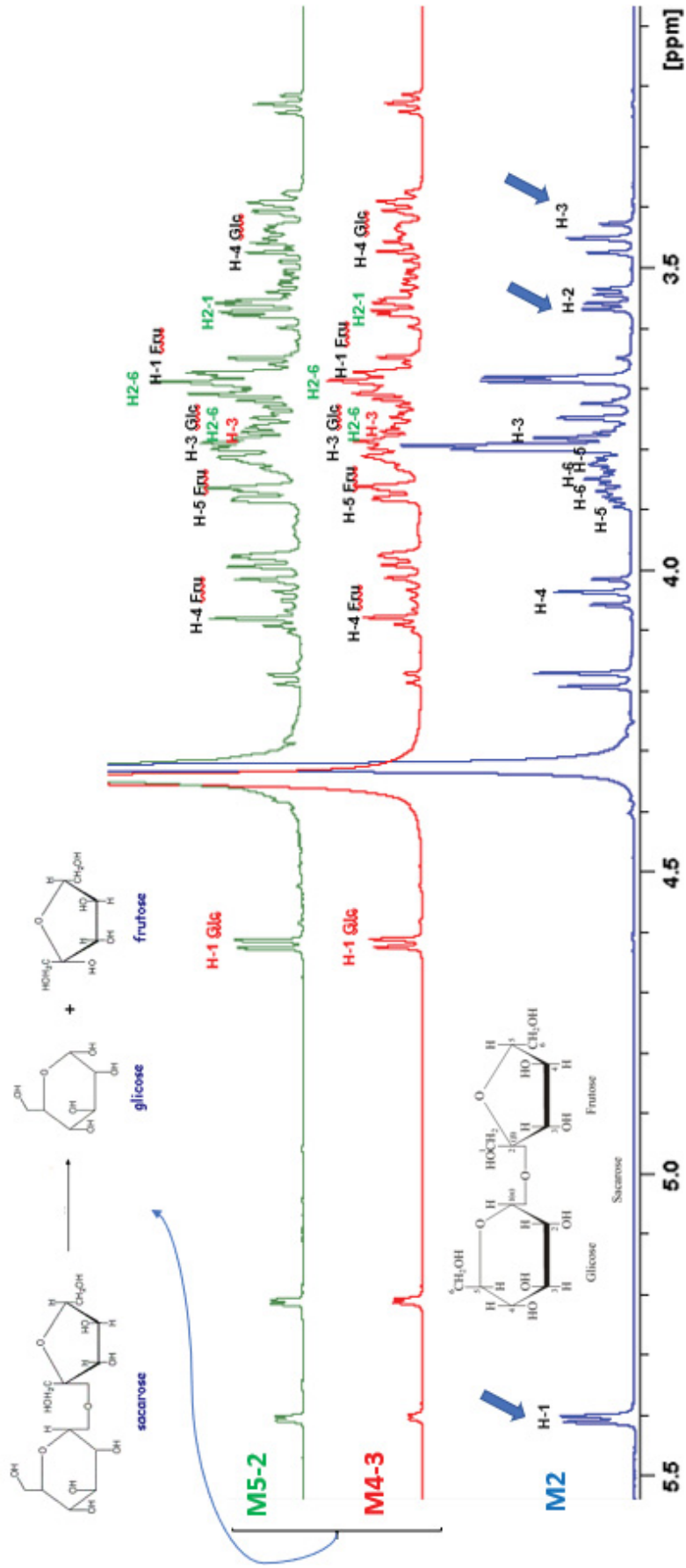
Fonte: O autor, 2021.

As dosagens realizadas no exopolissacarídeo obtido do cultivo da espécie *Rhizobium tropici* em meio PSYL, por 96 h (SEMIA 4080 and MUTZC3), revelaram percentagens de 79-85% de carboidratos e cerca de 0,12 mg de proteína por grama de EPS, para as frações encontradas (CASTELLANE et al., 2017). Xu e colaboradores (2018) relatam que o extrato apresentou 90% de proteína, anterior a purificação. Neste caso, o autor cultivou *Paenibacillus*, em meio sintético contendo 3,5% de sacarose a 30°C. O cultivo da cepa *Paenibacillus* sp. 2H2, cultivada com 3% de sacarose, a 30°C por 48 h, obteve uma percentagem de 65% para carboidratos (RAFIGH et al., 2014). Os baixos teores de carboidratos e proteínas obtidos no presente trabalho indicam a ausência de EPS nos cultivos, uma vez que em frações com EPS esperasse um valor somatório de carboidratos e proteínas alto.

Em seguida as frações obtidas dos meios de cultivo foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). No espectro de RMN ^1H da fração M2-2 (Figura 14) verifica-se sinais típicos da sacarose: hidrogênio anomérico ($\alpha\text{-D-Glcp}$) em 5,42ppm, apresentado como um duplete de constante de acoplamento igual a 3,85 Hz. Hidrogênios correspondentes H3, H5 e H6 da unidade foram observados em 3,77, 3,86 e 3,82 ppm, respectivamente. Os sinais 3,89 e 3,83 ppm pertencentes a H5 e H6 de unidades de frutose também foram notados. (SOBOLEV et al., 2005).

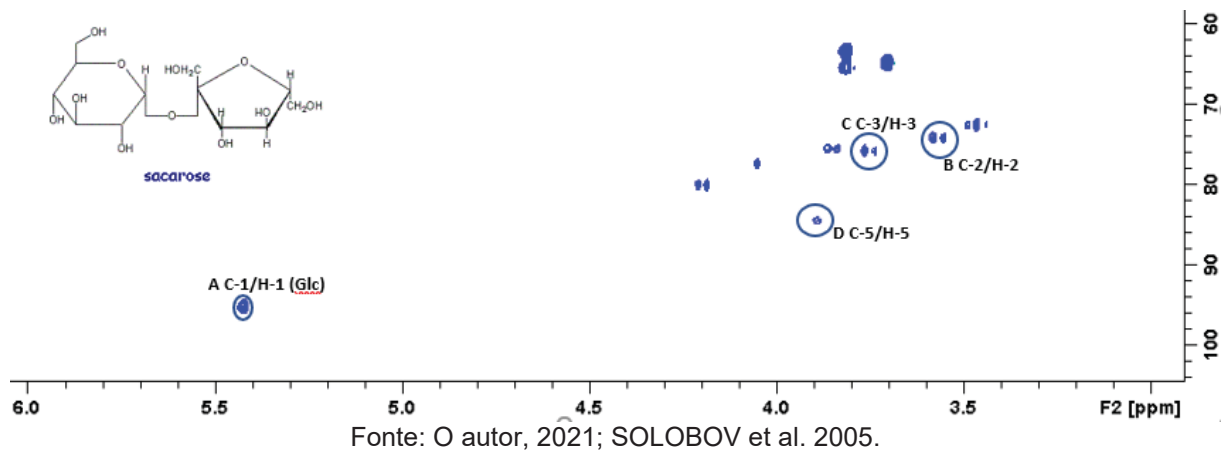
No espectro de ^1H - ^{13}C HSQC de M2-2 (Figura 15), podemos notar a correlação do H-1/C-1 (5,42/95,0 ppm) da $\alpha\text{-D-Glcp}$ da sacarose. A correlação C-5/H-5 da unidade de frutose foi observada em 3,86/84,0 ppm (D), já a correlação C2/H2 (B) e C3/H3 (C) pode ser notada em 3,56/74,1 e 3,77/73,2 ppm, respectivamente (SOBOLEV et al., 2005). Isso demonstra que a fração M2-2 continha sacarose, porém não foram identificados sinais relativos a polissacarídeos e/ou fruto-oligossacarídeos.

FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE ¹H DA FRAÇÃO M2-2 (AZUL) M4-3 (VERMELHO) E M5-2 (VERDE)



Fonte: O autor, 2021; SOLOBOV et al. 2005

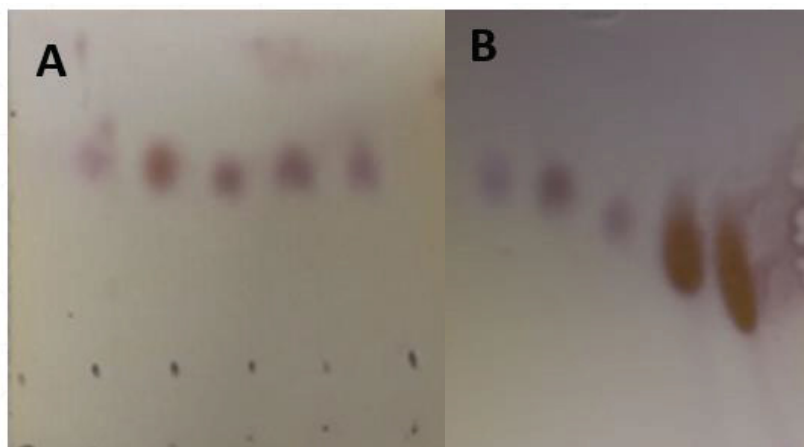
400 MHz, 70°C. SOLVENTE: D₂O, ACETONA COMO PADRÃO INTERNO EM 2.208 PPM

FIGURA 15 – $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC DA FRAÇÃO OBTIDA DO CULTIVO DO MEIO M2-2

70°C, 400 MHz. SOLVENTE D_2O , ACETONA COMO PADRÃO INTERNO EM 2,208 PPM E 32,69 PPM PARA ^1H E ^{13}C .

Além do baixo rendimento observado para as frações M4-3 e M5-2, ao analisar os espectros de RMN de ^1H (Figura 14) nota-se sinais característicos de H1 de glucose e frutose livres em 4.61 e 3,69 ppm, respectivamente, provenientes da hidrólise da sacarose. Estes resultados indicaram que o material recuperado nestes cultivos não seria a levana ou outro EPS.

FIGURA 16 - - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA, DAS FRAÇÕES M2-2, M4-3, M5-2 e M5-3



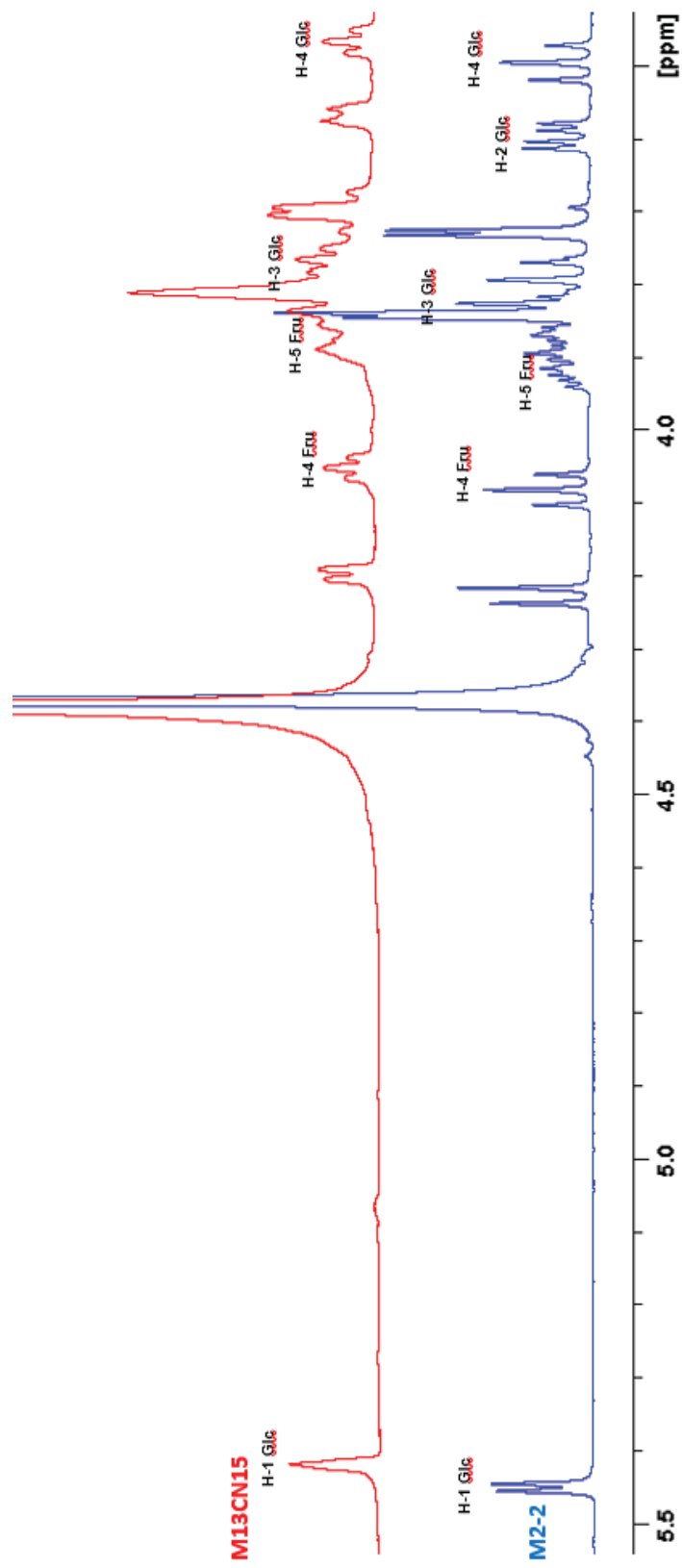
Fonte: O autor, 2021.

Padrões utilizados: sacarose, glucose e frutose (1 mg/mL).

A: Meio M2-2 e meio M5-2 **B:** Meio M5-3 e meio M4-4

Cromatografias em camada delgada foram realizadas para as frações M2-2, M4-3 e M5-2 e M5-3, utilizando a fase móvel acetato de etila: ácido acético: propanol: água 4:2:2:1 (Figura 16). A presença da sacarose pode ser notada mais uma vez em todas as frações analisadas. Não é possível ver sinais de glucose e frutose com clareza para todas as frações testadas, levando-nos a acreditar que a sacarose no meio predomina. As bandas mais marcantes presentes na Figura 16, indicadas pela seta no quadro B, podem sugerir a existência de componentes de maior massa na amostra. Entretanto, não foram observados sinais destes oligossacarídeos no espectro de RMN de ^1H . Provavelmente, essas bandas mais espaçadas na CCD são provenientes da alta concentração de sacarose na amostra, mesmo após diálise e diluições para aplicação da amostra na placa.

Inicialmente os rendimentos foram obtidos após centrifugação (3500 g/20 min), seguida de precipitação com 3 volumes de etanol, na qual foi observada grande precipitação de material, que foi recolhido, liofilizado e pesado. Foram observados os rendimentos de 10,6 e 7,74 g/L obtidos para as frações M13CN15 e M13CN30 (Tabela 5). Baseado nos resultados obtidos com M2-2, M4-3 e M5-2 o alto rendimento de M13CN15 e M13CN30 poderia ser resultante da presença de sais e sacarose proveniente do meio de cultura. Assim, as frações foram submetidas a diálise, gerando M13CN15D (0,10 g/L) e M13CN30D (0,05 g/L), respectivamente, sugerindo que grande parte da massa apresentada anteriormente não se tratava de EPS (Tabela 5). Nota-se que ao modificar a razão carbono/nitrogênio para uma razão maior (M13CN30), o rendimento decaiu bastante, de 0,10 g/L para a razão 15, caindo para 0,05 g/L na razão 30, sendo assim os demais cultivos foram feitos utilizando a composição do meio com razão de 15 C/N.

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE M13CN15 e M2-2

Fonte: O autor, 2021.

Referências: SOLOBOV, et al., 2005.

400 MHZ, 70°C. SOLVENTE: D_2O , ACETONA COMO PADRÃO INTERNO EM 2,208 PPM.

FIGURA 18 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA, REALIZADA NAS FRAÇÕES OBTIDAS, APÓS HIDRÓLISE. M13CN15



Sacarose Glucose Frutose Manose M13CN15

Fonte: O autor, 2021.

Padrões utilizados: sacarose, glucose, frutose e manose (1 mg/mL).

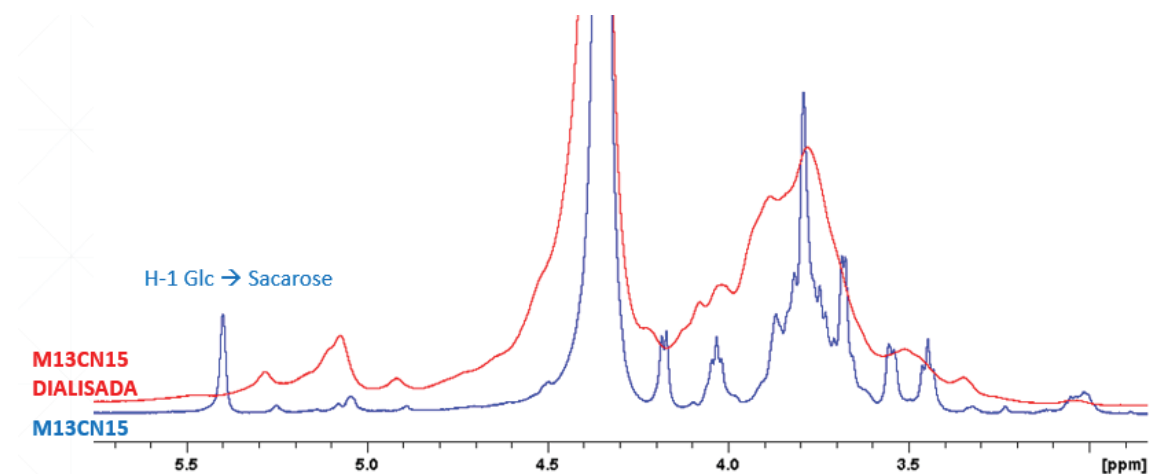
A cromatografia em camada delgada realizada nas amostras M13CN15 foi realizada após a hidrólise com TFA 2 M a 100°C por 8 h (USOV; ELASHVILI, 1991), com o intuito de observar os monossacarídeos componentes da fração, uma vez que o espectro na figura 18 apresenta outros sinais além dos sinais da sacarose já observados anteriormente nos espectros das frações M2-2, M4-3 e M5-2. A banda mais aparente decorrente da aplicação da amostra pode sugerir presença de manose (Padrão indicado pelo círculo e manose da amostra indicada pela seta azul), no entanto tanto a migração da frutose quanto da glucose estão muito semelhantes a marca de migração da manose, podendo também se referir a esses dois monossacarídeos decorrentes da hidrólise da sacarose, além da manose.

Ao comparar o espectro de RMN ^1H (Figura 17) da fração M13CN15 com o espectro de M2-2, foi possível observar a presença dos sinais de sacarose, já observados anteriormente. Dessa forma o meio M13CN15 também continha sacarose residual, e não houve detecção de polímero na fração. É importante ressaltar que a análise de RMN de M13CN15 foi realizada antes da diálise da fração (Figura 17).

Dessa forma, foi realizada a diálise de M13CN15 de modo a remover a sacarose, dando origem a M13CN15D. No espectro de RMN ^1H de M13CN15D, foi possível observar que o sinal de H1 em 5,41 ppm da unidade de $\alpha\text{-Glcp}$ da sacarose

já não estava mais presente. Além disso foram observados sinais adicionais na região de 4.80-5.30 ppm, sugerindo a presença de um polissacarídeo (Figura 19).

FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H M13CN15D

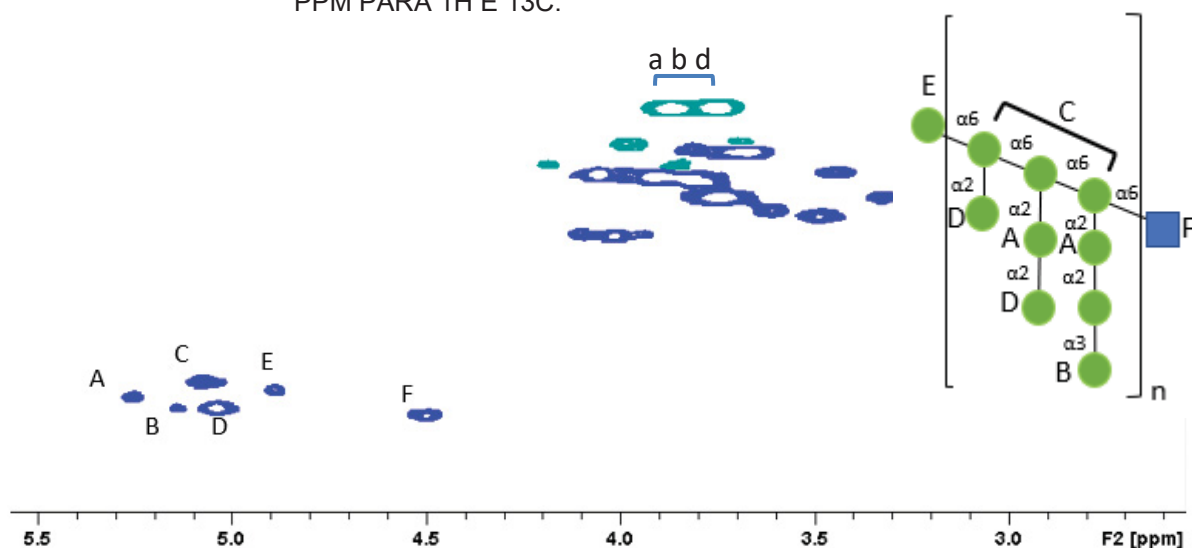


Fonte: O autor, 2021.

Comparação entre os espectros de RMN ^1H das amostras M13CN15D (vermelho) e M13CN15 (azul)

400 MHz, 70°C. SOLVENTE: D₂O, ACETONA COMO PADRÃO INTERNO EM 2,208 PPM

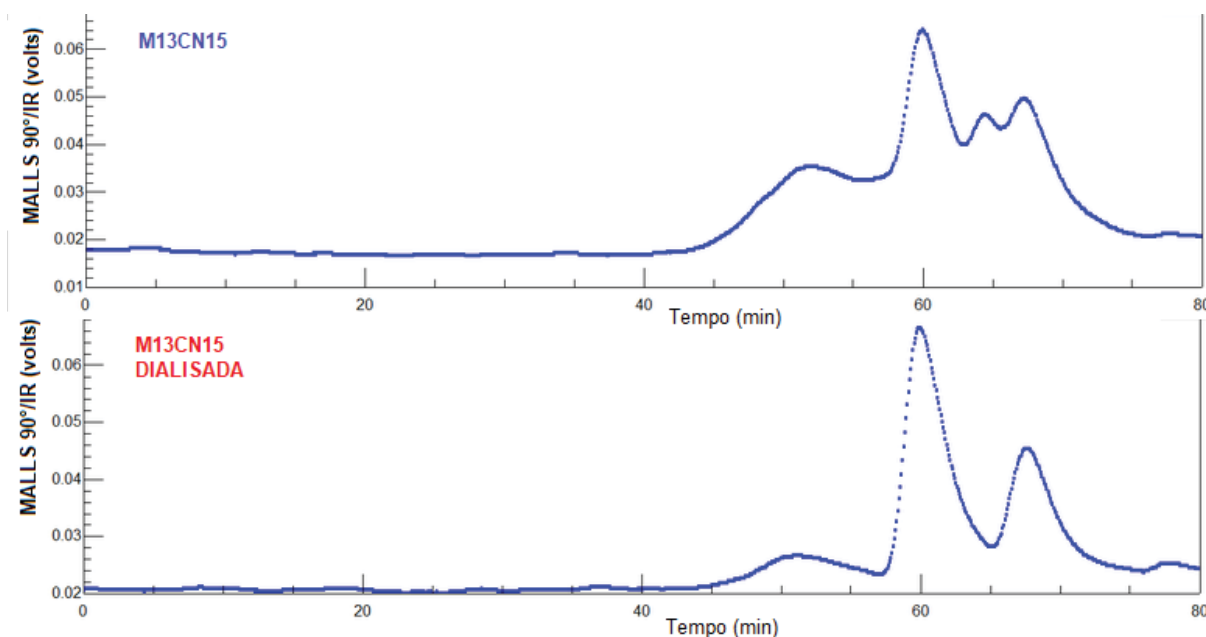
FIGURA 20 - $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC DA FRAÇÃO OBTIDA DO CULTIVO DO MEIO M13CN15 DIALISADA, 70°C, 400 MHz. SOLVENTE D₂O, ACETONA COMO PADRÃO INTERNO EM 2,208 PPM E 32,69 PPM PARA ^1H E ^{13}C .



Fonte: O autor, 2021.

Ao analisar o espectro de ^1H - ^{13}C HSQC de M13CN15D foram observadas várias correlações na região anomérica. A correlação em 100.9/4.88 ppm (E) é correspondente C1/H1 das unidades de α -D-Manp 1 \rightarrow 6-ligadas. Já a correlação em 103.5/5.26 ppm (A) é correspondente a C1/H1 de unidades de α -D-Manp 1 \rightarrow 2-ligadas, em cadeias laterais. A correlação C1/H1 o da unidade de α -D-Manp 1 \rightarrow 2-ligadas de terminais não redutor pode ser notada em 104.5/5.05 ppm (D). Em 100.9/5.09 ppm (C) foi observado a correlação correspondente a C1/H1 da unidade de α -D-Manp 1 \rightarrow 6-ligada e substituída em C6. A correlação anomérica de terminais redutores de α -D-Manp 1 \rightarrow 3-ligada foi observada em 104.4/5.14 ppm (B). Foi possível notar ainda em 105.8/4.50 ppm (F) a correlação anomérica corresponde a unidades de β -D-GlcNAcp terminal (GALINARI et al., 2017; VINOGRADOV et al., 1998). Esses resultados permitiram concluir que o polímero detectado se trata de uma α -manana proveniente do extrato de levedura utilizado no meio de cultura.

FIGURA 21 - PERFIS DE ELUIÇÃO DE M13CN5 OBTIDOS POR HPSEC-MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO.



Fonte: O autor, 2021.

Observando os perfis de eluição da amostra M13CN15, anterior a dialise (Figura 21 – A), foi possível notar a presença de um pico em 65 min, o qual não se mantém presente após a dialise (Figura 20 – B), podendo ser correspondente a sacarose removida durante o processo. O pico de maior massa, presente por volta de

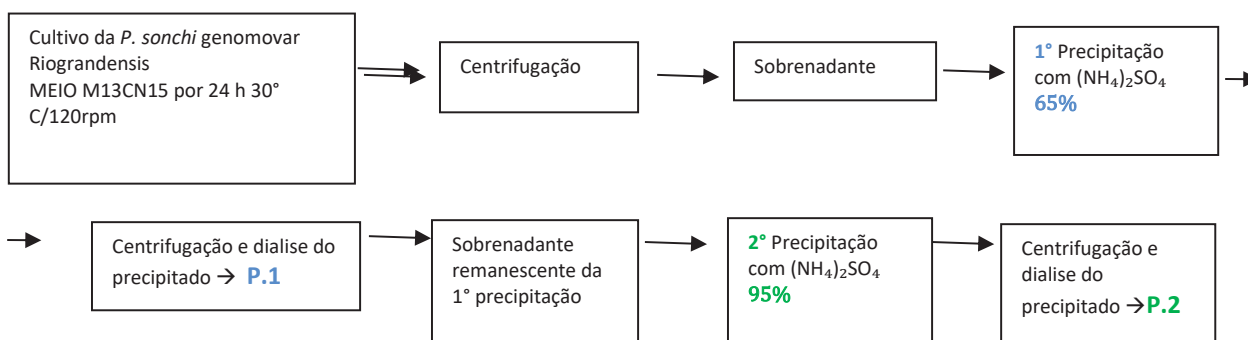
50 min, permanece em ambos os perfis, podendo corresponder a α -manana detectada nos espectros de ressonância magnética nuclear. Dessa forma, a bactéria também não produziu levana ou FOS no meio de cultivo M13.

4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTIVO NO MEIO M13CN15 E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LEVANASACARASE

4.3.1 Purificação das proteínas no sobrenadante do meio de cultivo M13CN15

P. sonchi genomovar Riograndensis SBR5 foi cultivado no meio M13CN15 por 24 h a 30 °C/ 120 rpm de agitação. O sobrenadante foi centrifugado, resfriado, e precipitado com sulfato de amônio em duas concentrações 65% e 95%, sendo que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi adicionada lentamente sobre agitação ao sobrenadante resfriado continuamente em banho de gelo. Os precipitados resultantes das duas precipitações foram ressuspensos em 12 ml de tampão fosfato com concentração de 50 mM e pH = 6. Os precipitados com 65% e 95% de sulfato de amônio renderam respectivamente as frações P.1 e P.2.

FIGURA 22 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE P.1 E P.2



Fonte: O autor, 2021.

P.1 e P.2 apresentaram respectivamente 0,30 e 1,13 mg/mL de proteína (Tabela 6). Utilizando o mesmo protocolo, Dedonder (1966) relatou que o cultivo de *B. subtilis* (suplementado com 6% de sacarose), apresentou 10 mg/mL de proteínas.

TABELA 6 RENDIMENTO E TEOR DE PROTEÍNA DOS PRECIPITADOS P.1 E P.2

Precipitado recuperado	Proteína (mg/mL)
P.1	0,30
P.2	1,13

Fonte: O autor, 2021.

4.3.2 Avaliação da atividade enzimática de P.1 e P.2

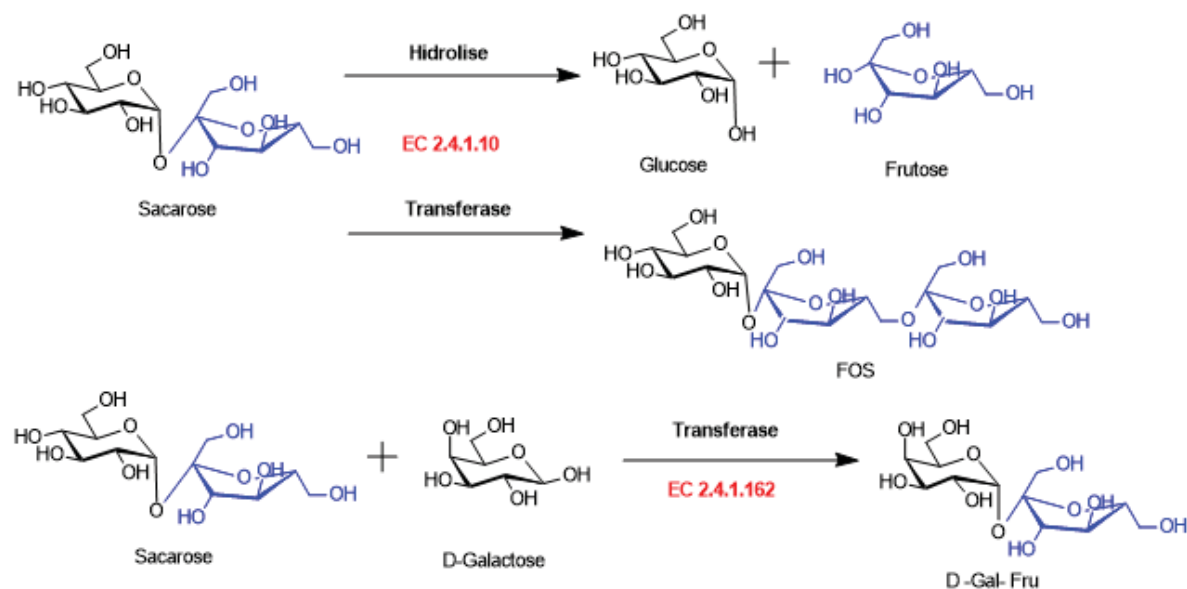
O experimento de avaliação de atividade enzimática buscou investigar a presença de levanasacarase em P.1 e P.2. Para observar a atividade, nos tubos teste desse experimento (TB4) foi adicionada sacarose em PBS. Caso a alíquota de P.1 ou P.2 possua levanasacarase, espera-se que a unidade de frutose da sacarose seja transferida para outra unidade de sacarose, dando início a reação de polimerização, com a formação de FOS. A glucose liberada poderia ser detectada pelo Kit de glucose oxidase. Essa detecção se daria pela formação de um produto vermelho, uma vez que, o princípio do método se dá pela oxidação da glicose, catalisada pela glucose oxidase. Nessa reação o peróxido de hidrogênio formado na reação de oxidação da glucose, reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando um produto vermelho.

Outra atividade que pode ser avaliada neste experimento além da transferase, é a de hidrolase. Esta reação pode ser catalisada por alguma glicosidases, como a invertase, por exemplo.

Além dessas atividades, existem relatos que mostram que a cepa de *B. subtilis* NCIMB 11871 produz uma sacB da família GH68 que não produz levana (BACIU et al., 2005; SEIBEL et al., 2006; VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009). Foi demonstrado que essa sacB possui uma atividade de frutossiltransferase (EC 2.4.1.162). Diferente da reação catalisada pelas levanasacarases (EC 2.4.1.10), a ação das enzimas frutossiltransferases (EC 2.4.1.162) se dá pela transferência de um resíduo de frutose proveniente da sacarose para uma aldose, como a galactose

(Figura 23), sendo estas enzimas chamadas de aldose β -D-frutossiltransferases. Para avaliar esta atividade foram preparados os tubos 5 e 6, contendo sacarose e galactose.

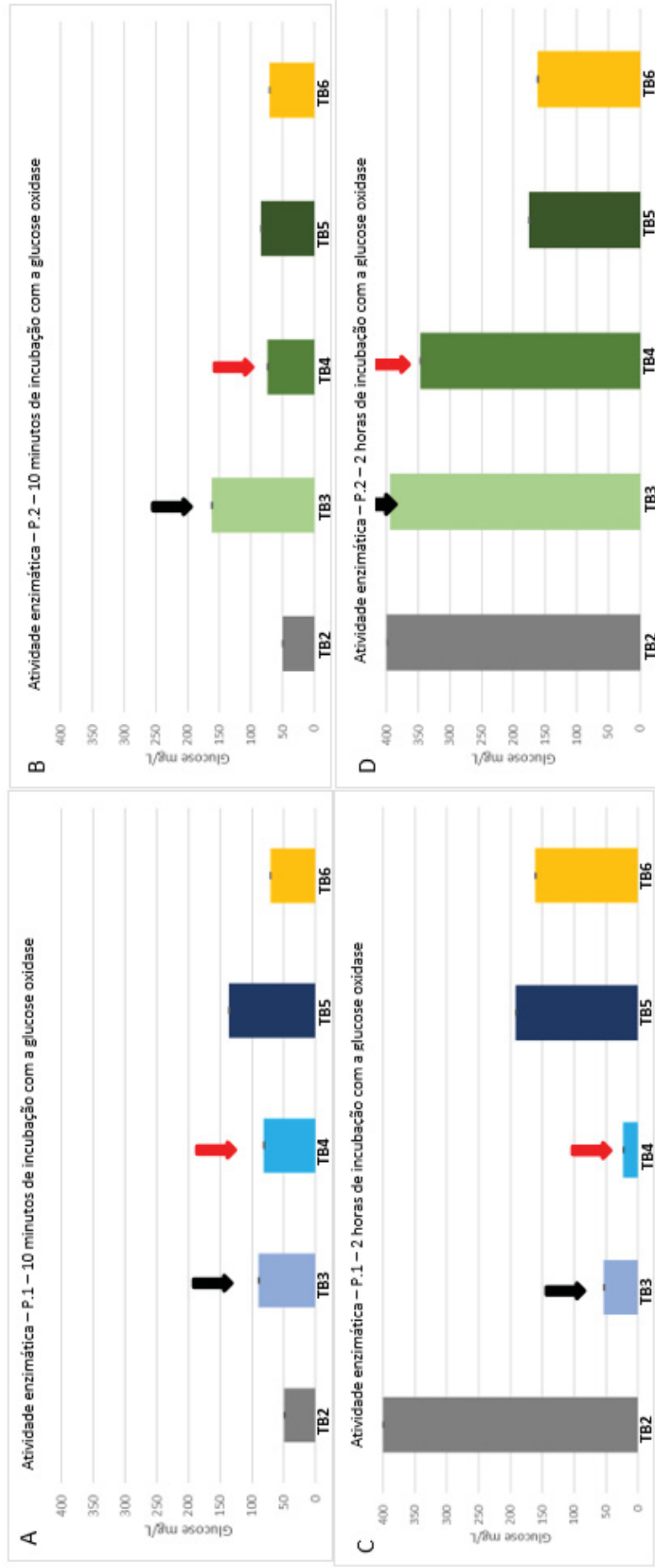
FIGURA 23 - REAÇÃO DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DE GLICOSIDASES GH68 (EC 2.4.1.10 E EC 2.4.1.162)



Fonte: O autor, 2021.

Alíquotas das soluções de P.1 e P.2 foram utilizadas nos tubos 3 e 4 juntamente com tampão PBS no tubo 3. No tubo 4 foi adicionado ainda uma solução de 0,5 M de sacarose também preparada com tampão fosfato. O tubo 1 recebeu somente tampão fosfato. Já os tubos 5 e 6 receberam uma solução de galactose e sacarose preparada no tampão fosfato (pH = 6), sendo que o tubo 5 ainda recebeu alíquota de P.1 e P.2.

FIGURA 24 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE P.1 E P.2 EM 24 HORAS DE INCUBAÇÃO A 37°C.



Fonte: O autor, 2021.

TB 1: (BRANCO): 500 µl tampão PBS 50 mmol/L, pH = 6

TB 2: (Controle): 250 µl sacarose 0,5 mol/L em PBS + 250 µl tampão PBS 50 mmol/L, pH = 6

TB 3: (Controle): 400 µl tampão PBS 50 mmol/L, pH = 6 + 100 µl P.1 ou P.2

TB4: (Tubo teste): 150 µl Tampão PBS 50 mmol/L, pH = 6 + 250 µl sacarose 0,5 mol/L em PBS + 100 µl P.1 ou P.2

TB 5: 250 µl galactose 0,5 mol/L em PBS + 150 µl de PBS com sacarose + 100 µl P.1 ou P.2

TB 6: 250 µl de PBS com galactose + 150 µl sacarose 0,5 mol/L em PBS + 100 µl PBS 50 mmol/L, pH = 6

É importante ressaltar que o teste da glucose oxidase foi realizado em dois tempos diferentes de incubação (10 min e 2 h) com o intuito de estabelecer possíveis atividades enzimáticas de P.1 e P.2 tanto em tempos menores de incubação ou baixa atividade, como em tempos mais extensos ou atividade mais expressiva.

Para o teste de atividade de P.1 (Figura 24A e C), foi observado que todos os tubos, com exceção de TB3 e TB4, aumentaram sua quantidade de glucose detectada com 2 h de incubação com a glucose oxidase. Quando comparamos o tubo TB4 (tubo teste) com TB3, em ambos os tempos de incubação com glucose oxidase, foi observado um menor teor de glucose em TB4. Com 10 min de incubação, TB3 apresentou 90 mg/ml de glucose, já o tubo TB4 apresentou 81 mg/ml, indicando que não houve atividade enzimática. O maior teor de glucose observado em TB3 em relação ao TB2 (controle), pode ser devido aos resíduos de glucose provenientes da sacarose hidrolisada do meio de cultura, presentes ainda em P.1. Quando comparado o TB5 com seu tubo controle TB6, houve um aumento no teor de glucose, de 71 mg/ml de glucose TB6 para 137 mg/ml TB5 no tempo de 10 min de incubação (Figura 24A) e de 162 mg/ml em TB6 para 192 mg/ml de glucose em TB5 no tempo de incubação de 2 h (Figura 24C). Embora neste segundo tempo de incubação os valores entre TB5 e TB6 ainda tenham sido próximos o TB5 teve valor de glucose (mg/ml) superior ao TB6. Essa diferença de concentração de glucose entre os tubos pode ser devido o açúcar residual do meio presente em P.1 ou ainda pode sugerir a presença da atividade de aldose β -D-frutossiltransferases (EC 2.4.1.162). Dessa forma, seria necessário um aceptor galactose ou outro monossacarídeo para que a enzima no meio catalise a reação, podendo ser uma característica da GH68 presente na *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5.

Os resultados de P.2 (Figura 24B e D), são muito semelhantes a de P.1. O TB4 (tubos teste) não apresentou valores superiores aos seus tubos controle (TB2 e TB3), tanto no tempo de 10 min de incubação quanto em 2 h, o que sugere uma ausência de atividade enzimática. Quando comparados os tubos TB5 e TB6, para ambos os tempos de incubação os valores de glucose detectados foram superiores em TB5 (71 mg/mL em TB6 e 84 mg/ml de glucose em TB5 no tempo de 10 min; e 162 mg/mL em TB6 e 176 mg/ml de glucose em TB5), sugerindo mais uma vez uma possível presença de atividade enzimática de frutossiltransferase.

Conclui-se com esses estudos preliminares que pode existir uma enzima com atividade de transferase para a galactose tanto em P.1 quanto em P.2. No entanto, seriam necessários mais estudos com as reações dos tubos 5 e 6 para confirmação dessa possibilidade. A presença da atividade de aldose β -D-frutossiltransferases (EC 2.4.1.162) poderia explicar a não observação de produção de FOS nem levana nos meios cultivados, uma vez que a enzima GH68 não teria atividade de levanasacarase.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com as análises de bioinformática, foi possível concluir que o *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis SBR5 possui 4 classes diferentes de Cazymes, sendo que uma dessas classes engloba a família GH68, importante para a produção de levana. O grande número de Cazymes encontradas com potenciais aplicações na área da saúde, nutrição e biotecnologia, abre novos rumos e perspectivas para futuros estudos das enzimas de *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5.

Quanto aos cultivos, foram testadas diferentes relações de C/N e diferentes composições de meio de cultura. Foi observado que o microrganismo estudado cresce em todos os meios fornecidos, no entanto, não foi possível detectar a produção de EPS, em particular levana. Entretanto, seria importante uma otimização nos meios de cultura, em relação aos parâmetros temperatura e pH, para verificar a eficiência desses meios de cultura na produção de EPS ou levana.

Ao estudar a atividade enzimática do sobrenadante do meio de cultura, não foi possível detectar nenhuma atividade hidrolítica ou de transferase na presença de sacarose. No entanto, houve indícios de atividade de transferase na presença de galactose no meio reacional, o que não permite descartar totalmente a possibilidade da presença de atividade de aldose β -D-frutossiltransferases (EC 2.4.1.162), provavelmente pertencente a GH68, com uma atividade diferente da esperada inicialmente. Entretanto, seria interessante continuar os estudos enzimáticos para poder confirmar a atividade de transferase, que apresenta potencial na produção de oligossacarídeos com aplicação biotecnológica.

O estudo da produção de EPS e das enzimas produzidas pelos microrganismos portadores da enzima levanasacarase foi prejudicado uma vez que naturalmente essas cepas apresentam uma baixa produção da enzima. Sendo assim se torna relevante o estudo da enzima por meio da técnica de clonagem, uma vez que por meio dessa técnica seria possível obter maiores quantidades de enzimas para posteriores estudos, além de agregar valor facilitando também no estudo da catálise, das propriedades enzimáticas e do seu produto.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, M., QUESADA, M. T., DEL ÁGUILA, V. G., MORILLO, J. A., RIVADENEYRA, M. A., RAMOS-CORMENZANA, A., & MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. (2008). Characterisation of *Paenibacillus jamilae* strains that produce exopolysaccharide during growth on and detoxification of olive mill wastewaters. *Bioresource Technology*, 99(13), 5640–5644. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.032>
- ARVIDSON, S. A., RINEHART, B. T., & GADALA-MARIA, F. (2006). Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydrate Polymers*, 65(2), 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.039>
- BACIU, I. E., SEIBEL, J.JÖRDENING, H. J., & BUCHHOLZ, K. (2005). Investigations of the transfructosylation reaction by fructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogue galactosyl-fructoside. *Journal of Biotechnology*, 116(4), 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.10.019>
- BAE, I. Y., OH, I.-K., LEE, S., YOO, S.-H., & LEE, H. G. (2008). Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(1), 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.08.006>
- BANGELA A, H. L. (2003). Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotecnologia Aplicada*, 42, 147–173.
- BATTISTI, J.A.; PEREIRA, J.A.A.; COSTA, P. M. A. (1985). Composição química e valores energéticos de alguns alimentos para suínos com diferentes idades. *Revista Da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 14, 141–150.
- BELAICH, J. P.; SENEZ, J. C. (1965). Influence of aeration and of pentothenate on growth of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, 89, J. Bacteriol.
- BENEDUZI, A., CAMPOS, S., AMBROSINI, A., DE SOUZA, R., GRANADA, C., COSTA, P., ARRUDA, L., MOREIRA, F., VARGAS, L. K., WEISS, V., TIEPPO, E., FAORO, H., DE SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., & PASSAGLIA, L. M. P. (2011). Genome sequence of the diazotrophic gram-positive rhizobacterium *Paenibacillus riograndensis* SBR5 T. *Journal of Bacteriology*, 193(22), 6391–6392. <https://doi.org/10.1128/JB.06100-11>
- BENEDUZI, A., COSTA, P. B., PARMA, M., MELO, I. S., BODANESE-ZANETTINI, M. H., & PASSAGLIA, L. M. P. (2010). *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 128–133. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011973-0>
- BEZZATE, S.; AYMERICH, S.; CHAMBERT, R.; CZARNES, S.; BERGE, O; HEULIN, T. (2000). Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environmental Microbiology*, 2, 333–342.
- BEZZATE, S., AYMERICH, S., CHAMBERT, R., CZARNES, S., BERGE, O., & HEULIN, T. (2000). Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environmental Microbiology*, 2(3), 333–342. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00114.x>
- BORASTON, A. B., BOLAM, D. N., GILBERT, H. J., & DAVIES, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, 382(3), 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- BRITO, L. F.; BACH, E.; KALINOWSKI, J.; RÜCKERT, C.; WIBBERG, D.; PASSAGLIA, L. M.; WENDISH, F. V. (2015). Complete genome sequence of

- Paenibacillus riograndensis* SBR5(T), a Gram-positive diazotrophic rhizobacterium. *Journal of Biotechnology*, *207*, 30–31.
- BRITO, L. F., BACH, E., KALINOWSKI, J., RÜCKERT, C., WIBBERG, D., PASSAGLIA, L. M., & WENDISCH, V. F. (2015). Complete genome sequence of *Paenibacillus riograndensis* SBR5T, a gram-positive diazotrophic rhizobacterium. *Journal of Biotechnology*, *207*, 30–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.025>
- CASTELLANE, T. C. L., CAMPANHARO, J. C., COLNAGO, L. A., COUTINHO, I. D., LOPES, É. M., LEMOS, M. V. F., & DE MACEDO LEMOS, E. G. (2017). Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. *International Journal of Biological Macromolecules*, *96*, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.123>
- CHAMBERT, R.; TREBOUL, G.; DEDONDER, R. (1974). Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, *41*, 285–300.
- CHAMBERT, R., & GONZY-TREBOUL, G. (1976). Levansucrase of *Bacillus subtilis* Characterization of a Stabilized Fructosyl-Enzyme Complex and Identification of an Aspartyl Residue as the Binding Site of the Fructosyl Group. *European Journal of Biochemistry*, *71*(2), 493–508. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb11138.x>
- CHEETHAM, P. S. J., HACKING, A. J., & VLITOS, M. (1989). Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, *11*(4), 212–219. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90095-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90095-1)
- CHIKU, K.; NIHIRA, T.; SUZUKI, E.; NISHIMOTO, M.; KITAOKA, M.; OHTSUBO, K.; NAKAI, H. (2014). Discovery of two β -1,2-mannoside phosphorylases showing different chain-length specificities from *Thermoanaerobacter* sp. X-514. *PLoS ONE*, *12*.
- CHOU, W. I.; PAI T. W.; LIU, S.H.; HSIUNG, B. K.; CHANG, M. D. (2006). The family 21 carbohydrate-binding module of glucoamylase from *Rhizopus oryzae* consists of two sites playing distinct roles in ligand binding. *Biochemistry Journal*, *396*, 469–477.
- CHRISTENSEN, B. E. (1989). The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Journal of Biotechnology*, *10*(3–4), 181–202. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(89\)90064-3](https://doi.org/10.1016/0168-1656(89)90064-3)
- CHRISTOV, L. P., & PRIOR, B. A. (1993). Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance. *Enzyme and Microbial Technology*, *15*(6), 460–475. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90078-G](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90078-G)
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R., & LAPPIN-SCOTT, H. M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, *49*(1), 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- CRUTZ, A. M., STEINMETZ, M., AYMERICH, S., RICHTER, R., & LE COQ, D. (1990). Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*: an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology*, *172*(2), 1043–1050. <https://doi.org/10.1128/JB.172.2.1043-1050.1990>
- DEDONDER, R. (1966). *Levansucrase from Bacillus subtilis* (pp. 500–505). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)08091-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(66)08091-1)
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J.K.; SMITH, P. A. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*, 350–356.
- ERNANDES, F. M. P. G. (2006). *Produção de levana por Bacillus subtilis e*

- Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo de cana-de-açúcar).
- FERNANDES, G. D. C., TRARBACH, L. J., DE CAMPOS, S. B., BENEDUZI, A., & PASSAGLIA, L. M. P. (2014). Alternative nitrogenase and pseudogenes: unique features of the *Paenibacillus riograndensis* nitrogen fixation system. *Research in Microbiology*, *165*(7), 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.06.002>
- FITTING, C.; DOUDOROFF, M. (1952). Phosphorolysis of maltose by enzyme preparations from *Neisseria meningitidis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *199*, 153–163.
- FLIPPPI, M. J.; VISSER, J.; VAN DER VEEN, P.; DE GRAAFF, L. H. (1993). Cloning of the *Aspergillus niger* gene encoding alpha-L-arabinofuranosidase. *Microbiology Biotechnology*, *39*, 335–340.
- FOWLER, A. V.; ZABIN, I. (1978). Amino acid sequence of beta-galactosidase. XI. Peptide ordering procedures and the complete sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, *253*, 5521–5525.
- FREITAS, F., ALVES, V. D., & REIS, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, *29*(8), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
- GALINARI, É., SABRY, D. A., SASSAKI, G. L., MACEDO, G. R., PASSOS, F. M. L., MANTOVANI, H. C., & ROCHA, H. A. O. (2017). Chemical structure, antiproliferative and antioxidant activities of a cell wall α -D-mannan from yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Carbohydrate Polymers*, *157*, 1298–1305. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.015>
- GARRON, M.-L., & HENRISSAT, B. (2019). The continuing expansion of CAZymes and their families. *Current Opinion in Chemical Biology*, *53*, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.08.004>
- GILKES, N.R.; WARREN, R.A.; MILLER, R.C.J. & KILBURN, D. G. (1988). Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, *263*, 10401–10407.
- GRINEV, V. S., TREGUBOVA, K. V., ANIS'KOV, A. A., SIGIDA, E. N., SHIROKOV, A. A., FEDONENKO, Y. P., & YEGORENKOVA, I. V. (2020). Isolation, structure, and potential biotechnological applications of the exopolysaccharide from *Paenibacillus polymyxa* 92. *Carbohydrate Polymers*, *232*, 115780. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115780>
- GUPTA, A., & VERMA, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *41*, 550–567. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>
- HADDAR, A., HAMED, M., BOUALLEGUE, A., BASTOS, R., COELHO, E., & COIMBRA, M. A. (2021). Structural elucidation and interfacial properties of a levan isolated from *Bacillus mojavensis*. *Food Chemistry*, *343*, 128456. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128456>
- HAN, Y. W., & CLARKE, M. A. (1990). Production and characterization of microbial levan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*(2), 393–396. <https://doi.org/10.1021/jf00092a011>
- HARTREE, E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, *48*(2), 422–427. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2)
- HENRIKSSON, G., JOHANSSON, G., & PETTERSSON, G. (2000). A critical review of cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology*, *78*(2), 93–113.

- [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00206-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00206-6)
- HENRISSAT, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280(2), 309–316. <https://doi.org/10.1042/bj2800309>
- HERNÁNDEZ, L., SOTOLONGO, M., ROSABAL, Y., MENÉNDEZ, C., RAMÍREZ, R., CABALLERO-MELLADO, J., & ARRIETA, J. (2000). Structural levansucrase gene (IsdA) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Archives of Microbiology*, 174(1–2), 120–124. <https://doi.org/10.1007/s002030000173>
- HONG, Y.-Y., MA, Y.-C., ZHOU, Y.-G., GAO, F., LIU, H.-C., & CHEN, S.-F. (2009). *Paenibacillus sonchi* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sonchus oleraceus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(11), 2656–2661. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009308-0>
- [Http://www.cazy.org](http://www.cazy.org) CAZy. (n.d.). CAZy; <http://www.cazy.org>.
- INTHANA VONG, L., TIAN, F., KHODADADI, M., & KARBOUNE, S. (2013). Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Biotechnology Progress*, 29(6), 1405–1415. <https://doi.org/10.1002/btpr.1788>
- JAKOB, F., MEIßNER, D., & VOGEL, R. F. (2012). Comparison of novel GH 68 levansucrases of levan-overproducing *Gluconobacter* species. *Acetic Acid Bacteria*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.4081/aab.2012.e2>
- JAKOB, F., PFAFF, A., NOVOA-CARBALLAL, R., RÜBSAM, H., BECKER, T., & VOGEL, R. F. (2013). Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1234–1242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.054>
- JENKINS, J.; SHEVCHIK, V. E.; HUGOVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; PICKERSGILL, R. W. (2004). The Crystal Structure of Pectate Lyase Pel9A from *Erwinia chrysanthemi*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 9139–9145.
- JUNG, H. K., HONG, J. H., PARK, S. C., PARK, B. K., NAM, D. H., & KIM, S. D. (2007). Production and physicochemical characterization of β -glucan produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12(6), 713–719. <https://doi.org/10.1007/BF02931090>
- KANG, E. T.; AL, S.A.; KANG, K.-H.; JANG, J. W.; SEO, K.H.; KIM, Y.H.; KIM, D. RAIKHWADA, M.Y; SEO, J.O; LEE, S.D; HA, C.-H; KIM, S.-K. (2009). *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors*. Caister Academic Press. <https://pt.scribd.com/document/241676443/Levan-Application-and-Perspectives>
- KAWAI, H., ISOBE, Y., HORIBE, M., TOKUDA, J., TOKUNO, I., ENDO, K., & KAWAI, F. (1992). Production of a novel extracellular polysaccharide by a *Bacillus* Strain isolated from soil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(6), 853–857. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.853>
- KAZAK SARILMISER, H., ATES, O., OZDEMIR, G., ARGAS, K. Y., & TOKSOY ONER, E. (2015). Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(4), 455–463. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.09.019>
- KOCZAN, J. M., MCGRATH, M. J., ZHAO, Y., & SUNDIN, G. W. (2009). Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: Implications in pathogenicity. *Phytopathology*®, 99(11), 1237–1244. <https://doi.org/10.1094/PHTO-99-11-1237>

- KOSHLAND, D. E.; STEIN, S. S. (1954). Correlation of bond breaking with enzyme specificity; cleavage point of invertase. *Biochemistry Journal*, *208*, 48–139.
- KOSHLAND, D. E. (1953). Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews*, *28*(4), 416–436. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1953.tb01386.x>
- KUPPANAN, NANTHAKUMARJEYASEELAN, P., CHAHAR, S., DAS, S., CHANNASHETTAR, V., & LAL, B. (2021). Bio-fermentative Production of Xanthan Gum Biopolymer and Its Application in Petroleum Sector. In *Microbial Polymers* (pp. 655–673). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0045-6_26
- LAIRSON, L. L.; HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J.; WITHERS, S. G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, *77*, 521–555.
- LAIRSON, L. L., HENRISSAT, B., DAVIES, G. J., & WITHERS, S. G. (2008). Glycosyl transferases: Structures, functions, and mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, *77*, 521–555. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322>
- LAMMENS, W.; LE ROY, K.; SCHROEVEN, L.; VAN LAERE, A.; RABIJNS, A.; VAN DEN ENDE, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany*, *60*, 727–740.
- LANGSTON, J. A., BROWN, K., XU, F., BORCH, K., GARNER, A., & SWEENEY, M. D. (2012). Cloning, expression, and characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Thielavia terrestris* induced under cellulose growth conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1824*(6), 802–812. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.03.009>
- LEBRUN, E.; VANRAPENBUSCH, R. (1980). The structure of *Bacillus subtilis* levansucrase at 3.8 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, *255*, 2034–2036.
- LEVASSEUR, A., DRULA, E., LOMBARD, V., COUTINHO, P. M., & HENRISSAT, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>
- LI, S.; YAN, Y.; ZHOU, Z.; YU, H.; ZHAN, Y.; ZHANG, W.; CHEN, M.; LU, W.; PING, S. . L. M. (2011). Single amino acid residue changes in subsite –1 of levansucrase from *Zymomonas mobilis* 10232 strongly influence the enzyme activities and products. *Molecular Biology Reports*, *38*, 2437–2443.
- LI, O., LU, C., LIU, A., ZHU, L., WANG, P.-M., QIAN, C.-D., JIANG, X.-H., & WU, X.-C. (2013a). Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by *Paenibacillus elgii* B69 and its application in wastewater treatment. *Bioresource Technology*, *134*, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.013>
- LI, O., LU, C., LIU, A., ZHU, L., WANG, P.-M., QIAN, C.-D., JIANG, X.-H., & WU, X.-C. (2013b). Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by *Paenibacillus elgii* B69 and its application in wastewater treatment. *Bioresource Technology*, *134*, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.013>
- LIANG, T.-W., TSENG, S.-C., & WANG, S.-L. (2016). Production and characterization of antioxidant properties of exopolysaccharide(s) from *Paenibacillus mucilaginosus* TKU032. *Marine Drugs*, *14*(2), 40.

- <https://doi.org/10.3390/md14020040>
- LIANG, T.-W., & WANG, S.-L. (2015). Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: Production, isolation, structure, and bioactivities. *Marine Drugs*, *13*(4), 1847–1863. <https://doi.org/10.3390/md13041847>
- LIU, Y. N.; LAI, Y. T.; CHOU, W.; CHANG, M. D. T.; LYU, P. C. (2007). Solution structure of family 21 carbohydrate-binding module from *Rhizopus oryzae glucoamylase*. *Biochemistry Journal*, *403*, 21–30.
- LIU, J., LUO, J., YE, H., SUN, Y., LU, Z., & ZENG, X. (2009). Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers*, *78*(2), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.046>
- LIU, J., LUO, J., YE, H., SUN, Y., LU, Z., & ZENG, X. (2010a). Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers*, *79*(1), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.055>
- LIU, J., LUO, J., YE, H., SUN, Y., LU, Z., & ZENG, X. (2010b). Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers*, *79*(1), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.055>
- LIU, J., LUO, J., YE, H., & ZENG, X. (2012). Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(3–4), 767–772. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.016>
- LOMBARD, V., BERNARD, T., RANCUREL, C., BRUMER, H., COUTINHO, P. M., & HENRISSAT, B. (2010). A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. *Biochemical Journal*, *432*(3), 437–444. <https://doi.org/10.1042/BJ20101185>
- LOMBARD, V., GOLACONDA RAMULU, H., DRULA, E., COUTINHO, P. M., & HENRISSAT, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, K. L. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, *183*, 265.
- MACDONALD, L. C., & BERGER, B. W. (2014). A Polysaccharide Lyase from *Stenotrophomonas maltophilia* with a Unique, pH-regulated substrate Specificity. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(1), 312–325. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489195>
- MACGREGOR, E. A.; JANECEK, S.; SVENSSON, B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1546*, 1–20.
- MARDO, K.; VISNAPUU, T.; GROMKOVA, M.; AASAMETS, A.; VIIGAND K.; VIJA, H. ALÄMAE, T. (2014). High-Throughput Assay of Levansucrase Variants in Search of Feasible Catalysts for the Synthesis of Fructooligosaccharides and Levan. *Molecules*, *19*, 8434–8455.
- MARTINEZ-FLEITES, C.; ORTIZ-LOMBARDIA, M.; PONS, T.; TARBOURIECH, E. J.; TAYLOR, E. J.; ARRIETA, J. G.; HERNANDEZ, L.; DAVIES, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the gramnegative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochemistry Journal*, *390*, 19–27.
- MEHMOOD, A., ABDALLAH, K., KHANDEKAR, S., ZHURINA, D., SRIVASTAVA, A.,

- AL-KARABLIEH, N., ALFARO-ESPINOZA, G., PLETZER, D., & ULLRICH, M. S. (2015). Expression of extra-cellular levansucrase in *Pseudomonas syringae* is controlled by the in planta fitness-promoting metabolic repressor HexR. *BMC Microbiology*, *15*(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0349-0>
- MENG, G.; FÜTTERER, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structure Biology*, *10*, 935–941.
- MENG, G., & FÜTTERER, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology*, *10*(11), 935–941. <https://doi.org/10.1038/nsb974>
- MILLER, G. L. (1959). Use of DNS acid reagent for the determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, *31*, 426–428.
- MONTANIER, C.; BUEREN VAN, A. L.; DUMON, C.; FLINT, J. E.; CORREIA, M. A.; PRATES, J. A.; FIRBANK, S. J.; LEWIS, R. J.; GRONDIN, G. G.; GHINET, M. G.; GLOSTER, T.M.; HERVE, C; KNOX, J. P.; TALBOT, B. G. , KEROVUO, J.; BREZEZINSKI, R.; FONTES, C. M.; DAVI, H. J. (2009). Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, *106*, 3065–3070.
- MOSCOVICI, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01012>
- NAKAMURA, A. M.; NASCIMENTO, A. S.; POLIKARPOV, I. (2017). Structural diversity of carbohydrate esterases. *Biotechnology Research and Innovation*, *1*, 35–51.
- NAKAMURA, A. M., NASCIMENTO, A. S., & POLIKARPOV, I. (2017). Structural diversity of carbohydrate esterases. *Biotechnology Research and Innovation*, *1*(1), 35–51. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.02.001>
- NAKAPONG, S., PICHYANGKURA, R., ITO, K., IIZUKA, M., & PONGSAWASDI, P. (2013). High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *54*, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.017>
- NWODO, U., GREEN, E., & OKOH, A. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(12), 14002–14015. <https://doi.org/10.3390/ijms131114002>
- ÖNER, E.T.; HERNÁNDEZ L.; COMBIE, J. (2016). Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, *34*, 827–844.
- ÖNER, E. T., HERNÁNDEZ, L., & COMBIE, J. (2016). Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, *34*(5), 827–844. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002>
- ORSOD, M., MUGAMBWA, J., & HUYOP, F. (2012). Characterization of exopolysaccharides produced by *Bacillus cereus* and *Brachybacterium* sp. Isolated from asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Malaysian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.21161/mjm.04412>
- ORTIZ-SOLO, M. E.; PORRAS-DOMINGUEZ, J. R.; SEIBEL, J.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. (2019). A close look at the structural features and reaction conditions that modulate the synthesis of low and high molecular weight fructans by levansucrases. *Carbohydrate Polymers*, *219*, 130–142.
- ORTIZ-SOTO, M. E., PORRAS-DOMÍNGUEZ, J. R., SEIBEL, J., & LÓPEZ-MUNGUÍA,

- A. L. M. (2019). A close look at the structural features and reaction conditions that modulate the synthesis of low and high molecular weight fructans by levansucrases. *Carbohydrate Polymers*, 219(January), 130–142. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.014>
- PARIKH, S. (2018). Production and characterization of alginate extracted from *Paenibacillus riograndensis*. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Science*, 560, 4–6. <https://doi.org/10.20959/wjpr20205-17405>
- PHILLIPS, D. C. (1966). The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Scientific American*, 215(5), 78–90. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1166-78>
- PORRAS-DOMÍNGUEZ, J. R., ÁVILA-FERNÁNDEZ, Á., MIRANDA-MOLINA, A., RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M. E., & MUNGUÍA, A. L. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 132, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.056>
- PRIEST, F. G., GOODFELLOW, M., & TODD, C. (1988). A Numerical classification of the genus *Bacillus*. *Microbiology*, 134(7), 1847–1882. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-7-1847>
- PYEON, H. M.; LEE, Y. S.; CHOI, Y. L. (2019). Cloning, purification, and characterization of GH3 β -glucosidase, MtBgl85, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221. *Peer-Reviewed and Open Access*, 7, 7106.
- RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. (2015). *Coletanea de procesamentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de Bacillus e gêneros esporulados aeróbicos correlatos* (Vol. 36). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz Laboratório de Fisiologia Bacteriana.
- RAFIGH, S. M., YAZDI, A. V., VOSSOUGH, M., SAFEKORDI, A. A., & ARDJMAND, M. (2014). Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.034>
- RAGA-CARBAJAL, E., LÓPEZ-MUNGUÍA, A., ALVAREZ, L., & OLVERA, C. (2018). Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32872-7>
- RAVEENDRAN, S., POULOSE, A. C., YOSHIDA, Y., MAEKAWA, T., & KUMAR, D. S. (2013). Bacterial exopolysaccharide based nanoparticles for sustained drug delivery, cancer chemotherapy and bioimaging. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.079>
- RAZACK, VIJAYAGOPAL VELAYUTHAM, V. T. (2013). Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. *Turkish Journal of Biology*, 37, 280–288. <https://doi.org/10.3906/biy-1206-50>
- ROSALAM, S., & ENGLAND, R. (2006). Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.019>
- RUANE, K. M.; DAVIES, G. J.; MARTINEZ-FLEITES, C. M. (2008). Crystal structure of a family GT4 glycosyltransferase from *Bacillus anthracis* ORF BA1558. *Proteins Structure Function Bioinformatics*, 73, 784–787.
- RÜTERING, M., SCHMID, J., RÜHMANN, B., SCHILLING, M., & SIEBER, V. (2016). Controlled production of polysaccharides-exploiting nutrient supply for levan and

- heteropolysaccharide formation in *Paenibacillus* sp. *Carbohydrate Polymers*, *148*, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.074>
- SCHMID, J., SIEBER, V., & REHM, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496>
- SEIBEL, J., MORARU, R., GÖTZE, S., BUCHHOLZ, K., NA'AMNIEH, S., PAWLOWSKI, A., & HECHT, H. J. (2006). Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydrate Research*, *341*(14), 2335–2349. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.07.001>
- SENOURA, T.; ITO, S.; TAGUCHI, H.; HIGA, M.; HAMADA, S.; MATSUI, H.; OZAWA, T.; JIN, S.; WATANABE, J.; WASAKI, J.; ITO, S. (2011). New microbial mannan catabolic pathway that involves a novel mannosylglucose phosphorylase. *Biochemical Biophys Research Communications*, *408*, 701–706.
- SINNOTT, M. L. (1990). Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews*, *90*(7), 1171–1202. <https://doi.org/10.1021/cr00105a006>
- SOBOLEV, A. P., BROSIO, E., GIANFERRI, R., & SEGRE, A. L. (2005a). Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *43*(8), 625–638. <https://doi.org/10.1002/mrc.1618>
- SOBOLEV, A. P., BROSIO, E., GIANFERRI, R., & SEGRE, A. L. (2005b). Metabolic profile of lettuce leaves by high-field nmr spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *43*(8), 625–638. <https://doi.org/10.1002/mrc.1618>
- SOUZA, C. F. (2013). Prospecção e desenvolvimento de membranas biocurativas a partir da interação entre celulose bacteriana, xiloglucana e/ou gelana e fluconazol.
- SPERB, E. R., TADRA-SFEIR, M. Z., SPEROTTO, R. A., FERNANDES, G. D. C., PEDROSA, F. D. O., DE SOUZA, E. M., & PASSAGLIA, L. M. P. (2016). Iron deficiency resistance mechanisms enlightened by gene expression analysis in *Paenibacillus riograndensis* SBR5. *Research in Microbiology*, *167*(6), 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.04.007>
- STEINMETZ, M., LE COQ, D., AYMERICH, S., GONZY-TRÉBOUL, G., & GAY, P. (1985). The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *MGG Molecular & General Genetics*, *200*(2), 220–228. <https://doi.org/10.1007/BF00425427>
- STEPHEN, M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- SUTHERLAND, I. W. (1980). Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Annual Reviews Microbiology*, *34*, 79–150. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60336-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60336-7)
- SUTHERLAND, I. W. (1988). Bacterial Surface Polysaccharides: Structure and Functio. *International Review of Cytology*, *113*, 196–197.
- SUTHERLAND, IAN W. (1993). Biosynthesis of extracellular polysaccharides: exopolysaccharides. In *Industrial Gums* (pp. 69–85). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092654-4.50008-5>
- SUTHERLAND, IAN W. (1995). Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiology Reviews*, *16*(4), 323–347. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00179.x>
- TANAKA, T.; FUKUI, T.; FUJIWARA, S.; ATOMI, H.; IMANAKA, T. (2004). Concerted action of diacetylchitobiose deacetylase and exo--D-glucosaminidase in a novel chitinolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 30021–30027.
- TIAN, T., SUN, B., SHI, H., GAO, T., HE, Y., LI, Y., LIU, Y., LI, X., ZHANG, L., LI, S.,

- WANG, Q., & CHAI, Y. (2021). Sucrose triggers a novel signaling cascade promoting *Bacillus subtilis* rhizosphere colonization. *The ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00966-2>
- TOMME, P., TILBEURGH, H., PETTERSSON, G., DAMME, J., VANDEKERCKHOVE, J., KNOWLES, J., TEERI, T., & CLAEYSSENS, M. (1988). Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *European Journal of Biochemistry*, *170*(3), 575–581. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13736.x>
- TOSHIO TANAKA, SUSUMU, M. I. A. T. Y. (1978). Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *32*, 147–156.
- USOV, A. I.; ELASHVILI, Y. (1991). Polysaccharides of Algae: 44. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae). *Botania Marina*, *34*, 553–560.
- VAN de VELD, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMAN, H. S. (2004). The revised NMR chemical shift data of carageenans. *Carbohydrate Research*, *339*, 2309–2313.
- VAN HIJUM, S.; KRALJ, S.; OZIMEK, L. K.; DIJKHUIZEN, L.; VAN GEEL-SCHUTTEN, I. G. H. (2006). Structure–function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*, 157–176.
- VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M. L., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M., BRAVO-PATIÑO, A., CAJERO-JUÁREZ, M., CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P., & VALDEZ-ALARCÓN, J. J. (2009). Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(6), 1763–1778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04120.x>
- VERLI, H. (2014). *Bioinformática da Biologia à flexibilidade Molecular*. SBBq.
- Vinogradov, E., Petersen, B., & Bock, K. (1998). Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using ¹H and ¹³C NMR spectroscopy at 750 MHz. *Carbohydrate Research*, *307*(1–2), 177–183. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00042-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00042-1)
- WANG, C.-L., HUANG, T.-H., LIANG, T.-W., FANG, C.-Y., & WANG, S.-L. (2011). Production and characterization of exopolysaccharides and antioxidant from *Paenibacillus* sp. TKU023. *New Biotechnology*, *28*(6), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.003>
- WANG, Y., AHMED, Z., FENG, W., LI, C., & SONG, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, *43*(3), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011>
- WHITFIELD, C.; SZYMANSKI, C. M.; AEBI, M. Eubacteria. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; STANLEY, P.; HART, G. W.; AEBI, M.; DARLVILL, A. G.; KINOSHITA, T.; PACKER, N. H.; PRESTEGARD, J. H.; SCHNAAR, R. L.; SEEBERG, P. H. (2017). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor: New York.
- WITHERS, S. G. (1995). *Probing of glycosidase active sites through labeling, mutagenesis and kinetic studies* (pp. 97–111). [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(06\)80097-3](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(06)80097-3)
- WONGRATPANYA, K.; IMJONGJAIKAK, S.; WAEONUKUL, R.; SORNYOTHA, S.; PHITSUWAN P.; PASON, P.; NIMCHUA, T.; TACHAAPAUKOON, C.; RATANAKHANOKCHAI, K. (2015). Multifunctional properties of glycoside hydrolase family 43 from *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 including exo-

- β -xylosidase, endo-xylanase, and α -L-arabinofuranosidase activities. *BioResources*, 10, 2492–2505.
- WU, F.-C., CHOU, S.-Z., & SHIH, I.-L. (2013). Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 846–853. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.03.009>
- XU, H., LI, J., WANG, L., FU, R., CHENG, R., WANG, S., & ZHANG, J. (2018). Purification and characterization of a highly viscous polysaccharide produced by *Paenibacillus* strain. *European Polymer Journal*, 101, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.040>
- XU, M., ZHANG, L., ZHAO, F., WANG, J., ZHAO, B., ZHOU, Z., & HAN, Y. (2021). Cloning and expression of levansucrase gene of *Bacillus velezensis* BM-2 and enzymatic synthesis of levan. *Processes*, 9(2), 317. <https://doi.org/10.3390/pr9020317>
- XU, X., GAO, C., LIU, Z., WU, J., HAN, J., YAN, M., & WU, Z. (2016). Characterization of the levan produced by *Paenibacillus bovis* sp. nov. BD3526 and its immunological activity. *Carbohydrate Polymers*, 144, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.049>
- YIP, V. L. Y., & WITHERS, S. G. (2012). Identification of Tyr241 as a key catalytic Base in the Family 4 glycoside hydrolase BglIT from *Thermotoga maritima*. *Biochemistry*, 51(42), 8464–8474. <https://doi.org/10.1021/bi301021u>
- ZHANG, H.; YOHE, T.; HUANG, L.; ENTWISLE, S.; YANG, Z.; BUSK, P.; XU, Y.; YIN, Y. (2018). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 46, 95–101.

**APÊNDICE 1 – CAZYMES IDENTIFICADAS *Paenibacillus sonchi* genomovar
Riograndensis SBR5 pelo dbCAN.**

Gene ID	HMMER	Hotpep	DIAMOND	Peptideo sinal
WP_052741430.1	CBM16	CBM20	CBM20+GH13_2	N
WP_020431867.1	CBM16(30-150)+GT39(852-1084)	GT39+CBM10	CBM0+GT39	Y(1-28)
WP_052741407.1	CBM21	CBM21	CBM21	Y(1-29)
WP_020427330.1	CBM21(33-140)+CBM21(164-252)	CBM21	CBM21	Y(1-29)
WP_020431889.1	CBM21(51-139)+CBM21(166-254)	CBM21	CBM21	Y(1-29)
WP_085981562.1	CBM34	CBM20+CBM25	CBM20+CBM25+CBM32	Y(1-23)
WP_039786150.1	CBM35	CBM32+CBM35	CBM32	N
WP_046502953.1	CBM35(183-303)+GH87(354-1288)	GH87+CBM2+CBM32+CBM35+CBM6	CBM32+CBM35+GH87	Y(1-37)
WP_063850475.1	CBM35(212-325)+GH26(341-643)+CBM35(655-769)	GH26+CBM10+CBM3+CBM35	CBM35+GH26	Y(1-33)
WP_046504060.1	CBM41	GH13+CBM20+CBM34+CBM48	CBM34+GH13_20	N
WP_046502253.1	CBM41(262-364)+CBM41(372-473)+GH13_12(745-1083)+GH13_41(1698-2007)	GH13+CBM2+CBM35+CBM41+CBM48	CBM41+CBM48+GH13_12+GH13_41	Y(1-35)
WP_020428210.1	CBM48	GH13+CBM20+CBM34+CBM48	CBM34+GH13_20	N
WP_046504066.1	CBM48(31-118)+GH13_9(183-483)	GH13+CBM48	CBM48+GH13_9	N
WP_020430207.1	CBM54	GH13+CBM20+CBM34+CBM48	CBM34+GH13_20	N
WP_020425778.1	CBM54(228-340)+GH16(519-762)+CBM4(794-935)+CBM4(969-1098)+CBM4(1127-	GH16+CBM4+CBM54+CBM6	CBM4+CBM54+GH16	Y(1-31)

WP_046506649.1	1247)+CBM4(1365-1475)+CBM4(1526-1650)	GH13+CBM20+CBM34+CBM48	CBM34+GH13_20	N
WP_046503522.1	CBM56		CBM56+GH64	Y(1-29)
WP_020426848.1	CBM56(24-119)+GH64(145-361)	GH64+CBM56	CBM34+GH13_20	N
WP_052741432.1	CBM66	GH13+CBM20+CBM34+CBM48	CBM13+CBM66+GH32	
	CBM66(60-216)+CBM66(225-377)+GH32(396-709)+CBM66(971-1127)+CBM13(1141-1269)			
WP_046505729.1	CBM67	GH32+CBM38+CBM66	CBM25+CBM26+CBM35+GH13	Y(1-21)
WP_167345670.1	CBM67(31-209)+GH78(233-809)	CBM25+CBM26+CBM35	GH78	Y(1-32)
WP_020432712.1	CBM9(95-284)	GH78	CBM9	N
WP_020428997.1	CE12(3-213)	CBM2+CBM9	CE12	Y(1-39)
WP_020428569.1	CE14(22-129)	CE12	CE12	N
WP_020427658.1	CE14(6-111)	CE14	CE14	N
WP_020427010.1	CE2(135-350)	CE14	CE14	N
WP_020430666.1	CE4(111-237)	CE2	CE2	N
WP_020434073.1	CE4(130-253)	CE4	CE4	N
WP_046504523.1	CE4(36-143)	CE4	CE4	N
WP_020428281.1	CE4(37-140)	CE4	CE4	N
WP_020426665.1	CE4(45-166)	CE4	CE4	N
WP_039832611.1	CE4(49-174)	CE4	CE4	Y(1-25)
WP_085981603.1	CE4(60-168)	CE4	CE4	N
WP_020429894.1	CE4(96-218)	CE4	CE4	N
WP_039785373.1	CE6(56-147)	CE6	CE6	Y(1-33)
WP_020434030.1	CE7(5-313)	CE7	CE7	N
WP_020428275.1	CE7(5-315)	CE7	CE7	N

WP_020429214.1	CE8(3-289)	CE8	CE8	N
WP_039785072.1	CE9(13-389)	CE9	CE9	N
WP_020430053.1	GH1(1-482)	GH1	GH1	N
WP_020428450.1	GH1(5-480)	GH1	GH1	N
WP_020426734.1	GH1(5-482)	GH1	GH1	N
WP_020433862.1	GH1(6-466)	GH1	GH1	N
WP_020434395.1	GH1(7-475)	GH1	GH1	N
WP_020427241.1	GH10(11-332)	GH10+CBM9	GH10	N
WP_081487166.1	GH10(24-291)	GH10	GH10	N
WP_020426630.1	GH105(25-339)	GH105	GH105	N
WP_020430463.1	GH105(27-339)	GH105	GH105	N
WP_082118148.1	GH105(30-360)	GH105	GH105	N
WP_020427987.1	GH105(31-340)	GH105	GH105	N
WP_082118109.1	GH105(380-719)	GH105	GH105	N
WP_046506777.1	GH105(41-378)	GH105	GH105	N
WP_167345599.1	GH106(14-554)	GH106	GH106	N
WP_020427605.1	GH106(28-882)	GH106	GH106	N
WP_020433488.1	GH109(6-119)	GH109	GH109	N
WP_020430448.1	GH11(32-210)	GH11+CBM2+CBM60	GH11	Y(1-30)
WP_020428267.1	GH113(9-307)	GH113	GH113	N
WP_039785486.1	GH115(25-467)	GH115	GH115	N
WP_052741476.1	GH120(296-386)	GH120+CBM6	GH120	N
WP_020429532.1	GH125(22-417)	GH125	GH125	N
WP_039790020.1	GH125(23-416)	GH125	GH125	N
WP_020427468.1	GH125(35-430)	GH125	GH125	N
WP_020427413.1	GH126(60-379)	GH126	GH126	Y(1-26)
WP_046504980.1	GH127(12-560)	GH127	GH127	N
WP_020432391.1	GH127(18-565)	GH127	GH127	N
WP_046502436.1	GH13_1(82-395)	GH18+CBM12+CBM2+CBM20+CBM25+CBM35+CBM5	CBM20+CBM25+GH13	Y(1-34)

WP_020432771.1	GH13_14(189-540)+CBM41(695-770)	GH13+CBM25+CBM41+CBM48+CBM68	CBM41+GH13_14	N
WP_020433561.1	GH13_14(201-518)	GH13+CBM25+CBM41+CBM48+CBM68	CBM48+GH13_14	N
WP_167345645.1	GH13_19(87-465)+CBM26(691-764)	GH13+CBM25+CBM26	CBM25+CBM26+GH13_19	Y(1-16)
WP_046503477.1	GH13_2(78-394)+CBM20(615-704)	CBM20	CBM20+GH13_2	Y(1-28)
WP_046503658.1	GH13_29(31-380)	GH13	GH13_29	N
WP_046505577.1	GH13_31(28-377)	GH13	GH13_31	N
WP_020428204.1	GH13_31(28-379)	GH13	GH13_31	N
WP_020429794.1	GH13_31(28-379)	GH13	GH13_31	N
WP_020426950.1	GH13_5(31-371)	GH13	GH13_5	N
WP_020429613.1	GH130(16-330)	GH130	GH130	N
WP_020429622.1	GH130(16-330)	GH130	GH130	N
WP_020430274.1	GH130(18-332)	GH130	GH130	N
WP_020428274.1	GH130(28-325)	GH130	GH130	N
WP_020428282.1	GH130(4-332)	GH130	GH130	N
WP_020429540.1	GH130(4-333)	GH130	GH130	N
WP_020426481.1	GH130(4-346)	GH130	GH130	N
WP_020428265.1	GH130(51-363)	GH130	GH130	N
WP_020430617.1	GH133(246-599)	GH0	GH0	N
WP_063850482.1	GH136(39-568)	GH136	GH136	Y(1-35)
WP_046501184.1	GH141(34-267)+CBM16(614-728)	PLO+CBM16	CBM16+PLO	Y(1-31)
WP_020433897.1	GH146(9-554)	GH146	GH146	N
WP_020432442.1	GH151(24-155)	GH151	GH151	N
SLH - Domínio de homologia em camada S	GH154(7-360)	GH154	GH154	N
WP_039787836.1	GH16(40-234)	GH16	GH16	Y(1-27)
WP_020426902.1	GH161(1-1078)	GH161	GH161	N

WP_020427556.1	GH18(143-408)	GH18+CBM50	CBM50+GH18	N
WP_020426261.1	GH18(312-558)	GH18	GH18	Y(1-30)
WP_063850483.1	GH18(41-441)+CBM12(596-628)	GH18+CBM12+CBM2+CBM5+CBM54	CBM12+CBM5+GH18	Y(1-38)
WP_052741526.1	GH18(57-452)+CBM12(773-805)	GH18+CBM12+CBM2+CBM5+CBM73	CBM12+CBM5+GH18	N
WP_046507076.1	GH2(10-464)	GH2	GH2	N
WP_039787780.1	GH2(11-587)	GH2	GH2	N
WP_020430882.1	GH2(15-580)	GH2+CBM42+CBM67	GH2	N
WP_020431678.1	GH2(16-473)	GH2	GH2	N
WP_046504993.1	GH2(4-564)	GH2+CBM32+CBM6+CBM67	GH2	N
WP_046503633.1	GH2(46-922)	GH2+CBM51+CBM67	GH2	N
WP_046505471.1	GH2(5-606)	GH2	GH2	N
WP_020426031.1	GH2(8-760)	GH2	GH2	N
WP_046502355.1	GH2(9-691)	GH2	GH2	N
WP_020426706.1	GH20(131-395)	GH20	GH20	N
WP_020426895.1	GH23(117-229)	GH23	GH23	N
WP_020427944.1	GH23(50-182)	GH23	GH23	N
WP_085981526.1	GH26(11-318)	GH26+CBM3+CBM35	GH26	N
WP_039787469.1	GH26(39-334)	GH26	GH26	N
WP_052741468.1	GH26(516-816)+CBM23(832-992)	GH26	CBM16+CBM23+GH26	Y(1-33)
WP_046501417.1	GH26(59-357)	GH26	GH26	N
WP_046502786.1	GH27(6-184)	GH27+CBM51	GH27	N
WP_020427009.1	GH27(6-185)	GH27+CBM51	GH27	N
WP_020428060.1	GH27(99-296)	GH27	GH27	N
WP_020431702.1	GH28(203-456)	GH28	GH28	N
WP_020429212.1	GH28(45-433)	GH28	GH28	N
WP_020429835.1	GH29(14-382)	GH29+CBM13	GH29	N
WP_020429538.1	GH3(101-327)	GH3+CBM6	GH3	N

WP_046502136.1	GH3(103-328)	GH3+CBM6	GH3	N
WP_039791331.1	GH3(144-369)	GH3	GH3	Y(1-29)
WP_046501973.1	GH3(31-251)	GH3	GH3	N
WP_046501969.1	GH3(40-272)+CBM6(824-939)	GH3+CBM6	GH3	N
WP_085981555.1	GH3(53-287)	GH3	GH3	N
WP_020427554.1	GH3(538-756)	GH3	GH3	N
WP_020430817.1	GH3(59-264)	GH3	GH3	N
WP_020433255.1	GH3(78-300)	GH3	GH3	N
WP_020427988.1	GH3(87-314)	GH3	GH3	N
WP_020426903.1	GH30_1(33-442)	GH30	GH30_1	N
WP_020430033.1	GH30_2(42-449)	GH30	GH30_2	N
WP_046507333.1	GH30_3(26-439)	GH30	GH30_3	N
WP_046505123.1	GH30_8(35-378)	GH30+CBM35+CBM6	GH30_8	Y(1-33)
WP_046505172.1	GH31(197-652)	GH31	GH31	N
WP_020425797.1	GH31(231-671)	GH31	GH31	N
WP_020425872.1	GH31(231-671)	GH31	GH31	N
WP_167345664.1	GH31(240-707)	GH31	GH31	N
WP_020432426.1	GH32(14-330)	GH32+CBM38+CBM66	GH32	N
WP_020434233.1	GH32(282-594)	GH32+CBM38	GH32	N
WP_063850488.1	GH32(283-593)+CBM38(852-993)+CBM38(1115-1246)	GH18+GH32+CBM38+CBM5	CBM38+GH32	Y(1-23)
WP_082118080.1	GH32(335-645)	GH32+CBM38+CBM66	GH32	N
WP_020434348.1	GH32(55-363)	GH32	GH32	N
WP_020434235.1	GH32(6-256)	GH32	GH32	N
WP_046505068.1	GH32(6-292)	GH32	GH32	N
WP_020434287.1	GH32(7-292)	GH32	GH32	N
WP_020428753.1	GH35(40-391)	GH35	GH35	N
WP_020434152.1	GH36(11-698)	GH36	GH36	N

WP_046501862.1	GH36(11-703)	GH36	GH36	N
WP_020430967.1	GH36(11-709)	GH36	GH36	N
WP_052741469.1	GH36(186-495)	GH36	GH36	N
WP_020428765.1	GH36(83-625)	GH36	GH36	N
WP_046501309.1	GH38(232-484)	GH38	GH38	N
WP_020429539.1	GH38(234-485)	GH38	GH38	N
WP_046504955.1	GH38(239-503)	GH38	GH38	N
WP_046505817.1	GH38(6-275)	GH38	GH38	N
WP_020427466.1	GH38(7-273)	GH38	GH38	N
WP_046502079.1	GH39(339-771)	GH39	GH39	N
WP_020431020.1	GH4(3-177)	GH4	GH4	N
WP_020428216.1	GH4(4-183)	GH4	GH4	N
WP_020426242.1	GH4(8-184)	GH4	GH4	N
WP_046502100.1	GH42(10-375)	GH42	GH42	N
WP_020425884.1	GH42(14-383)	GH42	GH42	N
WP_046503451.1	GH42(15-393)	GH42	GH42	N
WP_046504253.1	GH42(20-393)	GH42	GH42	N
WP_020428066.1	GH43_1(10-319)	GH43	GH43_1	N
WP_020425556.1	GH43_10(23-290)	GH28+GH43	GH43_10	N
WP_046505176.1	GH43_10(7-279)	GH43+CBM22	GH43_10	N
WP_020427606.1	GH43_11(4-294)	GH43	GH43_11	N
WP_020431711.1	GH43_11(5-297)	GH43	GH43_11	N
WP_020429099.1	GH43_11(6-296)	GH43	GH43_11	N
WP_020428057.1	GH43_12(14-299)	GH43	GH43_12	N
WP_020433934.1	GH43_12(5-282)	GH43	GH43_12	N
WP_020429211.1	GH43_12(5-294)	GH43	GH43_12	N
WP_020427240.1	GH43_16(17-328)+CBM6(352-473)	GH43	GH43_16	N
		GH43+CBM13+CBM22+CBM36+CBM6	CBM6+GH43_16	N

WP_020427920.1	GH43_16(38-359)+CBM6(381-508)+CBM36(524-636)	GH43+CBM13+CBM22+CBM36+CBM6	CBM36+CBM6+GH43_16	Y(1-27)
WP_020434266.1	GH43_24(1-167)	GH43	GH43_24	N
WP_082118150.1	GH43_26(31-342)+CBM35(369-485)+CBM35(496-618)+CBM35(627-749)+CBM35(757-878)	CBM35	CBM13+CBM35+GH43_26	Y(1-26)
WP_082118079.1	GH43_26(50-344)+CBM35(390-493)	GH43+CBM35	CBM35+GH43_26	Y(1-29)
WP_020425889.1	GH43_26(7-299)	GH43	GH43_26	N
WP_046502010.1	GH43_26(7-309)	GH43+CBM13+CBM35+CBM42	GH43_26	N
WP_020427607.1	GH43_28(28-318)+CBM32(357-489)	GH43+CBM32	GH43_28	N
WP_039789981.1	GH43_34(3-281)	GH43	GH43_34	N
WP_046507392.1	GH43_35(8-309)	GH43	GH43_35	N
WP_046503264.1	GH43_4(29-358)	GH43+CBM54	GH43_4	Y(1-29)
WP_082118145.1	GH48(42-495)+CBM3(848-929)	GH48+CBM2+CBM3	CBM3+GH48	Y(1-38)
WP_052741475.1	GH5_1(47-360)+CBM3(407-487)	GH5+CBM2+CBM3	CBM3+GH5_1	Y(1-32)
WP_046502059.1	GH5_8(51-297)+CBM3(412-490)	GH5+CBM13+CBM2+CBM35+CBM59	CBM3+GH5_8	Y(1-35)
WP_020429505.1	GH51(2-491)	GH51	GH51	N
WP_020432697.1	GH51(3-495)	GH51	GH51	N
WP_020434037.1	GH51(3-500)	GH51	GH51	N
WP_046504219.1	GH52(20-439)	GH52	GH52	N
WP_039788740.1	GH52(21-463)	GH52	GH52	N
WP_020429160.1	GH65(289-685)	GH65	GH65	N
WP_020434239.1	GH65(318-708)	GH65	GH65	N
WP_020426999.1	GH65(319-693)	GH65	GH65	N

WP_046504920.1	GH65(319-694)	GH65	GH65	N
WP_039786502.1	GH65(320-711)	GH65	GH65	N
WP_085981635.1	GH65(321-695)	GH65	GH65	N
WP_020428205.1	GH65(322-700)	GH65	GH65	N
WP_020425921.1	GH65(340-715)	GH65	GH65	N
WP_020428048.1	GH67(11-686)	GH67	GH67	N
WP_020429094.1	GH67(15-687)	GH67	GH67	N
WP_020434349.1	GH68(49-490)	GH68	GH68	Y(1-28)
WP_082118172.1	GH74(90-204)+GH74(595-718)+CBM46(893-963)+CBM3(982-1063)	GH74	CBM3+GH74	
WP_020432784.1	GH8(55-372)	GH74+CBM1+CBM2+CBM3	GH8	Y(1-35)
WP_020429386.1	GH8(64-401)	GH8+CBM36	GH8	N
WP_046503935.1	GH85(113-477)	GH85	GH85	Y(1-32)
WP_046503644.1	GH87(552-1152)	GH87+CBM32+CBM35	CBM32+GH87	Y(1-34)
WP_082118085.1	GH88(38-365)	GH88	GH88	Y(1-32)
WP_046504213.1	GH88(40-359)	GH88	GH88	N
WP_039790311.1	GH88(45-369)	GH88	GH88	N
WP_063822379.1	GH9(41-475)+CBM3(502-587)+CBM3(766-847)	GH9+CBM2+CBM3	CBM3+GH9	N
WP_046502912.1	GH9(96-537)	GH9+CBM4	GH9	Y(1-36)
WP_020433258.1	GH94(113-1097)	GH94	GH94	N
WP_020428082.1	GH94(169-984)	GH94	GH94	N
WP_046502977.1	GH94(2-808)	GH94	GH94	N
WP_020426834.1	GH94(32-822)	GH94	GH94	N
WP_046506726.1	GH94(74-884)	GH94	GH94	N
WP_046505779.1	GH95(11-756)	GH95+CBM13+CBM32+CBM51	GH95	N
WP_020432775.1	GH95(5-727)	GH95+CBM13+CBM32+CBM51	GH95	N
WP_046503528.1	GT1(10-395)	GT1	GT1	N

WP_020428708.1	GT1(197-394)	GT1	GT1	N
WP_167345621.1	GT14(2-249)	GT14	GT14	N
WP_046503162.1	GT14(3-232)	GT14	GT14	N
WP_020427375.1	GT2_Glyco_transf_2_3(42-266)	GT2	GT2	N
WP_020427410.1	GT2_Glyco_transf_2_3(49-279)	GT2	GT2	N
WP_020425791.1	GT2_Glycos_transf_2(10-124)	GT2	GT2	N
WP_052741540.1	GT2_Glycos_transf_2(4-111)	GT2	GT2	N
WP_046505952.1	GT2_Glycos_transf_2(5-106)	GT2	GT2	N
WP_020434025.1	GT2_Glycos_transf_2(5-90)	GT2	GT2	N
WP_046507638.1	GT2_Glycos_transf_2(6-109)	GT2	GT2	N
WP_020431869.1	GT2_Glycos_transf_2(6-167)	GT2	GT2	N
WP_046505891.1	GT2_Glycos_transf_2(7-170)	GT2	GT2	N
WP_020425790.1	GT2_Glycos_transf_2(8-130)	GT2	GT2	N
WP_020427463.1	GT2_Glycos_transf_2(8-171)	GT2	GT2	N
WP_020426696.1	GT26(56-229)	GT26	GT26	N
WP_046501348.1	GT26(58-223)	GT26	GT26	N
WP_039788282.1	GT26(62-231)	GT26	GT26	N
WP_020427838.1	GT28(190-353)	GT28	GT28	N
WP_046501442.1	GT28(205-339)	GT28	GT28	N
WP_020427373.1	GT28(205-348)	GT28	GT28	N
WP_020426045.1	GT35(163-485)	GT35	GT35	N

WP_020428246.1	GT35(93-805)	GT35	GT35	N
WP_046502375.1	GT4(160-274)	GT4	GT4	N
WP_020427657.1	GT4(195-341)	GT4	GT4	N
WP_020426690.1	GT4(198-325)	GT4	GT4	N
WP_046502483.1	GT4(201-345)	GT4	GT4	N
WP_046504063.1	GT5(2-470)	GT5	GT5	N
WP_020427649.1	GT5(35-385)	GT4	GT4	N
WP_020425646.1	GT51(61-237)	GT51	GT51	N
WP_046505882.1	GT51(77-244)	GT51	GT51	N
WP_046503064.1	GT51(81-271)	GT51	GT51	N
WP_046504117.1	GT51(96-271)	GT51	GT51	N
WP_020426125.1	PL1(237-403)+CBM77(624-724)	PL1+CBM77	CBM77+PL1	Y(1-34)
WP_020430694.1	PL12(414-552)	PL12	PL12	N
WP_020430897.1	PL33_2(388-535)	PL33	PL33_2	N
WP_052741402.1	PL8(337-568)+CBM32(698-812)+CBM32(830-942)	PL8	CBM32+PL8	N
WP_039791363.1	PL9_1(2-372)	GH16+PL8+CBM32	CBM66+PL9_1	N
WP_039789052.1	PL9_2(35-408)	PL9+CBM35+CBM66	PL9_2	N
WP_052741418.1	SLH(31-70)+CBM54(194-306)+GH26(434-780)+CBM27(903-1073)+CBM23(1086-1245)	PL9	CBM23+CBM27+CBM54+GH26	Y(1-33)
		GH26+CBM23+CBM27+CBM54+CBM59		Y(1-27)

