



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUIZ GUSTAVO FERREIRA DE ALMEIDA

**Predição *in silico* da via biossintética de polihidroxialcanoatos (PHAs) em
bactérias do gênero *Brevibacterium***

Recife
2024

LUIZ GUSTAVO FERREIRA DE ALMEIDA

**Predição *in silico* da via biossintética de polihidroxialcanoatos (PHAs) em
bactérias do gênero *Brevibacterium***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Maria Paloma Silva de Barros

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Almeida, Luiz Gustavo Ferreira de.

Predição in silico da via biossintética de polihidroxialcanoatos (PHAs) em bactérias do gênero *Brevibacterium* / Luiz Gustavo Ferreira de Almeida. - Recife, 2024.

43 : il., tab.

Orientador(a): Maria Paloma Silva de Barros

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2024.

Inclui referências, anexos.

1. Bioinformática. 2. Predição de rotas metabólicas. 3. Polihidroxialcanoatos. 4. *Brevibacterium*. I. Barros, Maria Paloma Silva de. (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

LUIZ GUSTAVO FERREIRA DE ALMEIDA

**Predição *in silico* da via biossintética de polihidroxialcanoatos (PHAs) em
bactérias do gênero *Brevibacterium***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: __/__/2024

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Paloma Silva de Barros (Orientadora)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

Dra. Ana Carolina de Oliveira Luz
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

Dra. Aline de Andrade Alves
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Dra. Maria Paloma Barros, por me dar a oportunidade de trabalhar junto a ela, me guiar e se esforçar para que minha experiência no mundo da ciência fosse a melhor e mais enriquecedora possível. A todos os outros pesquisadores e trabalhadores do CETENE, de modo geral, pelo acolhimento, entusiasmo e vontade de ajudar sempre. Aos professores que tive durante o curso por todos os conhecimentos compartilhados e orientação. Aos meus colegas de curso pelo companheirismo ao passarmos pela montanha russa de emoções que foram esses anos de universidade. E a todos os amigos e família por absolutamente tudo, bem mais do que eu conseguiria expressar em palavras; se cheguei aqui foi por causa de vocês.

RESUMO

A poluição plástica é um problema urgente para o planeta e a substituição desses polímeros derivados do petróleo é uma urgência. Uma das alternativas é a utilização de polihidroxialcanoatos (PHAs), que são biopolímeros sintetizados por diversos microrganismos. No gênero *Brevibacterium*, já foi observada a produção de PHAs em algumas linhagens, porém o metabolismo de biossíntese ainda não foi descrito. Neste trabalho, foi realizada a análise de genomas de *Brevibacterium* disponíveis publicamente no banco de dados NCBI, com o objetivo de realizar uma predição *in silico* da via de biossíntese de PHAs dentro desse gênero. Proteínas com características de uma PHA sintase (PhaC), a enzima chave que polimeriza as moléculas de polihidroxialcanoatos, foram encontradas em apenas duas espécies: *B. daeguense* e *B. yomogidense*. Duas PhaC putativas foram identificadas em cada uma das espécies, em um cluster gênico semelhante em ambas. Apesar do BLASTP demonstrar maior identidade entre essas PhaCs putativas e PhaC de classe III, o cluster gênico observado, com duas unidades de genes de PhaC putativa, não é comparável com o de outros organismos produtores de PHA, então foi sugerida uma subclasse relacionada a classe III. Diante da rara incidência desse cluster e suas proteínas relacionadas dentro do gênero e do fato desses elementos serem bastante similares a sequências de bactérias de outros gêneros, a hipótese de transferência horizontal de genes foi proposta. Pela observação de enzimas contidas em vias descritas como precursoras da biossíntese do PHA e características das PhaC putativas encontradas, foi proposta uma possível via de biossíntese: a β -oxidação de ácidos graxos, já que *B. daeguense* e *B. yomogidense* possuem todas as enzimas utilizadas nessa via; mas o metabolismo do carbono não foi descartado e também pode ser utilizado, dependendo das características de especificidade de substrato das enzimas formadoras de monômero.

Palavras-chave: Bioinformática; Biopolímeros; Genética; Metabolismo.

ABSTRACT

Plastic pollution is an urgent problem for the planet, and the replacement of these petroleum-derived polymers is a necessity. One alternative is the use of polyhydroxyalkanoates (PHAs), which are biopolymers synthesized by various microorganisms. In the genus *Brevibacterium*, the production of PHAs has already been observed in some strains, but the biosynthetic metabolism has not yet been described. In this work, the analysis of publicly available *Brevibacterium* genomes in the NCBI database was performed with the aim of conducting an *in silico* prediction of the PHA biosynthesis pathway within this genus. Proteins with characteristics of a PHA synthase (PhaC), the key enzyme that polymerizes polyhydroxyalkanoate molecules, were found in only two species: *B. daeguense* and *B. yomogidense*. Two putative PhaC proteins were identified in each species, in a gene cluster similar in both. Although BLASTP showed higher identity between these putative PhaCs and Class III PhaC, the observed gene cluster, with the presence of two units of putative PhaC genes, is not comparable to that of other PHA-producing organisms, so a subclass related to Class III was suggested. Given the rare incidence of this cluster and its related proteins within the genus and the fact that these elements are quite similar to sequences of bacteria from other genera, the hypothesis of horizontal gene transfer was proposed. Through the observation of enzymes contained in pathways described as precursors of PHA biosynthesis and characteristics of the putative PhaCs found, a possible biosynthesis pathway was proposed: β -oxidation of fatty acids, since *B. daeguense* and *B. yomogidense* possess all the enzymes used in this pathway; however, carbon metabolism was not ruled out and may also be used depending on the substrate specificity characteristics of the monomer-forming enzymes.

Keywords: Bioinformatics; Biopolymers; Genetics; Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura química dos polihidroxialcanoatos	12
Figura 2 –	Clusters gênicos característicos de cada classe de PhaC	13
Figura 3 –	Possíveis rotas metabólicas de biossíntese de PHA	15
Figura 4 –	Parte do alinhamento múltiplo das PhaC putativas de <i>B. daeguense</i> e <i>B. epidermidis</i> com PhaCs de todas as classes já descritas na literatura	28
Figura 5 –	Comparação do cluster gênico do qual PhaC faz parte em <i>B. daeguense</i> e <i>B. yomogidense</i> , com representantes de todas as classes	29
Figura 6 –	Possíveis rotas de biossíntese do PHA em <i>B. daeguense</i> e <i>B. yomogidense</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Genomas de referência utilizados no estudo, com códigos de Assembly, GenBank e RefSeq, cepa, nível de montagem do genoma, tamanho.	23
Tabela 2 –	Primeiro resultado do BLASTP das proteínas presentes no cluster identificado	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	ARTIGO	19
3.1	Introdução	19
3.2	Materiais e métodos	22
3.2.1	<i>Genomas utilizados</i>	22
3.2.2	<i>Triagem para identificação de genes envolvidos na biossíntese de PHA</i>	24
3.2.3	<i>Identificação molecular de isolados de Brevibacterium sp. que possuem enzimas semelhantes a PhaC</i>	25
3.2.4	<i>Análise das enzimas identificadas como PhaCs putativas</i>	25
3.2.5	<i>Alinhamento de proteínas</i>	25
3.2.6	<i>Visualização dos genomas</i>	26
3.2.7	<i>Predição da via metabólica</i>	26
3.3	Resultados e Discussão	26
3.3.1	<i>Identificação de PhaCs putativas</i>	26
3.3.2	<i>Cluster gênico e classe de PhaC</i>	28
3.3.3	<i>Predição da via metabólica de biossíntese de polihidroxialcanoatos por Brevibacterium daeguense e Brevibacterium yomogidense</i>	32
3.4	Conclusão	33
3.5	Referências	34
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO A – INFORMAÇÕES SOBRE A SUBMISSÃO DO ARTIGO	42

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos derivados do petróleo são polímeros obtidos a partir de fontes não renováveis que apresentam uma vasta gama de aplicações devido à sua versatilidade e custo acessível (Naser; Deiab; Darras, 2021). Esses polímeros não são biodegradáveis, persistindo no ambiente por longos períodos, muitas vezes centenas ou milhares de anos, contribuindo de forma bastante relevante para a poluição ambiental através da contaminação do solo, da água e do ar (Evode et al., 2021). Diante desse cenário desafiador, surge a necessidade de alternativas sustentáveis aos plásticos do petróleo e da substituição desses recursos não renováveis por alternativas biorrenováveis, reduzindo assim a geração de resíduos e contribuindo para uma economia mais circular (Mangal; Rao; Banerjee, 2023).

Os bioplásticos emergem como uma alternativa sustentável promissora para mitigar os impactos ambientais associados ao descarte de resíduos plásticos (Vicente; Proença; Morais, 2023). Eles podem ser sintetizados via catálise enzimática, síntese em plantas geneticamente modificadas ou fermentação microbiana, e possuem características semelhantes aos plásticos convencionais (Seratale et al., 2021; Zimmermann et al., 2020).

Dentre os bioplásticos, os polihidroxialcanoatos (PHAs) podem ser sintetizados por diversos microrganismos utilizando fontes de carbono renováveis, como substrato, e se destacam devido ao seu significativo potencial biotecnológico por conta de suas propriedades físico-químicas comparáveis aos plásticos convencionais e pelo fato de serem biodegradáveis e biocompatíveis (Seratale et al., 2021). A identificação do primeiro PHA foi registrado em 1926, quando Maurice Lemoigne observou a presença de grânulos intracelulares de polihidroxibutirato (PHB), um tipo de PHA constituído por quatro átomos de carbono. A primeira bactéria identificada como produtora de PHA foi a *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926) e, desde então, a síntese de PHA foi documentada em mais de 300 espécies de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e arqueas, como *Alcaligenes latus*, *Azobacter vinelandii*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* e *Escherischia coli* (Alves et al., 2023).

Os PHAs também já foram identificados nos eucariotos, como um componente da membrana celular de plantas e animais em complexos de poli- β -hidroxibutirato/polifosfato de cálcio (PHB-CaPolyPi) (Reusch, 1989). Em procariotos,

os PHAs são armazenados em grânulos citoplasmáticos e desempenham uma função primária como reservatório de energia e carbono. Sua biossíntese ocorre em situação de excesso de carbono, associado a limitação de nutrientes essenciais para a multiplicação celular, como nitrogênio, fósforo e magnésio (Shahid; Razzaq; Farooq, 2021).

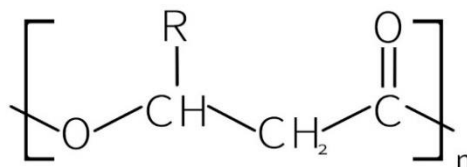
Notavelmente, o acúmulo de PHA influencia positivamente a capacidade de microrganismos enfrentarem diferentes tipos de estresse celular, incluindo situações de altas temperaturas, congelamento, estresse oxidativo, pressão osmótica, dano radioativo e toxicidade de metais pesados (Obruca et al., 2020).

Muitos esforços têm sido dedicados para utilização de PHAs na indústria, entre elas: investigação de novas espécies produtoras, modificações no processo e aplicação de ferramentas biotecnológicas, juntamente com protocolos de aprimoramento das características físico-químicas dos polímeros (Chen; Wu, 2005; Koller et al., 2010; Mannina et al., 2019). Em especial, há um interesse em reduzir custos de produção e processamento, fatores determinantes para a competitividade desses bioplásticos em relação aos plásticos derivados do petróleo (Chen et al., 2020).

A aplicação de PHAs é bastante interdisciplinar e agrega valor a diversas indústrias, incluindo: agricultura, materiais, biocombustíveis, produtos químicos finos, medicamentos, nutrição, engenharia de tecidos, nanocompósitos e misturas de polímeros (Chen, 2009; Philip; Keshavarz; Roy, 2007). Esses biopolímeros podem ser sintetizados a partir de açúcares, incluindo glicose, sacarose, glicerol, lignina e xilose, bem como de óleos vegetais, gases de xisto, resíduos agrícolas, entre outras fontes de carbono que colaboram para uma economia circular (Adeleye et al., 2020).

Uma molécula de PHA é constituída por cerca de 600 a 35000 monômeros de ácido hidroxialcanóico. Cada um desses monômeros possui uma cadeia lateral R, que é geralmente um grupo alquila insaturado, mas também pode ser um grupo alquila ramificado ou substituído (Figura 1) (Tam et al., 2014). A depender do número de carbonos presente no monômero, o polímero formado terá uma nomenclatura diferente, sendo o mais comum deles o polihidroxibutirato (PHB) (Gao et al., 2011).

Figura 1 – Estrutura química dos polihidroxialcanoatos



Fonte: O Autor (2024).

A composição monomérica desempenha um papel determinante nas características físico-químicas dos PHAs (Li; Yang; Loh, 2016). Os monômeros de PHAs podem ser divididos em três categorias principais de acordo com a quantidade de átomos de carbono neles: três ou cinco átomos de carbono, conhecidos como PHA de cadeia curta (scl-PHA, do inglês *short-chain length* PHA), caracterizados por sua rigidez e fragilidade; de seis a 14 átomos de carbono, denominados PHA de cadeia média (mcl-PHA, do inglês *medium-chain length* PHA), que exibem flexibilidade e propriedades elastoméricas; e com 15 ou mais átomos de carbono, designados PHA de cadeia longa (lcl-PHA, do inglês *long-chain length* PHA), sendo estes últimos raramente produzidos por microrganismos (Reddy, 2022; Bedade; Edson; Gross, 2021).

A produção de copolímeros, polímeros constituídos por mais de um tipo de monômero, é uma alternativa promissora para alcançar as características desejáveis comparáveis aos plásticos convencionais (Volova et al., 2021). Nesse sentido, um dos focos no aprimoramento de microrganismos é direcionado à produção de copolímeros que exibam propriedades amórficas e elastoméricas (Song et al., 2022).

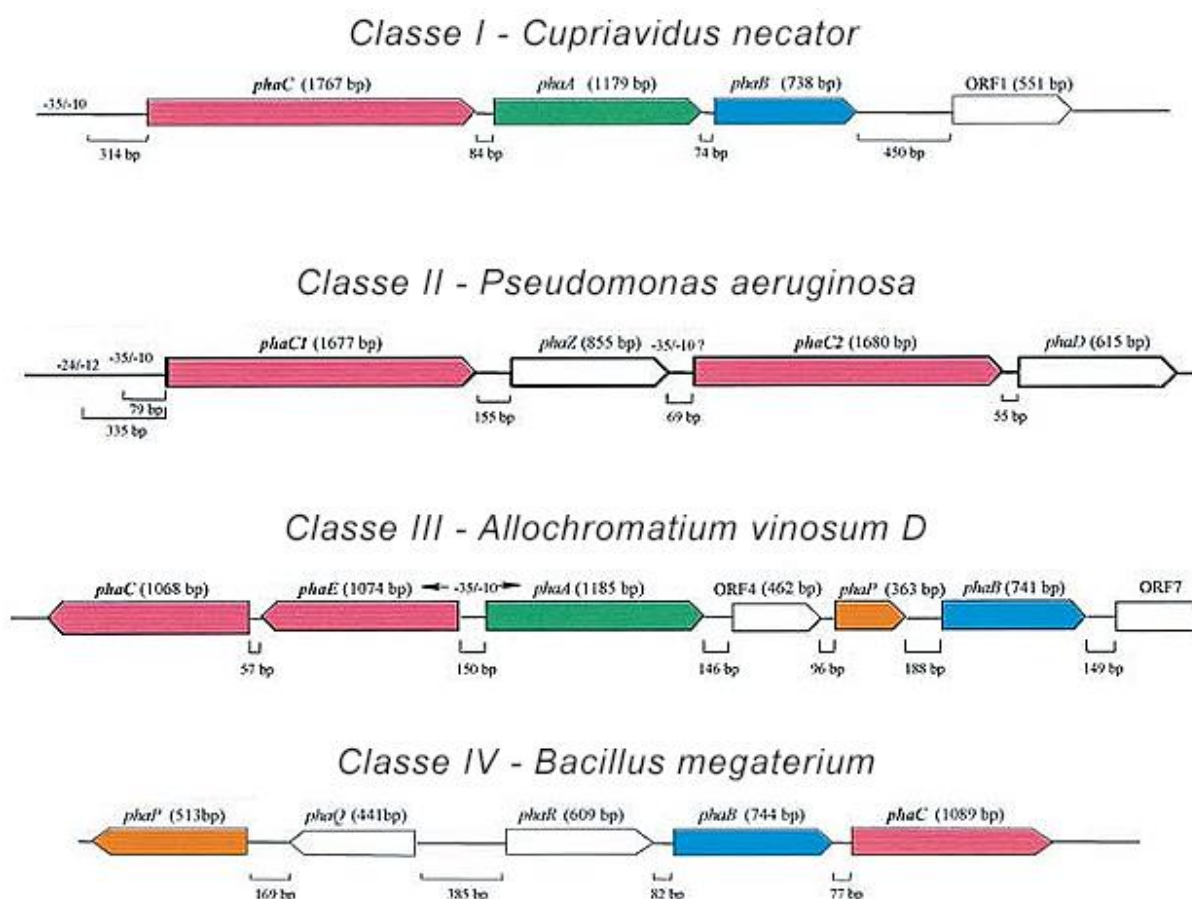
O metabolismo de biossíntese dos PHAs tem sido elucidado desde sua descoberta nos anos 1920 e compreender esse processo é essencial para a definição dos substratos a serem utilizados, que determinam a constituição monomérica do biopolímero (Sharma et al., 2017; Koller et al., 2010).

A principal enzima da via de biossíntese dos PHAs é a PhaC (PHA sintase ou PHA polimerase), responsável por polimerizar os monômeros de (R)-hidroxiácido graxo (Chek et al., 2019; Neoh et al., 2022). Em termos gerais, a PhaC possui uma configuração estrutural que inclui domínio catalítico N-terminal, cuja composição é flexível e ainda não bem compreendida; uma parte C-terminal, que engloba o local de entrada do substrato, o sítio ativo, caracterizado pela tríade catalítica Cys-Asp-His (cisteína, ácido aspártico e histidina) e o túnel de liberação do produto (Neoh et

al., 2022). O resíduo de cisteína presente no sítio catalítico é o centro ativo da enzima PhaC e está localizado em uma sequência de seis aminoácidos denominada *phaC-box*, que possui uma conformação similar a uma lipase-box e segue a sequência consenso ([GAST]-X-C-X-[GASV]-[GA]), com X sendo um aminoácido qualquer e os aminoácidos entre colchetes as opções já observadas em cada posição (Mezzola; D'Urso, 2018; Nambu et al., 2020).

A enzima PhaC é classificada em quatro classes baseado nas suas subunidades, estrutura primária e especificidade de substrato: classe I, classe II, classe III e classe IV. Cada classe está associada a vias metabólicas diferentes e está presente em um cluster gênico característico (Neoh et al., 2022; Rehm, 2003), como observado na Figura 2.

Figura 2 – Clusters gênicos característicos de cada classe de PhaC



Fonte: Adaptado de Rehm, 2003.

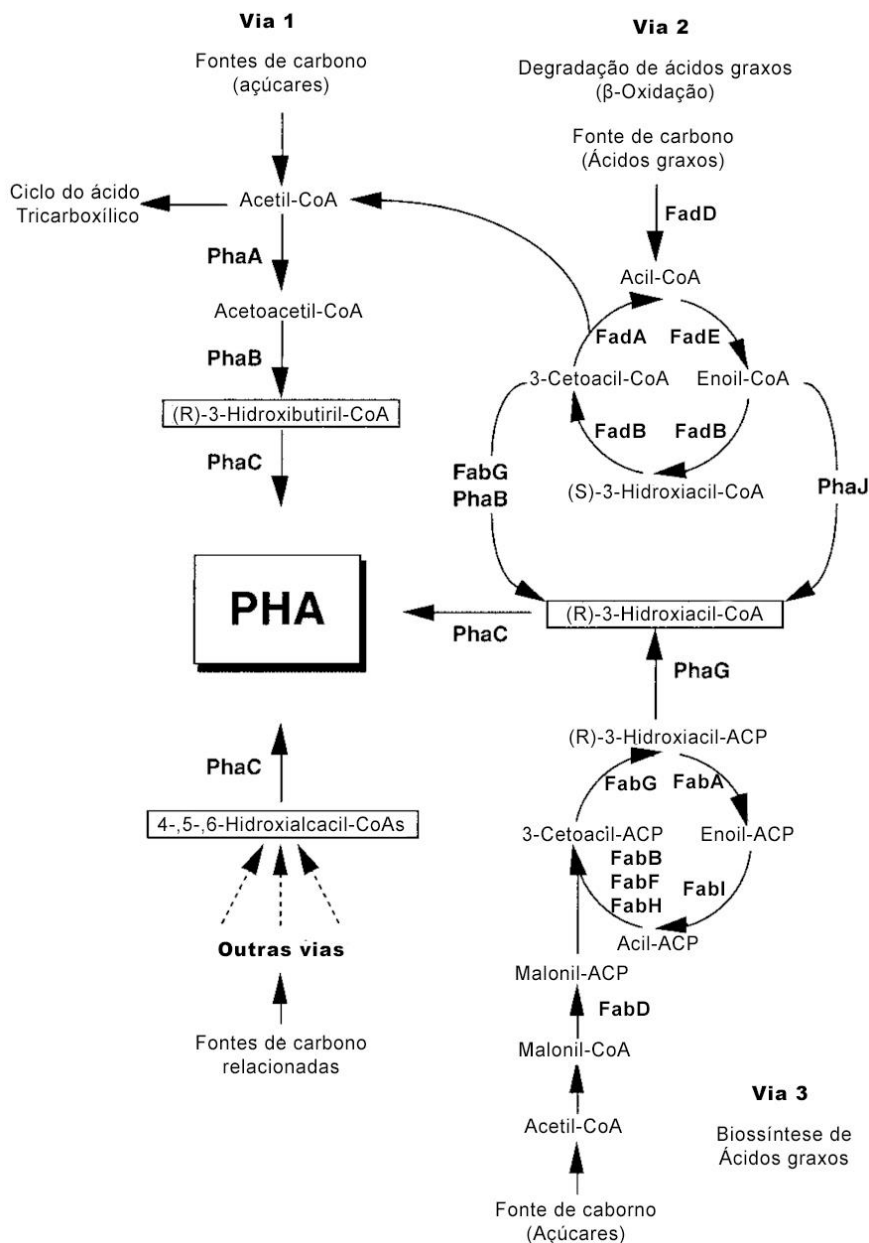
A classe I possui uma subunidade (63-73 kDa) e, de modo geral, especificidade com scl-PHAs, tendo como exemplo a espécie *Cupriavidus necator*. A

classe II também possui uma subunidade (PhaC1 ou PhaC2) de aproximadamente 63 kDa e é a única que possui especificidade de substrato voltada para os mcl-PHAs, estando presente em muitas espécies de *Pseudomonas*, como a *P. aeruginosa*. As classes III e IV também possuem especificidade com scl-PHAs e ambas são compostas por duas subunidades. Na classe III, a função de PHA sintase é realizada pelas heterounidades: subunidade PhaC (39-53 kDa) e subunidade PhaE (20-43 kDa), e é exemplificada pela espécie *Allochromatium vinosum*. A classe IV também possui duas heterounidades: a subunidade PhaC (~41 kDa) e a subunidade PhaR, que é um regulador transcricional com aproximadamente 20 kDa, cuja ausência não permite a função de biossíntese; representantes desta classe incluem *Bacillus cereus* e *Bacillus megaterium* (Singh et al., 2018; McCool; Cannon, 2001).

Interessantemente, a subunidade PhaC da classe III e a subunidade PhaC da classe IV, ao serem comparadas por homologia, possuem cerca de 32-34% de similaridade nas sequências de aminoácidos, o que é bastante alto, levando em conta que a similaridade observada entre subunidades PhaC de espécies de classe III é de 38% (Tsuge; Hyakutake; Mizuno, 2015).

Outras enzimas importantes que podem estar presentes no genoma de organismos produtores são aquelas envolvidas na formação dos monômeros que serão polimerizados pela PhaC. São elas: β -cetotiolase (PhaA), acetatoacetil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB), 3HA-ACP:CoA transacilase (PhaG), enoil-CoA-hidratase (R)-específica (PhaJ), 3-cetoacil-CoA tiolase (FadA), 3HA-CoA desidrogenase (FadB), acil-CoA sintetase (FadD), acil-CoA desidrogenase (FadE), β -cetoacil-ACP redutase (FabG), 3HA-ACP desidratase (FabA), β -cetoacil-ACP sintase I (FabB), β -cetoacil-ACP sintase II (FabF), β -cetoacil-ACP sintase III (FabH), enoil-ACP redutase (FabI), malonil-CoA:ACP-transacilase (FabD) (Taguchi et al., 2012.). Na Figura 3, observa-se a função de cada uma delas dentro das vias de biossíntese de PHAs. Além disso, existem enzimas relevantes com outras funções, como a PHA depolimerase (PhaZ), o regulador transcricional (PhaD) e outras proteínas associadas aos grânulos de PHA, relacionadas com o tamanho e quantidades deles, as fasinas: PhaF, PhaI, PhaP e PhaM (Choi et al., 2020).

Figura 3 – Possíveis rotas metabólicas de biossíntese de PHA. Enzimas identificadas ao lado das setas de acordo com substrato e produto gerado



Fonte: Adaptado de Taguchi et al., 2012.

A via do metabolismo do carbono está associada a formação de monômeros de scl-PHA, monômero que possui maior afinidade com PhaCs das classes I, III e IV. Já as vias de β-oxidação de ácidos graxos, assim como via de síntese *de novo* de ácidos graxos estão mais relacionadas com a formação de mcl-PHA, sendo utilizadas caracteristicamente por organismos que possuem PhaC de classe II (Chek et al., 2019; Singh et al., 2018; Zou et al., 2017).

Diante deste entendimento, uma das principais áreas de estudo atual que vem avançando é a edição gênica. A aplicação bem-sucedida da edição gênica em vários microrganismos tem se destacado como uma abordagem promissora (Favaro; Basaglia; Casella, 2019). Esta forma de melhoramento tem a capacidade de aumentar a produção de PHAs, inserir a via de biossíntese em organismos nos quais ela não é nativa e, de maneira geral, buscar uma produção mais eficiente e econômica de um produto com características desejáveis, potencializando a capacidade de customização e otimização desses biopolímeros para atender às demandas específicas da indústria e da pesquisa (Zhang et al., 2020).

O gênero *Brevibacterium* foi descrito pela primeira vez por Breed (1953), utilizando *Brevibacterium linens* como espécie-tipo. Esse gênero, pertencente à família das Brevibacteriaceae (ordem Micrococcales, classe Actinomycetia, filo Actinomycetota), é constituído por bactérias Gram-positivas estritamente aeróbicas quimio-organotróficas. Esse gênero possui 50 espécies, cuja morfologia apresenta ciclo bastonete-cocos durante crescimento em meio complexo; elas não possuem motilidade, não são resistentes a ácidos e não formam endósporos (Vecten et al, 2017).

As bactérias do gênero crescem bem em meio complexo com pH próximo ao neutro, mas acima de 6.0, com temperatura ótima entre 20-30°C ou 37°C, dependendo da linhagem. Todas as cepas estudadas toleram bem a salinidade com adição de NaCl no meio, sendo algumas até estimuladas nessas condições. Brevibactérias são catalase positivas, oxidase e nitrato redutase variável de acordo com a espécie, além de terem capacidade de hidrolisar gelatina e caseína, mas não amido ou ureia (Onraedt; Soetaert; Vandamme, 2005).

O isolamento dessas bactérias já foi observado em variados habitats, como solos, sedimentos/ambientes altamente salinos e microbioma da pele humana. Também foram encontradas em alimentos fermentados, como o queijo, no qual desempenham função no amadurecimento e sabor (Lee, 2008).

Na área da biotecnologia, esse gênero está relacionado a produção de aminoácidos, como: ácido aspártico e lisina, enzimas relacionadas produção de queijo, biosurfactantes, carotenoides, entre outros. Novas espécies foram descritas na última década, possuindo propriedades metabólicas diversas, como o processamento de metais e biorremediação (Forquin-Gomez et al., 2014; Vecten et al., 2017).

A produção de PHAs já foi registrada em algumas linhagens desse gênero, mas as publicações são escassas. Até mesmo a principal espécie relacionada a essa produção, a *B. casei*, possui apenas duas cepas com registros. Uma delas, a *B. casei* SRKP2 (Pandian et al., 2009), isolada de resíduos da indústria de laticínios, na qual se observou a síntese de PHB, chegando a um rendimento máximo médio de 2,940 g/L em resíduos de laticínios e água do mar. A outra espécie, *B. casei* MSI04 (Kiran et al., 2014), também produziu PHB e o rendimento observado foi de 6,74 g/L em meio contendo 25 g/L de amido como fonte de carbono com NaCl (3%), com 96 horas de incubação a 35°C. Além disso, Endah et al. (2021) registraram a produção de PHB pela cepa *Brevibacterium* sp. B45, verificando o efeito do inóculo e da adição de glicose no rendimento, sendo o maior rendimento de biomassa seca (2,92%) obtido utilizando 3% de inóculo e 3% de glicose.

As Brevibactérias apresentam diversas habilidades biossintéticas e demonstram grande potencial para a prospecção de biocompostos e, por conta da sua vasta gama de habitats, existe a possibilidade de propriedades metabólicas ainda não exploradas, que podem agregar a diversas áreas da biotecnologia (Cumsille et al., 2023). A quantidade de dados genômicos, recentemente, gerados para organismos desse gênero permite a investigação de potenciais produtores de bioprodutos, como os PHAs.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Descrever possíveis vias de biossíntese de PHAs em espécies de *Brevibacterium* baseado em dados genômicos disponíveis em bancos de dados públicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar genes que codificam PHA sintases (PhaCs) putativas nos genomas de bactérias do gênero *Brevibacterium* disponíveis publicamente para selecionar potenciais espécies produtoras;
- Classificar as PhaCs putativas das espécies selecionadas por meio da comparação da enzima e cluster gênico com organismos das diferentes classes;
- Identificar genes envolvidos nas rotas metabólicas do PHA nas espécies de *Brevibacterium* selecionadas;
- Predizer possíveis rotas metabólicas para produção de PHA em *Brevibacterium*.

3 ARTIGO

PREDIÇÃO *IN SILICO* DA VIA BIOSSINTÉTICA DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *BREVIBACTERIUM*

Resumo

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros capazes de formar bioplásticos com valor competitivo em relação aos plásticos derivados do petróleo, podendo ser sintetizados por diversos microrganismos. Neste trabalho, foram utilizados dados genômicos de bactérias do gênero *Brevibacterium* disponíveis publicamente para sugerir possíveis espécies produtoras de polihidroxicanoatos e suas possíveis vias de biossíntese dentro desse gênero. Pela análise dos genomas, foram encontradas enzimas semelhantes a PHA sintase (PhaC) em duas espécies: *B. daeguense* e *B. yomogidense*. Duas PhaCs putativas foram identificadas em cada espécie; ambas apresentaram maior identidade com PhaCs de classe III e estavam presentes no mesmo cluster gênico. Este é semelhante nas duas espécies e possui uma conformação de genes diferente de organismos com biossíntese confirmada. Como essas características não remetem às classes previamente descritas na literatura, foi sugerida uma subclasse relacionada a classe III. Por conta da raridade do cluster identificado dentro do gênero e por ele possuir uma similaridade alta com espécies de outros gêneros, a hipótese de transferência horizontal de genes foi sugerida. A via de biossíntese pela β -oxidação de ácidos graxos foi definida como a mais provável de ser utilizada nesse gênero, mas o metabolismo dos carboidratos não pôde ser descartado como possibilidade, a depender da especificidade de substrato das enzimas formadoras de monômero. Estudos experimentais complementares são necessários para comprovar a funcionalidade e especificidade das enzimas identificadas, assim como testar a hipótese de transferência horizontal de genes, as vias de biossíntese sugerida e caracterização do PHA produzido.

3.1 Introdução

Desde que os polímeros derivados do petróleo se popularizaram como matéria prima para produção em larga escala na década de 1950, eles obtiveram grande sucesso por conta de suas propriedades físico-químicas e custo-benefício (Barnes et al., 2009). No entanto, a intensa poluição advinda do acúmulo de

resíduos dessa indústria é uma das grandes preocupações da atualidade, já que cerca de 80% deles são descartados irregularmente e podem causar poluição ao dispersar pelos ecossistemas (Rosenboom et al., 2022). Dessa forma, existe um claro esforço na busca por substituintes aos plásticos convencionais que sejam capazes de manter características atrativas desses materiais, mas que sejam menos prejudiciais ao meio ambiente (Vicente et al., 2023).

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são biopolímeros que possuem a capacidade de formar bioplásticos biodegradáveis e biocompatíveis, além de poderem ser provenientes de recursos renováveis (Khatami et al., 2021). Eles podem ser sintetizados de três maneiras: catálise enzimática, síntese em plantas geneticamente modificadas e fermentação microbiana, sendo esta última a mais comum e descrita em diversas espécies (Seratale et al., 2021; Zimmermann et al., 2020). A biossíntese de PHA se dá em ambiente estressado com excesso de carbono e escassez de nutrientes essenciais para a divisão celular, como fósforo, nitrogênio e magnésio. O PHA é acumulado em grânulos dentro da célula e têm função biológica de reserva energética e de carbono, além de auxiliar na superação de estresses ambientais (Shahid et al., 2021; Jendrosseck, 2009; Kumar et al., 2020).

Existem cerca de 150 monômeros que podem ser incorporados para formar o PHA (Muhammadi et al., 2015), os quais podem ser metabolizados por diversas vias, sendo a glicólise, a β -oxidação de ácidos graxos e a síntese *de novo* de ácidos graxos as três principais e mais robustas (Chen, 2010). A depender de qual monômero utilizado na polimerização os PHAs irão possuir diferentes propriedades físico-químicas e podem ser classificados como PHA de cadeia curta (scl-PHA, com três ou cinco carbonos na cadeia lateral), PHA de cadeia média (mcl-PHA, seis a 14 carbonos) ou PHA de cadeia longa (lcl-PHA, mais de 14 carbonos) (Bedade et al., 2021). Além disso, também existem copolímeros formados por mais de um tipo de monômero (Nomura et al., 2005).

A reação de produção desses monômeros é catalisada por enzimas específicas. A cetoacetil-CoA redutase (PhaB) é responsável pela redução de acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA, um importante monômero na produção de PHAs. A 3-oxoacetil-CoA redutase (PhaC) e a enoil-CoA hidratase (R)-específica (PhaJ) participam da síntese via β -oxidação de ácidos graxos, fornecendo monômeros, geralmente de cadeia média, para a produção de PHAs. Já a 3-

hidroxiacil-ACP-CoA transacilase (PhaG) está relacionada com a via de síntese *de novo* de ácidos graxos (Khatami et al., 2021; Vo et al., 2023).

A enzima central para a via biossintética do PHA, responsável pela polimerização dos monômeros, é a PHA sintase ou PhaC (Chek et al., 2019). A estrutura da PhaC consiste em um domínio catalítico N-terminal flexível, que ainda não foi bem caracterizado, e um C-terminal, que possui o canal de entrada do substrato, sítio ativo e túnel de saída do produto (Neoh et al., 2022). O sítio catalítico da PHA sintase é caracterizado pela tríade catalítica Cys-Asp-His. Esta cisteína é o centro ativo da enzima PhaC e está localizada na *phaC-box*, uma sequência similar a uma *lipase-box*, que segue o consenso ([GAST]-X-C-X-[GASV]-[GA]), com X sendo um aminoácido arbitrário e os aminoácidos entre colchetes sendo as opções possíveis para uma determinada posição (Nambu et al., 2020).

Quatro classes de PhaC já foram descritas, baseado nas suas subunidades, estrutura primária e especificidade de substrato. A PhaC de Classe I possui especificidade para scl-PHAs e é exemplificada na espécie *Cupriavidus necator*. A PhaC classe II está presente em muitas espécies do gênero *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa*, e sua especificidade é para mcl-PHAs. A Classe III possui especificidade para scl-PHAs e é constituída por um heterodímero das subunidades PhaC e PhaE, como presente em *Allochromatium vinosum*. Por fim, a Classe IV também possui duas heterosubunidades: PhaC e PhaR; é representada por *Bacillus cereus* e possui especificidade para scl-PHAs (Singh et al., 2018). As subunidades PhaC das classes III e IV possuem elevada porcentagem de homologia entre si (Tsuge et al., 2015).

A utilização da sequência genômica para predição de rotas metabólicas é bastante útil no contexto atual, em que uma grande quantidade de dados genômicos está sendo gerada e disponibilizada (Oberhardt et al., 2009). Muitas ferramentas de bioinformática vêm sendo desenvolvidas para a interpretação desses dados, englobando desde a identificação de genes, anotação funcional baseado em homologia, até a reconstrução metabólica e simulações. Isso permite a identificação de possíveis organismos que possuem vias metabólicas de interesse para a biotecnologia, como para a formação de bioprodutos ou degradação de compostos (Li et al., 2009). Além disso, compreender a constituição genética é essencial para esclarecer as capacidades metabólicas do organismo, assim como para o direcionamento de esforços de melhoramento genético (Xu et al., 2013).

O gênero *Brevibacterium*, da família das Brevibacteriaceae, é formado por bactérias Gram-positivas e pertence à ordem das Micrococcales (classe Actinomycetia, filo Actinomycetota) (Cumsille et al., 2023). De acordo com Vecten et al. (2017), 50 espécies são reconhecidas, sua morfologia segue o ciclo bastonete-cocos e não possuem motilidade, sendo muitas delas descritas na última década. O habitat dessas bactérias é diverso, podendo ser encontradas em solos, em alimentos fermentados, em sedimentos, em ambientes com alta concentração de sal, como o marinho, além de serem parte do microbioma normal da pele humana (Lee, 2008; Forquin-Gomez et al., 2014). Essas bactérias possuem grande diversidade genética, que se reflete em habilidades biossintéticas variadas. A crescente quantidade de dados genômicos desse gênero permite a investigação de propriedades metabólicas potenciais, mas ainda não exploradas (Cumsille et al., 2023).

Em relação a produção de PHA, esse gênero não possui muitos registros publicados. A principal espécie relacionada é a *B. casei*, que possui duas cepas com produção comprovada: *B. casei* SRKP2 (Pandian et al., 2009) e *B. casei* MSI04 (Kiran et al., 2014). Endah et al. (2021) também descreveram a produção de PHB pela cepa *Brevibacterium* sp. B45.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é utilizar dados genômicos disponíveis publicamente de diversas espécies de *Brevibacterium* para prospectar possíveis espécies produtoras de PHA com base na presença de PhaCs putativas, classificar essas enzimas nas espécies identificadas e predizer rotas metabólicas de biossíntese nesse gênero, com base nos genes encontrados no genoma.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1. Genomas utilizados

Para as análises realizadas fora do ambiente do NCBI, foram utilizados os arquivos FASTA referentes a todos os 32 genomas disponíveis no banco de dados do NCBI classificados como “reference genome”, pertencentes a diferentes espécies de bactérias do gênero *Brevibacterium*. A Tabela 1 apresenta uma lista completa desses genomas, incluindo informações pertinentes a cada um deles. Além disso, todos os genomas disponíveis de *Brevibacterium casei* com taxonomia confirmada (27, incluindo o genoma de referência) também foram utilizados, de forma a

abranger o máximo de variedade genética disponível, já que essa espécie apresenta maior quantidade de registros de produção de PHA.

Tabela 1. Genomas de referência utilizados no estudo, com códigos de Assembly, GenBank e RefSeq, cepa, nível de montagem do genoma, tamanho.

Espécie	Assembly	Cepa	GenBank	RefSeq	Tamanho (Mb)
<i>Brevibacterium album</i>	ASM42644v1	DSM 18261	GCA_000426445.1	GCF_000426445.1	4.095
<i>Brevibacterium antiquum</i>	ASM1610765v1	DSM 21545	GCA_016107655.1	GCF_016107655.1	4.255
<i>Brevibacterium atlanticum</i>	ASM1161724v1	WO024	GCA_011617245.1	GCF_011617245.1	4.157
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	ASM393299v1	SMQ-1419	GCA_003932995.1	GCF_003932995.1	4.039
<i>Brevibacterium casei</i>	ASM1602741v1	FDAARGOS_902	GCA_016027415.1	GCF_016027415.1	3.960
<i>Brevibacterium celere</i>	ASM331541v1	3b_TX	GCA_003315415.1	GCF_003315415.1	3.766
<i>Brevibacterium daeguense</i>	ASM2172913v1	DSM 27938	GCA_021729135.1	GCF_021729135.1	3.555
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	ASM157080v1	NBRC 14811	GCA_001570805.1	GCF_001570805.1	3.703
<i>Brevibacterium gallinarum</i>	ASM1483688v1	Re57	GCA_014836885.1	GCF_014836885.1	3.168
<i>Brevibacterium ihuae</i>	PRJEB20939	CV3	GCA_900184225.1	GCF_900184225.1	3.097
<i>Brevibacterium iodinum</i>	55312_A01	NCTC9742	GCA_900445875.1	GCF_900445875.1	3.615
<i>Brevibacterium jeotgali</i>	ASM782815v1	DSM 29217	GCA_007828155.1	GCF_007828155.1	3.330
<i>Brevibacterium limosum</i>	ASM1161770v1	o2	GCA_011617705.1	GCF_011617705.1	4.253
<i>Brevibacterium linens</i>	ASM399933v1	ATCC 19391	GCA_003999335.1	GCF_003999335.1	3.814
<i>Brevibacterium luteolum</i>	ASM2514761v1	p3-SID304	GCA_025147615.1	GCF_025147615.1	2.831
<i>Brevibacterium marinum</i>	ASM1192795v1	DSM 18964	GCA_011927955.1	GCF_011927955.1	4.221
<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	ASM17845v1	ATCC 49030	GCA_000178455.1	GCF_000178455.1	2.562
<i>Brevibacterium oceanii</i>	ASM1794832v1	WW007	GCA_017948325.1	GCF_017948325.1	4.304
<i>Brevibacterium paucivorans</i>	ASM1690773v1	DSM 13657	GCA_016907735.1	GCF_016907735.1	2.410
<i>Brevibacterium permense</i>	ASM1328049v1	VKM Ac-2280	GCA_013280495.1	GCF_013280495.1	3.703
<i>Brevibacterium</i>	ASM1161746v1	YB235	GCA_011617465.1	GCF_011617465.1	3.913

<i>pigmentatum</i>					
<i>Brevibacterium ravenburgense</i>	ASM158461v1	CCUG56047	GCA_001584615.1	GCF_001584615.1	2.297
<i>Brevibacterium renqingii</i>	ASM1780809v1	REN4-1	GCA_017808095.1	GCF_017808095.1	3.719
<i>Brevibacterium rongguense</i>	ASM985784v1	5221	GCA_009857845.1	GCF_009857845.1	3.118
<i>Brevibacterium sandarakinum</i>	IMG-taxon 2634166182 annotated DSM 22082 assembly		GCA_900105045.1	GCF_900105045.1	4.441
<i>Brevibacterium sanguinis</i>	ASM331540v1	2b_TX	GCA_003315405.1	GCF_003315405.1	3.764
<i>Brevibacterium sediminis</i>	ASM2489529v1	COD27	GCA_024895295.1	GCF_024895295.1	4.335
<i>Brevibacterium senegalense</i>	ASM28583v2	JC43	GCA_000285835.2	GCF_000285835.1	3.427
<i>Brevibacterium siliguriense</i>	IMG-taxon 2634166182 annotated DSM 23676 assembly		GCA_900105045.1	GCF_900105045.1	4.023
<i>Brevibacterium spongiae</i>	ASM2616851v1	WHS-Z9	GCA_026168515.1	GCF_026168515.1	4.218
<i>Brevibacterium yomogidense</i>	ASM1610768v1	DSM 24850	GCA_016107685.1	GCF_016107685.1	3.709
<i>Brevibacterium zhoupengii</i>	ASM2111742v1	HY170	GCA_021117425.1	GCF_021117425.1	4.408

3.2.2 Triagem para identificação de genes envolvidos na biossíntese de PHA

Uma triagem inicial foi feita utilizando a ferramenta BLASTP do banco de dados nr (*non-redundant protein sequences*) no NCBI. A busca se limitou ao gênero *Brevibacterium* (taxid:1696), com o propósito de localizar possíveis espécies de interesse. A análise foi direcionada para as diferentes classes de PhaC, como também outras proteínas que caracterizam as diferentes classes, como PhaE e PhaR. Quinhentas sequências de proteínas depositadas no NCBI, anotadas como PhaC, PHB sintase ou PHA sintase, foram utilizadas como sequências de entrada. Esses dados de entrada foram escolhidos de modo a englobar as diferentes classes conhecidas destas proteínas, assim como as sequências consenso dos domínios conservados relacionados presentes no NCBI.

Importante ressaltar que a subunidade PhaC de espécies de classe IV é classificada, no NCBI, como subunidade PhaC de classe III e o que é determinante para a classificação é a presença da outra subunidade, PhaE para classe III e PhaR para classe IV. Logo, cem sequências anotadas no NCBI como PhaE e cem

anotadas como PhaR também foram utilizadas como dados de entrada no BLASTP, de modo a ser possível diferenciar essas duas classes.

As enzimas precursoras da PhaC no metabolismo também foram pesquisadas, ou seja, aquelas capazes de gerar monômeros: PhaB, FabG, PhaJ e PhaG. Essa abordagem permitiu uma análise comparativa, identificando genes e proteínas candidatas com base na similaridade genética.

A ferramenta Operon-mapper (Taboada et al., 2018), cuja função é identificar possíveis *operons*, importantes em vias metabólicas, foi empregada em todos os genomas de referência e de *B. casei*, com o objetivo de confirmar a ausência ou presença das enzimas, assim como ter ideia da posição e vizinhança dos genes encontrados.

3.2.3 Identificação molecular de isolados de *Brevibacterium* sp. que possuem enzimas semelhantes a PhaC

A ferramenta BLASTN, com as sequências do rRNA 16S dos isolados, foi aplicada para investigar a identidade molecular dos que não apresentavam identificação a nível de espécie, comparando com o banco de dados “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)” disponível no NCBI.

3.2.4 Análise das enzimas identificadas como PhaCs putativas

As proteínas que demonstraram similaridade com qualquer sequência de PhaC foram analisadas por meio da ferramenta InterPro (Paysan-Lafosse, 2023), que desempenha um papel fundamental na identificação de domínios funcionais e na obtenção de informações detalhadas nas proteínas.

3.2.5 Alinhamento de proteínas

As PhaC putativas identificadas foram alinhadas com proteínas representativas de cada classe de PhaC no software MEGA11, utilizando o algoritmo Muscle. As seguintes proteínas foram utilizadas, identificadas pelo código de referência do NCBI: WP_011615085.1, PhaC classe I, de *Cupriavidus necator*; WP_003161244.1, PhaC classe II, do gênero *Pseudomonas*; WP_.1, ABK60193.1 PhaC classe III, de *Allochromatium vinosum*; WP_000206336 PhaC classe IV, do gênero *Bacillus*.

3.2.6 Visualização dos genomas

A análise visual dos genomas foi conduzida por meio do SEED Viewer, integrado ao RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Overbeek et al., 2014), proporcionando uma visualização detalhada e compreensão visual dos genomas que foram submetidos à análise, contextualizando a informação.

3.2.7 Predição da via metabólica

A ferramenta GeneMarkS-2 (Lomsadze et al., 2018) foi empregada, visando a predição de genes e das possíveis vias de biossíntese de PHAs nos organismos selecionados. Os dados gerados foram utilizados para a anotação e análise funcional dos genes no BLASTKoala (Kanehisa et al., 2016), ferramenta associada a plataforma KEGG, que atribui funções aos genes por meio da similaridade com bancos de dados funcionais. Utilizou-se o banco de dados de procariotos para a reconstrução do metabolismo das bactérias analisadas. Com base nas funções de enzimas semelhantes já descritas, o BLASTKoala é capaz de preencher as lacunas das vias metabólicas presentes no banco de dados do KEGG.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Identificação de PhaCs putativas

Os resultados do BLASTP das espécies de *Brevibacterium* não identificaram similaridade com nenhuma das entradas de PhaC de classe I e II, no entanto houveram correspondências com enzimas PhaC da classe III de diversas espécies produtoras de PHA utilizadas como entrada. As espécies de *Brevibacterium* que apresentaram proteínas com essa característica foram: *B. antiquum*, *B. aurantiacum*, *B. daeguense*, *B. linens*, *B. marinum*, *B. mcbrelineri*, *B. sandarakinum*, *B. yomogidense* e *B. zhoupengii*, além das linhagens de *Brevibacterium* sp. (239c, CFH 10365, FME37, PAMC21349, PAMC23299, RIT 803, S111, UCMA 11752, UMB10442, UMB1308A e ZH18). Em todos os resultados, exceto quatro (*B. daeguense*, *B. yomogidense*, *Brevibacterium* sp. PAMC21349 e *Brevibacterium* sp. PAMC23299), o *e-value* se encontrou em magnitudes acima de 10^{-6} . Uma análise com o InterPro foi realizada para investigar mais a fundo a identidade das enzimas e apenas os quatro isolados mencionados de fato apresentavam domínios referente a poli(3-hidroxoalcanoato) polimerase subunidade PhaC.

Ao se analisar os dados de saída do Operon-mapper referentes aos isolados de *Brevibacterium* sp. PAMC21349 e *Brevibacterium* sp. PAMC23299, observou-se padrões diferentes nos *operons* em comparação com as duas outras espécies selecionadas. Algo bastante explícito no fato que *B. daeguense* e *B. yomogidense* possuem duas unidades de PhaCs putativas, enquanto que os isolados possuem apenas uma; a vizinhança gênica dessa PhaC putativa encontrada também demonstrou diferentes padrões, o que levantou a dúvida se essa diferença seria uma variação proveniente de diversidade genética dentro do gênero e com quais espécies os isolados estavam mais relacionados. Então, foi realizada a identificação molecular, baseado na região rRNA 16S; ambos os isolados obtiveram uma maior identidade com a espécie *Peribacillus frigoritolerans*, com *e-value* 0 e similaridade de 99%. Portanto, foram desconsiderados das análises posteriores.

As PhaC putativas identificadas em *B. daeguense* e *B. yomogidense* possuem *phaC-box* com uma cisteína central, parte da tríade catalítica C-H-D que caracteriza esse tipo de enzima e sua atividade (Figura 4) (Nambu et al., 2020). Em cada espécie, a PhaC putativa 1 possui a sequência “GWCIGA”, enquanto que na PhaC putativa 2 é “GDCQGG”. As posições dos resíduos que fazem parte da tríade catalítica foram identificadas com base na PhaC de *C. necator*, como descrito por Wittenborn et al., 2016.

WP 011615085.1 <i>C. necator</i> Classe I	WDDYIEHAAIRAI EVARDISGQDKINVL	GF	C	V	G	G	T	I	V	S	T	A	L	A	V	L	A	A	R	G	E	H
WP 003161244.1 <i>Pseudomonas</i> Classe II	LTTYIE-ALKEAIEVVLSITGSKDLNLL	GA	C	S	G	G	I	T	T	A	T	L	V	G	H	Y	V	A	S	G	E	K
ABK60193.1 <i>A. vinosum</i> Classe III	LDDYINGYIDRCVDHIRETHDIDHVNI	LG	I	C	Q	G	G	A	F	S	L	M	Y	T	S	L	H	Q	D	-	-	-
WP 000206336.1 <i>Bacillus</i> Classe IV	FDDFVFDYIAKAVKKVMRTAKSDEISLL	GY	C	M	G	G	T	L	T	S	I	Y	A	A	L	H	P	H	M	-	-	-
WP 236862901.1 <i>B. daeguense</i> 1	LDDYVLEHLPRAIRKVLRTSGAEEITLV	GW	C	I	G	A	L	T	G	M	Y	L	G	V	T	P	D	A	-	-	-	
WP 236862904.1 <i>B. daeguense</i> 2	IDDYMA- - - - ILRETAELLGGK-VNLV	GD	C	Q	G	G	W	T	A	T	I	F	T	A	L	Y	P	E	-	-	-	
WP 198394985.1 <i>B. yomogidense</i> 1	LDDYVMEYIPRAIREVRRASGAREISLI	GW	C	I	G	A	L	T	G	M	Y	L	A	L	N	P	D	A	-	-	-	
WP 232483694.1 <i>B. yomogidense</i> 2	IDDYMV- - - - MLRETTADLLGGR-INLV	GD	C	Q	G	G	W	L	A	T	I	F	T	A	L	H	P	E	-	-	-	
WP 011615085.1 <i>C. necator</i> Classe I	PAASVTLLTTLTLDFA- - - - DTGILDVVFVDEGHVQLREATLGGGAGAPCA																					
WP 003161244.1 <i>Pseudomonas</i> Classe II	KVNAFTQLVSVLDFE- - - - LNTQVALFADEKTLAAKRRS-YQSG- - - -																					
ABK60193.1 <i>A. vinosum</i> Classe III	KVNNLVMTVPVDFQTPDNLLSAWV- - - - QDVDVDLAVDTM- - - - G- - - -																					
WP 000206336.1 <i>Bacillus</i> Classe IV	PIRNLI FMTSPFDFS- ETGLYGPLLDE- - - KYFNLDKAVDTF- - - - G- - - -																					
WP 236862901.1 <i>B. daeguense</i> 1	PVRNWVPLTMPFDFS- NTTYQTLLDN- - - DEMDVWLAKQRT- - - - G- - - -																					
WP 236862904.1 <i>B. daeguense</i> 2	RVNTLAIAGAPI DFHAGEPLIRDWVDAIAPGGDMTIYRSVVEANN- - - -																					
WP 198394985.1 <i>B. yomogidense</i> 1	PVRNWVPLTMPYDVT- - - GSTYETLLNT- - - EALDLDWLEDRA- - - - S- - - -																					
WP 232483694.1 <i>B. yomogidense</i> 2	LVTSLTIAGAPVDFSAGDGLMKDWDVLAPAEADMTYFRSAVAANDG- - - -																					
WP 011615085.1 <i>C. necator</i> Classe I	LRLGLELANTF SFLRP- NDLVWNYVVD- - - NYLKGNTPVPFDDL F- - - WNGD																					
WP 003161244.1 <i>Pseudomonas</i> Classe II	VLE GKDMAKVF AWMRP- NDLI WNYWVN- - - NYLLGNQPPAFDILY- - - WNND																					
ABK60193.1 <i>A. vinosum</i> Classe III	NIPGELLNWTFLSLKPF S- LTGQKYI NMVDLLDDPRKVKNF L RMEKWI F D																					
WP 000206336.1 <i>Bacillus</i> Classe IV	NIPPEMI DFGNKMLKPI TNFVGPIYVAL- VDRSENERFVESWRLVQKWWGD																					
WP 236862901.1 <i>B. daeguense</i> 1	YLP GAHVDTVNKLLKQVPVNFVGTPLRLRFREVDQGTADKIA YQSMKSWVAD																					
WP 236862904.1 <i>B. daeguense</i> 2	VLPGRFLLLDGFKALQPDQEF SRSIQLL- - - ANLHDAEHVVERYQFEDWFWQW																					
WP 198394985.1 <i>B. yomogidense</i> 1	YLP GVVYDVTVNKMLKQVPNFLGTPWRLYTSVEDGTA DKTAYQSMKSWVAD																					
WP 232483694.1 <i>B. yomogidense</i> 2	L L P G R F L L D G F K A L Q P F N E L T Q S L G L L - - - A N L H D P Q H V E R Y R K F E D W F Q W																					
WP 011615085.1 <i>C. necator</i> Classe I	ATNLPGPWYCWYLRHTY LQNELKVP GKLTVC GVPV	D	L	A	S	I	D	V	P	T	Y	I	Y	G	S	R						
WP 003161244.1 <i>Pseudomonas</i> Classe II	TTRLPAALHGEFVEL- FKS NPLNRP GALEVSGTPI	D	L	K	Q	V	T	C	D	F	Y	C	V	A	G	L						
ABK60193.1 <i>A. vinosum</i> Classe III	SPDQAGETFRQFI KDFYQRNGF- I NGGVRI GEDEI	D	L	G	R	I	S	C	P	V	L	N	I	Y	A	L						
WP 000206336.1 <i>Bacillus</i> Classe IV	GIPFPGESYRQWI RDFYQNNKL- VKGELVIRGQKV	D	L	A	N	I	K	A	N	V	L	N	I	S	G	K						
WP 236862901.1 <i>B. daeguense</i> 1	NP N F P M R A F R Q W V T W I Y Q E N R L - A T G R L R L R G H R V	D	L	S	S	I	Q	S	T	L	V	V	T	A	S							
WP 236862904.1 <i>B. daeguense</i> 2	TQALPGVFYLVVVEHLFI RNSL- I KGELVVEGRI V	D	L	A	A	I	E	C	P	L	F	L	M	A	G	Q						
WP 198394985.1 <i>B. yomogidense</i> 1	NP N F P M R A F R Q W V T W M Y R E N R L - A R G R M R L R G R K V	D	L	A	K	I	Q	S	I	L	V	V	T	A	S							
WP 232483694.1 <i>B. yomogidense</i> 2	TQPLPGAFYLVIVENLFVRNLL- VNGELEVEGRTV	D	L	S	Q	I	S	C	P	L	F	L	L	A	G	K						
WP 011615085.1 <i>C. necator</i> Classe I	EDHI V P W T A A Y A S T A L L A N K - - - L R F V L G A S G H I A G V I N P P A K N K R S H W -																					
WP 003161244.1 <i>Pseudomonas</i> Classe II	NDHI T P W E S C Y K S A R L L G G K - - - C E F I L S N S G H I Q S I L N P P G N P K A R F M -																					
ABK60193.1 <i>A. vinosum</i> Classe III	QDHLVPPDASRALKGLVGS E D - - Y T E L A F P G G H I G I Y V S - - G K A Q K E V T -																					
WP 000206336.1 <i>Bacillus</i> Classe IV	RDHI A L P C Q V E A L L D H I S T D - - K Q Y V C L P T G H M S I V Y G - - G T A V K Q T Y -																					
WP 236862901.1 <i>B. daeguense</i> 1	NDHI A P R D G T V P L F D V L T T Q D - - L E H L D G V G G H I G L M A G - - S R A R R D I W -																					
WP 236862904.1 <i>B. daeguense</i> 2	TDHI T P A D Q V W A L A D Y A S T P A S M I G R Q S S T G G H L G L F M G - - H E S L R N H W Q																					
WP 198394985.1 <i>B. yomogidense</i> 1	KDHI A P R D G T L P V F D V L T S P D - - T E H L D G V G G H I G L M A G - - S R A R G T I W -																					
WP 232483694.1 <i>B. yomogidense</i> 2	TDHI T P A D Q V W A L A D H V T T P A D Q I E R Q L A E S G H L G L F M S - - H S A L S A H W -																					

Figura 4. Parte do alinhamento múltiplo das PhaC putativas de *B. daeguense* e *B. epidermidis* com PhaCs de todas as classes já descritas na literatura. Em evidência, dentro da caixa tem-se a *PhaC-box*, com o resíduo de cisteína marcado em amarelo. Os resíduos de ácido aspártico (verde) e histidina (azul) também foram marcados e completam a tríade catalítica.

Anotações realizadas com os 32 genomas de referência de *Brevibacterium* foram realizados, mas, dentre as proteínas identificadas, apenas aquelas que já haviam sido selecionadas demonstraram semelhança com a PhaC; dessa forma, não acrescentaram nenhum resultado. Os genomas de *B. casei* também não apresentaram PhaCs putativas. Diante do exposto, a habilidade de produzir PHA não é algo comum no gênero *Brevibacterium*, nem mesmo na espécie com registros de produção na literatura. O que indica que essa seja uma característica específica de algumas linhagens, nenhuma das quais com genoma disponível publicamente.

3.3.2 Cluster gênico e classe de PhaC

Os clusters gênicos de *B. daeguense* e *B. yomogidense*, no qual os genes que sintetizam as PhaCs putativas estão inseridos, são semelhantes. Em ambas as espécies, a mesma sequência de genes é observada: proteína hipotética, PHA

sintase (phaC), 3-oxoacil-ACP redutase (fabG), PHA sintase (phaC) e um regulador transcrricional, mesmo com variação no tamanho dos genes (Figura 6).

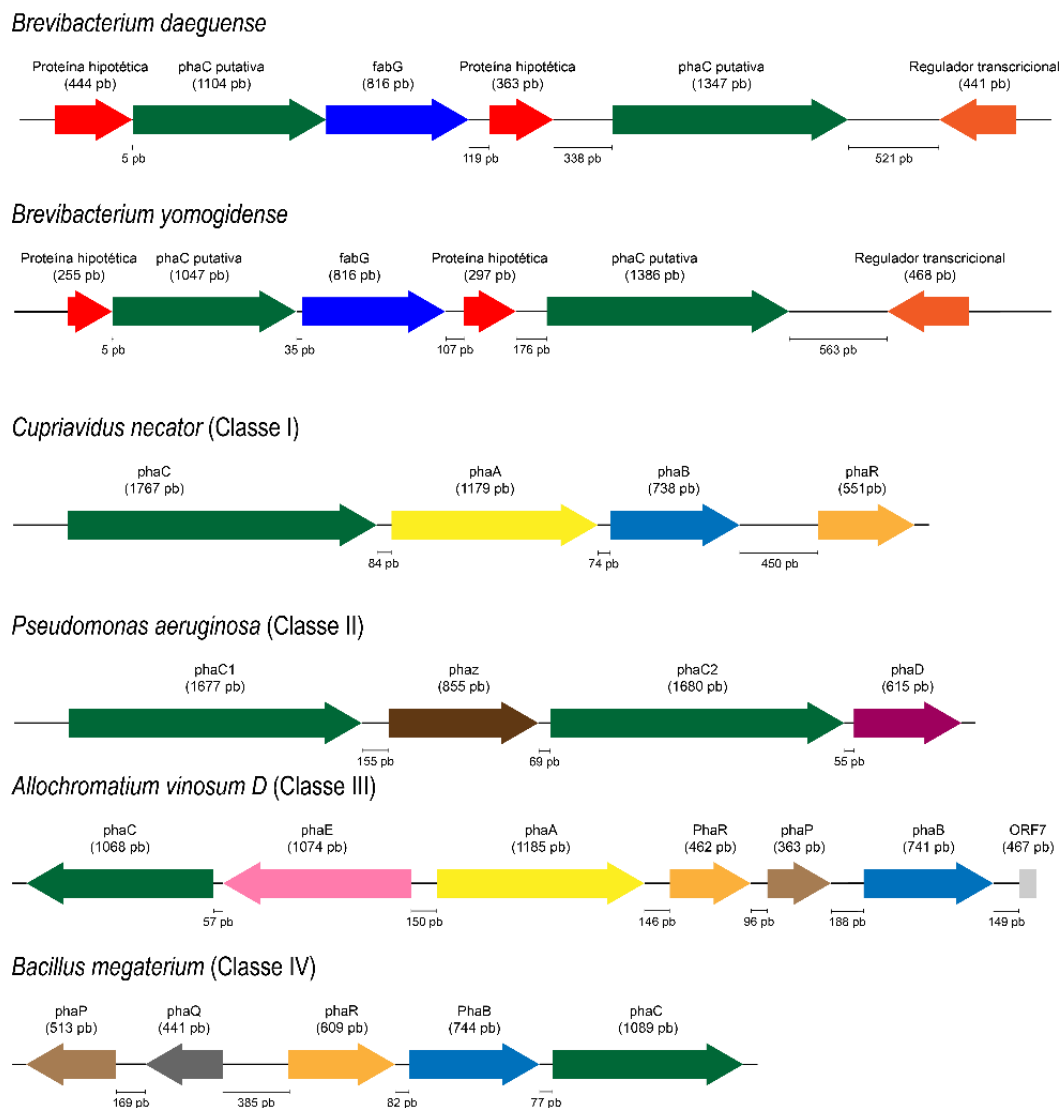


Figura 5. Comparação do cluster gênico do qual PhaC faz parte em *B. daeguense* e *B. yomogidense*, com representantes de todas as classes. Adaptado de Maehara et al., 2001 e Rehm et al., 2003.

Nas duas bactérias, *B. daeguense* e *B. yomogidense*, as proteínas PhaC putativas demonstraram similaridade com PhaC de classe III no BLASTP. Como a subunidade PhaC de espécies de classe IV e de classe III são similares, a presença de PhaE ou PhaR seria determinante para a diferenciação entre elas. No entanto, não foram identificadas enzimas semelhantes a PhaE, que forma o heterodímero que caracteriza a classe III e a PhaR, que caracteriza a classe IV, também não foi encontrada. A presença de duas unidades de PhaC classe III no mesmo cluster gênico não é encontrada em outros organismos com biossíntese comprovada.

Quanto as enzimas capazes de gerar monômeros para utilização da PhaC, a FabG foi encontrada no cluster descrito anteriormente, enquanto homólogos de PhaJ estão presentes em outras regiões do genoma. Baseado nos dados gerados, a PhaC encontrada nas espécies *B. daeguense* e *B. yomogidense* não se enquadra em nenhuma das classes descritas.

Estudos experimentais, como a verificação de ocorrência da produção de PHA e ensaio espectrométrico para determinar a atividade PHA sintases, são necessários para comprovar a função prevista de PHA-polimerase da PhaC identificada no estudo. Se confirmada a função de biossíntese, é possível a sugestão de uma subclasse derivada da PhaC de classe III.

As sequências de nucleotídeos dos clusters gênicos de *B. daeguense* e *B. yomogidense*, ao serem comparados com o banco de dados de nucleotídeos (nr/nt) do NCBI, não possuíram similaridade com nenhuma outra espécie dentro de *Brevibacterium*, mas demonstraram resultados com espécies de outros gêneros bacterianos, dentre eles: *Ornithinimicrobium avium*, *Nakamurella multipartitae* e *Nocardioides aquaticus*, *Rhodococcus* sp., *Austwickia* sp. e *Citricoccus* sp.

Quanto às proteínas sintetizadas pelo cluster, a semelhança de todas elas se dá principalmente com bactérias dos gêneros *Citricoccus*, *Micrococcus*, *Ornithinimicrobium* e *Cellulosimicrobium*. Novamente, dentro do gênero *Brevibacterium* a única semelhança encontrada é entre *B. daeguense* e *B. yomogidense*. O primeiro resultado do BLASTP de cada uma das proteínas pode ser observado na Tabela 2.

Citrococcus e *Ornithinimicrobium* não possuem menção de produção de PHA registradas na literatura. Jabeen et al. (2022), Shraddha et al. (2012), Mohanrasu et al. (2021) relataram a produção de PHA em *Micrococcus*, entretanto não há informação genética e molecular substancial sobre como a biossíntese ocorre. Enquanto Javaid et al. (2019) verificaram a produção de PHA na espécie *Cellulosimicrobium* sp. A8, onde obtiveram produção máxima de 1.43 g/L de biomassa em óleo de mostarda (1%); sendo esse o único registro encontrado.

Tabela 2. Primeiro resultado do BLASTP das proteínas presentes no cluster identificado

Proteína	Organismo	Primeiro resultado do BLASTP	Cobertura	e-value	Identidade	Accension
Proteína hipotética	<i>B. daeguense</i>	<i>Citricoccus</i> sp.	77%	4e-51	74,56%	WP_137774393.1
	<i>B. yomogidense</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	80%	5e-23	73,44%	MDI3332010.1
PhaC	<i>B. daeguense</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	95%	0	80,29%	MBB5749288.1
	<i>B. yomogidense</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	98%	0	77,94%	MDI3332011.1
FadG	<i>B. daeguense</i>	<i>Citricoccus</i> sp.	99%	5e-170	84,87%	WP_137774392.1
	<i>B. yomogidense</i>	<i>Ornithinimicrobium flavum</i>	99%	2e-163	81,18%	WP_134772710.1
Proteína hipotética	<i>B. daeguense</i>	<i>Citricoccus</i> sp.	85%	5e-42	66,99%	WP_137774391.1
	<i>B. yomogidense</i>	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	98%	1e-38	79,59%	NUL48360.1
PhaC	<i>B. daeguense</i>	<i>Citricoccus</i> sp.	82%	0	71,26%	WP_137774390.1
	<i>B. yomogidense</i>	<i>Ornithinimicrobium flavum</i>	84%	0	63,17%	WP_238695352.1
Regulador transcricional	<i>B. daeguense</i>	<i>Citricoccus</i> sp.	75%	1e-51	80,18%	WP_137774389.1
	<i>B. yomogidense</i>	<i>Citricoccus</i> sp.	96%	1e-45	56,95%	WP_137774389.1

Por conta da alta similaridade do cluster com organismos fora do gênero, mas não com espécies próximas evolutivamente, levantou-se a hipótese de transferência horizontal de genes. Essa ideia foi substantiada por estudos apresentados por Lercher e Pál (2008) e Dilthey e Lercher (2015), nos quais a identificação de clusters gênicos com essa característica é o primeiro passo para a investigação de transferência horizontal de genes.

De acordo com Forquin-Gomez et al. (2014), as espécies *B. yomogidense* e *B. daeguense* são próximas filogeneticamente. Dessa forma, é possível que a aquisição desse cluster tenha ocorrido a partir de um ancestral comum de ambas as espécies e depois se perdido em outras linhagens próximas, como *B. album*.

3.3.3 Predição da via metabólica de biossíntese de polihidroxialcanoatos por *Brevibacterium daeguense* e *Brevibacterium yomogidense*

O BLASTKoala foi capaz de anotar e predizer a função de 1521 de 3172 genes (48%) de *B. daeguense* identificados pelo GeneMarkS-2. Para *B. yomogidense*, a anotação funcional se deu com 1566 genes (49,2% do total de 3182 identificados). De acordo com os resultados gerados, foi possível visualizar possíveis vias para a produção de PHA, incluindo a PhaC putativa em ambas as espécies.

Caso *B. daeguense* e *B. yomogidense* sejam capazes de produzir PHA, a via de β -oxidação de ácidos graxos foi classificada como a mais provável de participar dessa biossíntese, visto que ambas espécies possuem todas as enzimas necessárias para o seu pleno funcionamento: 3-cetoacil-CoA tiolase (FadA), 3HA-CoA desidrogenase (FadB), acil-CoA sintetase (FadD), acil-CoA desidrogenase (FadE), β -cetoacil-ACP redutase (FabG) e enoil-CoA-hidratase (R)-específica (PhaJ). Sendo FabG e PhaJ as que possibilitam a formação de monômeros de (R)-3-hidroxiacil-CoA, que podem ser utilizados pela PhaC para a polimerização. Nota-se que ambas FabG e PhaJ estão mais relacionadas a produção de monômeros de cadeia média em organismos que pertencem à classe II (Vo et al., 2023). Entretanto, Quillaguamán et al. (2010), demonstrou a utilização de mcl-PHAs na classe III da PhaC. Além disso, existem PhaJ e FabG com especificidades diferentes, podendo gerar também monômeros de cadeia curta (Nomura et al., 2005; Araceli et al., 2022), o que justificaria a produção de monômeros de cadeia curta nos isolados de *Brevibacterium*.

Apesar das enzimas PhaC classe III, com as quais similaridade foi encontrada com as PhaC putativas de *B. daeguense* e *B. yomogidense*, terem maior especificidade com monômeros de cadeia curta para formar principalmente scl-PHA (Jia et al., 2016), já foi relatada a produção por essa classe utilizando monômeros de cadeia média (Quillaguamán et al., 2010). Logo, é possível que ocorra a incorporação de monômeros de cadeia curta ou média, o que deve ser investigado com a caracterização do PHA produzido.

Para a via do metabolismo do carbono, homólogos de β -cetotiolase (PhaA) foram observados, porém não identificada a presença de acetatoacetil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB) no genoma. Essa enzima é estruturalmente semelhante à FabG e possuem funções similares, desta forma, a depender de sua

especificidade, pode ser capaz de substituir a PhaB, como observado em Zhang et al. (2017).

A via de biossíntese de ácidos graxos, está parcialmente completa com 3HA-ACP desidratase (FabA), β -cetoacil-ACP sintase I (FabB), β -cetoacil-ACP sintase III (FabH), enoil-ACP redutase (FabI), malonil-CoA:ACP-transacilase (FabD), com exceção da 3HA-ACP:CoA transacilase (PhaG), essencial para a formação do monômero de PHA por esta via, portanto é improvável que ela seja utilizada para produção de PHA. As vias propostas para *B. daeguense* e *B. yomogidense* se encontram na Figura 6.

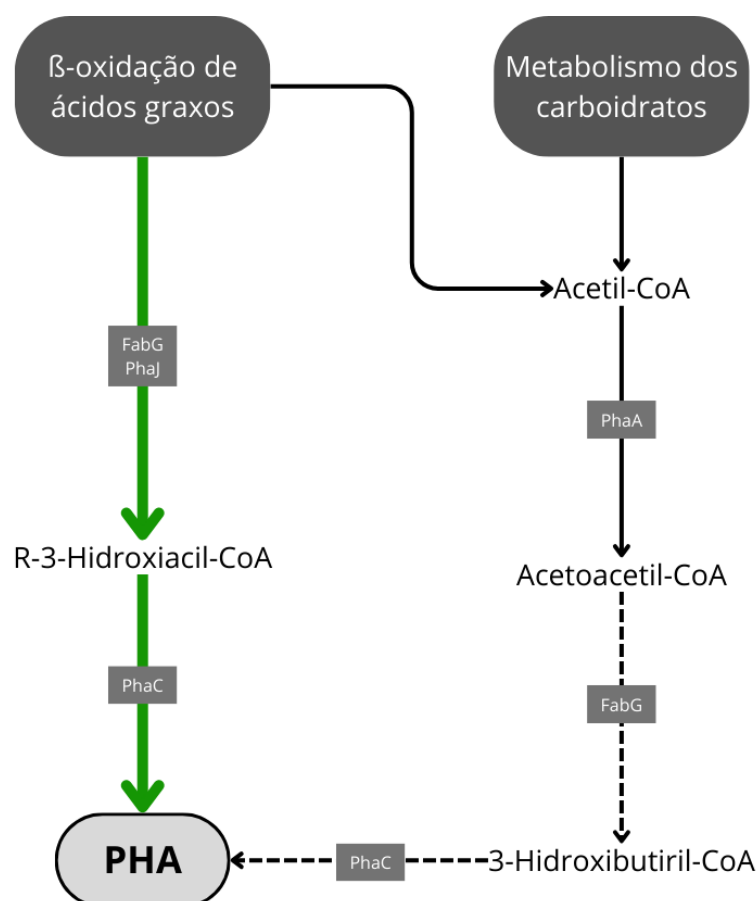


Figura 6. Possíveis rotas de biossíntese do PHA em *B. daeguense* e *B. yomogidense*. O caminho em verde representa a via mais provável para a biossíntese, a partir da β -oxidação de ácidos graxos. O caminho pontilhado representa a hipótese de que a especificidade de alguma FabG presente em *B. daeguense* e *B. yomogidense* seja semelhante à da enzima PhaB.

3.4 Conclusão

Esse estudo identificou genes codificantes de PhaCs putativas em duas espécies do gênero *Brevibacterium*: *Brevibacterium daeguense* e *Brevibacterium*

yomogidense. A presença dessas enzimas, necessária para a biossíntese do PHA, não é algo amplamente encontrado no gênero *Brevibacterium*, surgindo apenas em algumas linhagens. Foram observadas duas unidades de genes referentes a PhaCs putativas em cada uma dessas espécies, e as proteínas geradas por eles tiveram maior identidade com a Classe III de acordo com o BLASTP. No entanto, essas espécies não possuem em seus genomas genes relacionados a proteínas necessárias para formar dímeros com essa subunidade, PhaE ou PhaR, que caracterizam as classes III e IV, respectivamente. Logo, não foram observadas características específicas de nenhuma das classes descritas e, se de fato ocorrer a produção de PHA nessas espécies, foi sugerida uma subclasse relacionada com a classe III que necessita ser caracterizada a partir de estudos experimentais. O cluster gênico no qual as PhaCs putativas estão inseridas também possui características incomuns se comparado ao de organismos produtores das diversas classes. Além disso, o cluster é incomum dentro de *Brevibacterium* e é comparável com espécies de outros gêneros, levando a sugestão de uma transferência horizontal de genes. A via metabólica mais provável de ser utilizada, caso a biossíntese de PHA ocorra nessas espécies, é a β -oxidação de ácidos graxos, já que todas as enzimas necessárias para seu pleno funcionamento foram encontradas, mas é possível que a do metabolismo do carbono também seja utilizada a depender da especificidade de substrato das enzimas formadoras de monômero.

3.5. Referências

- Alves, A.A., Siqueira, E.C., Barros, M.P.S., Silva, P.E.C. and Houllou, L.M., 2023. Polyhydroxyalkanoates: a review of microbial production and technology application. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(3), pp.3409-3420.
- Araceli, F.S., Berenice, V.P. and Fermin, P.G., 2022. High amounts of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates subunits can be accumulated in recombinant *Cupriavidus necator* with wild-type synthase. *Journal of Biotechnology*, 349, pp.25-31.

- Barnes, D.K., Galgani, F., Thompson, R.C. and Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 364(1526), pp.1985-1998.
- Bedade, D.K., Edson, C.B. and Gross, R.A., 2021. Emergent approaches to efficient and sustainable polyhydroxyalkanoate production. *Molecules*, 26(11), p.3463.
- Chek, M.F., Hiroe, A., Hakoshima, T., Sudesh, K. and Taguchi, S., 2019. PHA synthase (PhaC): interpreting the functions of bioplastic-producing enzyme from a structural perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, pp.1131-1141.
- Chen, G.Q., 2010. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. *Plastics from bacteria: natural functions and applications*, pp.17-37.
- Cumsille, A., Serna-Cardona, N., González, V., Claverías, F., Undabarrena, A., Molina, V., Salvà-Serra, F., Moore, E.R. and Cámara, B., 2023. Exploring the biosynthetic gene clusters in *Brevibacterium*: a comparative genomic analysis of diversity and distribution. *BMC genomics*, 24(1), p.622.
- Dilthey, A. and Lercher, M.J., 2015. Horizontally transferred genes cluster spatially and metabolically. *Biology direct*, 10(1), pp.1-8.
- Endah, E.S., Abdullah, A.H.D. and Saraswaty, V., 2021. The effect of inoculum and glucose addition on polyhydroxyalkanoate production by *Brevibacterium* sp. B45. *Menara Perkebunan*, 89(1).
- Forquin-Gomez, M.P., Weimer, B.C., Sorieul, L., Kalinowski, J. and Vallaey, T., 2014. The family Brevibacteriaceae. *Prokaryotes Actinobacteria*. 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer, pp.141-53.
- Jabeen, A., Batool, R. and Jamil, N., 2022. *Micrococcus yunnanensis* and *Psychrobacter* sp. as potential producers of polymers from hot spring. *Industria: Jurnal Teknologi dan Manajemen Agroindustri*, 11(1), pp.1-9.
- Javaid, N., Batool, R. and Jamil, N., 2019. Blend of polyhydroxyalkanoates synthesized by lipase positive bacteria from plant oils. *Journal of Renewable Materials*, 7(5), p.463.
- Jendrossek, D., 2009. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of bacteriology*, 191(10), pp.3195-3202.

- Jia, K., Cao, R., Hua, D.H. and Li, P., 2016. Study of class I and class III polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases with substrates containing a modified side chain. *Biomacromolecules*, 17(4), pp.1477-1485.
- Kanehisa, M., Sato, Y. and Morishima, K., 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Journal of molecular biology*, 428(4), pp.726-731.
- Khatami, K., Perez-Zabaleta, M., Owusu-Agyeman, I. and Cetecioglu, Z., 2021. Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production?. *Waste Management*, 119, pp.374-388.
- Kiran, G.S., Lipton, A.N., Priyadharshini, S., Anitha, K., Suárez, L.E.C., Arasu, M.V., Choi, K.C., Selvin, J. and Al-Dhabi, N.A., 2014. Antiadhesive activity of poly-hydroxy butyrate biopolymer from a marine *Brevibacterium casei* MSI04 against shrimp pathogenic vibrios. *Microbial cell factories*, 13(1), pp.1-12.
- Kumar, M., Rathour, R., Singh, R., Sun, Y., Pandey, A., Gnansounou, E., Lin, K.Y.A., Tsang, D.C. and Thakur, I.S., 2020. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *Journal of Cleaner Production*, 263, p.121500.
- Lee, S.D., 2008. *Brevibacterium marinum* sp. nov., isolated from seawater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(2), pp.500-504.
- Lercher, M.J. and Pál, C., 2008. Integration of horizontally transferred genes into regulatory interaction networks takes many million years. *Molecular biology and evolution*, 25(3), pp.559-567.
- Li, L.L., McCorkle, S.R., Monchy, S., Taghavi, S. and van der Lelie, D., 2009. Bioprospecting metagenomes: glycosyl hydrolases for converting biomass. *Biotechnology for biofuels*, 2, pp.1-11.
- Lomsadze, A., Gemayel, K., Tang, S. and Borodovsky, M., 2018. Modeling leaderless transcription and atypical genes results in more accurate gene prediction in prokaryotes. *Genome research*, 28(7), pp.1079-1089.
- Maehara, A., Yamane, T., Taguchi, S. and Doi, Y., 2001. Molecular characterization of a regulatory protein (PhaR) involved in PHA biosynthesis. *RIKEN REVIEW*, pp.77-80.
- Mohanrasu, K., Rao, R.G.R., Dinesh, G.H., Zhang, K., Sudhakar, M., Pugazhendhi, A., Jeyakanthan, J., Ponnuchamy, K., Govarthanan, M. and Arun, A., 2021. Production and characterization of biodegradable polyhydroxybutyrate by

Micrococcus luteus isolated from marine environment. International Journal of Biological Macromolecules, 186, pp.125-134.

Muhammadi, Shabina, Afzal, M. and Hameed, S., 2015. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. Green Chemistry Letters and Reviews, 8(3-4), pp.56-77.

Nambu, Y., Ishii-Hyakutake, M., Harada, K., Mizuno, S. and Tsuge, T., 2020. Expanded amino acid sequence of the PhaC box in the active center of polyhydroxyalkanoate synthases. FEBS letters, 594(4), pp.710-716.

Neoh, S.Z., Chek, M.F., Tan, H.T., Linares-Pastén, J.A., Nandakumar, A., Hakoshima, T. and Sudesh, K., 2022. Polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC): The key enzyme for biopolyester synthesis. Current Research in Biotechnology, 4, pp.87-101.

Nomura, C.T., Taguchi, K., Gan, Z., Kuwabara, K., Tanaka, T., Takase, K. and Doi, Y., 2005. Expression of 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) genes enhances production of polyhydroxyalkanoate copolymer from glucose in recombinant *Escherichia coli* JM109. Applied and environmental microbiology, 71(8), pp.4297-4306.

Oberhardt, M.A., Palsson, B.Ø. and Papin, J.A., 2009. Applications of genome-scale metabolic reconstructions. Molecular systems biology, 5(1), p.320.

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M. and Vonstein, V., 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic acids research, 42(D1), pp.D206-D214.

Pandian, S.R.K., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Muniyandi, J., Rameshkumar, N. and Gurunathan, S., 2009. Synthesis of PHB nanoparticles from optimized medium utilizing dairy industrial waste using *Brevibacterium casei* SRKP2: a green chemistry approach. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 74(1), pp.266-273.

Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B.L., Salazar, G.A., Bileschi, M.L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L. and Gough, J., 2023. InterPro in 2022. Nucleic acids research, 51(D1), pp.D418-D427.

- Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D. and Hatti-Kaul, R., 2010. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, pp.1687-1696.
- Rehm, B.H., 2003. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376(1), pp.15-33.
- Rosenboom, J.G., Langer, R. and Traverso, G., 2022. Bioplastics for a circular economy. *Nature Reviews Materials*, 7(2), pp.117-137.
- Saratale, R.G., Cho, S.K., Saratale, G.D., Kadam, A.A., Ghodake, G.S., Kumar, M., Bharagava, R.N., Kumar, G., Kim, D.S., Mulla, S.I. and Shin, H.S., 2021. A comprehensive overview and recent advances on polyhydroxyalkanoates (PHA) production using various organic waste streams. *Bioresource technology*, 325, p.124685.
- Shraddha, G., Yogita, R., Simanta, S., Aparna, S. and Kamlesh, S., 2012. SCREENING OF POLYHYDROXYALKANOATES (PHAS) PRODUCING BACTERIA FROM RHIZOSPHERIC SOILS OF CHHATTISGARH. *Advances in Pharmacology and Toxicology*, 13(3), p.51.
- Singh, A.K., Sharma, L., Srivastava, J.K., Mallick, N. and Ansari, M.I., 2018. Microbially originated polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymers: an insight into the molecular mechanism and biogenesis of PHA granules. *Sustainable biotechnology-enzymatic resources of renewable energy*, pp.355-398.
- Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R. and Merino, E., 2018. Operon-mapper: a web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinformatics*, 34(23), pp.4118-4120.
- Tsuge, T., Hyakutake, M. and Mizuno, K., 2015. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, pp.6231-6240.
- Vecten, M., Gouriet, F., Cano, A. and Raoult, D., 2017. *Brevibacterium massiliense* bacteremia. *IDCases*, 7, pp.25-26.
- Vicente, D., Proença, D.N. and Morais, P.V., 2023. The Role of Bacterial Polyhydroalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(4), p.2959.
- Vo, M.T., Lee, K.W., Jung, Y.M. and Lee, Y.H., 2008. Comparative effect of overexpressed *phaJ* and *fabG* genes supplementing (R)-3-hydroxyalkanoate

monomer units on biosynthesis of mcl-polyhydroxyalkanoate in *Pseudomonas putida* KCTC1639. *Journal of bioscience and bioengineering*, 106(1), pp.95-98.

Wittenborn, E.C., Jost, M., Wei, Y., Stubbe, J. and Drennan, C.L., 2016. Structure of the catalytic domain of the class I polyhydroxybutyrate synthase from *Cupriavidus necator*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(48), pp.25264-25277.

Xu, C., Liu, L., Zhang, Z., Jin, D., Qiu, J. and Chen, M., 2013. Genome-scale metabolic model in guiding metabolic engineering of microbial improvement. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, pp.519-539.

Zhang, H., Liu, Y., Yao, C., Cao, X., Tian, J. and Xue, S., 2017. FabG can function as PhaB for poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis in photosynthetic cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioengineered*, 8(6), pp.707-715.

Zimmermann, L., Dombrowski, A., Völker, C. and Wagner, M., 2020. Are bioplastics and plant-based materials safer than conventional plastics? In vitro toxicity and chemical composition. *Environment international*, 145, p.106066.

REFERÊNCIAS

- ADELEYE, Aderemi T. et al. Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. **Process biochemistry**, v. 96, p. 174-193, 2020.
- NASER, Ahmed Z.; DEIAB, Ibrahim; DARRAS, Basil M. Poly (lactic acid)(PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. **RSC advances**, v. 11, n. 28, p. 17151-17196, 2021.
- CHEN, Guo-Qiang et al. Polyhydroxyalkanoates (PHA) toward cost competitiveness and functionality. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2020.
- CHEN, Guo-Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. **Chemical society reviews**, v. 38, n. 8, p. 2434-2446, 2009.
- CHEN, Guo-Qiang; WU, Qiong. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6565-6578, 2005.
- CHOI, So Young et al. Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. **Metabolic engineering**, v. 58, p. 47-81, 2020.
- EVODE, Niyitanga et al. Plastic waste and its management strategies for environmental sustainability. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 4, p. 100142, 2021.
- FAVARO, Lorenzo; BASAGLIA, Marina; CASELLA, Sergio. Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 1, p. 208-227, 2019.
- KOLLER, Martin et al. Modern biotechnological polymer synthesis: a review. **Food Technol Biotechnol**, v. 48, n. 3, p. 255-269, 2010.
- LEMOIGNE, M. de l'acide 3-oxybutyrique. **Bull Soc Chim Biol (Paris)**, v. 8, p. 770, 1926.
- MANGAL, Mangal; RAO, Chebrolu Venkateswara; BANERJEE, Tamal. Bioplastic: an eco-friendly alternative to non-biodegradable plastic. **Polymer International**, v. 72, n. 11, p. 984-996, 2023.

MANNINA, Giorgio et al. Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures. **Bioresource technology**, v. 282, p. 361-369, 2019.

MCCOOL, Gabriel J.; CANNON, Maura C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 14, p. 4235-4243, 2001.

OBRUCA, Stanislav et al. Novel unexpected functions of PHA granules. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, p. 4795-4810, 2020.

ONRAEDT, Annelies; SOETAERT, Wim; VANDAMME, Erick. Industrial importance of the genus *Brevibacterium*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 527-533, 2005.

REDDY, V. Uttej Nandan et al. Review of the developments of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs). **Bioengineering**, v. 9, n. 5, p. 225, 2022.

REUSCH, Rosetta N. Poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 191, n. 4, p. 377-381, 1989.

SHARMA, Parveen K. et al. Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate polymers with different monomer compositions by recombinant *Pseudomonas putida* LS46 expressing a novel PHA synthase (PhaC116) enzyme. **Applied sciences**, v. 7, n. 3, p. 242, 2017.

SONG, Hye Min et al. Production of polyhydroxyalkanoates containing monomers conferring amorphous and elastomeric properties from renewable resources: Current status and future perspectives. **Bioresource Technology**, p. 128114, 2022.

TAGUCHI, Kazunori et al. Investigation of metabolic pathways for biopolyester production. **Riken review**, p. 71-74, 2001.

ZHANG, Xu et al. Synthetic biology and genome-editing tools for improving PHA metabolic engineering. **Trends in biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 689-700, 2020.

ZOU, Huibin et al. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 7417-7426, 2017.

ANEXO A – INFORMAÇÕES SOBRE A SUBMISSÃO DO ARTIGO

O artigo será submetido à revista “*Current Research in Biotechnology*” e segue as normas de submissão do periódico. Ela possui fator de impacto de 5,641 e é uma publicação da Elsevier BV, sediada nos Países Baixos. Ela cobre disciplinas centrais de biotecnologia, como engenharia genética e molecular, biotecnologia de plantas e animais, biotecnologia alimentar, biotecnologia energética, biotecnologia ambiental e engenharia de tecidos, células e vias metabólicas.

