



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium beijerinckii* Br21 a partir de glicerol:
expressão gênica das principais enzimas envolvidas e
manipulação genética por transformação”

Jonatã Bortolucci

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para
a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

Ribeirão Preto – SP

2022



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium beijerinckii* Br21 a partir de glicerol:
expressão gênica das principais enzimas envolvidas e
manipulação genética por transformação”

Jonatã Bortolucci

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para
a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.
Orientadora: Profa. Dra. Valeria Reginatto Spiller

Ribeirão Preto – SP

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bortolucci, Jonatã

Produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium beijerinckii* Br21 a partir de glicerol: expressão gênica das principais enzimas envolvidas e manipulação genética por transformação. Ribeirão Preto, 2022.

110 p.: 27 il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Reginatto Spiller

1. RT-qPCR. 2. Glicerol quinase. 3. Glicerol-3-fosfato desidrogenase.
4. 1,3-propanodiol desidrogenase. 6. Eletroporação. 7. Superexpressão.
8. pMTL83251.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Jonatã Bortolucci

Título: Produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium beijerinckii* Br21 a partir de glicerol: expressão gênica das principais enzimas envolvidas e manipulação genética por transformação.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: **Química**.

Aprovado em Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação

aos meus Pais, Roseli Cristina Vicentim Bortolucci e Jair Bortolucci.

AGRADECIMENTOS

Ao longo desses anos de Mestrado, sou grato por muitas coisas!

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Roseli e Jair, que me possibilitaram a oportunidade aos estudos durante toda minha formação. Desde o ensino fundamental, médio e superior, sempre tive total apoio de vocês: emocional, financeiro, enfim, de todas as formas possíveis. Sou eternamente grato!

Em seguida, gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Valeria Reginatto Spiller. Foram anos de atuação em seu laboratório, que se iniciaram ainda durante a minha graduação, como Iniciação Científica. E, durante todos esses anos, sempre tive seu apoio, incentivo e confiança em meu trabalho. Agradeço muito por tudo que você sempre fez por mim! Com certeza nada disso seria possível sem sua orientação!

Também gostaria de agradecer aos demais integrantes do grupo de pesquisa: Bruna, Beatriz, Emelin, Rafael, Ana Clara, João, Lucca, Tiago, Daniel, Pedro, Ana Carolina e Danielli! Todos vocês também foram muito importantes no meu aprendizado, pois sempre nos ajudamos e trabalhamos em equipe. Somos um grupo muito unido e que possui uma sintonia única! O laboratório não seria o mesmo sem vocês. Agradeço a todos de coração!

Agradeço ao Prof. Dr. Peter Dürre, que me possibilitou a estadia em seu laboratório na Universidade de Ulm, Alemanha. Foram 6 meses de muito trabalho e aprendizado! A experiência de fazer Ciência em um laboratório internacional é muito enriquecedora e com certeza vou levá-la para toda a vida. Durante esse estágio de pesquisa internacional, também tive a oportunidade de conhecer pessoas muito queridas, que me ajudaram imensamente ao longo desse enorme choque cultural. Agradeço muito a Fabiana, Wiebke, Lisa, Felix, Mareike, Christian, Anne, Alexander, Maximilian, Franziska, Jana, Tina, Saskia, Teresa e Frank. Espero um dia reencontrá-los! Em especial, agradeço novamente ao Maximilian por realizar a análise por HPLC de minhas amostras de fermentação, após o meu retorno ao Brasil. Também agradeço às técnicas Brigitte, Petra, Iris e Karin, pela organização do laboratório, operação da autoclave e limpeza de vidrarias.

Agradeço ao Prof. Dr. Richard John Ward e integrantes de seu grupo de pesquisa, por disponibilizarem seu laboratório para o desenvolvimento de nossos experimentos. Também agradeço à Profa. Dra. Taisa Magnani Dinamarco e seus alunos de pós-graduação, Paula, Lucas e Débora, por toda a ajuda durante os procedimentos de Biologia Molecular. Agradeço à Profa.

Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade e seus alunos de pós-graduação, Fabiano, Jesimiel e Érica, por disponibilizarem o laboratório para a realização das análises por HPLC.

Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por também disponibilizar seu laboratório para realizar as análises de qPCR. Também agradeço ao técnico Emerson, que também esteve presente auxiliando nas análises.

Agradeço à Profa. Dra. Taísa Magnani Dinamarco e à Profa. Dra. Maria Eugenia Guazzaroni, por participarem da Banca Examinadora durante meu Exame de Qualificação. Suas considerações foram muito importantes para a continuação do meu trabalho!

Agradeço aos técnicos e funcionários do Departamento de Química, por fornecerem a estrutura necessária para o desenvolvimento de minha pesquisa. E também ao Programa de Pós-graduação, pelo suporte oferecido ao longo do Mestrado.

E, finalmente, agradeço às agências de fomento à pesquisa, que possibilitaram a realização desse trabalho: à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo primeiro ano de financiamento (Processo 88887.475299/2020-00); e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por dois anos de financiamento, 6 meses dos quais foram realizados como estágio internacional (Processos 2020/03168-3 e 2021/06757-2). Também agradeço à FAPESP pelo financiamento do laboratório, que possibilitou o trabalho de todos os integrantes de nosso grupo de pesquisa (Processos 2018/12471-1 e 2022/04024-0).

A todos os demais que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigado!!

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras
respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”*

- Claude Lévi-Strauss

RESUMO

A bioeconomia como substituição ao modelo econômico atual é a alternativa mais discutida nas últimas décadas, como forma de diminuição da dependência de recursos fósseis, caracterizados como poluentes e não-renováveis. Os processos biotecnológicos desenvolvidos em biorrefinarias são considerados como uma das alternativas mais atraentes na valorização de biomassas, convertendo-as em bioprodutos, biocombustíveis e bioenergia. Por exemplo, o biodiesel pode ser obtido a partir de óleos e gorduras, porém gera glicerol como subproduto. A utilização do glicerol como fonte de carbono tem sido estudada em vários bioprocessos, dentre os quais destaca-se a sua conversão a 1,3-propanodiol (1,3-PDO) por bactérias do gênero *Clostridium*. A metabolização do glicerol ocorre por duas vias, uma oxidativa, pelas enzimas glicerol desidrogenase (GDH) e di-hidroxiacetona quinase (DHAK), ou glicerol quinase (GK) e glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH); e outra redutiva, pelas enzimas glicerol desidratase (GDHt) e 1,3-propanodiol desidrogenase (PDODH), sendo que a produtividade final de 1,3-PDO é dependente da expressão gênica destas enzimas. Neste trabalho, estudou-se o isolado *Clostridium beijerinckii* Br21, para o qual foram investigadas as condições nutricionais de fermentação e a expressão de enzimas envolvidas no processo de oxidação/redução de glicerol. Tais investigações também foram efetuadas e comparadas a uma cepa referência, *Clostridium pasteurianum* DSM 525. Finalmente, estudou-se a manipulação genética de *C. beijerinckii* Br21, para aprimorar a obtenção de 1,3-PDO. Comparando a fermentação da cepa Br21 em meio bastante nutritivo (RCM) e pouco nutritivo (WIS, descrito por (WISCHRAL *et al.*, 2015)), verifica-se a obtenção de 1,3-PDO somente em condições de menor disponibilidade nutricional. A concentração final de 1,3-PDO obtida em meio WIS é similar à obtida por *C. pasteurianum* DSM 525. Além disso, a expressão de GPDH na cepa Br21 em meio WIS é baixa, possivelmente indicando limitação da velocidade de oxidação do glicerol via GK. Dessa forma, esta oxidação provavelmente ocorre via GDH/DHAK. Quanto à redução do glicerol, a expressão gênica de PDODH foi similar para as cepas Br21 e DSM 525. Com o intuito de aumentar a expressão gênica de redução do glicerol, realizou-se a transformação de *C. beijerinckii* Br21, utilizando o plasmídeo pMTL83251 contendo os genes codificantes das enzimas GDHt, cobalamina adenosiltransferase e PDODH, sob controle do promotor codificante das enzimas fosfotransacetilase/acetato quinase. Após a seleção e aperfeiçoamento de um método descrito na literatura, a transformação por eletroporação para promover a

superexpressão gênica de GDHt, cobalamina adenosiltransferase e PDODH foi bem-sucedida. A superexpressão desses genes promoveu o aumento da produtividade de 1,3-PDO, porém não houve aumento da concentração final deste composto. Este estudo contribuiu para o melhor entendimento das vias de transformação de glicerol a 1,3-PDO por um isolado de *C. beijerinckii*, além de possibilitar a adaptação de um método de transformação para o mesmo.

Palavras chaves: RT-qPCR, glicerol quinase, glicerol-3-fosfato desidrogenase, 1,3-propanodiol desidrogenase, eletroporação, superexpressão, pMTL83251.

ABSTRACT

Bioeconomy as a substitute for the current economic model is the most discussed strategy in recent decades, as a way to diminish dependence on fossil resources, which are considered as pollutants and non-renewable. Biotechnological processes carried out at biorefineries are considered as one of the most attractive alternatives for valorization of biomasses, by converting them into bioproducts, biofuels and bioenergy. For example, biodiesel can be obtained from oils and grease, but generates glycerol as byproduct. Glycerol recycling as carbon source has been studied in several bioprocesses, one of them being its conversion to 1,3-propanediol (1,3-PDO) by bacteria from *Clostridium* genus. Glycerol metabolization occurs by two routes: the oxidative one, by glycerol dehydrogenase (GDH) and dihydroxyacetone kinase (DHAK) enzymes, or glycerol kinase (GK) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) enzymes; and the reductive one, by glycerol dehydratase (GDHt) and 1,3-propanediol dehydrogenase (PDODH) enzymes. The final 1,3-PDO productivity is dependent on the gene expression of these enzymes. In this work, the isolate *Clostridium beijerinckii* Br21 was studied, for which the fermentation nutritional conditions and gene expression of enzymes involved in glycerol oxidation/reduction were investigated. These investigations were also carried out for a reference strain, *Clostridium pasteurianum* DSM 525. Finally, genetic engineering was studied for *C. beijerinckii* Br21, to improve 1,3-PDO synthesis. Comparing the Br21 strain fermentation at highly nutritious (RCM) and lowly nutritious medium (WIS, described by WISCHRAL *et al.*, 2015), 1,3-PDO attainment was only observed at lower availability of nutrients. The final concentration of 1,3-PDO is similar to the one obtained by *C. pasteurianum* DSM 525. In addition, GPDH gene expression on the Br21 strain cultivated in WIS medium was low, possibly indicating rate limitations of glycerol oxidation via GK. Thus, this oxidation probably occurs via GDH/DHAK. As for glycerol reduction, gene expression of PDODH was similar for both strains, Br21 and DSM 525. To increase gene expression related to glycerol reduction, *C. beijerinckii* Br21 transformation was performed. pMTL83251 plasmid was used, containing the genes encoding for GDHt, cobalamin adenosyltransferase and PDODH, under control of the promoter coding for phosphotransacetylase/acetate kinase enzymes. After selection and improvement of a literature described protocol, transformation by electroporation to promote the gene overexpression of GDHt, cobalamin adenosyltransferase and PDODH was successful. The overexpression of these genes increased 1,3-PDO productivity, but there was no increase in the final concentration of this compound. This work contributed to better understanding of

the metabolic pathways of glycerol conversion to 1,3-PDO by a *C. beijerinckii* isolate, as well as made possible to adapt a transformation method for this strain.

Keywords: RT-qPCR, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, 1,3-propanediol dehydrogenase, electroporation, overexpression, pMTL83251.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Evolução do percentual obrigatório de adição de biodiesel ao diesel comum no Brasil. Adaptado de: (COSTA; OLIVEIRA, 2022). Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.27
- Figura 2** - Histórico da produção nacional de biodiesel, de 2011 a 2021. Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.....28
- Figura 3** - Reação de síntese do biodiesel.28
- Figura 4** - Vias metabólicas relacionadas ao consumo de glicose em *C. beijerinckii* e *C. pasteurianum*. ADC: acetoacetato descarboxilase; ACK: acetato quinase; BUK: butirato quinase; CoAT: acetoacetil-CoA-acetato/butirato-CoA transferase. Adaptado de (AGU; UJOR; EZEJI, 2019). As setas verdes pontilhadas representam as reações que não ocorrem em *C. beijerinckii* Br21.35
- Figura 5** - Vias metabólicas relacionadas ao consumo de glicerol em *Clostridium*. GDH: glicerol desidrogenase (codificada pelo gene *dhaD*); DHAK: di-hidroxiacetona quinase (codificada pelo gene *dhaK*); GK: glicerol quinase; GPDH: glicerol-3-fosfato desidrogenase; GDHt: glicerol desidratase (codificada pelos genes *dhaB1* e *dhaB2*); PDODH: 1,3-propanodiol desidrogenase (*dhaT*). Adaptado de (AGU; UJOR; EZEJI, 2019).37
- Figura 6** - Representação esquemática dos genes aglomerados relacionados à via reductiva de síntese do 1,3-PDO. *dhaB1*: gene codificante da subunidade grande do complexo enzimático da glicerol desidratase (*locus tag*: CBEIBR21_22760); *dhaB2*: gene codificante da subunidade pequena do complexo enzimático da glicerol desidratase (*locus tag*: CBEIBR21_22765); *CoT*: gene codificante da enzima cobalamina adenosiltransferase (*locus tag*: CBEIBR21_22770); *dhaT*: gene codificante da enzima 1,3-propanodiol desidrogenase (*locus tag*: CBEIBR21_22775).54
- Figura 7** - pMTL83251 (a), pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-propanediol_CLOBI (b) e pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster (c). *ori*: replicon de bactérias gram-negativas, derivado do plasmídeo ColE1; *traJ*: gene de transferência conjugativa do plasmídeo; *lacZ*: gene codificante da enzima β-galactosidase; *repH*: replicon de bactérias gram-positivas pCB102, de *C. butyricum*; *ermB*: gene de resistência a eritromicina (ou claritromicina, para anaeróbios); P_{pta-ack}: gene da fosfotransacetilase-acetato quinase, utilizado como promotor constitutivo; *dhaB1*: gene codificante da subunidade grande do complexo enzimático da glicerol desidratase

(locus tag: CBEIBR21_22760); *dhaB2*: gene codificante da subunidade pequena do complexo enzimático da glicerol desidratase (locus tag: CBEIBR21_22765); *CoT*: gene codificante da enzima cobalamina adenosiltransferase (locus tag: CBEIBR21_22770); *dhaT*: gene codificante da enzima 1,3-propanodiol desidrogenase (locus tag: CBEIBR21_22775)..... 56

Figura 8 - Ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em RCM, contendo glicerol 450 mmol L⁻¹. (a) DO₆₀₀; (b) pH; e concentrações de (c) glicerol, (d) 1,3-propanodiol, (e) ácido acético e (f) ácido butírico. Nos gráficos dos ácidos acético e butírico, os símbolos com preenchimento representam as concentrações totais de ácido, enquanto os símbolos sem preenchimento representam as concentrações de ácido não dissociado..... 64

Figura 9 - Velocidades específicas de crescimento no ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em RCM, contendo glicerol 450 mmol L⁻¹. ... 65

Figura 10 - Ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 400 mmol L⁻¹. (a) DO₆₀₀; (b) pH; e concentrações de (c) glicerol, (d) 1,3-propanodiol, (e) ácido acético e (f) ácido butírico. Nos gráficos dos ácidos acético e butírico, os símbolos com preenchimento representam as concentrações totais de ácido, enquanto os símbolos sem preenchimento representam as concentrações de ácido não dissociado. 66

Figura 11 - Velocidades específicas de crescimento no ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 400 mmol L⁻¹. 67

Figura 12 - Ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 400 mmol L⁻¹, para coleta e armazenamento das células. (a) DO₆₀₀; (b) pH. As linhas vermelhas tracejadas representam o momento de armazenamento das células (35 h)..... 70

Figura 13 - Eletroforese em gel das amostras de RNA total. Poças 1 a 3: RNA total extraído de *C. beijerinckii* Br21. Poças 4 a 6: RNA total extraído de *C. pasteurianum* DSM 525. 71

Figura 14 - Níveis de expressão gênica absoluta relacionados às enzimas glicerol quinase, glicerol-3-fosfato desidrogenase e 1,3-propanodiol desidrogenase, nos ensaios fermentativos realizados com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 400 mmol L⁻¹. O asterisco indica que a expressão gênica da enzima glicerol quinase não foi quantificada para o *C. pasteurianum* DSM 525, visto que este não possui o respectivo gene codificante (*glpK*). 71

Figura 15 - Vias oxidativas relacionadas ao consumo de glicerol em *Clostridium*. DHA: di-hidroxiacetona; GDH: glicerol desidrogenase, codificada pelo gene *dhaD*; DHAK: di-

hidroxiacetona quinase, codificada pelo gene <i>dhaK</i> ; GK: glicerol quinase, codificada pelo gene <i>glpK</i> ; GPDH: glicerol-3-fosfato desidrogenase, codificada pelo gene <i>glpD</i>	72
Figura 16 - Eletroforese em gel das amostras de amplificação do cluster de genes de 1,3-PDO. Poças 1 e 11: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Poça 2: Controle negativo. Poças 3 a 10: temperaturas de anelamento de 51,0; 52,4; 53,9; 55,3; 56,7; 58,1; 59,6 e 61,0 °C, respectivamente.....	74
Figura 17 - Eletroforese em gel. Poças 1 e 6: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Poça 2: pMTL83251_ <i>P_{pta-ack}</i> _1,3-propanediol_CLOBI sem digerir. Poça 3: digestão de pMTL83251_ <i>P_{pta-ack}</i> _1,3-propanediol_CLOBI com FastDigest® <i>Bsp119I</i> , <i>NheI</i> e <i>XbaI</i> (Thermo Fisher Scientific). Poça 4: produto da reação de clonagem utilizando proporção 1:2 (esqueleto:inserto); Poça 5: produto da reação de clonagem utilizando proporção 1:3 (esqueleto:inserto)	74
Figura 18 - <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' [pMTL83251_ <i>P_{pta-ack}</i> _1,3-PDO_cluster] replicada em meio LB sólido (a) e meio LB líquido (b). Ambos os meios foram suplementados com eritromicina 250 µg mL ⁻¹	75
Figura 19 - Eletroforese em gel das amostras de digestão controle com <i>PvuII</i> e <i>XbaI</i> . Poças 1 e 14: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Poças 2 a 13: digestão controle do DNA plasmidial extraído de culturas derivadas de 12 colônias de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' transformada com pMTL83251_ <i>P_{pta-ack}</i> _1,3-PDO_cluster.	76
Figura 20 - Incubação do <i>C. beijerinckii</i> Br21 com pMTL83251, em meio 2xYTG suplementado com claritromicina 2 µg mL ⁻¹ . As setas indicam as replicatas nas quais a transformação foi bem sucedida: replicatas referentes à 5 e 6 h de regeneração das células após a transformação. Nos demais tubos, não houve crescimento.	77
Figura 21 - Colônias de <i>C. beijerinckii</i> Br21 [pMTL83251].	78
Figura 22 - Digestão controle do pMTL83251 com <i>EcoRI</i> . Poças 1 e 11: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Poças 2 a 4: colônia 1; Poças 5 a 7: colônia 2; Poças 8 a 10: colônia 3.	79
Figura 23 - Digestão controle do pMTL83251_ <i>P_{pta-ack}</i> _1,3-PDO_cluster com <i>PvuII</i> e <i>XbaI</i> . Poça 1: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Poças 2 e 3: colônia 1; Poça 4: colônia 2.	79
Figura 24 - Ensaio cinético realizado com <i>C. beijerinckii</i> Br21, <i>C. beijerinckii</i> Br21 [pMTL83251] e <i>C. beijerinckii</i> Br21 [pMTL83251_ <i>P_{pta-ack}</i> _1,3-PDO_cluster] em meio WIS (WISCHRAL <i>et al.</i> , 2015), contendo glicerol 500 mmol L ⁻¹ . (a) DO ₆₀₀ ; (b) pH; e concentrações de (c) glicerol, (d) 1,3-propanodiol e (e) ácido butírico.	80

Figura 25 - Velocidades específicas de crescimento no ensaio cinético realizado com <i>C. beijerinckii</i> Br21 e <i>C. beijerinckii</i> Br21 [pMTL83251_P _{pta-ack} _1,3-PDO_cluster] em meio WIS (WISCHRAL <i>et al.</i> , 2015), contendo glicerol 500 mmol L ⁻¹ . <i>C. beijerinckii</i> Br21 [pMTL83251] foi omitido desta figura, visto que não houve crescimento desse microrganismo no ensaio.	81
Figura 26 - Vias metabólicas relacionadas ao consumo de glicerol em <i>Clostridium</i> , com destaque para o início das vias oxidativa e reductiva. 3-HPA: 3-hidroxipropionaldeído; 1,3-PDO: 1,3-propanodiol; DHA: di-hidroxiacetona; DHA-P: di-hidroxiacetona fosfato; GDHt: glicerol desidratase, codificada pelo gene <i>dhaB</i> ; PDODH: 1,3-propanodiol desidrogenase, codificada pelo gene <i>dhaT</i> ; GDH: glicerol desidrogenase, codificada pelo gene <i>dhaD</i> ; DHAK: di-hidroxiacetona quinase, codificada pelo gene <i>dhaK</i> . Adaptado de (CHEN; LIU; LIU, 2009).	82
Figura 27 - Resumo dos resultados obtidos com o <i>C. beijerinckii</i> Br21, considerando a recuperação de carbono (%).	87

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Expressão matemática experimentalmente determinada para a conversão de densidade ótica (y , sem unidade) em concentração de massa celular seca (x , mg L^{-1}).....	44
Equação 2 - Cálculo da concentração de ácido orgânico não dissociado, utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch.	45
Equação 3 - Determinação da velocidade de crescimento (r_x).	45
Equação 4 - Cálculo da velocidade específica de crescimento (μ).	45
Equação 5 - Expressão matemática para determinação do fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$)	46
Equação 6 - Reação estequiométrica da biossíntese de 1,3-PDO e subprodutos, a partir de glicerol.....	46
Equação 7 - Cálculo da eficiência (%) de conversão de substrato em produto.....	46
Equação 8 - Cálculo da produtividade ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$).....	46
Equação 9 - Propagação de erros em operações de adição ou subtração.	47
Equação 10 - Propagação de erros em operações de multiplicação ou divisão.....	47
Equação 11 - Cálculo da recuperação de carbono (%).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de compostos de alto valor agregado obtidos por fermentação de diferentes microrganismos utilizando glicerol bruto como substrato. Adaptado de (UPRETY; VENKATESAGOWDA; RAKSHIT, 2017a).	30
Tabela 2 – Comparativo entre os rendimentos e produtividades da síntese de 1,3-PDO a partir de glicerol por diferentes microrganismos. Adaptado de (GUPTA <i>et al.</i> , 2022), (YANG <i>et al.</i> , 2017) e (TEE <i>et al.</i> , 2017).	32
Tabela 3 - Exemplos de protocolos de eletroporação utilizados para transformação de <i>Clostridium</i>	40
Tabela 4 - Composição do tampão de carregamento 5X (para amostras de RNA).....	49
Tabela 5 - Componentes utilizados no preparo das amostras de RNA para análise por eletroforese em gel de agarose (1 % m/v)	49
Tabela 6 - Composição do tampão MOPS 10X pH 7,0.....	49
Tabela 7 - Componentes utilizados para o tratamento com DNase.....	50
Tabela 8 - Reagentes necessários para a síntese do cDNA, por reação.....	51
Tabela 9 - Programa de temperaturas empregado na síntese do cDNA	51
Tabela 10 - Enzimas selecionadas para a quantificação da expressão gênica absoluta em <i>C. beijerinckii</i> Br21	52
Tabela 11 - Enzimas selecionadas para a quantificação da expressão gênica absoluta em <i>C. pasteurianum</i> DSM 525	52
Tabela 12 - Volumes dos reagentes utilizados no preparo das amostras para a qPCR	53
Tabela 13 - Programa de temperaturas empregado na qPCR.....	53
Tabela 14 - Primers utilizados para a amplificação do <i>cluster</i> de genes de 1,3-PDO e sequenciamento do plasmídeo pMTL83251_P _{pta-ack} _1,3-PDO_cluster	55
Tabela 15 - Programa de temperaturas empregado na amplificação do <i>cluster</i> de genes de 1,3_PDO	55
Tabela 16 - Programa de temperaturas empregado na amplificação do gene 16S rRNA	60
Tabela 17 - Resumo dos resultados dos ensaios com <i>C. beijerinckii</i> Br21 e <i>C. pasteurianum</i> DSM 525 sob diferentes meios de cultura e o <i>C. beijerinckii</i> Br21 após a transformação.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Grau Celsius

Ω - Ohm, unidade de resistência elétrica

ΔP – Variação da concentração de produto

Δt – Variação de tempo

μ – Velocidade específica de crescimento

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

1,3-PDO – 1,3-propanodiol

16 S rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal 16S

2xYTG – Meio de cultura composto por extrato de levedura, triptona e glicose, duas vezes concentrado

ABE – Fermentação cujos produtos principais são acetona, butanol e etanol

ack – Gene codificante da enzima acetato quinase

ACK – Acetato quinase

ADC – Acetoacetato descarboxilase

ATP – Adenosina trifosfato

bp – Par de bases

Bsp119I – Enzima de restrição

BUK – Butirato quinase

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CoA – Coenzima A

CoAT – CoA transferase

CoT – Gene codificante da enzima cobalamina adenosiltransferase

dhaB – Gene codificante da enzima glicerol desidratase

dhaD – Gene codificante da enzima glicerol desidrogenase

dhaK – Gene codificante da enzima dihidroxiacetona quinase

DHAK – Dihidroxiacetona quinase

dhaT – Gene codificante da enzima 1,3-propanodiol desidrogenase

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO₆₀₀ – Densidade óptica a 600 nm

EcoRI – Enzima de restrição

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilenodiaminotetracético

ermB – Gene de resistência a eritromicina (ou claritromicina, para anaeróbios)

FID – *Flame ionization detector*, detector de ionização de chama

g – Grama

GC – *Gas Chromatography*, Cromatografia gasosa

GDH – Glicerol desidrogenase

GDHt – Glicerol desidratase

gDNA – Ácido desoxirribonucleico genômico

GK – Glicerol quinase

glpD – Gene codificante da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase

glpK – Gene codificante da enzima glicerol quinase

GPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h – Hora

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia líquida de alta eficiência

K_m – Constante de Michaelis

L – Litro

lacZ – gene codificante da enzima β-galactosidase

Lag – Fase de adaptação

LB – Meio de cultura Luria-Bertani

Locus tag – Identificadores sistematicamente aplicados a cada um dos genes determinados em um projeto de sequenciamento

Log – Fase exponencial de crescimento

m - Metro

mg – Miligrama

min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mmol – Milimol

MOPS – *3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*, ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

NADH – Dinucleotídeo de nicotilamida-adenina reduzido

NAD⁺ – Dinucleotídeo de nicotilamida-adenina oxidado

NheI – Enzima de restrição

nm – Nanômetro

ori – *Replicon* de bactérias gram-negativas

PCR – *Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase

PDODH – 1,3-propanodiol desidrogenase

pH – Potencial hidrogeniônico

PPT – Polipropileno tereftalato

Primer – Pequena molécula de ácido desoxirribonucleico cadeia simples utilizado como iniciador na Reação em Cadeia da Polimerase

pta – Gene codificante da enzima fosfotransacetilase

PTA – Fosfotransacetilase

PTB – Fosfotransbutirilase

PvuII – Enzima de restrição

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

RCM – *Reinforced clostridial medium*

repH – *Replicon* de bactérias gram-positivas pCB102, de *Clostridium butyricum*

RID – *Refractive Index Detector*, detector de índice de refração

RNA – *Ribonucleic acid*, ácido ribonucleico

Rpm – Rotações por minuto

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

RT-qPCR – Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

rx – Velocidade de crescimento

TAE – Tris-Acetate-*Ethylenediaminetetraacetic acid*, Tris-Acetato-Ácido etilenodiaminotetracético

traJ – Gene de transferência conjugativa

UV/Vis – Ultravioleta visível

WIS – Meio de cultura descrito por (WISCHRAL *et al.*, 2015)

Y_{P/S} – Fator de conversão de substrato em produto

XbaI – Enzima de restrição

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1. Biodiesel e glicerol.....	27
3.2. Glicerol como matéria-prima em bioprocessos.....	29
3.3. 1,3-propanodiol (1,3-PDO)	30
3.4. Microrganismos produtores de 1,3-PDO.....	31
3.4.1. Bactérias do gênero <i>Clostridium</i> produtoras de 1,3-PDO.....	34
3.5. Metabolismo central de <i>Clostridium</i>	34
3.5.1. Metabolismo do glicerol.....	36
3.6. Melhoramento genético de <i>Clostridium</i>	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1. Microrganismos e condições de cultivo	42
4.2. Estoque dos microrganismos.....	42
4.3. Preparo do inóculo de <i>Clostridium</i>	43
4.4. Ensaio fermentativo.....	43
4.4.1. Acompanhamento da fermentação	43
4.4.1.1. Quantificação celular e pH	43
4.4.1.2. Quantificação do substrato e produtos de fermentação	44
4.4.2. Parâmetros cinéticos dos ensaios fermentativos.....	45
4.4.3. Balanço de carbono.....	47
4.5. Quantificação da expressão gênica absoluta	47
4.5.1. Armazenamento e conservação das células.....	48
4.5.2. Extração do RNA total e verificação de integridade	48
4.5.3. Tratamento com DNase	50
4.5.4. Síntese do cDNA	50

4.5.5. PCR em tempo real (qPCR).....	51
4.6. Superexpressão homóloga dos genes <i>dhaB1</i> , <i>dhaB2</i> , <i>CoT</i> e <i>dhaT</i> em <i>C. beijerinckii</i> Br21	53
4.6.1. Amplificação do cluster de genes de 1,3-PDO.....	54
4.6.2. Construção e replicação do pMTL83251_P _{pta-ack} _1,3-PDO_cluster	55
4.6.2.1. Preparo das células competentes de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	56
4.6.2.2. Transformação de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' com pMTL83251_P _{pta-ack} _1,3-PDO_cluster	57
4.6.3. Verificação do pMTL83251_P _{pta-ack} _1,3-PDO_cluster.....	58
4.6.4. Transformação de <i>C. beijerinckii</i> Br21 com pMTL83251 e pMTL83251_P _{pta-ack} _1,3-PDO_cluster.....	58
4.6.5. Confirmação das cepas transformadas.....	59
4.6.6. Estoque das cepas transformadas.....	60
4.6.7. Ensaio cinético com as cepas transformadas.....	61
4.6.7.1. Quantificação do substrato e produtos de fermentação	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1. Obtenção de 1,3-PDO em diferentes meios de cultura	63
5.2. Expressão gênica absoluta de enzimas do metabolismo do glicerol.....	69
5.3. Superexpressão homóloga dos genes <i>dhaB1</i> , <i>dhaB2</i> , <i>CoT</i> e <i>dhaT</i> em <i>C. beijerinckii</i> Br21	73
5.3.1. Construção e replicação do pMTL83251_P _{pta-ack} _1,3-PDO_cluster	73
5.3.2. Verificação do pMTL83251_P _{pta-ack} _1,3-PDO_cluster.....	75
5.3.3. Transformação de <i>C. beijerinckii</i> Br21 com pMTL83251 e pMTL83251_P _{pta-ack} _1,3-PDO_cluster.....	76
5.3.4. Confirmação das cepas transformadas.....	78
5.3.5. Ensaio cinético.....	80
5.4. Comparação entre as abordagens para o aumento da produção de 1, 3-PDO por <i>C. beijerinckii</i> Br21: composição do meio de cultura e transformação	84
6. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

O mundo atual é marcado por uma crescente demanda energética, que desempenha um importante papel no crescimento econômico por ser crucial e insubstituível na produção industrial. Estima-se que a demanda por energia global irá aumentar 45 % até 2030, superando 300 % até o final do século (HAO *et al.*, 2016). Os combustíveis fósseis, isto é, carvão mineral, petróleo e gás natural, representam consumo energético global superior a 80 % (WANG; FAN; ZHOU, 2022). Porém, são amplamente reconhecidos como a principal fonte de emissões causadora da crise climática e degradação de ecossistemas, refletindo em consequências sociais, político-econômicas e para a saúde (SAHA; CARTER, 2022).

A distribuição dos combustíveis fósseis entre os diferentes países ao redor do mundo é desigual, levando à formação de uma rede de troca energética internacional que causa dependência de alguns dos maiores exportadores desses combustíveis, como Rússia e Arábia Saudita (OVERLAND; JURAEV; VAKULCHUK, 2022; WANG; FAN; ZHOU, 2022). Somado ao fato de que esses são recursos não-renováveis, a utilização de combustíveis fósseis torna-se insustentável a longo prazo. Dessa forma, a transição da economia atual, dependente de combustíveis fósseis, para uma economia baseada em recursos renováveis tem sido considerada imprescindível nas últimas décadas (WEI *et al.*, 2022). De acordo com as novas estratégias da geopolítica de energia, as fontes de energia renováveis estão mais uniformemente distribuídas entre os países, tornando as relações energéticas internacionais mais simétricas (OVERLAND; JURAEV; VAKULCHUK, 2022).

A substituição do modelo econômico atual para a utilização desse tipo de recursos é a conceito central da bioeconomia, ou economia baseada em biomassa. Comparada a outros modelos econômicos, como o industrial, a bioeconomia é altamente consistente em termos de sustentabilidade e economia circular, promovendo redução do uso de combustíveis fósseis, diminuição de emissões poluentes e aumento da eficiência industrial (WEI *et al.*, 2022).

Uma das propostas da bioeconomia são as biorrefinarias, unidades industriais capazes de converter eficientemente a biomassa em bioprodutos, biocombustíveis e bioenergia (AWASTHI *et al.*, 2020). São utilizados diferentes tipos de biomassa, como lignocelulose, algas e vários tipos de resíduos industriais (UBANDO; FELIX; CHEN, 2020). A exata configuração da biorrefinaria é variável e depende fortemente das condições locais, como práticas de agricultura, clima, disponibilidade de matérias-primas e transporte (AWASTHI *et al.*, 2020).

O processamento de biomassas realizado em biorrefinarias pode ser classificado em quatro grupos distintos (TAKKELLAPATI; LI; GONZALEZ, 2018): 1) Mecânico/Físico, 2) Bioquímico, 3) Químico, e 4) Termoquímico. Dentre os bioquímicos, se encontram processos realizados por enzimas e/ou microrganismos, como fermentação, digestão anaeróbia, entre outros. Os crescentes avanços da indústria biotecnológica tornaram possíveis a derivação de recursos renováveis em diferentes produtos por processos bioquímicos, como materiais, produtos químicos e energia (BRACCO *et al.*, 2018).

Em especial, destaca-se a biorrefinaria do biodiesel, que tem sido empregado como substituto ao diesel de petróleo e é produzido a partir de óleos e gorduras (CHONG *et al.*, 2021). A produção de biodiesel global aumentou sete vezes de 2005 a 2015; além disso, espera-se um aumento adicional de 35 % até 2025 (NAYLOR; HIGGINS, 2018), que representa uma geração de aproximadamente 45 milhões de m³ de biodiesel. Somente no Brasil, foram produzidos 6,7 milhões de m³ de biodiesel em 2021 (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2022).

Um dos subprodutos gerados na indústria do biodiesel é o glicerol, cuja produção inevitavelmente aumenta atrelada ao aumento do consumo e produção de biodiesel. Porém, o destino do glicerol cru obtido a partir da síntese de biodiesel ainda é incerto, tornando-se um potencial poluente ambiental (LEONETI; ARAGÃO-LEONETI; DE OLIVEIRA, 2012).

Alguns processos biotecnológicos tem sido desenvolvidos para a utilização do glicerol residual obtido na indústria do biodiesel. Diversos compostos de valor agregado podem ser obtidos pela conversão biológica de glicerol, como 1,3-propanodiol, ácido cítrico, gás hidrogênio, polihidroxialcanoatos, entre outros (YANG; HANNA; SUN, 2012). Entretanto, os microrganismos capazes de utilizar o glicerol como substrato e convertê-lo em produtos de valor agregado são limitados.

Nessa perspectiva, esta pesquisa se insere no contexto da biorrefinaria do biodiesel/glicerol, sendo aqui estudada a possibilidade de utilização do glicerol como substrato de fermentação. Especificamente será estudado um potencial biocatalisador, *Clostridium beijerinckii* Br21 e suas vias bioquímicas envolvidas no processo fermentativo para a obtenção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a obtenção bioquímica de 1,3-PDO por *C. beijerinckii* Br21, a partir de glicerol.

2.2. Objetivos Específicos

Comparar o perfil de fermentação do glicerol por *C. beijerinckii* Br21 e por *Clostridium pasteurianum* DSM 525.

Verificar como diferentes composições de meios de cultura afetam o perfil de fermentação do glicerol por *C. beijerinckii* Br21 e por *C. pasteurianum* DSM 525

Quantificar a expressão gênica de algumas das enzimas relacionadas ao metabolismo do glicerol por *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525.

Selecionar e aperfeiçoar um método de transformação para *C. beijerinckii* Br21.

Realizar a transformação de *C. beijerinckii* Br21.

Avaliar o efeito da superexpressão dos genes relacionados à via redutiva do glicerol em termos de produtividade e rendimento de 1,3-PDO por *C. beijerinckii* Br21.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biodiesel e glicerol

O biodiesel é um dos principais biocombustíveis produzidos atualmente, pois foi obrigatoriamente incorporado à matriz de combustíveis em alguns países (LANDWEHR *et al.*, 2022). No Brasil, o biodiesel passou a fazer parte da matriz energética em 2005, com a Lei nº 11097, que tornou obrigatória a mistura de 2 % de biodiesel ao diesel comum. Desde então, este percentual tem aumentado, chegando a um máximo de 13 % em 2021. Porém, devido aos desdobramentos da pandemia de COVID-19, o percentual atual é de 10 % (Figura 1) (Diário Oficial da União, Resolução nº 25, 22 de novembro de 2021). Com a obrigatoriedade de utilização deste composto, a produção nacional de biodiesel aumenta ano após ano (Figura 2).

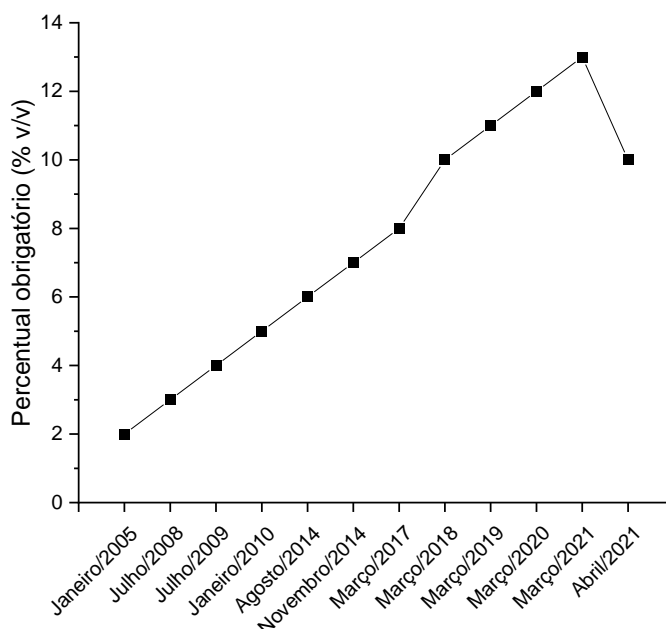


Figura 1 - Evolução do percentual obrigatório de adição de biodiesel ao diesel comum no Brasil. Adaptado de: (COSTA; OLIVEIRA, 2022). Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.

Este biocombustível é uma mistura de alquil ésteres de ácidos graxos, provenientes da transesterificação de gorduras animais e óleos vegetais, geralmente reciclados para este fim. Neste processo, os triglicerídeos reagem com álcoois (geralmente primários), produzindo o biodiesel (éster), além de glicerol como subproduto (**Figura 3**) (MITREA *et al.*, 2017). O crescente aumento na demanda de biodiesel promoveu o aumento da oferta de glicerol. São gerados aproximadamente 10 % (m/m) de glicerol do total de biodiesel produzido, cujo destino tem sido fonte extensiva de estudo.

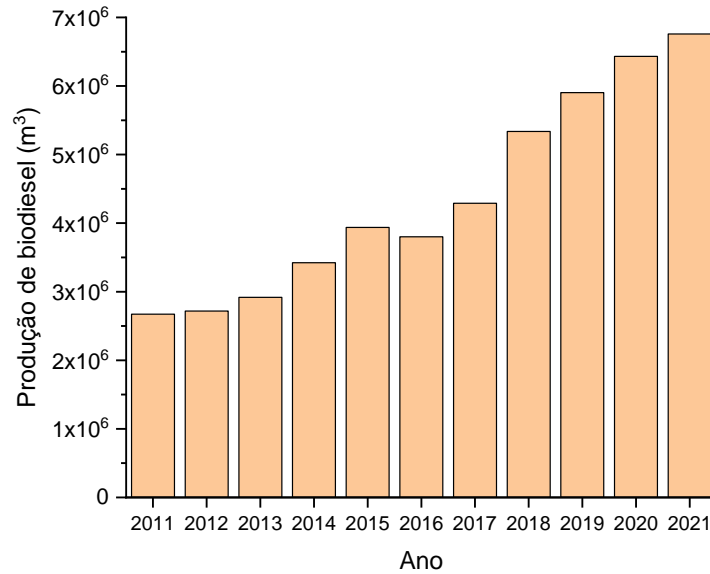


Figura 2 - Histórico da produção nacional de biodiesel, de 2011 a 2021. Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.

O glicerol, também denominado propan-1,2,3-triol ou glicerina, é um poliálcool de três carbonos (3C) e caracterizado como um líquido incolor, inodoro e com alta viscosidade. Apresenta inúmeras aplicações nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (BEATRIZ; ARAÚJO; DE LIMA, 2011). Entretanto, para que o glicerol seja aplicado como matéria-prima nessas indústrias, deve passar por processos de purificação, visto que o glicerol bruto obtido com subproduto da produção do biodiesel apresenta diversas impurezas, variando de cinzas a metais (KAZMI; CLARK, 2012).

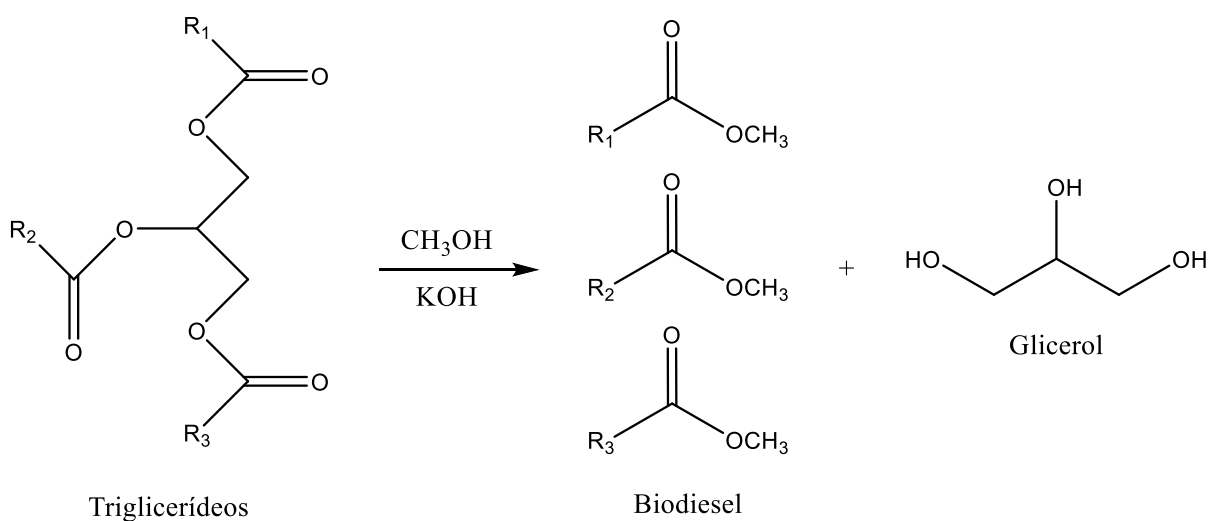


Figura 3 - Reação de síntese do biodiesel.

Com isso, para aumentar a viabilidade da produção de biodiesel, é necessário que o glicerol cru obtido seja reutilizado para a geração de compostos de valor agregado. Como exemplo, alguns processos biotecnológicos utilizam o glicerol para a obtenção de biopolímeros, ácidos graxos poli-insaturados, etanol, hidrogênio e n-butanol (GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016). Tais aplicações visam melhorar os aspectos econômicos da produção de biodiesel.

3.2. Glicerol como matéria-prima em bioprocessos

Uma das aplicações para o excesso de glicerol gerado na indústria do biodiesel é a sua utilização como fonte de carbono por microrganismos em processos fermentativos, para a obtenção de compostos químicos de alto valor agregado (ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012; COMELLI; COMELLI, 2011). A principal vantagem do glicerol, neste caso, deve-se ao seu estado altamente reduzido: a conversão biológica de glicerol a fosfoenolpiruvato ou piruvato gera o dobro de equivalentes redutores em comparação à glicose ou xilose (MAERVOET *et al.*, 2011), o que resulta em maiores rendimentos dos produtos reduzidos.

A utilização de glicerol puro seria o cenário ideal, porém este apresenta preço de mercado variando entre 0,70 a 1,96 dólares, enquanto o glicerol bruto custa entre 0,08 a 0,18 dólares (ABDUL RAMAN; TAN; BUTHIYAPPAN, 2019). Porém, como mencionado anteriormente, o glicerol bruto obtido como subproduto da síntese de biodiesel apresenta grande quantidade de contaminantes, que podem afetar o metabolismo de alguns microrganismos. Esforços têm sido realizados para a viabilizar a purificação deste composto (ABDUL RAMAN; TAN; BUTHIYAPPAN, 2019; PITT; DOMINGOS; BARROS, 2019; YULIANA *et al.*, 2021), bem como o desenvolvimento de processos fermentativos utilizando diretamente o glicerol bruto (KONGJAN *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2021).

Alguns dos compostos obtidos a partir de glicerol bruto e os seus rendimentos, bem como os microrganismos envolvidos encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de compostos de alto valor agregado obtidos por fermentação de diferentes microrganismos utilizando glicerol bruto como substrato. Adaptado de (UPRETY; VENKATESAGOWDA; RAKSHIT, 2017a).

Produto	Microrganismo	Espécie	Rendimento (mol mol ⁻¹)	Referência
Hidrogênio	Bactéria	<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	1,32	(NGO et al., 2011)
1,3-PDO	Bactéria	<i>Clostridium butyricum</i> AKR102a	0,62	(WILKENS et al., 2012a)
n-butanol	Bactéria	<i>Clostridium pasteurianum</i> MTCC 116	0,43	(KHANNA et al., 2013)
Trealose	Bactéria	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>Shermanii</i> NCIM 5137	0,027	(RUHAL et al., 2011)
Ácido propanoico	Bactéria	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> 1	0,70	(KOŚMIDER et al., 2010)
Etanol	Bactéria	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> 1	1,60	(CHOI et al., 2011)
Ácido succínico	Bactéria	<i>Pasteurellaceae</i> strain DD1	0,94	(SCHOLTEN et al., 2008)
Ácido cítrico	Levedura	<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 50109	0,27	(PAPANIKOLAOU et al., 2008)
Ácido γ -linoleico	Levedura	<i>Candida</i> sp. LEB-M3	0,11	(DUARTE et al., 2013)
Ácido γ -linoleico	Levedura	<i>Rhodospiridium toruloides</i> ATCC 10788	0,15	(UPRETY et al., 2017b)
Ácido γ -linoleico	Fungo	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411	0,033	(FAKAS et al., 2009)
Ácido γ -linoleico	Fungo	<i>Mortierella isabellina</i> ANTHUM 2935	0,026	(PAPANIKOLAOU et al., 2008)

3.3. 1,3-propanodiol (1,3-PDO)

Dentre os compostos listados na Tabela 1, destaca-se o 1,3-propanodiol (1,3-PDO) como bioproduto obtido a partir da transformação biológica de glicerol. O 1,3-PDO também é denominado trimetileno glicol ou polipropileno glicol. Trata-se de um poliálcool de 3 carbonos (3C) e apresenta-se como um líquido incolor e inodoro. É amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, além de ser empregado na síntese de biocidas e compostos heterocíclicos. Porém, atualmente o principal uso deste composto é na produção de polímeros, como poliéteres, poliuretanos e poliésteres (LEE et al., 2015; WISCHRAL et al., 2016). O principal polímero produzido a partir de 1,3-PDO é o polipropileno tereftalato (PPT), também denominado politrimetileno tereftalato (PTT) (SILVA et al., 2014).

O 1,3-PDO pode ser produzido quimicamente por duas vias: através de hidratação da acroleína; e por hidroformilação do óxido de etileno (LEE *et al.*, 2015). Entretanto, a síntese química de 1,3-PDO não é sustentável ambientalmente, pois gera intermediários tóxicos e poluentes e depende diretamente de combustíveis fósseis (SILVA *et al.*, 2014). Portanto, a síntese biológica de 1,3-PDO torna-se vantajosa, pois é obtido a partir de recursos renováveis e a temperatura e pressão ambientes.

3.4. Microrganismos produtores de 1,3-PDO

Diversas bactérias são capazes de metabolizar glicerol em 1,3-PDO, principalmente as pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Clostridium*, mais especificamente, as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium pasteurianum*. Entretanto, as cepas de *Clostridium* têm tido preferência pois apresentam bons rendimentos e grande parte das cepas de *Klebsiella* são patogênicas (BIEBL, 2001; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016).

Um resumo com os resultados de alguns dos trabalhos da literatura pode ser encontrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparativo entre os rendimentos e produtividades da síntese de 1,3-PDO a partir de glicerol por diferentes microrganismos. Adaptado de (GUPTA *et al.*, 2022), (YANG *et al.*, 2017) e (TEE *et al.*, 2017).

Microrganismo	Processo	1,3-PDO obtido (mol L ⁻¹)	Y _{P/S} (mol mol ⁻¹)	Produtividade (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	Referência
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Batelada alimentada	0,70	-	-	(MU <i>et al.</i> , 2006)
<i>K. pneumoniae</i> XJ-Li	Batelada alimentada	0,501	0,69	-	(ZHANG <i>et al.</i> , 2007)
<i>K. oxytoca</i> FMCC-197	Batelada alimentada	0,658	0,5	-	(METSOVITI <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. freundii</i> FMCC-B 294 (VK-19)	Batelada alimentada	0,895	0,5	-	(METSOVITI <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Batelada alimentada	0,62	0,69	-	(BIEBL <i>et al.</i> , 1992)
<i>C. butyricum</i> VPI 1718	Batelada alimentada	0,892	0,67	-	(CHATZIFRAGKOU <i>et al.</i> , 2011b)
<i>C. butyricum</i> AKR102a	Batelada alimentada	1,00	0,62	-	(WILKENS <i>et al.</i> , 2012b)
<i>C. butyricum</i> DSP1	Batelada alimentada	0,494	0,64	14,7	(SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA; BIAŁAS, 2014)
<i>C. butyricum</i> L4	Batelada alimentada	0,921	0,65	-	(GUPTA <i>et al.</i> , 2022)
<i>C. butyricum</i> DSM 5341	Batelada	0,74	0,62	25,0	(BIEBL <i>et al.</i> , 1992)
<i>C. butyricum</i> VPI 3266	Batelada alimentada	0,46	0,65	9,5	(SAINT-AMANS <i>et al.</i> , 1994)

<i>C. butyricum</i> CNCM 1211	Batelada alimentada	0,859	0,67	22	(HIMMI; BORIES; BARBIRATO, 1999)
<i>C. butyricum</i> F2b	Batelada	0,29	0,67	16	(PAPANIKOLAOU <i>et al.</i> , 2000)
<i>C. butyricum</i> VPI 1718	Batelada	0,442	0,67	8,5	(CHATZIFRAGKOU <i>et al.</i> , 2011 ^a)
<i>C. butyricum</i> DSM 10702	Batelada	0,53	0,69	8,3	(LOUREIRO-PINTO <i>et al.</i> , 2016)
<i>C. beijerinckii</i> DSM 791	Batelada	0,230	0,67	9,5	(WISCHRAL <i>et al.</i> , 2016)
<i>C. diolis</i> DSM 15410	Batelada	0,1530	0,68	17,0	(XIN <i>et al.</i> , 2016)
<i>C. butyricum</i> M01	Batelada	0,308	0,61	32,7	(ZHU; FANG; WANG, 2016)
<i>C. butyricum</i> JKT37	Batelada	0,2575	0,59	36,8	(TEE <i>et al.</i> , 2017 ^a)

3.4.1. Bactérias do gênero *Clostridium* produtoras de 1,3-PDO

As bactérias pertencentes ao gênero *Clostridium* caracterizam-se como bastonetes, gram-positivas, anaeróbias estritas e formadoras de esporos. Em geral, têm sido amplamente utilizadas como biocatalisadores em processos biotecnológicos, pois são capazes de metabolizar uma ampla gama de substratos, incluindo hexoses (C6), pentoses (C5) e fontes de carbono não-sacarídicas, como o glicerol (JURGENS *et al.*, 2012; QURESHI *et al.*, 2006).

Dentre as espécies capazes de metabolizar diretamente o glicerol, temos: *C. diolis*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* e *C. pasteurianum* (LEJA; CZACZYK; MYSZKA, 2013). Além dessas, o *C. beijerinckii*, que tem sido relacionado à obtenção de n-butanol pela fermentação de glicose, também revelou ser um bom produtor de 1,3-PDO quando a fonte de carbono é o glicerol (WISCHRAL *et al.*, 2016).

3.5. Metabolismo central de *Clostridium*

O metabolismo de carboidratos característico das espécies *C. beijerinckii* e *C. pasteurianum* encontra-se representado na Figura 4. A fermentação de carboidratos realizada por estas espécies é denominada ABE, pois os principais produtos gerados são acetona, butanol e etanol. Este metabolismo ocorre em duas etapas distintas: a acidogênese e a solventogênese (LIBERATO *et al.*, 2019; PROCENTESE *et al.*, 2015; SCHIEL-BENGELSDORF *et al.*, 2013; USMANI *et al.*, 2021).

Durante a acidogênese, o carboidrato é assimilado pelas células em crescimento exponencial e convertido em piruvato e acetil-CoA; esta conversão já resulta em um dos produtos de interesse, o gás hidrogênio (AGU; UJOR; EZEJI, 2019). O acetil-CoA formado é então convertido em acetil-fosfato, pela enzima fosfotransacetilase (PTA), sendo este convertido a ácido acético pela enzima acetato quinase (ACK). Parte do acetil-CoA formado anteriormente segue por outra rota metabólica, resultando em butiril-CoA, que é convertido em butiril-fosfato pela enzima fosfotransbutirilase (PTB), e finalmente a ácido butírico pela enzima butirato quinase (BUK) (AGU; UJOR; EZEJI, 2019). Os ácidos acético e butírico são liberados para o meio extracelular, causando a acidificação do mesmo. Dessa forma, a acidogênese resulta principalmente em gás hidrogênio e ácidos orgânicos (acético e butírico) (AGU; UJOR; EZEJI, 2019).

O acúmulo de ácidos orgânicos no meio de cultura, associado ao início da fase estacionária de crescimento do microrganismo, desencadeia a solventogênese (LIBERATO *et*

al., 2019; PROCENTESE *et al.*, 2015). Na solventogênese, os ácidos orgânicos formados na etapa anterior são reassimilados para o interior celular pela enzima acetoacetyl-CoA-acetato/butirato-CoA transferase (CoAT) e convertidos em acetyl-CoA e butiril-CoA. Finalmente, estes compostos são direcionados para a formação dos produtos principais da solventogênese: acetona, butanol e etanol.

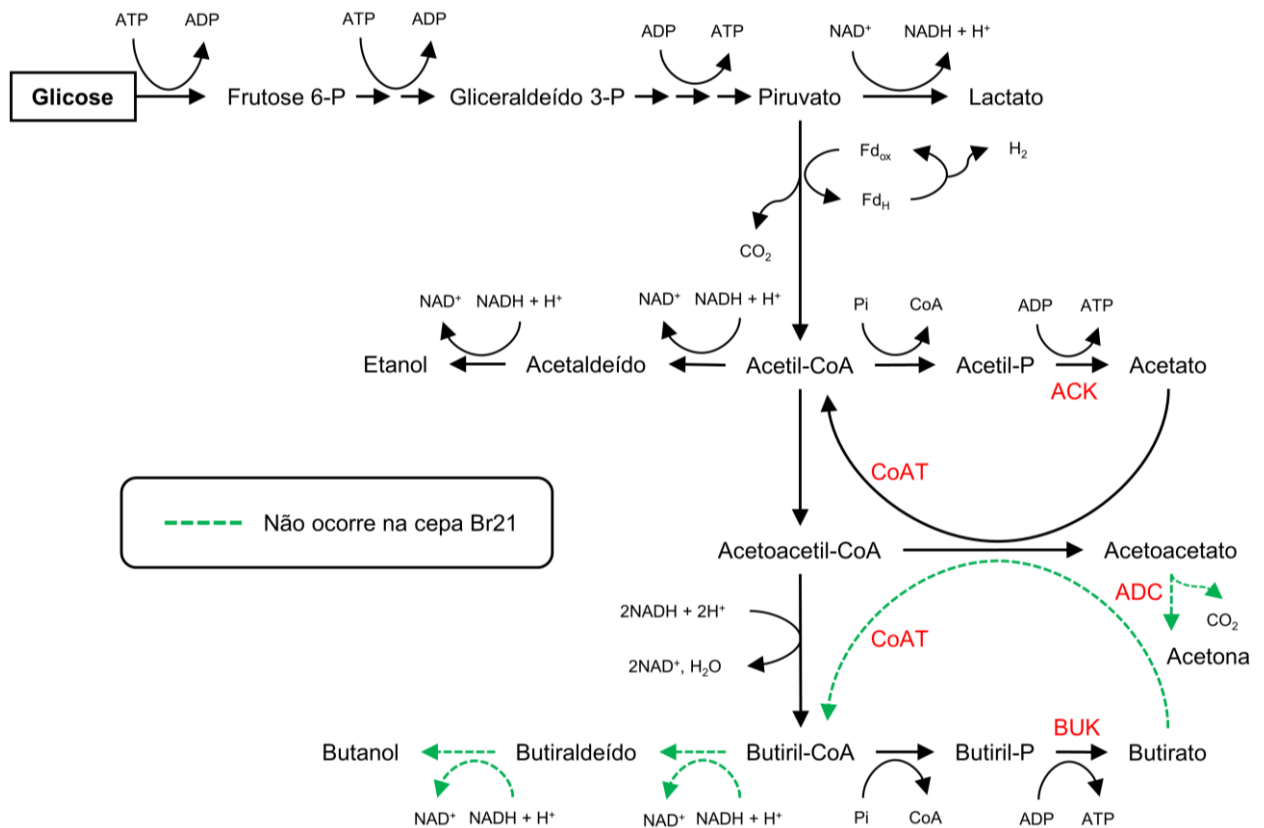


Figura 4 - Vias metabólicas relacionadas ao consumo de glicose em *C. beijerinckii* e *C. pasteurianum*. ADC: acetoacetato descarboxilase; ACK: acetato quinase; BUK: butirato quinase; CoAT: acetoacetyl-CoA-acetato/butirato-CoA transferase. Adaptado de (AGU; UJOR; EZEJI, 2019). As setas verdes pontilhadas representam as reações que não ocorrem em *C. beijerinckii* Br21.

Embora as reações do metabolismo representadas na Figura 4 são características da maior parte das espécies de *C. beijerinckii* e *C. pasteurianum*, algumas cepas perdem a capacidade de evoluir para a solventogênese. Este fenômeno é observado após cultivos sucessivos de cepas e é conhecido como degeneração (KASHKET; ZHI-YI CAO, 1995). Estudo de cepas degeneradas mostraram que em *C. beijerinckii* isto se deve especialmente a perda ou falta de genes que codificam determinadas enzimas, tais como CoAT, acetoacetato descarboxilase (ADC) e BUK (HARTMANIS; KLASON; GATENBECK, 1984b; KASHKET;

ZHI-YI CAO, 1995; TUMMALA; WELKER; PAPOUTSAKIS, 2003). Este foi o caso da cepa *C. beijerinckii* Br21 isolada em nosso laboratório, na qual após o sequenciamento (FONSECA *et al.*, 2019), verificou-se a ausência do gene *adc* que codifica a enzima ADC. Aparentemente a falta deste gene, cuja enzima catalisa a reação de descarboxilação do acetoacetato em acetona, não prejudicaria a formação de butanol, produto de maior valor agregado associado ao *Clostridium*. Entretanto, segundo alguns pesquisadores esta reação seria responsável por fornecer a energia livre necessária para a reabsorção dos ácidos acético e butírico pela célula (HARTMANIS *et al.*, 1984). Com isso, os ácidos permanecem no meio extracelular e o microrganismo não é capaz de produzir os solventes correspondentes, tornando a cepa exclusivamente acidogênica.

3.5.1. Metabolismo do glicerol

O metabolismo para síntese de 1,3-PDO a partir de glicerol por *C. beijerinckii* e *C. pasteurianum* é dividido em dois ramos distintos (Figura 5): 1) a via oxidativa, que pode ter início com duas reações distintas. Em uma das possibilidades, o glicerol é convertido em di-hidroxiacetona (catalisada pela enzima glicerol desidrogenase – GDH, codificada pelo gene *dhaD*), e posteriormente fosforilado à di-hidroxiacetona-fosfato (catalisada pela enzima di-hidroxiacetona quinase - DHAK, codificada pelo gene *dhaK*). Em outra possibilidade, o glicerol é convertido a glicerol-3-fosfato (catalisada pela enzima glicerol quinase) e posteriormente em di-hidroxiacetona-fosfato (catalisada pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase). A di-hidroxiacetona-fosfato é então processada pela via glicolítica, produzindo ATP, equivalentes redutores ($\text{NADH} + \text{H}^+$) que possibilitam o crescimento celular, além de outros produtos da fermentação (como n-butanol, butirato, acetato e etanol). Ou seja, a conversão de glicerol a di-hidroxiacetona fosfato pode ser realizada por duas possibilidades, que envolvem as mesmas classes de enzimas: desidrogenase seguida de quinase (GDH, DHAK) ou quinase seguida de desidrogenase (GK, GPDH); 2) no ramo redutivo da via, o glicerol é desidratado a 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) (catalisada pela enzima glicerol desidratase – GDHt, codificada pelos genes *dhaB1* e *dhaB2*), que posteriormente é reduzido a 1,3-propanodiol (catalisada pela enzima 1,3-propanodiol desidrogenase – PDODH, codificada pelo gene *dhaT*) (HONGWEN; BAISHAN; ZONGDING, 2005; LUERS *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2014).

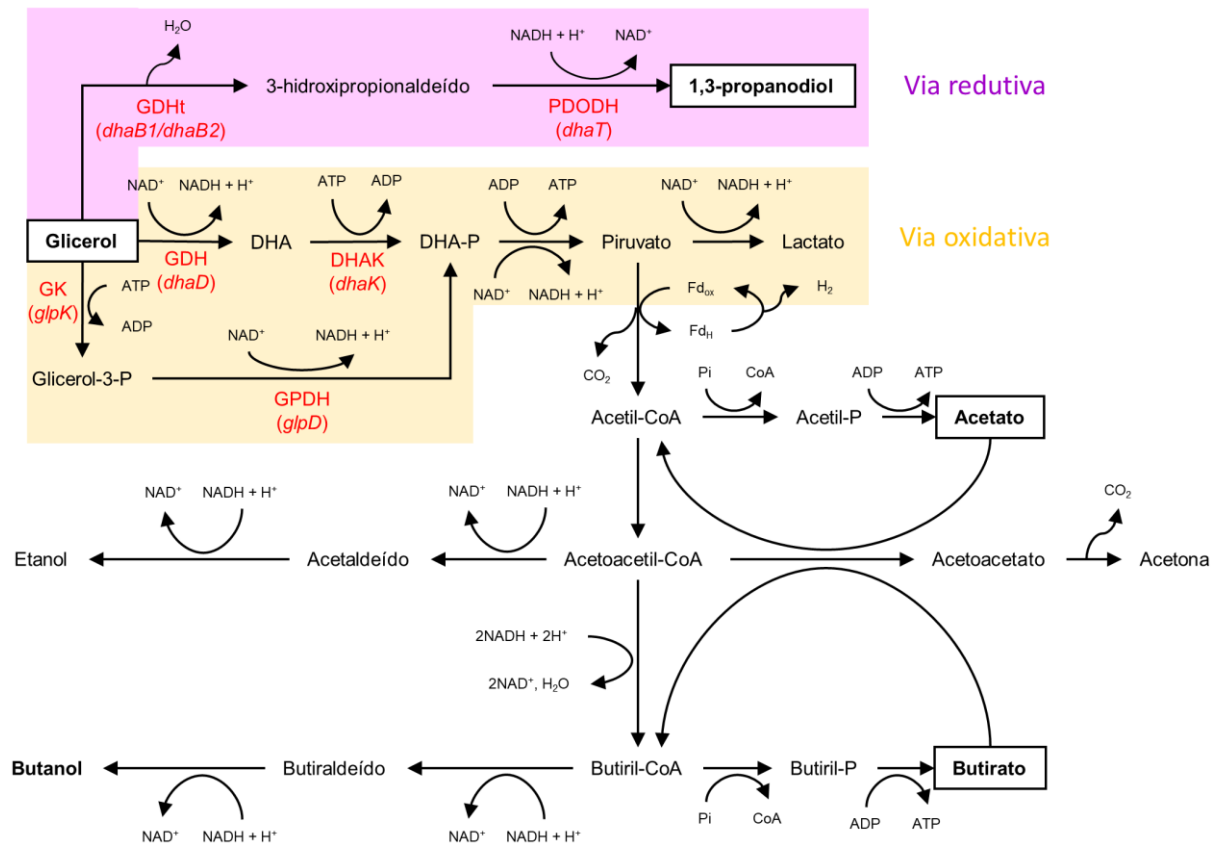


Figura 5 - Vias metabólicas relacionadas ao consumo de glicerol em *Clostridium*. GDH: glicerol desidrogenase (codificada pelo gene *dhaD*); DHAK: di-hidroxiacetona quinase (codificada pelo gene *dhaK*); GK: glicerol quinase; GPDH: glicerol-3-fosfato desidrogenase; GDHt: glicerol desidratase (codificada pelos genes *dhaB1* e *dhaB2*); PDODH: 1,3-propanodiol desidrogenase (*dhaT*). Adaptado de (AGU; UJOR; EZEJI, 2019).

Como pode ser observado na Figura 5, as vias do metabolismo do glicerol estão interligadas, pois a via oxidativa é responsável por gerar os equivalentes redutores (NADH + H⁺) necessários para viabilizar a via reductiva (SILVA *et al.*, 2014). Os equivalentes redutores são gerados principalmente na primeira etapa da via oxidativa, durante a conversão de glicerol em di-hidroxiacetona, e durante o processamento dos intermediários da via glicolítica. Desse modo, parte do glicerol é destinado à síntese de 1,3-PDO, para que a célula mantenha o balanço redox. Uma das estratégias utilizadas para aumentar os equivalentes redutores é a co-fermentação de glicerol junto a outros substratos, tais como glicose, xilose, sacarose e maltose, que são convertidos a intermediários da via glicolítica e fornecem equivalentes redutores. Nesse caso, o glicerol poderia se tornar integralmente disponível para ser metabolizado pela via reductiva, elevando o rendimento de 1,3-PDO (JIN *et al.*, 2011).

Neste contexto de estudo das vias metabólicas, a análise do perfil de expressão gênica torna-se extremamente importante, pois permite detectar alterações na expressão gênica

ocasionadas por estímulos ambientais ou modificações genéticas, possibilitando maior conhecimento sobre a fisiologia celular (KABIR; SHIMIZU, 2003). Considerando um metabolismo ramificado, como o do *Clostridium*, catalisado por diversas enzimas, geralmente há regulação dos genes codificantes por diversos cofatores, precursores, intermediários ou produtos da própria via metabólica. Por meio da análise da expressão gênica, é possível avaliar individualmente cada gene ou *regulon* relacionado à via e como este determina a fisiologia celular, além de sua interação com outros componentes do metabolismo global (TAO *et al.*, 1999; WILSON *et al.*, 1999).

Desenvolvida nos anos 1990, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real, ou RT-qPCR, é uma das principais técnicas utilizadas atualmente para analisar a atividade transcricional celular, devido à alta sensibilidade, precisão, velocidade de análise, reprodutibilidade e custo benefício, possibilitando monitorar a expressão gênica em diferentes amostras (LI *et al.*, 2020; UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008).

Analisando o metabolismo do glicerol e visando o aprimoramento da síntese de 1,3-PDO, são descritas quatro enzimas-chave como as principais responsáveis pela utilização microbiana deste composto (GDH, DHAK, GDHt e PDODH, como visto anteriormente na Figura 5). Tais enzimas são expressas e induzidas na presença de glicerol ou di-hidroxiacetona e são codificadas por um conjunto de genes, que formam o denominado *regulon dha*. Este é responsável por regular as quatro enzimas-chave, sendo reprimido pelo intermediário 3-HPA (YUAN *et al.*, 2016). Dessa forma, análise do perfil de expressão gênica dessas enzimas poderá contribuir de forma significativa para o melhor entendimento das vias do metabolismo de glicerol a 1,3-propanodiol.

Portanto, o estudo do perfil de expressão gênica em bioprocessos é de vital importância para o pleno entendimento das vias metabólicas e fisiologia celular. A partir deste conhecimento, será possível avançar para a etapa de desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados, nos quais as vias metabólicas são planejadas com o intuito de ampliar o rendimento e/ou produtividade de bioprodutos. Com isso, a biossíntese de compostos de interesse industrial, como o 1,3-propanodiol, torna-se mais eficiente em comparação ao microrganismo original, além de configurar um processo barato, sustentável e mais confiável que as sínteses químicas (MERRICK *et al.*, 2016; SJÖBERG *et al.*, 2019).

3.6. Melhoramento genético de *Clostridium*

Diversos trabalhos reportaram o melhoramento genético de microrganismos naturalmente produtores de 1,3-PDO, com o intuito de aumentar a produção deste composto. Para isso, foram utilizadas principalmente quatro estratégias distintas (SUN *et al.*, 2018): 1) remoção de genes relacionados à síntese de subprodutos (SEO *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2006); 2) superexpressão dos genes relacionados à via redutiva de conversão de glicerol a 1,3-propanodiol (CHEN; LIU; LIU, 2011; ZHAO *et al.*, 2009); 3) manipulação de genes relacionados aos níveis intracelulares de cofatores (NADH) (WISCHRAL *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2009); 4) evolução direta das enzimas da via redutiva, para melhorar sua atividade catalítica (QI *et al.*, 2009) ou diminuir a especificidade de coenzima (MA *et al.*, 2010).

Uma das formas mais habituais de obtenção de microrganismos geneticamente modificados é a transformação. Neste procedimento, a célula bacteriana recebe DNA exógeno e este é incorporado ao seu genoma, ou replicado independentemente como um plasmídeo. Algumas espécies bacterianas evoluíram para a capacidade de receber DNA (competência) por mecanismos específicos. Porém, em geral é possível realizar a competência mesmo de células que não apresentam naturalmente esta característica, por meio do tratamento com cálcio ou choque elétrico (WERTZ; LOW, 2017).

O tratamento com choque elétrico, ou eletroporação, consiste na aplicação de um pulso elétrico para induzir um potencial na membrana, ocasionando poros temporários nas membranas celulares, possibilitando a entrada de DNA nas células. (CHUNG; CHEN; LIN, 2015). A eficiência de incorporação do DNA pode ser aumentada intensificando o potencial elétrico aplicado, porém o aumento da intensidade do campo elétrico também resulta em aumento da porcentagem de morte celular. Dessa forma, o potencial deve ser cuidadosamente ajustado para possibilitar boa eficiência de transformação. O potencial aplicado varia de acordo com a espécie de bactéria utilizada; mas de maneira geral, bactérias gram-positivas são submetidas a menores valores em comparação a bactérias gram-negativas (XUE; JOHNSON; DALRYMPLE, 1999), resultando em menores eficiências de transformação em comparação a gram-negativas.

A dificuldade de eletrotransformação em bactérias gram-positivas pode estar relacionada a (DOWER *et al.*, 1992): sua menor vulnerabilidade a campos elétricos, devido à densa parede celular; incapacidade de macromoléculas em permear a espessa parede celular, mesmo após temporariamente permeáveis pelo pulso elétrico; altas pressões internas desses tipos celulares, que previne a entrada do DNA; limitações no estabelecimento e manutenção de

plasmídeos. Porém, as eficiências de transformação obtidas por eletroporação são geralmente suficientes para a manipulação genética desses microrganismos, em comparação a outras metodologias de transformação (DOWER *et al.*, 1992).

Em bactérias do gênero *Clostridium*, a transformação é geralmente realizada por eletroporação, porém diferentes parâmetros são utilizados, dependendo da espécie. Alguns exemplos estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Exemplos de protocolos de eletroporação utilizados para transformação de *Clostridium*.

Parâmetros	Autor		
	(LITTLE <i>et al.</i> , 2018)	(DAVIS <i>et al.</i> , 2005)	(XIN <i>et al.</i> , 2020)
Microrganismo	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB 14988	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	<i>C. beijerinckii</i> CC101
Meio de cultura	2xYTG	2xYTG	CGM
DO ₆₀₀ da cultura utilizada na transformação	0,2	0,6	0,4 a 0,6
Plasmídeo	Série pmTL	-	pNICKclos 2.0-xyIR
Quantidade de plasmídeo (µg)	1,0	0,5	1,0 a 2,0
Tampão de eletroporação	Tampão SEB	Tampão SEB	Tampão ETM / ET
Voltagem (kV)	1,25	1,25	1,8
Tempo de regeneração (h)	3,0	3,0	4,0 a 6,0

Legenda: 2xYTG (triptona 16 g L⁻¹, extrato de levedura 10 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹ e glicose 5 g L⁻¹); CGM (glicose 30 g L⁻¹, extrato de levedura 6,25 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 2,25 g L⁻¹, NaCl 1,25 g L⁻¹, asparagina 2,5 g L⁻¹, KH₂PO₄ 0,95 g L⁻¹, K₂HPO₄ 0,95 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,5 g L⁻¹, MnSO₄.7H₂O 13 mg L⁻¹, FeSO₄.7H₂O 13 mg L⁻¹, pH ajustado para 6,4); Tampão SEB (sacarose 270 mmol L⁻¹, Na₂HPO₄ 7 mmol L⁻¹, NaH₂PO₄ 7 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 1 mmol L⁻¹); Tampão ETM (sacarose 270 mmol L⁻¹, NaH₂PO₄ 4,4 mmol L⁻¹, Na₂HPO₄ 0,6 mmol L⁻¹, MgCl₂ 10 mmol L⁻¹, pH ajustado para 7,4); Tampão ET (sacarose 270 mmol L⁻¹, NaH₂PO₄ 4,4 mmol L⁻¹, Na₂HPO₄ 0,6 mmol L⁻¹, pH ajustado para 7,4).

Um passo essencial para o sucesso da transformação é a busca por sistemas de restrição e modificação no microrganismo a ser transformado. Esses sistemas são compostos por uma enzima de restrição e uma correspondente enzima de modificação (metilação). Podem ser classificados em quatro tipos distintos (I, II, III e IV), de acordo com a sequência nucleotídica de reconhecimento e os cofatores necessários (MURRAY, 2000). Esse conjunto de enzimas atua como um sistema imune no microrganismo, protegendo-o de material genético exógeno. Quando DNA sem o correto padrão de metilação é detectado na célula, a endonuclease de restrição rapidamente reconhece e degrada esta molécula. Com isso, o microrganismo é capaz de diferenciar seu próprio DNA (metilado) de DNA exógeno (não metilado) (ROER; AARESTRUP; HASMAN, 2015). Como exemplo, os sistemas de restrição e modificação do tipo I são codificados por três genes, cujos produtos formam um complexo enzimático: *hsdR* (restrição), *hsdM* (metilação) e *hsdS* (reconhecimento da sequência específica). A enzima mais conhecida e estudada de sistemas do tipo I é a *EcoKI* (ROBERTS *et al.*, 2003).

Esses sistemas devem ser considerados ao realizar a transformação de determinado microrganismo, visto que justamente o procedimento a ser realizado será a inserção de DNA exógeno. Para evitar a degradação do DNA no hospedeiro, este deve conter o correto padrão de metilação ou ausência dos sítios de restrição.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos e condições de cultivo

Foram utilizadas duas cepas de *Clostridium*: *C. beijerinckii* Br21, isolada em nosso laboratório (FONSECA, 2016) (disponível no banco de dados DDBJ/ENA/GenBank, número de acesso: MWMH00000000) e principal cepa em estudo neste trabalho; e *C. pasteurianum* DSM 525, obtida na Coleção de cultura *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) que foi empregada como referência. O cultivo destas cepas foi realizado em RCM (peptona 10 g L⁻¹, extrato de carne 10 g L⁻¹, extrato de levedura 3 g L⁻¹, glicose 5 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, amido solúvel 1 g L⁻¹, cisteína 0,5 g L⁻¹, acetato de sódio 3 g L⁻¹ e ágar 0,5 g L⁻¹) e meio WIS (K₂HPO₄ 5 g L⁻¹, extrato de levedura 0,5 g L⁻¹ e acetato de sódio 0,005 g L⁻¹) (WISCHRAL *et al.*, 2015), com pH ajustado para 7,2.

Na etapa de transformação, *C. beijerinckii* Br21 também foi cultivado em meio 2xYTG (triptona 16 g L⁻¹, extrato de levedura 10 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹ e glicose 5 g L⁻¹). Além disso, nesta etapa se utilizou *Escherichia coli* XL1-Blue MRF', que foi cultivada em meio LB (triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹ e NaCl 10 g L⁻¹). Após a transformação, os meios de cultura utilizados no crescimento de *C. beijerinckii* Br21 e *E. coli* XL1-Blue MRF' foram suplementados com claritromicina 2 µg mL⁻¹ e eritromicina 250 µg mL⁻¹, respectivamente.

Em todos os cultivos, a retirada do ar foi feita por meio de troca da fase gasosa no interior dos frascos, utilizando gás nitrogênio 5,0, com o objetivo de promover a anaerobiose do sistema. Os frascos foram fechados com tampa de borracha e selados com lacre de alumínio.

4.2. Estoque dos microrganismos

Para o armazenamento das cepas de *Clostridium* a longo prazo, foi realizado um estoque a partir de uma cultura incubada em RCM a 37 °C, por 18h. As células foram centrifugadas a 9000 rpm por 3 minutos e suspensas em RCM contendo 30 % de glicerol. Alíquotas de 2 mL dessa suspensão foram armazenadas em freezer a -80 °C. O preparo do inóculo foi sempre realizado a partir dessas alíquotas.

Para o armazenamento da cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' a longo prazo, utilizou-se uma cultura incubada a 37 °C por 18 h. Foram alíquotados 500 µL em tubos contendo 500 µL

de glicerol puro, totalizando 1 mL de suspensão celular. Os tubos foram armazenados em freezer a -80 °C. O inóculo foi realizado utilizando 100 µL dessa suspensão.

4.3. Preparo do inóculo de *Clostridium*

Para ativação das cepas de *Clostridium*, foram utilizados tubos de 150 mL contendo 60 mL de RCM (glicose 5 g L⁻¹). A este meio de cultivo, foram adicionados 2 mL da suspensão celular estoque. A cultura foi incubada a 37 °C sem agitação, por 24 h.

Após 24 h de incubação, foram transferidos 2 mL da cultura de ativação para 60 mL do mesmo meio de cultivo desejado para o ensaio fermentativo, como forma de adaptação do microrganismo. Esse cultivo também foi feito a 37 °C sem agitação, por 18 h.

Após 18 h de incubação, utilizou-se este segundo cultivo como inóculo dos ensaios fermentativos, em quantidade suficiente para que a densidade ótica (DO₆₀₀) inicial dos ensaios fosse igual a 0,1.

4.4. Ensaio fermentativos

Os ensaios fermentativos foram realizados em batelada em frascos de 100 mL, preenchido com 60 mL de meio contendo glicerol como fonte de carbono, cuja concentração inicial variou entre 400 a 500 mmol L⁻¹. Nos ensaios realizados em RCM, a glicose originalmente constituinte foi substituída por glicerol. O pH inicial dos meios foi ajustado para 7,2 e a anaerobiose propiciada pela troca de gás do *headspace*, além da tampa de borracha e do lacre de alumínio.

Ao longo da fermentação, foram coletadas amostras de 2 mL do meio de cultivo, para acompanhamento da fermentação e estimativa de parâmetros cinéticos.

4.4.1. Acompanhamento da fermentação

4.4.1.1. Quantificação celular e pH

O crescimento celular foi monitorado por medidas de densidade ótica do meio a 600 nm (DO₆₀₀), utilizando o espectrofotômetro UV-M51 (BEL Engineering).

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos, os valores de DO₆₀₀ foram convertidos em concentração de massa celular seca, por meio de uma correlação matemática determinada

experimentalmente por nosso grupo de pesquisa, que resultou na expressão representada a seguir (Equação 1).

Equação 1 - Expressão matemática experimentalmente determinada para a conversão de densidade ótica (y, sem unidade) em concentração de massa celular seca (x, mg L⁻¹)

$$y = 0,0024 x$$

O pH foi monitorado utilizando o medidor de pH mPA-210 (MS TECNOPON Instrumentação), devidamente calibrado com soluções padrão de pH 4, 7 e 10.

4.4.1.2. Quantificação do substrato e produtos de fermentação

A concentração de glicerol e de bioproductos ao longo da fermentação foi determinada por cromatografia gasosa (GC), utilizando o cromatógrafo GC-2014 (Shimadzu, Japão) equipado com uma coluna capilar polimérica Stabilwax®-DA (30 m de comprimento, 0,25 µm de espessura do filme e 0,25 mm de diâmetro) e detector de ionização por chama (*flame ionization detector* - FID).

O método de análise foi descrito por EGOBURO et al. (2017) e se inicia com o preparo da amostra: 250 µL de amostra do meio de cultivo, adicionados à 750 µL de etanol (com pureza apropriada para análise por GC) e agitação por 1 minuto. Em seguida, a solução é centrifugada a 4000 rpm por 4 minutos e filtrada utilizando membrana de 0,22 µm, sendo finalmente transferida ao frasco de análise.

A injeção é realizada de forma automática utilizando o amostrador AOC-20i (Shimadzu, Japão). São injetados 2 µL de amostra, com *split* de 30:1. O injetor é aquecido a 300 °C e o detector FID a 290 °C. O gás de arraste utilizado foi o N₂, com um fluxo de 2,5 mL min⁻¹.

Realizou-se um gradiente de temperatura na coluna ao longo da análise, sendo inicialmente mantida a 185 °C por 3 min, em seguida aumentando para 220 °C (taxa de aquecimento de 40 °C min⁻¹), permanecendo nesta temperatura por 1 min. O tempo de corrida para cada amostra foi de 5,4 min.

As concentrações de cada composto nas amostras foram determinadas pelo método de calibração externa, utilizando soluções padrão com concentrações conhecidas, preparadas com reagentes Sigma-Aldrich. As faixas de concentração de cada composto empregadas nas

soluções padrão foram: glicerol, 10 a 1000 mmol L⁻¹; ácido acético, 6 a 650 mmol L⁻¹; ácido butírico, 4 a 450 mmol L⁻¹; e 1,3-PDO, 5 a 500 mmol L⁻¹.

Além disso, as concentrações totais de cada ácido orgânico (C_{total}) determinadas por GC foram utilizadas para o cálculo das concentrações de ácidos não dissociados (C_{HA}) (Equação 2). Para isso, utilizou-se a equação de Henderson-Hasselbalch, considerando os valores de pKa (a 35 °C) de 4,75 e 4,83 para os ácidos acético e butírico, respectivamente (MADDOX *et al.*, 2000).

Equação 2 - Cálculo da concentração de ácido orgânico não dissociado, utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch.

$$C_{HA} = \frac{C_{total}}{1 + 10^{(pH-pKa)}}$$

4.4.2. Parâmetros cinéticos dos ensaios fermentativos

Após a quantificação do substrato e produtos por GC, os dados obtidos foram utilizados para o cálculo da velocidade específica de crescimento (μ , h⁻¹). Inicialmente, os valores de DO₆₀₀ são convertidos em concentração de massa celular seca, utilizando a Equação 1. Em seguida, faz-se o ajuste de uma curva sigmoideal, utilizando a equação de Boltzmann, aos valores de concentração celular (X , mg L⁻¹) em função do tempo (t , h). A velocidade de crescimento (r_x , mg L⁻¹ h⁻¹) é obtida a partir da derivada de primeira ordem de $X = f(t)$ (Equação 3). Em seguida, a velocidade específica de crescimento (μ , h⁻¹) é calculada pela divisão da velocidade de crescimento (r_x , mg L⁻¹ h⁻¹) pela concentração celular (X , mg L⁻¹) (Equação 4). A partir do gráfico de velocidade específica de crescimento (μ , h⁻¹) em função do tempo (t , h) pode-se determinar a velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max} , h⁻¹).

Equação 3 - Determinação da velocidade de crescimento (r_x).

$$r_x = \frac{dX}{dt}$$

Equação 4 - Cálculo da velocidade específica de crescimento (μ).

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$$

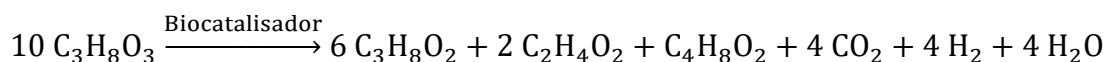
Outro parâmetro cinético calculado foi o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), utilizando a Equação 5.

Equação 5 - Expressão matemática para determinação do fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$)

$$Y_{(P/S)} = \frac{\text{Concentração de produto obtida ao final do ensaio (mmol L}^{-1}\text{)}}{\text{Concentração de substrato consumido ao final do ensaio (mmol L}^{-1}\text{)}}$$

Esse parâmetro é determinado experimentalmente, de acordo com os resultados obtidos. Porém, um valor teórico máximo também pode ser calculado, de acordo com a estequiometria envolvida no processo (Equação 6) (BIEBL *et al.*, 1992). Neste caso, o glicerol ($C_3H_8O_3$) consumido por *Clostridium* é principalmente convertido em 1,3-PDO ($C_3H_8O_2$), ácido acético ($C_2H_4O_2$) e ácido butírico ($C_4H_8O_2$). Portanto, o valor de $Y_{P/S}$ teórico máximo é 0,6 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol, ou 0,50 g 1,3-PDO g⁻¹ glicerol.

Equação 6 - Reação estequiométrica da biossíntese de 1,3-PDO e subprodutos, a partir de glicerol



Utilizando os valores de $Y_{P/S}$ experimental e teórico máximo, é possível calcular a eficiência do processo (Equação 7).

Equação 7 - Cálculo da eficiência (%) de conversão de substrato em produto

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{Y_{P/S} \text{ experimental}}{Y_{P/S} \text{ teórico máximo}} \times 100$$

Finalmente, também foi calculada a produtividade, que expressa a obtenção do produto por unidade de tempo (Equação 8). É calculada considerando a variação da concentração do produto (ΔP) em determinado intervalo de tempo (Δt).

Equação 8 - Cálculo da produtividade (mmol L⁻¹ h⁻¹)

$$\text{Produtividade (mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

Para calcular a incerteza referente a cada um dos parâmetros cinéticos, inicialmente foi calculado o desvio padrão (Δx , Δy) da média de concentração de cada composto. Em seguida, os erros foram propagados (Δz) de acordo com a operação matemática realizada para o cálculo do parâmetro cinético: adição ou subtração (Equação 9); multiplicação ou divisão (Equação 10).

Equação 9 - Propagação de erros em operações de adição ou subtração.

$$\Delta z = \sqrt{(\Delta x)^2 + (\Delta y)^2 + \dots}$$

Equação 10 - Propagação de erros em operações de multiplicação ou divisão.

$$\Delta z = \left(\sqrt{\left(\frac{\Delta x}{x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta y}{y}\right)^2 + \dots} \right) \cdot z$$

4.4.3. Balanço de carbono

O balanço de carbono foi calculado considerando: a quantidade total de glicerol consumida pelos microrganismos no ensaio; a concentração total obtida de cada produto (ácido acético, ácido butírico e 1,3-propanodiol); e a variação da concentração celular ao longo do ensaio. Em seguida, cada valor de concentração foi convertido em concentração de carbono total, considerando o número de mols de carbono presente em cada um dos compostos: glicerol (3C), ácido acético (2C) e ácido butírico (4C). A quantidade de carbonos referente à massa celular pode ser obtida pela fórmula mínima $C_4H_7O_2N$ (BIEBL, 2001), equivalendo a 4C.

Finalmente, calculou-se a recuperação de carbono (%) de acordo com a Equação 11.

Equação 11 - Cálculo da recuperação de carbono (%)

$$\text{Recuperação de carbono (\%)} = \frac{\text{Concentração de C (mmol L}^{-1}\text{) dos produtos}}{\text{Concentração de C (mmol L}^{-1}\text{) do glicerol consumido}} \times 100$$

4.5. Quantificação da expressão gênica absoluta

Durante a fase exponencial de crescimento dos microrganismos, foram coletadas amostras do meio de cultivo para armazenamento das células e posterior análise da expressão gênica absoluta de algumas das principais enzimas do metabolismo do glicerol. Esta etapa foi

realizada em colaboração com o laboratório coordenado pela Profa. Dra. Taísa Magnani Dinamarco (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo) e também com o laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Sergio Akira Uyemura (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo).

4.5.1. Armazenamento e conservação das células

Ao alcançar a fase exponencial de crescimento, foram coletados 5 mL do meio de cultivo, que foram centrifugados em tubos criogênicos de 5 mL a 12000 g e 4 °C por 20 minutos. Utilizando ponteiras com filtro e livres de RNases, todo o sobrenadante foi imediatamente removido do *pellet* de células e o tubo criogênico foi congelado em nitrogênio líquido, para armazenamento a curto prazo. Caso necessário, o armazenamento a longo prazo foi realizado em freezer a -80 °C.

4.5.2. Extração do RNA total e verificação de integridade

O RNA total das células coletadas foi extraído utilizando-se o *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen), de acordo com a seção dedicada a células bacterianas. Este protocolo consiste em duas etapas: 1) Lise e Homogeneização; 2) Ligação, Lavagem e Eluição. Na primeira etapa, o *pellet* de células é tratado com uma solução de lisozima, preparada antes da extração e de uso imediato; além de um tampão de lise celular, fornecido pelo kit. Utilizou-se um homogeneizador de amostras diretamente em cada tubo, a 20000 rpm por 20 segundos, para lise das células e mistura dos reagentes. Na segunda etapa, o homogeneizado celular resultante é submetido a sucessivas centrifugações em tubos contendo membranas na qual o RNA se adere, permitindo o tratamento com tampões de lavagem, para purificação do RNA obtido. Por fim, efetua-se a eluição do RNA aderido à membrana utilizando-se água livre de RNases. O RNA obtido foi quantificado utilizando-se o NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific), com 1 µL da solução de RNA.

Após a extração e quantificação do RNA total, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1 % m/v) em condições desnaturantes, para avaliar a integridade do material genético extraído. As amostras para a eletroforese foram preparadas utilizando-se 1000 ng (ou 1 µg) de RNA. Adicionou-se o corante de ácidos nucleicos Gel Red®, que emite fluorescência quando iluminado com radiação UV, possibilitando a revelação do gel; além disso, também foi utilizado o tampão de carregamento 5X (composição descrita na Tabela 4),

que permite monitorar o progresso da eletroforese e fornece as condições ideais para migração dos fragmentos de RNA no gel. Os componentes e quantidades utilizados no preparo das amostras encontram-se dispostos na Tabela 5. A eletroforese foi realizada utilizando o tampão MOPS 1X pH 7,0, preparado a partir do tampão MOPS 10X pH 7,0, cuja composição é descrita na Tabela 6. Como referência, foi utilizado o *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 4 - Composição do tampão de carregamento 5X (para amostras de RNA)

Componente	Proporção
Formamida	52,8 % (v/v)
Tampão MOPS 10X pH 7,0	10,5 % (v/v)
Formaldeído	16,9 % (v/v)
Glicerol	7,0 % (v/v)
Azul de bromofenol	5,6 % (m/v)
Água livre de nucleases	Suficiente para completar 100 %

Tabela 5 - Componentes utilizados no preparo das amostras de RNA para análise por eletroforese em gel de agarose (1 % m/v)

Componente	Quantidade
RNA	1000 ng
Tampão de carregamento 5X	3 µL
Gel Red® 1:500	2 µL
Água livre de nucleases	Suficiente para completar 15 µL

Tabela 6 - Composição do tampão MOPS 10X pH 7,0

Componente	Concentração (mmol L ⁻¹)
MOPS	200
Acetato de sódio	50
EDTA 0,25 M pH 8,0	10
NaOH sólido	Suficiente para pH 7,0

Obs.: armazenar o tampão MOPS 10X pH 7,0 em frasco âmbar.

A eletroforese foi realizada a 100 V, por aproximadamente 30 minutos, sendo o gel posteriormente revelado utilizando o Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad).

4.5.3. Tratamento com DNase

Após confirmar a integridade do RNA, realizou-se o tratamento com DNase, para eliminar possíveis moléculas de DNA presentes em solução. Para isso, utilizou-se o kit DNase I, *Amplification Grade* (Invitrogen). O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, no qual adicionam-se os componentes descritos na Tabela 7 (para o tratamento de 1 µg de RNA).

Tabela 7 - Componentes utilizados para o tratamento com DNase

Componente	Quantidade
RNA	1 µg
10X DNase I Reaction Buffer	1 µL
DNase I, 1 U µL ⁻¹	1 µL
Água livre de nucleases	Suficiente para completar 10 µL

Após a adição dos componentes, a solução foi incubada em temperatura ambiente, por 15 min. Em seguida, adicionou-se 1 µL de EDTA 25 mmol L⁻¹ (para 1 µg de RNA inicial) e o meio reacional foi aquecido a 65 °C, por 10 min, finalizando o procedimento.

4.5.4. Síntese do cDNA

Como a PCR somente pode ser realizada com DNA, é necessário sintetizar moléculas de DNA complementares (cDNA) ao RNA extraído anteriormente. Para isso, utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems).

De acordo com o protocolo, partindo de 10 µL da solução de RNA (que, neste volume, deve conter até 2 µg de RNA), devem ser utilizados 10 µL do RT *master mix*, totalizando 20 µL de volume final da reação.

As quantidades necessárias para o preparo do RT *master mix*, por reação, estão descritas na Tabela 8. Ao preparar o *master mix*, foram consideradas algumas reações adicionais, isto é, preparou-se quantidade superior à necessária, devido a eventuais perdas de volume durante as transferências de reagentes.

Tabela 8 - Reagentes necessários para a síntese do cDNA, por reação

Componente	Volume (μL)
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0
Água livre de nucleases	4,2
Total por reação	10,0

Após preparar o meio reacional (10 μL da solução de RNA + 10 μL do RT master mix), as amostras foram levadas ao termociclador C1000 Touch™ (Bio-Rad), com o seguinte programa de temperaturas (Tabela 9).

Tabela 9 - Programa de temperaturas empregado na síntese do cDNA

Parâmetro	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa	4ª Etapa
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	37	85	4
Tempo (min)	10	120	5	∞

O cDNA sintetizado foi quantificado utilizando-se o NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific), com 1 μL da solução de cDNA.

4.5.5. PCR em tempo real (qPCR)

Para a realização da qPCR, foram adquiridas sondas e *primers* para os genes de interesse, utilizando *Custom TaqMan™ Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). Como foram avaliadas duas espécies diferentes de *Clostridium*, os *primers* foram sintetizados separadamente para cada microrganismo. As enzimas-alvo, bem como os *primers* e sondas sintetizados para cada cepa encontram-se descritos nas Tabela 10 e Tabela 11.

Tabela 10 - Enzimas selecionadas para a quantificação da expressão gênica absoluta em *C. beijerinckii* Br21

Enzima	Primers (5' 3')	Reporter 1 (5' 3')
DNA girase (normalizador)	FW: AGATGTTGTGATAACATTAACACATTCAGGAT R: GCTTGAATTCCTTTCCACCTCTTC	TCTGCCGAAATTCTT
Glicerol quinase	FW: CAGGAGGCGTTAGAGTTCCAATAG R: TGTCCAAATAGAGCGCATTGTTGA	TCCCCTGCCATACCTG
Glicerol-3P desidrogenase	FW: TGGTGCAACTGATATTTTAGCATAGTGA R: AAAGAGTCAATAATTAATATATTTACAGAAGTATATAGCGAAAATGA	CCGGCCTCTAAATTA
1,3-propanodiol desidrogenase	FW: GGACGCTTAACTCATGCAATTGAA R: CTTGTATTGCTGAAGCATCTGTCA	CCGGATTGTCATCTTT

Tabela 11 - Enzimas selecionadas para a quantificação da expressão gênica absoluta em *C. pasteurianum* DSM 525

Enzima	Primers (5' 3')	Reporter 1 (5' 3')
DNA girase (normalizador)	FW: AGCACTTGACCATATTGATGAAGTAATAAGTATAATAAG R: CTGATTGCTTTTCAGAAAGACTAAATGCT	CCGCTTCACGAACTGT
Glicerol-3P desidrogenase	FW: GGAGTTGAAATAGGAGGTGCAGTTAAAA R: CAGCTTTGGTATTATCACCGTAACC	TCCATCACAAATTCC
1,3-propanodiol desidrogenase	FW: GCCTTAACTCATGCCATAGAGTCCTA R: TTATTGCTTGATAGCTAAGGCATCTGTT	CTGGGTTTGCATCTTT

O cDNA sintetizado foi diluído para 100 ng μL^{-1} após a quantificação. Em seguida, utilizou-se o *TaqMan™ Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) para o preparo das amostras, em placas de reação de 96 poças (*MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate*, Biosystems). Seguindo o protocolo fornecido pelo kit, as reações foram preparadas em triplicata para cada amostra de cDNA obtida, de acordo com as quantidades na

Tabela 12. Além disso, preparamos amostras NTC (*No Template Control*) substituindo a solução de cDNA por água, como controle negativo da reação.

Tabela 12 - Volumes dos reagentes utilizados no preparo das amostras para a qPCR

Componente	Volume (μL)
Solução de cDNA $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$	1,0
TaqMan™ Universal PCR Master Mix (2X)	5,0
TaqMan™ Gene Expression Assay (20X)	0,5
Água livre de nucleases	3,5
Total por reação	10,0

Em seguida, as placas de reação foram lacradas com *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems), para evitar a evaporação das amostras. A reação foi realizada no termociclador Mastercycler® RealPlex 4S (Eppendorf, Alemanha) utilizando o programa de temperaturas listado na Tabela 13.

Tabela 13 - Programa de temperaturas empregado na qPCR

Parâmetro	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa	4ª Etapa
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	50	95	95	60
Tempo (min:s)	02:00	10:00	00:15	01:00
Número de ciclos	1	1	40	40

A expressão gênica foi obtida por quantificação absoluta utilizando-se uma curva analítica de DNA relativa a cada enzima, com número de cópias do gene alvo situadas entre 10^7 e 10^1 .

4.6. Superexpressão homóloga dos genes *dhaB1*, *dhaB2*, *CoT* e *dhaT* em *C. beijerinckii* Br21

Esta etapa da pesquisa foi realizada em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Peter Dürre (Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm, Alemanha), sob financiamento da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) FAPESP (Processo 2021/06757-2). Neste caso, alguns dos procedimentos foram efetuados de maneira diferente da descrita anteriormente, conforme os métodos utilizados pelos parceiros alemães. Portanto, serão novamente detalhados.

4.6.1. Amplificação do *cluster* de genes de 1,3-PDO

De acordo com o genoma da cepa *C. beijerinckii* Br21 disponível no banco de dados DDBJ/ENA/GenBank (número de acesso: MWMH000000000), os genes *dhaB1*, *dhaB2* e *dhaT* estão aglomerados em sequência (Figura 6), com um gene *CoT* adicional (locus tag: CBEIBR21_22770) entre *dhaB2* e *dhaT*, que codifica a enzima cobalamina adenosiltransferase. Essa sequência de quatro genes possui 5015 bp.

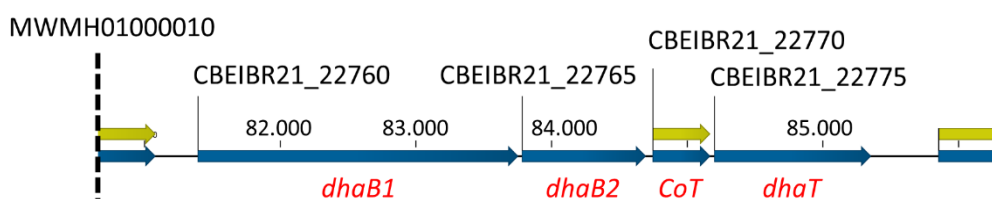


Figura 6 - Representação esquemática dos genes aglomerados relacionados à via reductiva de síntese do 1,3-PDO. *dhaB1*: gene codificante da subunidade grande do complexo enzimático da glicerol desidratase (locus tag: CBEIBR21_22760); *dhaB2*: gene codificante da subunidade pequena do complexo enzimático da glicerol desidratase (locus tag: CBEIBR21_22765); *CoT*: gene codificante da enzima cobalamina adenosiltransferase (locus tag: CBEIBR21_22770); *dhaT*: gene codificante da enzima 1,3-propanodiol desidrogenase (locus tag: CBEIBR21_22775).

Para a amplificação do *cluster* de genes de 1,3-PDO, DNA genômico foi inicialmente extraído de *C. beijerinckii* Br21. Para isso foi utilizado o *MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit* (Epicentre Biotechnologies). Os *primers* necessários para a amplificação (Tabela 14) do *cluster* de genes de 1,3-PDO foram desenhados utilizando a ferramenta *NEBuilder® Assembly Tool* (<https://nebuilder.neb.com>) e sintetizados pela empresa *Biomers GmbH* (Ulm, Baden-Württemberg, Alemanha). A temperatura de anelamento dos *primers* informada pela ferramenta online foi de 56 °C. Uma PCR em gradiente foi realizada, variando-se a temperatura de anelamento em 56 ± 5 °C. A PCR foi efetuada utilizando *CloneAmp™ HiFi PCR Premix* (Clontech), com o programa de temperaturas listado na Tabela 15. Um controle negativo também foi preparado, substituindo o DNA genômico da reação por água.

Após a PCR, realizou-se a eletroforese em gel de agarose (0,8 % m/v) e tampão TAE 1X, para confirmar a obtenção do fragmento de tamanho correto (5015 bp).

Tabela 14 - Primers utilizados para a amplificação do *cluster* de genes de 1,3-PDO e sequenciamento do plasmídeo pMTL83251_*P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster*

Nome	Sequência (5' 3')	Aplicação
dhaB1/2CoTdhaT.fwd	TTAAATTTAAAGGGAGGACTCTAGAATGATAAGTAAAGGATTAG TACC	Amplificação do <i>cluster</i> de genes de 1,3-PDO
dhaB1/2CoTdhaT.rev	GCAGGCTTCTTATTTTTATGCTAGCTTAATAAGCAGCTTTAAATAT ATTACG	
Seq1	GGAGCTGGTGAAGTACAT	Sequenciamento do plasmídeo pMTL83251_ <i>P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster</i>
Seq2	GAAACAGAAGGTCAACCG	
Seq3	GCGTGCAATCATTTTGG	
Seq4	AGGGAAAAGCCTTCAAGA	
Seq5	CCATCGGCATTAAGGT	
Seq6	GATTTTGCAGTGGAGCTT	
Seq7	TCCAAACATTCAGCCAGG	
Seq8	CCAGCAGGATTAACAGCA	
27f	ATAAGCTTGGATCCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Amplificação do gene 16S rRNA
1492r	ACTCGAGGATATCGGTTACCTTGTTACGACTT	

Tabela 15 - Programa de temperaturas empregado na amplificação do *cluster* de genes de 1,3_PDO

Parâmetro	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa	4ª Etapa	5ª Etapa	6ª Etapa
Temperatura (°C)	98	98	56	72	72	4
Tempo (min:s)	02:00	00:10	00:15	02:30	10:00	∞
Número de ciclos	1	33	33	33	1	

4.6.2. Construção e replicação do pMTL83251_*P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster*

O esqueleto (ou “*backbone*”) utilizado na construção do plasmídeo contendo o *cluster* de genes de 1,3-PDO foi o pMTL83251 (Figura 7a), descrito por HEAP et al., 2009. O promotor constitutivo utilizado foi o *P_{pta-ack}* (gene da fosfotransacetilase-acetato quinase), derivado de *Clostridium ljungdahlii*. Partindo de outro plasmídeo, pMTL83251_*P_{pta-ack}_1,3-propanediol_CLOBI* (Figura 7b) (SCHOCH, não publicado), recuperou-se o esqueleto contendo o promotor utilizando as enzimas de restrição *FastDigest*® *Bsp119I*, *NheI* e *XbaI* (Thermo Fisher Scientific) e *Zymoclean*™ Gel DNA Recovery Kit. Antes

da clonagem, ambos os fragmentos de DNA (esqueleto e cluster de genes de 1,3-PDO) foram purificados utilizando o *DNA Clean & Concentrator*[®]-5 (Zymo Research Corporation). Em seguida, a reação de clonagem foi efetuada utilizando o *NEBuilder*[®] *HiFi DNA Assembly Master Mix* (Clontech), para junção do esqueleto com o cluster de genes de 1,3-PDO, resultando em pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster (Figura 7c). As sequências gênicas dos três plasmídeos citados acima estão reportadas no Anexo 1.

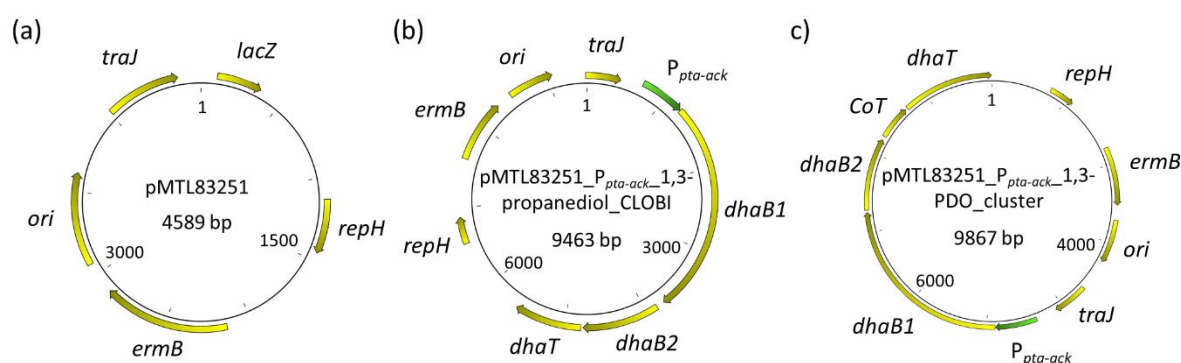


Figura 7 - pMTL83251 (a), pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-propanediol_CLOBI (b) e pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster (c). *ori*: replicon de bactérias gram-negativas, derivado do plasmídeo ColeI1; *traJ*: gene de transferência conjugativa do plasmídeo; *lacZ*: gene codificante da enzima β-galactosidase; *repH*: replicon de bactérias gram-positivas pCB102, de *C. butyricum*; *ermB*: gene de resistência a eritromicina (ou claritromicina, para anaeróbios); *P_{pta-ack}*: gene da fosfotransacetilase-acetato quinase, utilizado como promotor constitutivo; *dhaB1*: gene codificante da subunidade grande do complexo enzimático da glicerol desidratase (locus tag: CBEIBR21_22760); *dhaB2*: gene codificante da subunidade pequena do complexo enzimático da glicerol desidratase (locus tag: CBEIBR21_22765); *CoT*: gene codificante da enzima cobalamina adenosiltransferase (locus tag: CBEIBR21_22770); *dhaT*: gene codificante da enzima 1,3-propanodiol desidrogenase (locus tag: CBEIBR21_22775).

4.6.2.1. Preparo das células competentes de *E. coli* XL1-Blue MRF'

O plasmídeo pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster foi transformado em *E. coli* XL1-Blue MRF' para amplificação. Inicialmente, foi realizado o preparo das células competentes deste microrganismo. Para isso, foram inoculados 10 tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB com *E. coli* XL1-Blue MRF'. Cada um dos tubos de meio LB foi suplementado com tetraciclina 10 µg mL⁻¹. Após incubação a 37 °C e 200 rpm por 18 h, o meio de cultura dos 10 frascos foi unido e transferido a um tubo Falcon de 50 mL, para ser utilizado como inóculo na próxima etapa.

Essa cultura foi então utilizada para o inóculo de 250 mL de meio SOB em erlenmeyer de 1 L, que é preparado em duas soluções autoclavadas separadamente (SOB 1: triptona 40 g L⁻¹, extrato de levedura 10 g L⁻¹, KCl 0,38 g L⁻¹, NaCl 1,16 g L⁻¹; SOB 2: MgSO₄.7H₂O 4,88 g L⁻¹, MgCl₂.6H₂O 4,06 g L⁻¹), sendo misturadas no momento do inóculo. Este meio também foi suplementado com tetraciclina 10 µg mL⁻¹ e foi inoculado com DO inicial de 0,1. A cultura foi incubada a 18 °C e 100 rpm, até alcançar DO entre 0,6 e 0,8 (aproximadamente 24 a 26 h de incubação).

Após o crescimento, o meio de cultura foi centrifugado a 4000 rpm e 4 °C por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o pellet de células foi suspenso em 40 mL de tampão TB, que também é preparado em duas soluções autoclavadas separadamente (TB 1: PIPES 6,05 g L⁻¹, CaCl₂ 3,33 g L⁻¹, ajustar para pH 6,7 com KOH 2 mol L⁻¹; TB 2: KCl 37,28 g L⁻¹, MnCl₂.4H₂O 13,76 g L⁻¹) que são misturadas ao utilizar. A suspensão de células em tampão TB foi mantida em gelo por 10 min. Em seguida, foi novamente centrifugada a 4000 rpm e 4 °C por 10 min, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* de células foi finalmente suspenso em 10 mL de tampão TB e a esta solução adicionou-se 1,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Alíquotas de 200 µL foram distribuídas em microtubos de 1,5 mL e estes congelados em nitrogênio líquido. Imediatamente após o congelamento, os tubos foram armazenados em freezer a -80 °C.

4.6.2.2. Transformação de *E. coli* XL1-Blue MRF' com pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster

A transformação de *E. coli* XL1-Blue MRF' com o plasmídeo construído foi realizada utilizando uma das alíquotas de células competentes preparadas anteriormente. O tubo foi removido do freezer a -80 °C e permaneceu em gelo até o completo descongelamento das células. Foram adicionados 5 µL da solução do plasmídeo construído e a mistura foi mantida em gelo por 15 min. Após, a solução foi aquecida a 42 °C por 1 min, novamente seguido de incubação no gelo por 15 min. Finalmente, foram adicionados 800 µL de meio LB e o tubo foi incubado a 37 °C e 600 rpm por 45 min, para regeneração das células.

Após a regeneração das células, o meio foi centrifugado a 5000 g por 3 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* de células foi ressuspenso em 200 µL de meio LB fresco e essa suspensão celular foi então utilizada para o inóculo de uma placa contendo meio LB (1.5 % ágar) suplementado com eritromicina 250 µg mL⁻¹. A placa foi incubada a 37 °C por 1 a 2 dias, para crescimento das colônias.

4.6.3. Verificação do pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster

Após a obtenção de *E. coli* XL1-Blue MRF' [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster], foram coletadas e replicadas 12 colônias para a verificação do plasmídeo. Estas foram propagadas individualmente em meio LB por 18 h a 37 °C e 200 rpm, para a extração do DNA plasmidial utilizando o ZypTM Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research Corporation). Além disso, foram inoculadas em uma nova placa contendo meio LB sólido, que foi utilizada como estoque das colônias.

Para confirmar o correto tamanho do plasmídeo construído pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster, o DNA plasmidial foi utilizado em uma digestão controle com as enzimas de restrição *Pvu*II e *Xba*I, que resultaria nos fragmentos de 6445 e 3422 bp.

Em seguida, as amostras de DNA plasmidial que geraram os fragmentos de tamanho correto foram enviadas para sequenciamento na empresa *Microsynth Seqlab GmbH* (Göttingen, Niedersachsen, Alemanha). A reação de sequenciamento foi direcionada para a região do *cluster* de genes de 1,3-PDO do plasmídeo, utilizando os primers (Biomers GmbH, Ulm, Baden-Württemberg, Alemanha) listados na Tabela 14.

Finalmente, selecionou-se uma das colônias de *E. coli* XL1-Blue MRF' [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster] que apresentou o correto tamanho do plasmídeo e ausência de mutações como fonte do plasmídeo pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster.

4.6.4. Transformação de *C. beijerinckii* Br21 com pMTL83251 e pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster

Além da transformação desejada com o plasmídeo de superexpressão homóloga dos genes de 1,3-PDO, *C. beijerinckii* Br21 também foi transformado com o plasmídeo vazio sem o promotor, pMTL83251, sendo este utilizado como controle negativo da superexpressão gênica.

A transformação de *C. beijerinckii* Br21 com o plasmídeo pMTL83251 foi efetuada de acordo com o protocolo descrito por LITTLE et al., 2018. Todos os procedimentos foram realizados sob condições anaeróbias, em câmara de anaerobiose (atmosfera composta por 95 % N₂ e 5 % H₂). Quando as células alcançaram a fase de crescimento exponencial em RCM (etapa de ativação descrita no item 4.3), a cultura foi utilizada para inocular 60 mL de meio 2xYTG em frasco de 150 mL, com DO₆₀₀ inicial de 0,05. Quando a DO₆₀₀ alcançou 0,2, as

células foram centrifugadas a 2000 rpm e 4 °C, por 10 minutos. Em seguida, o *pellet* de células foi lavado com volumes decrescentes de tampão SEB gelado (sacarose 270 mmol L⁻¹, Na₂HPO₄ 7 mmol L⁻¹, NaH₂PO₄ 7 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 1 mmol L⁻¹) (LITTLE *et al.*, 2018): 40 e 20 mL, respectivamente. Finalmente, o *pellet* de células foi suspenso em 5 mL de tampão SEB gelado, contendo 10% de DMSO; alíquotas de 280 µL das células competentes foram armazenadas em freezer a -80 °C.

Para a transformação, 1 µg do DNA plasmidial foi adicionado aos 280 µL de células de *C. beijerinckii* Br21 competentes e essa solução foi transferida a uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (Bulldog Bio). Um pulso exponencial de 1,25 kV foi aplicado, com 200 Ω de resistência e 25 µF de capacitância, resultando em uma constante de tempo de 3 ms. Imediatamente após o pulso elétrico, as células foram recuperadas em tubos Hungate contendo 3 mL de meio 2xYTG. As culturas foram incubadas a 37 °C por 5 h. Após a incubação, 500 µL de cada cultura foram transferidos a novos tubos Hungate contendo meio fresco, suplementado com claritromicina 2 µg mL⁻¹. Quando observado crescimento na presença de antibiótico, 100 µL da cultura foi utilizado para inocular placas contendo meio 2xYTG com ágar 1,5% (m/v). Após incubação a 37 °C por 2 a 4 dias, as colônias foram coletadas e cultivadas em RCM, contendo claritromicina 2 µg mL⁻¹.

Para a transformação de *C. beijerinckii* Br21 com pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster, o mesmo protocolo utilizado para a transformação com pMTL83251 foi inicialmente testado. Entretanto, após 12 replicatas malsucedidas, o protocolo foi adaptado. A cultura em meio 2xYTG utilizada para preparar as células competentes de *C. beijerinckii* Br21 foi cultivada até DO₆₀₀ = 0,6, enquanto todos os outros parâmetros foram mantidos inalterados.

4.6.5. Confirmação das cepas transformadas

Para confirmar a transformação do *C. beijerinckii* Br21 com pMTL83251, o DNA genômico foi extraído de culturas incubadas *overnight*, que foram inoculadas individualmente com 3 colônias de *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251]. Em seguida, o DNA genômico extraído foi retransformado em *E. coli* XL1-Blue MRF['], para replicação e extração dos plasmídeos. Os plasmídeos foram então digeridos com *EcoRI*, que resultaria em fragmentos de 3588 e 1001 bp.

Para confirmar a transformação de *C. beijerinckii* Br21 com pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster, o DNA genômico foi extraído de culturas incubadas *overnight*, que foram inoculadas individualmente com 2 colônias de *C. beijerinckii* Br21

[pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster]. Em seguida, o DNA genômico extraído também foi retransformado em *E. coli* XL1-Blue MRF', para replicação e extração dos plasmídeos. Os plasmídeos foram então digeridos com *Pvu*II e *Xba*I, que resultaria em fragmentos de 6445 e 3422 bp.

Além disso, em ambas as transformações de *C. beijerinckii* Br21, a identidade da cepa transformada foi verificada por amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. Para a amplificação, realizou-se a extração do DNA genômico de uma cultura de *C. beijerinckii* Br21 transformado, assim como descrito no item 4.6.1. Os primers para amplificação do gene 16S rRNA foram sintetizados pela empresa *Biomers GmbH* (Ulm, Baden-Württemberg, Alemanha) e estão listados na Tabela 14. Em seguida, a PCR foi realizada utilizando *ReproFast-DNA Polymerase* (Genaxxon BioScience GmbH), com as condições listadas na Tabela 16.

Tabela 16 - Programa de temperaturas empregado na amplificação do gene 16S rRNA

Parâmetro	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa	4ª Etapa	5ª Etapa	6ª Etapa
Temperatura (°C)	95	95	55	72	72	4
Tempo (min:s)	05:00	00:30	00:30	01:30	10:00	∞
Número de ciclos	1	30	30	30	1	

Após confirmar a amplificação do fragmento de tamanho correto (1465 bp) por eletroforese em gel de agarose (0,8 % m/v) e tampão TAE 1X, o fragmento foi enviado para sequenciamento na empresa *Microsynth Seqlab GmbH* (Göttingen, Niedersachsen, Alemanha). Finalmente, o fragmento sequenciado foi alinhado ao genoma de *C. beijerinckii* Br21 e a identidade da cepa foi confirmada de acordo com o percentual de similaridade do alinhamento.

4.6.6. Estoque das cepas transformadas

Para armazenar as cepas transformadas de *C. beijerinckii* Br21 a longo prazo, foram realizados estoques para o freezer a -80 °C. Utilizando uma cultura do microrganismo, inoculou-se um frasco Hungate contendo 5 mL de RCM e este foi incubado a 37 °C sem agitação, por 18 h. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 4500 rpm e 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi imediatamente removido (para evitar a perda de células) e ao pellet de células foram adicionados 400 µL de tampão SMP (sacarose 270 mmol L⁻¹, MgCl₂ 1 mmol L⁻¹, NaH₂PO₄ 7 mmol L⁻¹, preparado de forma anaeróbica) e 200 µL de tampão *anti freezing* (60 % tampão

SMP, 40 % DMSO, pH 6). Após a suspensão das células nessa solução, o tubo Hungate foi armazenado em freezer a -80 °C. A propagação da cultura em etapas posteriores foi realizada utilizando 50 µL do estoque.

4.6.7. Ensaio cinético com as cepas transformadas

O ensaio cinético utilizando as cepas transformadas foi realizado da mesma forma descrita no item 4.3. Comparou-se o metabolismo das três variantes: *C. beijerinckii* Br21, *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] e *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster]. As cepas foram cultivadas em meio WIS (ajustado para pH = 7,2) (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 500 mmol L⁻¹. Também foram coletadas amostras periódicas de 2 mL do meio de cultivo, sendo o substrato e produtos de fermentação quantificados utilizando GC e HPLC.

4.6.7.1. Quantificação do substrato e produtos de fermentação

Neste caso, glicerol e 1,3-PDO foram quantificados por HPLC; enquanto acetato, butirato e etanol foram quantificados por GC. Para ambos os métodos, padrões de calibração externa foram utilizados para calcular as concentrações de cada componente nas amostras. Para executar as análises, as amostras do meio de cultura foram centrifugadas a 15000 rpm e 4 °C por 35 min. Em seguida, 480 µL do sobrenadante foi coletado e utilizado para a análise. Para a análise por GC, 20 µL de HCl 2 mol L⁻¹ também foi adicionado ao sobrenadante coletado.

A análise por HPLC foi executada utilizando o HPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies), equipado com a coluna *CS-Organic Acid Resin Column* 300 x 8 mm (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Nordrhein-Westfalen, Alemanha), contendo o copolímero poliestireno-divinilbenzeno como fase estacionária. A pré-coluna consistiu da mesma fase estacionária, com 40 x 8 mm de tamanho. A temperatura da coluna foi ajustada em 40 °C. Uma solução de H₂SO₄ 5 mmol L⁻¹ foi utilizada como fase móvel, com fluxo de 0,6 mL min⁻¹. Os detectores utilizados na análise foram RID e DAD/UV (210 nm). O volume de injeção foi 20 µL e o tempo de análise foi ajustado para 30 min.

A análise por GC foi executada utilizando o Clarus 600 (PerkinElmer Corp.) equipado com a coluna capilar Elite-FFAP (PerkinElmer Corp.), que possui 30 m de comprimento, 0,35 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme, contendo polietilenoglicol modificado com ácido nitrotereftálico como fase estacionária. H₂ foi utilizado como gás de

arraste, com um fluxo de $2,25 \text{ mL min}^{-1}$. O detector utilizado para a análise foi o FID, ajustado para temperatura de $300 \text{ }^\circ\text{C}$. O volume de injeção foi de $1 \text{ } \mu\text{L}$ com split de 1:20 e a temperatura do injetor foi ajustada para $225 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura da coluna variou ao longo da análise: $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min, em seguida aumentando para $250 \text{ }^\circ\text{C}$ (taxa de aquecimento de $40 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$), permanecendo nesta temperatura por 1 min. O tempo de análise foi ajustado para 7,5 min.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção de 1,3-PDO em diferentes meios de cultura

Nessa etapa inicial do trabalho, avaliou-se o metabolismo do glicerol por *C. beijerinckii* Br21 em diferentes condições nutricionais, fornecidas por diferentes de meios de cultura. Foram utilizados dois meios de cultura de composições diferentes: um meio rico em nutrientes (RCM); e outro meio, composto por apenas 3 constituintes (WIS, descrito por WISCHRAL et al., 2015). Originalmente, o RCM apresenta como substrato 5 g L⁻¹ de glicose, porém este foi alterado para glicerol 450 mmol L⁻¹, concentração que foi selecionada com base em outros estudos efetuados em nosso laboratório (MERMEJO et al., 2022). Como comparação ao nosso isolado, empregamos *C. pasteurianum* DSM 525, por trata-se de uma cepa muito reportada em estudos da biossíntese de 1,3-PDO a partir de glicerol (DABROCK; BAHL; GOTTSCHALK, 1992; GALLARDO; ALVES; RODRIGUES, 2017; LEE et al., 2015; VERAS et al., 2019).

Analisando a cinética de crescimento e formação de 1,3-PDO por ambas as cepas em RCM (Figura 8), nota-se que a cepa Br21 apresenta rápido crescimento, sem ou com curta fase lag (Figura 8a). Em contrapartida, a cepa DSM 525 apresentou maior fase lag, iniciando o crescimento em 5 h de fermentação. Esta observação é corroborada comparando-se as velocidades específicas de crescimento (Figura 9). A cepa Br21 apresentou maior valor máximo (0,47 h⁻¹), em menor intervalo de tempo (1,4 h), em comparação à cepa DSM 525 (0,43 h⁻¹ e 5,3 h, respectivamente).

O rápido crescimento se estende ao decaimento do pH (Figura 8b), que é inicialmente mais acentuado para a cepa Br21. Entretanto, a cepa DSM 525 apresentou maior concentração celular final (DO ≈ 6,5), bem como menor pH final (pH ≈ 4,6).

O crescimento distinto entre as duas cepas pode ser explicado pelo diferente perfil de produtos do metabolismo observado na Figura 8c, Figura 8d, Figura 8e e Figura 8f. Enquanto a cepa DSM 525 consumiu aproximadamente 50 % do glicerol adicionado (Figura 8c), a cepa Br21 consumiu apenas 12 %. Entretanto, na Figura 8e, observa-se que o *C. beijerinckii* Br21 consumiu o acetato presente no meio de cultura, em detrimento do glicerol adicionado como fonte de carbono, com formação de 30 mmol L⁻¹ de ácido butírico (Figura 8f). Além disso, o RCM, por se tratar de um meio bem nutritivo fornece ao microrganismo outros carboidratos, que também estão presentes no extrato de levedura, triptona e peptona

(RODRIGUES, 2021), consumidos preferencialmente pelo *C. beijerinckii* Br21, em detrimento do glicerol. Com isso, não houve a formação de 1,3-PDO pela cepa Br21 neste meio de cultura, no período do ensaio (Figura 8d). Ao contrário, o *C. pasteurianum* DSM 525 produz 1,3-PDO (14 mmol L⁻¹), conforme o esperado. Porém, a concentração de acetato permanece constante e com concentração de ácido butírico (13 mmol L⁻¹) menor que a cepa Br21.

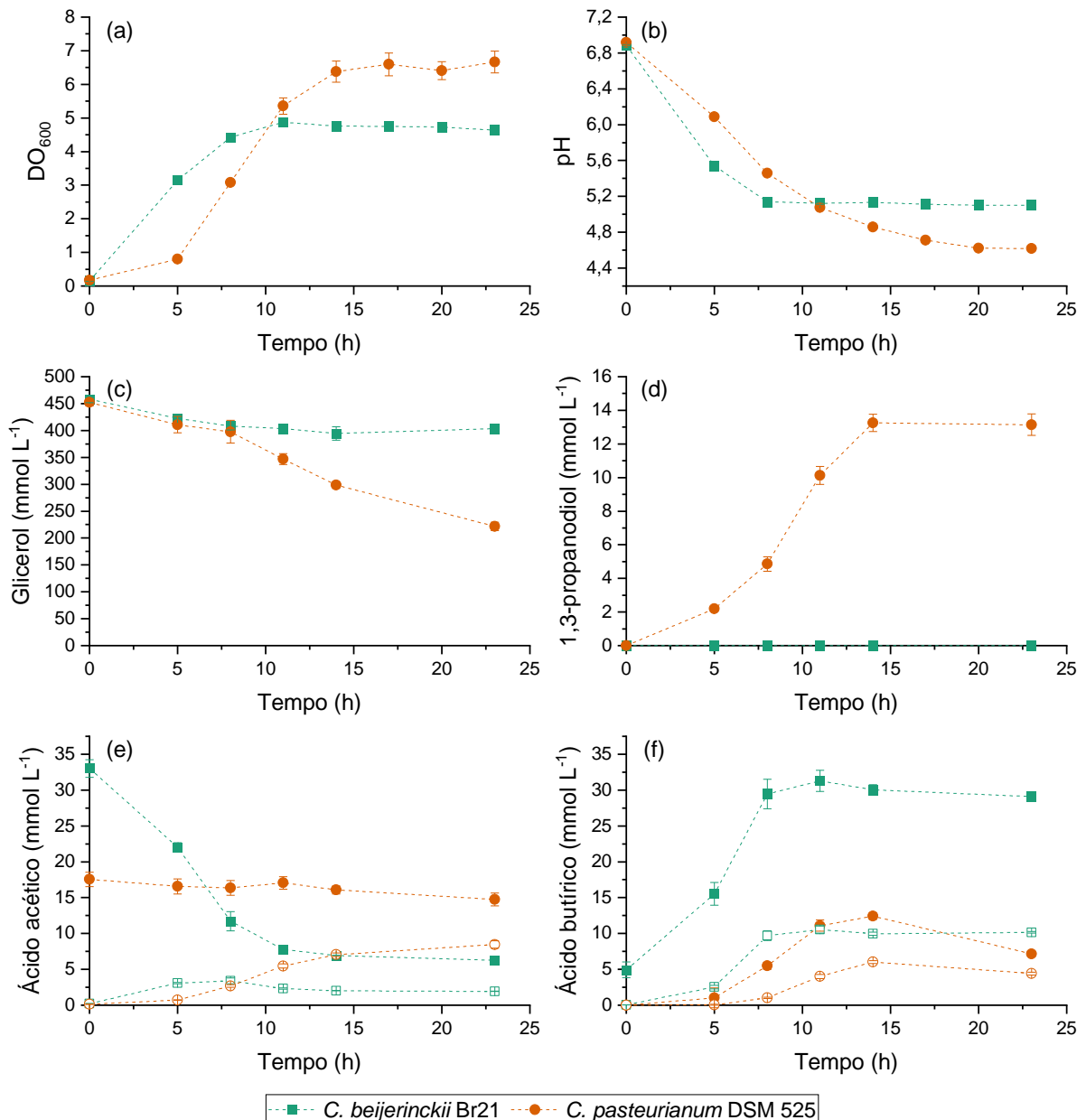


Figura 8 - Ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em RCM, contendo glicerol 450 mmol L⁻¹. (a) DO_{600} ; (b) pH; e concentrações de (c) glicerol, (d) 1,3-propanodiol, (e) ácido acético e (f) ácido butírico. Nos gráficos dos ácidos acético e butírico, os símbolos com preenchimento representam as concentrações totais de ácido, enquanto os símbolos sem preenchimento representam as concentrações de ácido não dissociado.

Possivelmente, ocorre um efeito de repressão catabólica em *C. beijerinckii* Br21, que inibe o consumo de glicerol, consequentemente impedindo a biossíntese de 1,3-PDO; nota-se que este efeito não é observado em *C. pasteurianum* DSM 525. A repressão catabólica por carboidratos presentes em fontes complexas constituintes do meio de cultura foi observada em *Clostridium diolis* (XIN *et al.*, 2016) e também inibiu o consumo de glicerol. Atualmente, *C. diolis* é classificado como *C. beijerinckii* (POEHLEIN *et al.*, 2017). Aparentemente, ao ser cultivado em RCM, *C. beijerinckii* Br21 está exposto a possíveis agentes de repressão catabólica presentes no extrato de levedura e peptona, tais como os carboidratos.

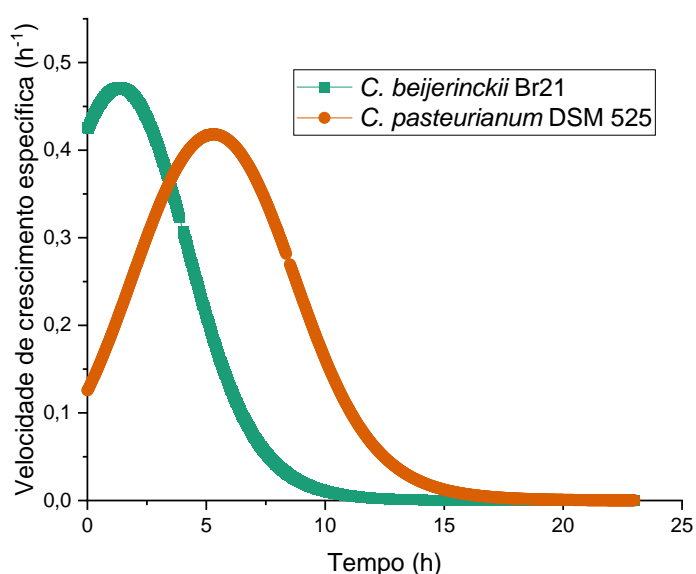


Figura 9 - Velocidades específicas de crescimento no ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em RCM, contendo glicerol 450 mmol L⁻¹.

Portanto, constatou-se que o RCM, rico em nutrientes, não é um meio adequado para síntese de 1,3-PDO por *C. beijerinckii* Br21. Para direcionar o metabolismo da cepa Br21 à produção desse composto, realizamos um novo ensaio empregando o meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), cuja composição contém glicerol 400 mmol L⁻¹, além de K₂HPO₄ 5 g L⁻¹, extrato de levedura 0,5 g L⁻¹ e acetato de sódio 0,005 g L⁻¹. Novamente, comparamos o metabolismo do *C. beijerinckii* Br21 com *C. pasteurianum* DSM 525 (Figura 10).

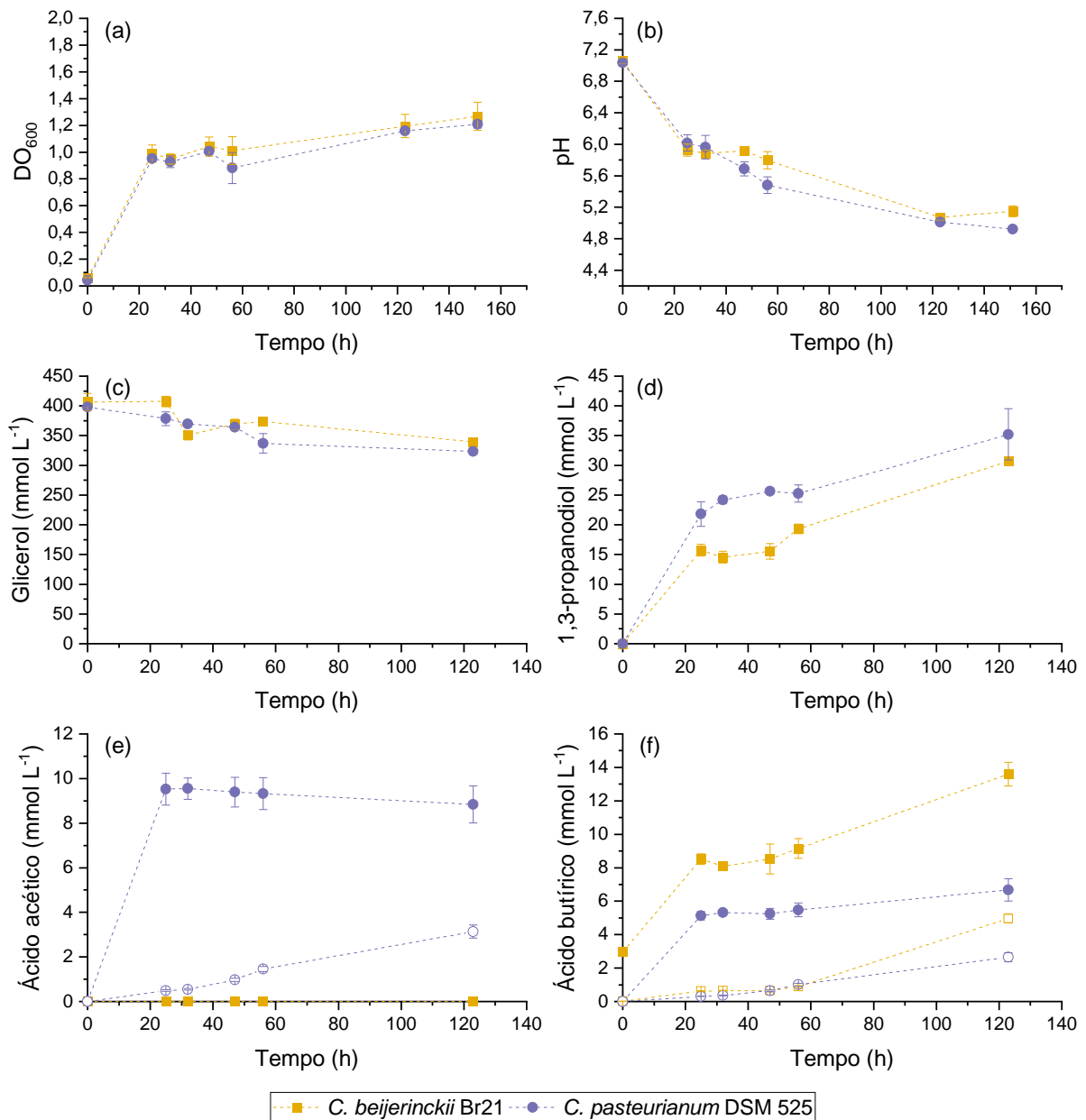


Figura 10 - Ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 400 mmol L⁻¹. (a) DO₆₀₀; (b) pH; e concentrações de (c) glicerol, (d) 1,3-propanodiol, (e) ácido acético e (f) ácido butírico. Nos gráficos dos ácidos acético e butírico, os símbolos com preenchimento representam as concentrações totais de ácido, enquanto os símbolos sem preenchimento representam as concentrações de ácido não dissociado.

Nesse caso, o crescimento celular de ambas as cepas foi similar, no qual observou-se a fase estacionária de crescimento em 25 horas de ensaio (Figura 10). A velocidade específica de crescimento máxima foi igual a 0,07 h⁻¹ para ambos os microrganismos, que foi alcançada nos momentos iniciais da fermentação, entre 2 a 3 h (Figura 11). Em comparação ao ensaio com RCM, a velocidade específica de crescimento máxima em meio WIS é 6,4 vezes menor

(0,45 versus 0,07 h⁻¹). Em outros trabalhos também foi observado o menor crescimento da cepa Br21, quando cultivada em meio menos nutritivo que o RCM, com glicerol como fonte de carbono (ALTAFINI *et al.*, 2022).

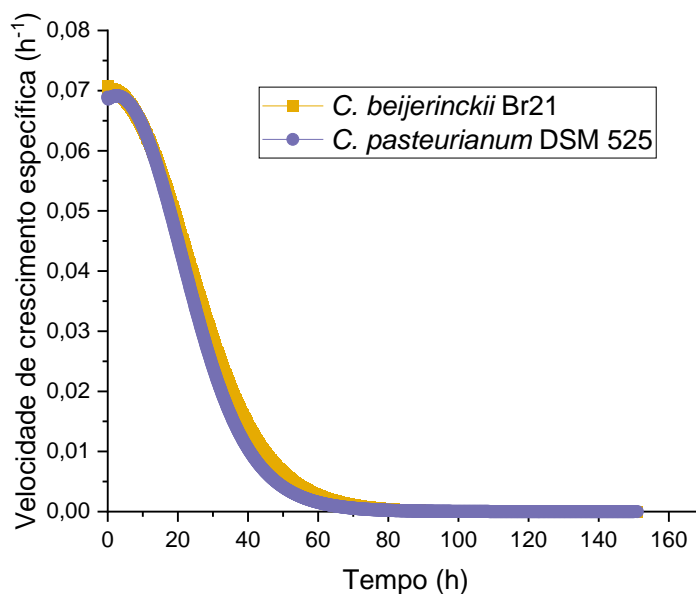


Figura 11 - Velocidades específicas de crescimento no ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 400 mmol L⁻¹.

Em geral, a concentração celular no meio WIS é menor em comparação ao RCM, com valores finais de DO próximas a 1,25. Além disso, em contraste ao ensaio com RCM, ao atingir a fase estacionária ambas as cepas apresentaram valores de pH em torno de 6,0.

Outra característica importante ao utilizar o meio WIS foi a maior duração do ensaio fermentativo. O RCM, empregado anteriormente, não apresenta compostos tamponantes, de forma que o pH decai rapidamente ao longo do crescimento, atingindo valor de 4,6 em 23 h (Figura 8b). Em contrapartida, ao utilizar o meio WIS para o cultivo, observamos que o pH varia mais lentamente, alcançando valor igual a 4,9 apenas em 150 h de ensaio (Figura 10b). Com isso, a fermentação ocorre por mais tempo, sem a inibição supostamente pelos baixos valores de pH, sendo possível observar crescimento celular mesmo após 100 h.

Com a diminuição do pH, ocorre alteração no equilíbrio reacional dos ácidos orgânicos presentes no meio extracelular, no sentido de formação de ácidos orgânicos não dissociados. Estes apresentam maior efeito inibitório do crescimento microbiano em comparação às respectivas espécies ionizadas, visto que apresentam carga neutra, que favorece a difusão para o interior da célula. No meio intracelular, os ácidos são expostos a pH neutro, que novamente

desloca o equilíbrio reacional, porém neste caso no sentido de formação das espécies ionizadas. Consequentemente há a liberação de H^+ no meio intracelular, que leva ao colapso do gradiente de pH transmembrana (DÜRRE, 2007; FONSECA *et al.*, 2020; MADDOX *et al.*, 2000).

A concentração dos ácidos acético e butírico não dissociados nos ensaios realizados em RCM e meio WIS foi representada nas Figura 8 (e, f) e Figura 10 (e, f), respectivamente. Em RCM, o crescimento de *C. beijerinckii* Br21 cessa em 8 h, quando a concentração de ácidos orgânicos não dissociados atinge aproximadamente 13 mmol L^{-1} . Esta concentração parece ser inibitória em *C. beijerinckii* Br21, tendo sido reportada em outro trabalho de nosso grupo de pesquisa (FONSECA *et al.*, 2020). Já o *C. pasteurianum* DSM 525 cresce por 14 h, momento no qual também há 13 mmol L^{-1} de ácidos orgânicos não dissociados. Dessa forma, o crescimento de ambas as cepas foi inibido pela mesma concentração de ácidos orgânicos não dissociados, porém a inibição ocorreu em diferentes tempos de fermentação.

Considerando o meio WIS, a concentração máxima de ácidos orgânicos não dissociados foi alcançada em 123 h, aproximadamente 5 mmol L^{-1} por ambos os microrganismos. Dessa forma, o meio WIS favorece o crescimento de *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 possivelmente por manter o pH mais elevado por mais tempo e, com isso devido diminui concentração de ácidos orgânicos não dissociados.

A adição de compostos tamponantes ao meio de cultivo é uma alternativa ao controle de pH por adição externa de reagentes ao longo da fermentação, particularmente útil em reatores operando em modo de batelada (TEE *et al.*, 2017). Neste caso, o reagente tamponante é o fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), principal constituinte do meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015). Outros autores também reportaram o uso de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) para este fim (TEE *et al.*, 2017).

Quanto à metabolização da fonte de carbono, ambas as cepas consumiram aproximadamente 70 mmol L^{-1} de glicerol (Figura 10c). O glicerol consumido é convertido em grande parte ao produto de interesse, 1,3-PDO, em ambas as cepas, alcançando concentrações finais similares e próximas a 30 mmol L^{-1} (Figura 10d). Isto pode ser constatado calculando-se o fator de conversão de substrato em produto para o *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525, os quais foram, respectivamente, 0,46 e 0,47 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol, ou seja, aproximadamente 77 % do teórico de 0,60 descrito por (BIEBL *et al.*, 1992).

Concentrações de ácido acético (10 mmol L^{-1}) e ácido butírico (5 mmol L^{-1}) (Figura 10e e Figura 10f, respectivamente) foram observadas no ensaio com o *C. pasteurianum* DSM 525. Por outro lado, com o *C. beijerinckii* Br21, apenas o ácido butírico foi detectado a

15 mmol L⁻¹ (Figura 10f), novamente evidenciando a especificidade desta cepa para o ácido butírico (FONSECA *et al.*, 2020). O ácido acético não foi observado no meio de cultivo. Possivelmente este foi consumido, conforme observado anteriormente no RCM, ou foi diretamente conduzido para a formação de ácido butírico.

A alteração da composição do meio de cultura, do RCM para o meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), possibilitou não apenas a produção de 1,3-PDO pelo *C. beijerinckii* Br21, como também aumentou a concentração final de 1,3-PDO pelo *C. pasteurianum* DSM 525. Provavelmente, a manutenção do pH do meio eliminou a inibição do crescimento pelos ácidos orgânicos não dissociados. No caso do *C. pasteurianum* DSM 525, observou-se um aumento de aproximadamente 22 mmol L⁻¹ na concentração final de 1,3-PDO, em comparação à obtida em RCM. Além disso, por apresentar poucos nutrientes, comparado ao RCM, o meio WIS não favorece o crescimento, ou seja, há a formação de pouca biomassa celular. Neste caso, isso torna-se vantajoso pois direciona os elétrons para a via redutiva, resultando na biossíntese de 1,3-PDO.

5.2. Expressão gênica absoluta de enzimas do metabolismo do glicerol

Com o intuito de realizar a análise da expressão gênica absoluta de enzimas do metabolismo do glicerol, foram coletadas e armazenadas amostras de células dos ensaios com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em meio WIS. Porém, após a extração do RNA total dessas amostras, verificou-se que apresentavam baixo rendimento de RNA (provavelmente devido ao baixo crescimento celular). Então, foi realizado um novo ensaio com as mesmas condições, exclusivamente para a coleta das amostras de células em maior quantidade, visto que a cinética de ambas as cepas já havia sido estudada e o perfil de metabólitos permaneceu similar. Neste novo ensaio, observou-se que o crescimento foi mais lento (Figura 12), isto é, apresentou maior fase lag, de forma que as amostras de células foram coletadas em 35 h.

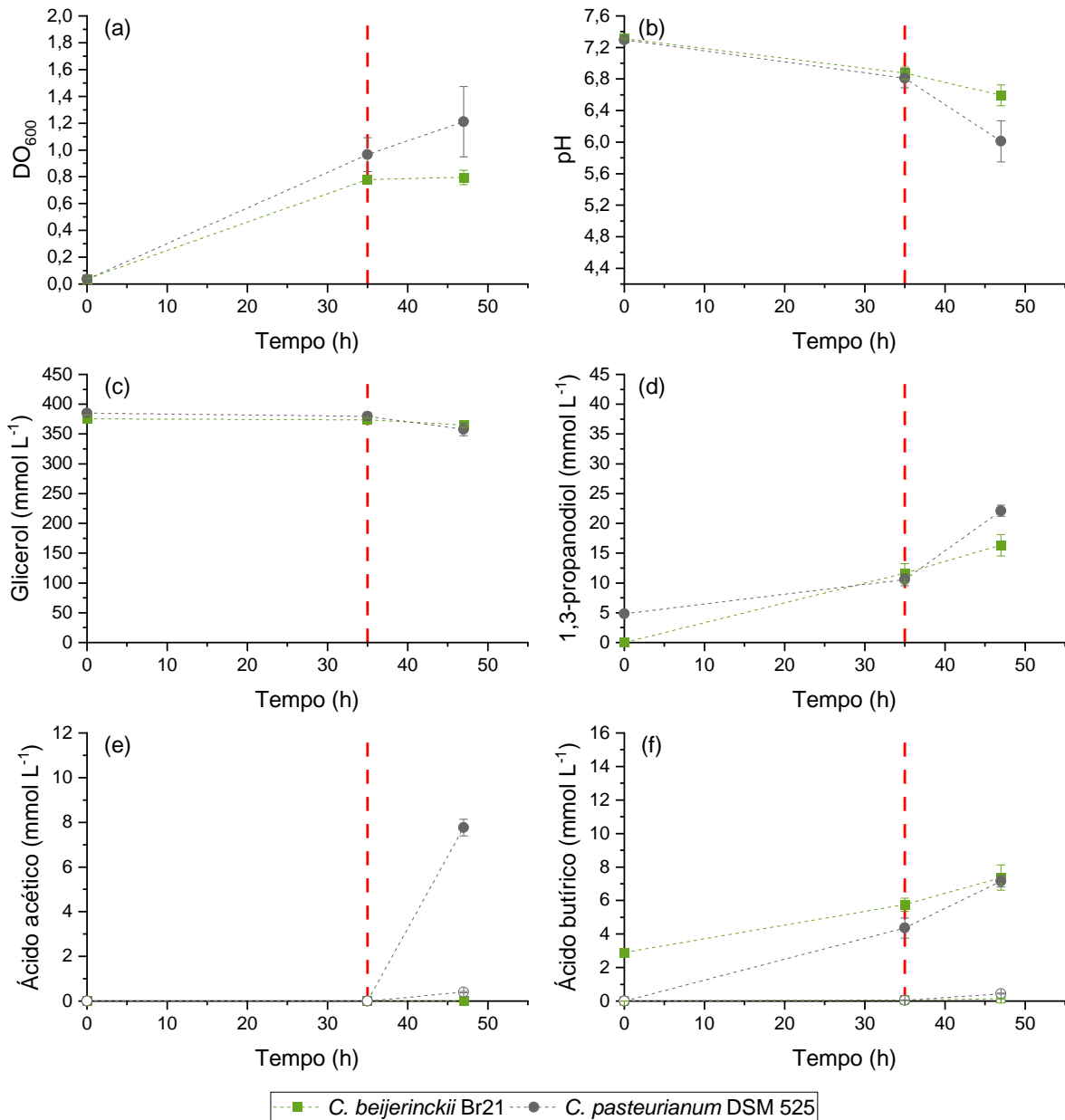


Figura 12 - Ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 400 $mmol L^{-1}$, para coleta e armazenamento das células. (a) DO_{600} ; (b) pH. As linhas vermelhas tracejadas representam o momento de armazenamento das células (35 h).

Após a realização do novo ensaio apenas para a coleta das células, extraiu-se o RNA total e, dessa vez, obtivemos bons rendimentos e integridade dos fragmentos, como pode ser observado na Figura 13. Então, prosseguimos para as etapas de tratamento com DNase, síntese do cDNA e análise da expressão gênica absoluta por RT-qPCR, assim como descrito na seção de Materiais e Métodos, item 4.5. Para estes ensaios, foram sintetizadas sondas (sequências das sondas Taqman™ nas Tabela 10 e Tabela 11) especificamente para as enzimas que representassem a via oxidativa, tais como a glicerol quinase (apenas Br21) e a glicerol-3-fosfato

desidrogenase (ver Figura 5); e a via reductiva, a 1,3-propanodiol desidrogenase (ver Figura 5). Para ambas as cepas o gene *housekeeping* utilizado foi o codificante da enzima DNA girase.

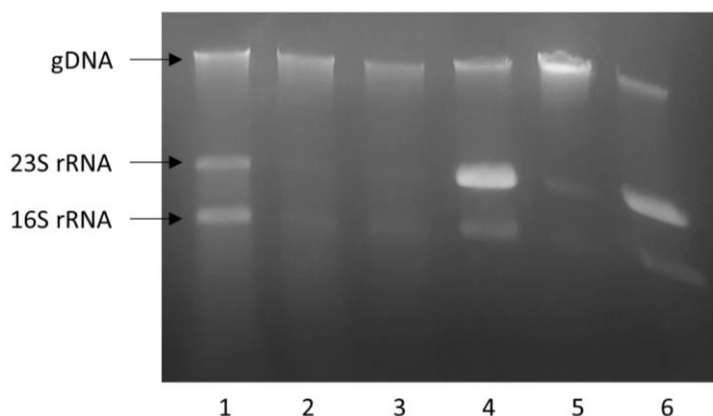


Figura 13 - Eletroforese em gel das amostras de RNA total. Poças 1 a 3: RNA total extraído de *C. beijerinckii* Br21. Poças 4 a 6: RNA total extraído de *C. pasteurianum* DSM 525.

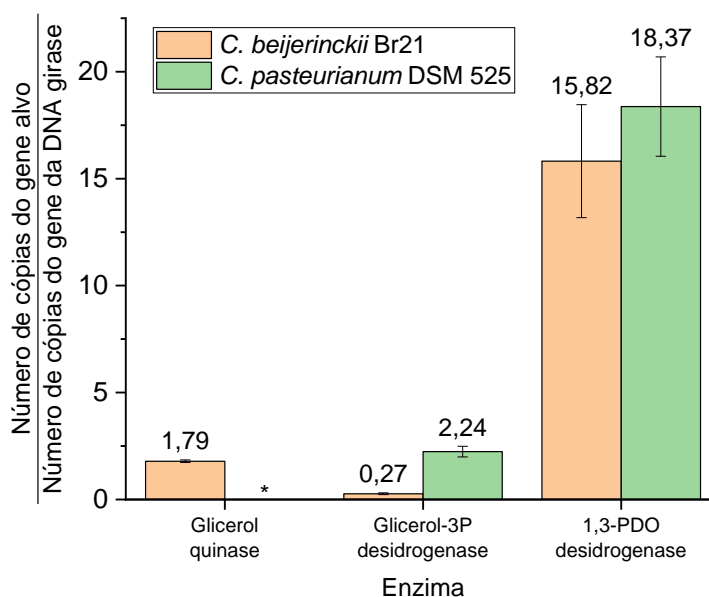


Figura 14 - Níveis de expressão gênica absoluta relacionados às enzimas glicerol quinase, glicerol-3-fosfato desidrogenase e 1,3-propanodiol desidrogenase, nos ensaios fermentativos realizados com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 400 mmol L⁻¹. O asterisco indica que a expressão gênica da enzima glicerol quinase não foi quantificada para o *C. pasteurianum* DSM 525, visto que este não possui o respectivo gene codificante (*glpK*).

O gene codificante da enzima glicerol quinase (*glpK*) foi encontrado apenas em *C. beijerinckii* Br21, e não em *C. pasteurianum* DSM 525. Observou-se uma diferença de 6,6 vezes na expressão da enzima glicerol quinase em comparação à enzima glicerol-3-fosfato

desidrogenase, em *C. beijerinckii* Br21. Com isso, caso a reação inicial de consumo do glicerol pela cepa Br21 seja catalisada pela enzima glicerol quinase (Figura 15), a via é limitada pela reação catalisada pela glicerol-3-fosfato desidrogenase, cuja expressão foi baixa (0,27 cópias). Isto resultaria numa limitação das reações posteriores e, conseqüentemente, na obtenção de energia pela célula. Estes resultados podem estar relacionados ao baixo consumo de glicerol e baixo crescimento celular. Provavelmente, a metabolização do glicerol ocorre pelas enzimas GDH e DHAK (Figura 15) na cepa Br21, porém a expressão destas não foi quantificada.

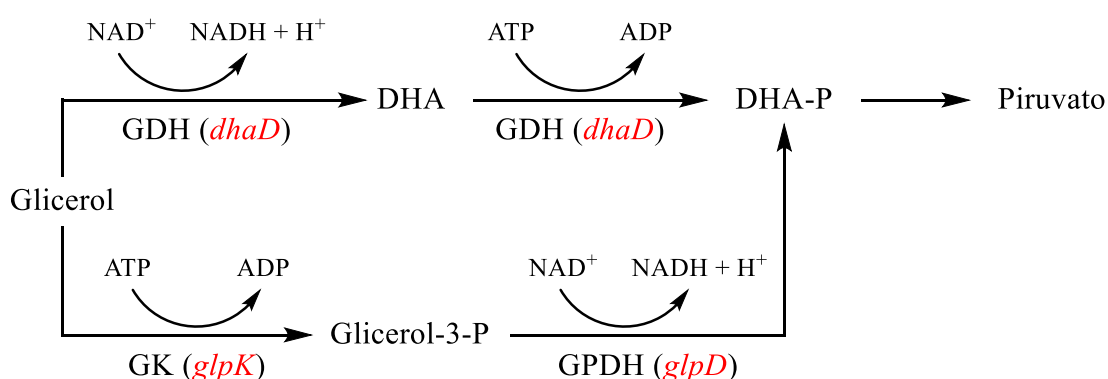


Figura 15 - Vias oxidativas relacionadas ao consumo de glicerol em *Clostridium*. DHA: di-hidroxiacetona; GDH: glicerol desidrogenase, codificada pelo gene *dhaD*; DHAK: di-hidroxiacetona quinase, codificada pelo gene *dhaK*; GK: glicerol quinase, codificada pelo gene *glpK*; GPDH: glicerol-3-fosfato desidrogenase, codificada pelo gene *glpD*.

A enzima glicerol quinase também tem sido reportada como ativa durante a metabolização do glicerol sob condições microaerofílicas por *Lactobacillus* (DOI, 2019). Neste caso, o oxigênio é utilizado em reações mediadas por flavinas oxidases para a síntese de ATP. Porém, estudos ainda são necessários para compreender o caminho utilizado pelo *C. beijerinckii* Br21 para assimilação do glicerol.

Já o *C. pasteurianum*, apesar de não apresentar a enzima glicerol quinase, realiza a conversão de glicerol-3-fosfato a di-hidroxiacetona fosfato com nível de expressão gênica 8,2 vezes maior em relação ao *C. beijerinckii*, e ligeiramente maior (1,3 vezes) que a glicerol quinase deste último microrganismo. Provavelmente, *C. pasteurianum* também consome o glicerol principalmente via GDH e DHAK (Figura 15), e o glicerol-3-fosfato está sendo formado por uma via alternativa, independente da glicerol quinase. Porém, *C. pasteurianum* ainda é capaz de realizar a reação de conversão de glicerol-3-fosfato a di-hidroxiacetona fosfato, ampliando a disponibilidade deste último composto para a formação de piruvato.

Outra possibilidade para explicar a expressão gênica da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase obtida em *C. pasteurianum* é a realização da reação inversa, partindo de di-hidroxiacetona fosfato. Em *Ceratititis capitata*, esta enzima apresenta constante de Michaelis (Km) de 0,74 e 0,33 mmol L⁻¹ para glicerol-3-fosfato e di-hidroxiacetona, respectivamente (FERNÁNDEZ-SOUSA *et al.*, 1977) . Ou seja, também é capaz de utilizar di-hidroxiacetona fosfato como substrato com metade da afinidade de glicerol-3-fosfato, que torna a velocidade de reação mais lenta, porém ainda possível.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, ALBERTYN e colaboradores (1992) observaram que a reação catalisada pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase ocorria principalmente no sentido de redução de di-hidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato, com Km de 0,54 mmol L⁻¹ para di-hidroxiacetona fosfato. Além disso, não houve atividade enzimática quando a enzima foi exposta a glicerol. Dessa forma, provavelmente *C. pasteurianum* não é capaz de utilizar glicerol como substrato da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase.

No ramo redutivo da via do glicerol, ambas as cepas apresentaram o mesmo nível de expressão da enzima 1,3-propanodiol desidrogenase (Figura 14), que pode ser relacionado às concentrações finais de 1,3-PDO similares obtidas por ambas as cepas (Figura 12d). Portanto, os esforços aqui foram concentrados em reforçar a via redutiva da cepa Br21, por meio de transformação da cepa Br21 para futuramente combinar as estratégias de suplementação nutricional e engenharia metabólica de forma a tornar a cepa num microrganismo bom produtor de 1,3-PDO. A suplementação do meio de cultura já foi empregada com sucesso pelo grupo a partir da introdução de um sal de ferro para complementar a formulação do meio WIS (ALTAFINI *et al.*, 2022), a qual promoveu um aumento de 14 % no consumo de glicerol e 51 % na concentração final de 1,3-PDO.

5.3. Superexpressão homóloga dos genes *dhaB1*, *dhaB2*, *CoT* e *dhaT* em *C. beijerinckii* Br21

5.3.1. Construção e replicação do pMTL83251_*P_{pta-ack}*_1,3-PDO_cluster

Após a PCR para amplificação do *cluster* de genes de 1,3-PDO, avaliou-se o fragmento amplificado por eletroforese em gel de agarose (0,8 % m/v) e tampão TAE 1X (Figura 16). Em todas as temperaturas de anelamento testadas, o fragmento de correto tamanho foi amplificado (5015 bp).

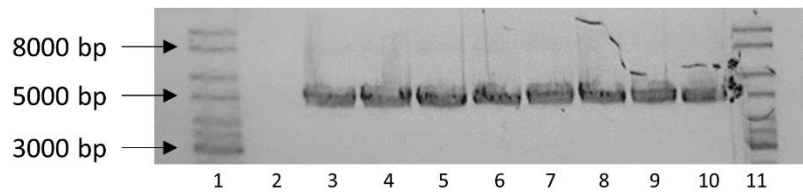


Figura 16 - Eletroforese em gel das amostras de amplificação do cluster de genes de 1,3-PDO. Poças 1 e 11: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Poça 2: Controle negativo. Poças 3 a 10: temperaturas de anelamento de 51,0; 52,4; 53,9; 55,3; 56,7; 58,1; 59,6 e 61,0 °C, respectivamente.

Em seguida, recuperou-se o esqueleto do plasmídeo pMTL83251, contendo o promotor $P_{pta-ack}$. Para isso, o plasmídeo pMTL83251_ $P_{pta-ack}$ _1,3-propanediol_CLOBI (Figura 7b) foi digerido com as enzimas FastDigest® *Bsp119I*, *NheI* e *XbaI* (Thermo Fisher Scientific), que resultou em fragmentos de 4898, 2525 e 2042 bp (Poça 3, da Figura 17), sendo o fragmento de 4898 bp referente ao esqueleto desejado. Nessa mesma poça, são observados dois fragmentos acima da banda de 4898 bp, em 10000 e 8000 bp, que correspondem ao plasmídeo não digerido, assim como na poça 2. O plasmídeo é capaz de assumir duas conformações diferentes que, apesar de apresentarem a mesma massa, possuem propriedades hidrodinâmicas diferentes (ANCHORDOQUY; MOLINA; KEMPNER, 2009): conformação circular aberta (ou *nicked*, em inglês), que é a forma de menor velocidade de migração (10000 bp); e conformação superenrolada (do inglês, *supercoiled*), que diminui o tamanho aparente do fragmento, aumentando sua velocidade de migração (8000 bp).

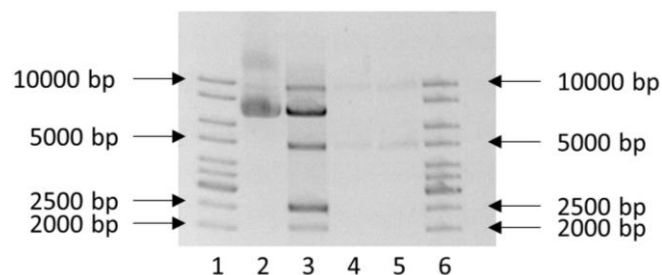


Figura 17 - Eletroforese em gel. Poças 1 e 6: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Poça 2: pMTL83251_ $P_{pta-ack}$ _1,3-propanediol_CLOBI sem digerir. Poça 3: digestão de pMTL83251_ $P_{pta-ack}$ _1,3-propanediol_CLOBI com FastDigest® *Bsp119I*, *NheI* e *XbaI* (Thermo Fisher Scientific). Poça 4: produto da reação de clonagem utilizando proporção 1:2 (esqueleto:inserto); Poça 5: produto da reação de clonagem utilizando proporção 1:3 (esqueleto:inserto)

Após a recuperação da banda de 4898 bp, este fragmento foi utilizado juntamente com o *cluster* de genes de 1,3-PDO para a realização da clonagem. Esta reação foi executada

utilizando duas proporções esqueleto:inserto, 1:2 e 1:3. O produto destas reações também foi submetido a eletroforese em gel (poças 4 e 5, respectivamente, da Figura 17). Observou-se a obtenção do plasmídeo (banda em 10000 bp), além de uma banda referente aos fragmentos remanescentes da clonagem (banda em 5000 bp). Porém, a quantidade de pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster obtida por esta reação de clonagem é muito pequena, vide a intensidade das bandas no gel. Com isso, realizou-se a transformação do plasmídeo construído por ambas as reações em *E. coli* XL1-Blue MRF', para amplificação.

Após 24 h de incubação a 37 °C, foram obtidas grandes quantidades de colônias nas placas referentes a ambas as reações de clonagem, indicando que ambas as reações foram capazes de construir corretamente o plasmídeo desejado. Para as próximas etapas, selecionamos a placa referente à clonagem com proporção esqueleto:inserto de 1:2.

5.3.2. Verificação do pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster

Após a obtenção dos clones de *E. coli* XL1-Blue MRF' contendo o plasmídeo desejado, foram coletadas e replicadas 12 colônias (Figura 18) da placa referente à reação de clonagem com proporção esqueleto:inserto de 1:2, para verificar qual (ou quais) possuía (m) o pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster intacto, isto é, com tamanho e sequência gênica corretos.

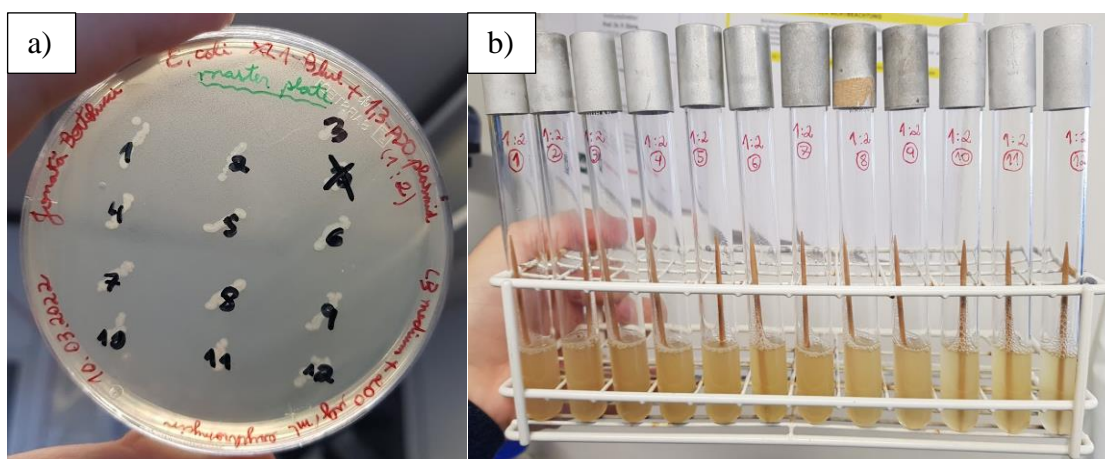


Figura 18 - *E. coli* XL1-Blue MRF' [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster] replicada em meio LB sólido (a) e meio LB líquido (b). Ambos os meios foram suplementados com eritromicina 250 µg mL⁻¹.

Após a extração dos 12 plasmídeos utilizando as culturas ilustradas na Figura 18b, estes foram digeridos com *Pvu*II e *Xba*I, para verificar o tamanho do plasmídeo replicado.

Observou-se que somente as colônias 2, 3, 6, 7, 9, 10 e 12 apresentaram os fragmentos esperados, 6445 e 3422 bp, que correspondem às poças 3, 4, 7, 8, 10, 11 e 13 na Figura 19.

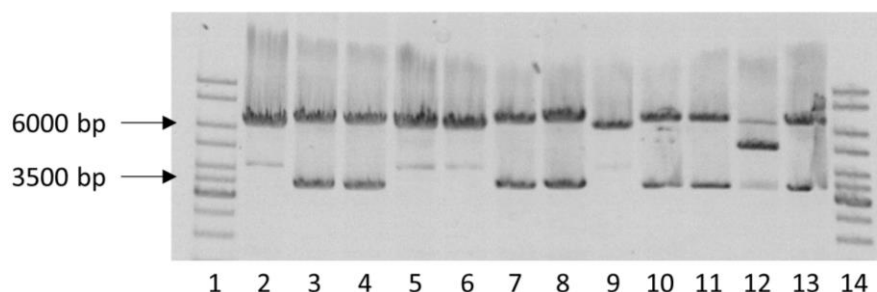


Figura 19 - Eletroforese em gel das amostras de digestão controle com *PvuII* e *XbaI*. Poças 1 e 14: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Poças 2 a 13: digestão controle do DNA plasmidial extraído de culturas derivadas de 12 colônias de *E. coli* XL1-Blue MRF' transformada com pMTL83251_*P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster*.

Em seguida, as amostras de DNA plasmidial que geraram os fragmentos de tamanho correto (poças 3, 4, 7, 8, 10, 11 e 14 na Figura 19) foram enviadas para sequenciamento na empresa Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen, Niedersachsen, Alemanha), que revelou que todos estes plasmídeos possuíam as seqüências desejadas, sem mutações. Para as próximas etapas, a colônia 2 foi selecionada como fonte do plasmídeo pMTL83251_*P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster*.

5.3.3. Transformação de *C. beijerinckii* Br21 com pMTL83251 e pMTL83251_*P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster*

A busca por sistemas de restrição e modificação no *C. beijerinckii* Br21 foi realizada utilizando o genoma disponível no banco de dados NCBI (número de acesso: MWMH00000000). Ao genoma, foram alinhados genes de outras cepas de *C. beijerinckii*, codificantes dos sistemas de restrição e modificação. Foram encontrados todos os genes necessários para a formação de um sistema do tipo I (locus tag: CBEIBR21_17880, CBEIBR21_17865, CBEIBR21_00480 e CBEIBR21_13600). Este tipo é formado pela endonuclease de restrição *EcoKI*, que reconhece o padrão de metilação m6a (N⁶-metiladenosina). Convenientemente, a *E. coli* XL1-Blue MRF' utilizada para a replicação do plasmídeo construído também apresenta um sistema de restrição e modificação do tipo I. Além disso, apresenta a mutação *hsdR17*(rK⁻ mK⁺), que elimina sua endonuclease de restrição, porém mantém sua enzima de modificação. Como resultado, ao transformar o plasmídeo

pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster em *E. coli* XL1-Blue MRF', esta não é capaz de degradá-lo, porém ainda é capaz de realizar a metilação. Com isso, ao realizar a extração do plasmídeo, este já apresenta o correto padrão de metilação necessário para a transformação em *C. beijerinckii* Br21.

Inicialmente, a transformação de *C. beijerinckii* Br21 foi realizada exatamente com o mesmo protocolo descrito por LITTLE et al., 2018. Entretanto, em um ensaio preliminar, não houve sucesso na transformação para ambos os plasmídeos. Comparando diferentes protocolos de transformação de *C. beijerinckii* descritos por diferentes autores na literatura, buscamos por possíveis parâmetros a serem alterados. Decidiu-se alterar o tempo de regeneração da cultura, após a transformação (em meio sem antibiótico), pois havia certa variação entre os protocolos avaliados. Foram testados 4, 5 e 6 h de regeneração das células, assim como descrito por (XIN et al., 2020). Variando apenas este parâmetro, foi possível realizar a transformação de *C. beijerinckii* Br21 com pMTL83251, sendo que se observou o crescimento desta variante na presença de antibiótico na replicatas referentes à 5 e 6 h de regeneração (Figura 20).



Figura 20 - Incubação do *C. beijerinckii* Br21 com pMTL83251, em meio 2xYTG suplementado com claritromicina $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. As setas indicam as replicatas nas quais a transformação foi bem sucedida: replicatas referentes à 5 e 6 h de regeneração das células após a transformação. Nos demais tubos, não houve crescimento.

Em seguida, ambos os tubos com crescimento celular ilustrados na Figura 20 foram utilizados para o inóculo de placas contendo meio 2xYTG sólido, também suplementado com claritromicina $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após incubação por 3 dias, foram obtidas grandes quantidades de colônias de *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] (Figura 21).

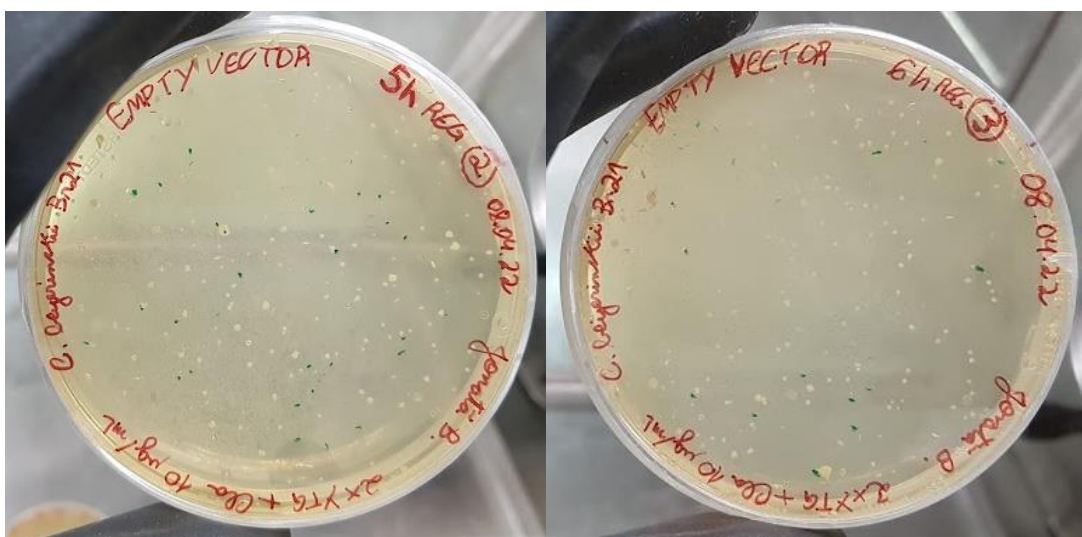


Figura 21 - Colônias de *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251].

O mesmo procedimento foi empregado na transformação do *C. beijerinckii* Br21 com pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster, somente alterando o tempo de regeneração (4, 5 e 6 h) em relação ao protocolo de LITTLE et al., 2018. Porém, após 12 replicatas malsucedidas, foi novamente necessário realizar alterações no protocolo. Assim como descrito no item 4.6.4, a cultura utilizada para realizar o estoque de células competentes foi incubada até alcançar DO = 0.6. Com isso, a transformação do *C. beijerinckii* Br21 com pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster foi bem-sucedida, resultando em grande número de colônias em meio sólido, assim como ilustrado na Figura 21.

Portanto, foram alterados 2 parâmetros em relação ao protocolo descrito por LITTLE et al., 2018, que variaram de acordo com o plasmídeo a ser transformado. Para a transformação com pMTL83251, foi necessário aumentar o tempo de regeneração das células para 5 h. Para a transformação com pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster, além de alterar o tempo de regeneração das células para 5 h, também foi necessário aumentar o tempo de incubação da cultura em meio 2xYTG utilizada para o estoque das células competentes, permitindo que esta alcançasse DO = 0,6.

5.3.4. Confirmação das cepas transformadas

Após a obtenção de colônias das cepas de *C. beijerinckii* Br21 transformadas, foi realizada uma verificação de seus plasmídeos, de acordo com a metodologia descrita no item 4.6.5.

O plasmídeo de três colônias de *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] foi confirmado por digestão com a enzima *EcoRI*, que resultou em fragmentos de 3588 e 1001 bp. Esses fragmentos foram observados por eletroforese em gel para as três colônias testadas (Figura 22), confirmando que as três apresentaram o plasmídeo correto. Para o ensaio cinético, apenas uma dessas colônias de *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] foi selecionada.

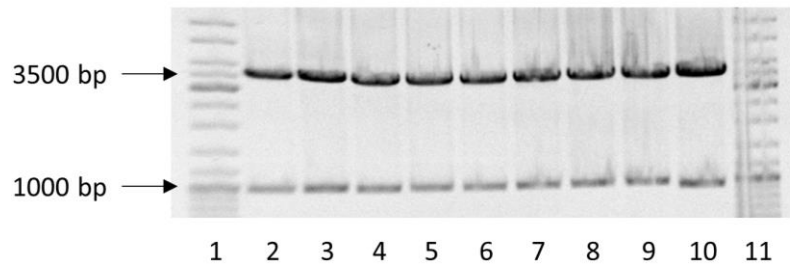


Figura 22 - Digestão controle do pMTL83251 com *EcoRI*. Poças 1 e 11: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Poças 2 a 4: colônia 1; Poças 5 a 7: colônia 2; Poças 8 a 10: colônia 3.

O plasmídeo de duas colônias de *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_*P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster*] foi confirmado por digestão com as enzimas *PvuII* e *XbaI*, que resultou em fragmentos de 6445 e 3422 bp. Esses fragmentos foram observados por eletroforese em gel para as duas colônias testadas (Figura 23), confirmando que as duas apresentaram o plasmídeo correto. Para o ensaio cinético, apenas uma dessas colônias de *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_*P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster*] foi selecionada.

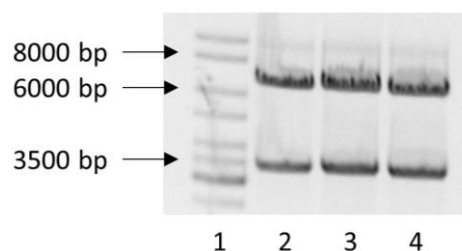


Figura 23 - Digestão controle do pMTL83251_*P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster* com *PvuII* e *XbaI*. Poça 1: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Poças 2 e 3: colônia 1; Poça 4: colônia 2.

Após confirmar a presença do plasmídeo de correto tamanho em ambas as variantes obtidas, realizou-se uma verificação da identidade da cepa transformada. Para isso, amplificou-se o gene 16S rRNA de *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] e *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_*P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster*] por PCR, sendo o tamanho do fragmento amplificado

confirmado por eletroforese em gel (1465 bp). Em seguida, o fragmento foi enviado para sequenciamento e o resultado foi comparado ao genoma da cepa Br21. Em ambos os casos, tanto para *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] quanto para *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster], observou-se que o alinhamento gerou um percentual de similaridade acima de 99 %, confirmando a identidade das cepas transformadas.

5.3.5. Ensaio cinético

O ensaio cinético foi realizado em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 500 mmol L⁻¹. Foram comparadas as três variantes obtidas: *C. beijerinckii* Br21, *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] e *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster] (Figura 24).

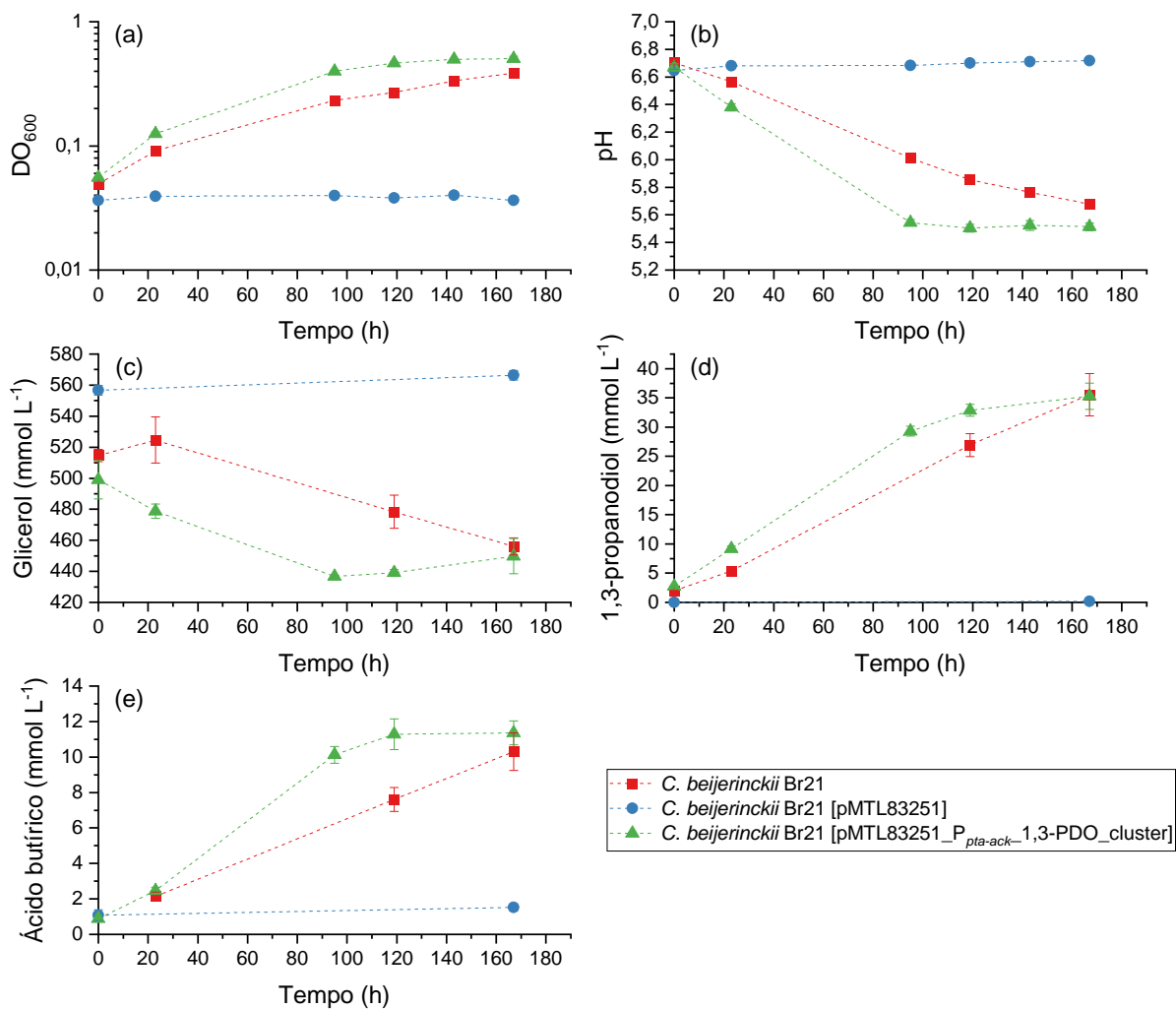


Figura 24 - Ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21, *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] e *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster] em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 500 mmol L⁻¹. (a) DO₆₀₀; (b) pH; e concentrações de (c) glicerol, (d) 1,3-propanodiol e (e) ácido butírico.

Houve uma clara diferença entre *C. beijerinckii* Br21 e o transformado *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster] na fermentação do glicerol. A superexpressão do *cluster* de genes de 1,3-PDO acelerou o metabolismo do glicerol, visto que o *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster] alcançou a fase estacionária de crescimento em 100 h. *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] não cresceu durante este ensaio, porém já foi observado o crescimento do microrganismo transformado com o plasmídeo sem os genes de interesse. A concentração inicial de glicerol para a variante portadora do vetor vazio foi maior comparada à cepa selvagem e a cepa com o vetor de superexpressão do *cluster* de genes de 1,3-PDO. Não é possível afirmar que essa foi a causa da incapacidade de crescimento.

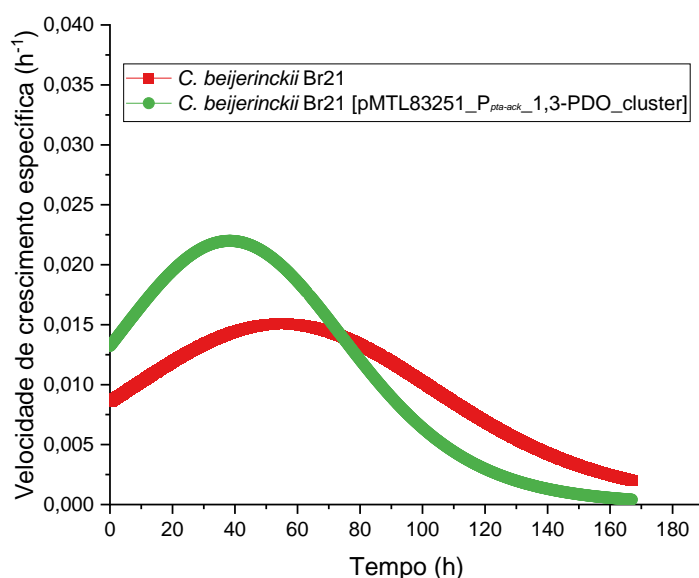


Figura 25 - Velocidades específicas de crescimento no ensaio cinético realizado com *C. beijerinckii* Br21 e *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster] em meio WIS (WISCHRAL *et al.*, 2015), contendo glicerol 500 mmol L⁻¹. *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] foi omitido desta figura, visto que não houve crescimento desse microrganismo no ensaio.

Em geral, *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster] foi capaz de crescer mais rápido que a cepa selvagem com velocidade específica de crescimento máxima de 0,022 h⁻¹ em 38 h, em comparação a 0,015 h⁻¹ em 55 h para a cepa selvagem (Figura 25). Com isso, a diminuição do pH (Figura 24b) e a produção de ácido butírico (Figura 24e) foram mais rápidas na cepa transformada. A concentração final de 1,3-PDO foi similar em ambos *C. beijerinckii* Br21 e *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster], aproximadamente 35 mmol L⁻¹. Entretanto, esta concentração foi detectada após 119 h na cepa transformada, enquanto a cepa selvagem levou 167 h para alcançar a mesma concentração. Isto

resulta em maior produtividade de 1,3-PDO pela cepa transformada, comparado à cepa selvagem: 0,27 e 0,20 mmol de 1,3-PDO L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. O consumo de glicerol também foi similar para ambas as cepas, aproximadamente 60 mmol L⁻¹. Isso resulta em um rendimento de 0,58 mol de 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol e uma eficiência de 97 %, comparado à estequiometria teórica (0,6 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol). Ácido butírico foi o principal subproduto, alcançando concentração final de 10 mmol L⁻¹ para ambas as cepas. Acetato e etanol foram detectados em concentrações inferiores a 1 mmol L⁻¹, sendo assim não foram representados na Figura 24. A ausência de etanol pode ser considerada vantajosa, pois dessa forma facilitaria em etapas posteriores de purificação dos produtos em processos industriais. Com isso, evita-se a perda do produto desejado devido a sucessivas etapas de purificação, além de diminuir o tempo de processamento e o custo de produção (SINGH *et al.*, 2022).

Dessa forma, apesar de acelerar o metabolismo do glicerol, as concentrações finais de glicerol, 1,3-PDO e ácido butírico foram similares para a cepa selvagem e a cepa portadora do vetor de superexpressão. Mesmo sem ter sido observado o crescimento de *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251] durante o ensaio, a presença dos genes contidos no *backbone* do plasmídeo parece não interferir no metabolismo do glicerol. Isto é, o perfil metabólico observado deve-se exclusivamente à superexpressão do *cluster* de genes de 1,3-PDO. Isto indica que o pMTL83251 é um bom vetor para a manipulação genética da cepa Br21.

Assim como visto anteriormente, o metabolismo do glicerol envolve principalmente quatro enzimas (Figura 26): glicerol desidrogenase (*dhaD*) e di-hidroxiacetona quinase (*dhaK*), no eixo oxidativo; e glicerol desidratase (*dhaB*) e 1,3-propanodiol desidrogenase (*dhaT*). Esses genes são constituintes do regulon de di-hidroxiacetona (*dha*), cuja expressão é induzida por di-hidroxiacetona ou glicerol (SUN *et al.*, 2003).

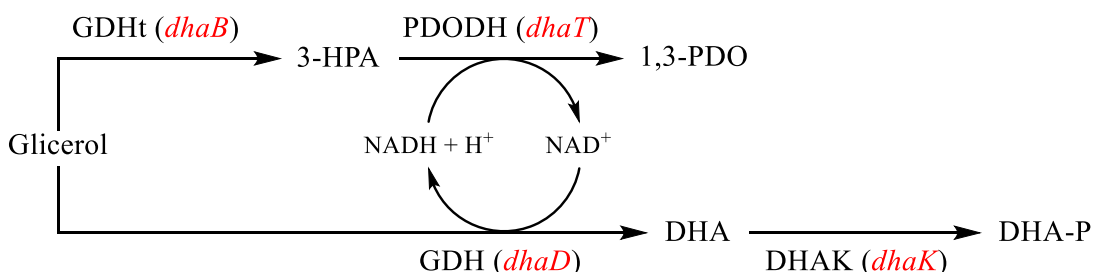


Figura 26 - Vias metabólicas relacionadas ao consumo de glicerol em *Clostridium*, com destaque para o início das vias oxidativa e redutiva. 3-HPA: 3-hidroxipropionaldeído; 1,3-PDO: 1,3-propanodiol; DHA: di-hidroxiacetona; DHA-P: di-hidroxiacetona fosfato; GDHt: glicerol desidratase, codificada pelo gene *dhaB*; PDODH: 1,3-propanodiol desidrogenase, codificada pelo gene *dhaT*; GDH: glicerol desidrogenase, codificada pelo gene *dhaD*; DHAK: di-hidroxiacetona quinase, codificada pelo gene *dhaK*. Adaptado de (CHEN; LIU; LIU, 2009).

Diferentes abordagens envolvendo estes genes foram testadas com o intuito de aumentar a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol em diferentes microrganismos (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Clostridium* spp.) (MAERVOET *et al.*, 2011). ZHENG e colaboradores (2006) estudaram a superexpressão simultânea de *dhaB* e *dhaT* em *K. pneumoniae*. Neste microrganismo, a superexpressão desses genes não promoveu aumento da produção de 1,3-PDO, além de atrasar o consumo de glicerol e síntese dos produtos. Os autores relatam que provavelmente o plasmídeo ocasionou uma sobrecarga (*metabolic burden*) ao metabolismo do glicerol neste microrganismo, visto que a fase logarítmica de crescimento se inicia quando os níveis de atividade enzimática relacionadas a *dhaB* e *dhaT* decrescem. Com isso, também foi possível inferir problemas de estabilidade do plasmídeo na célula ao longo da fermentação em batelada, possivelmente ocasionada devido à superexpressão de *dhaB*, que causa o acúmulo do intermediário tóxico 3-HPA, levando à perda do plasmídeo. Em nosso trabalho, a superexpressão de *dhaB* e *dhaT* em *C. beijerinckii* resultou no efeito contrário, aumentando a velocidade de consumo do glicerol e síntese dos produtos e aparentemente não houve perda do plasmídeo ao longo da fermentação.

Também foi reportada a superexpressão unicamente de *dhaT* em *K. pneumoniae* (ZHAO *et al.*, 2009), porém sem aumento na produção de 1,3-PDO, provavelmente devido à insuficiência de NADH necessários para a reação catalisada pela 1,3-propanodiol desidrogenase. Além disso, a reação catalisada pela enzima glicerol desidratase (*dhaB*) é a etapa limitante da via reductiva (MAERVOET *et al.*, 2011), de forma que somente superexpressar o gene *dhaT* não afeta a produção de 1,3-PDO.

Para contornar a insuficiência de NADH e diminuir o acúmulo de 3-HPA, CHEN e colaboradores (2009) superexpressaram *dhaT* e *dhaD*, também em *K. pneumoniae*. Com isso, houve um aumento de 2,6 e 3,2 vezes nas atividades enzimáticas de glicerol desidratase e 1,3-propanodiol desidrogenase, respectivamente, que resultou em um aumento de 56,3 % na concentração final de 1,3-propanodiol.

WISCHRAL *et al.*, (2016) selecionou GDH e DHAK como alvos da superexpressão em *C. beijerinckii* DSM 791. Esta foi realizada de forma heteróloga, utilizando os genes *gldA* e *dhaKLM* respectivamente, provenientes de *E. coli* CA434, pois esta cepa apresenta maior rendimento e produtividade de 1,3-PDO em relação a produtores naturais deste composto. Observou-se que a cepa modificada de *C. beijerinckii* DSM 791 apresentou maior velocidade de crescimento, que conseqüentemente aumentou a produtividade de 1,3-PDO. Porém, não houve aumento na concentração final de 1,3-PDO que, segundo os autores ocorreu, pois, apesar

de superexpressar um dos ramos do metabolismo do glicerol, as distribuições dos fluxos metabólicos permanecem iguais. Este resultado é similar ao obtido para a cepa Br21 em nosso trabalho e provavelmente pode se utilizar da mesma justificativa: a superexpressão dos genes relativos à via redutiva aumentaram as velocidades apenas dessas reações do metabolismo, e isso não resultou no aumento da concentração final de 1,3-PDO. Portanto, a complementação de abordagens, como mencionado anteriormente, com a suplementação nutricional de meios de cultura, aliado a ferramentas moleculares parecem ser uma boa estratégia para aumentar o produto de interesse.

5.4. Comparação entre as abordagens para o aumento da produção de 1, 3-PDO por

***C. beijerinckii* Br21: composição do meio de cultura e transformação**

A Tabela 17 apresenta um resumo dos resultados de todas as etapas do trabalho. O consumo médio de glicerol por *C. beijerinckii* Br21, considerando todos os ensaios, foi de aproximadamente 60 mmol L⁻¹. Com isso, ainda é necessário otimizar as condições de cultivo para maximizar o consumo de glicerol.

Neste ponto, vale ressaltar novamente que a manipulação genética realizada neste trabalho, para superexpressão do *cluster* de genes de 1,3-PDO, não promoveu o aumento da concentração final de 1,3-PDO ou do consumo de glicerol, porém houve aumento na produtividade (de 0,20 mmol L⁻¹ h⁻¹ para 0,27 mmol L⁻¹ h⁻¹). Possivelmente, a posterior combinação das estratégias de alteração do meio nutricional e utilização da cepa transformada poderiam resultar em aumento da concentração final de 1,3-PDO com o concomitante aumento da produtividade.

Em alguns casos, observou-se que a eficiência de obtenção de 1,3-PDO foi superior a 100 %. Provavelmente, isto se deve ao fato de *C. beijerinckii* Br21 consumir outros compostos como fonte de carbono, além do glicerol, como o acetato, mencionado anteriormente e já verificado em vários trabalhos do grupo (ALTAFINI, 2022; MERMEJO, 2020; RODRIGUES, 2021), que também obtiveram eficiências superiores a 100 %.

No ensaio da cepa referência (*C. pasteurianum* DSM 525) em RCM, observou-se o maior consumo de glicerol entre os ensaios (230,74 mmol L⁻¹) e a máxima produtividade de 1,3-PDO (0,95 mmol L⁻¹ h⁻¹). Porém, isto não se refletiu em maior concentração final de 1,3-PDO, comparado ao *C. beijerinckii* Br21. Provavelmente, o glicerol foi direcionado para outras vias metabólicas quando o microrganismo é exposto à alta oferta de nutrientes. A

concentração de 1,3-PDO variou de 13,25 a 35,20 mmol L⁻¹, em RCM e meio WIS, respectivamente, ressaltando, mais uma vez, a influência do meio nutricional que, neste caso, triplicou a concentração final.

Finalmente, calculou-se a recuperação de carbono nos ensaios (Figura 27), que variou entre 79 a 99 %. Valores abaixo de 100 % são esperados, visto que o microrganismo também produz CO₂ e este não foi quantificado. Entretanto, também foram obtidos valores cuja faixa de incerteza os torna acima de 100 %. Um dos possíveis motivos para este resultado seria a obtenção de carbono por diferentes fontes, além do glicerol, que não foram consideradas no cálculo. SANDOVAL-ESPINOLA e colaboradores (2017) reportaram evidências da captura mixotrófica de carbono por *C. beijerinckii*. Neste caso, o microrganismo seria capaz de metabolizar concomitantemente o carboidrato disponível no meio de cultura e o CO₂, resultando em produtos contendo carbono proveniente de diferentes fontes. Em nosso trabalho, somente quantificamos a principal fonte de carbono, o glicerol; porém o CO₂ possivelmente pode atuar como fonte de carbono complementar em *C. beijerinckii* Br21.

Tabela 17 - Resumo dos resultados dos ensaios com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 sob diferentes meios de cultura e o *C. beijerinckii* Br21 após a transformação.

Etapa	Microrganismo	Meio de cultura	Consumo de glicerol (mmol L ⁻¹)	DO ₆₀₀ máxima	pH final	Ácido butírico (mmol L ⁻¹)	1,3-PDO (mmol L ⁻¹)	Y _{1,3-PDO/glicerol} (mol mol ⁻¹)	Eficiência (%)	Produtividade (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)
Avaliação do efeito nutricional	<i>C. beijerinckii</i> Br21	RCM	54,78 ± 9,51	4,64 ± 0,08	5,10 ± 0,02	24,17 ± 1,14	0	0	0	0
	<i>C. pasteurianum</i> DSM 525	RCM	230,74 ± 10,17	6,66 ± 0,32	5,62 ± 0,03	12,42 ± 0,43	13,25 ± 0,51	0,06 ± 0,00	9,57 ± 0,56	0,95 ± 0,04
	<i>C. beijerinckii</i> Br21	WIS	66,78 ± 14,50	1,27 ± 0,10	5,15 ± 0,03	10,64 ± 0,72	30,68 ± 0,40	0,46 ± 0,10	76,58 ± 16,66	0,25 ± 0,00
	<i>C. pasteurianum</i> DSM 525	WIS	74,50 ± 6,73	1,21 ± 0,03	4,92 ± 0,01	6,67 ± 0,67	35,20 ± 4,32	0,47 ± 0,07	78,75 ± 12,00	0,29 ± 0,04
Transformação	<i>C. beijerinckii</i> Br21	WIS	58,55 ± 6,76	0,39 ± 0,02	5,68 ± 0,01	9,41 ± 1,06	33,52 ± 3,61	0,57 ± 0,09	95,44 ± 15,06	0,20 ± 0,02
	<i>C. beijerinckii</i> Br21 [pMTL83251_ P _{pta-ack} _ 1,3-PDO_cluster]	WIS	49,31 ± 16,79	0,50 ± 0,02	5,51 ± 0,03	10,47 ± 0,67	32,54 ± 2,27	0,66 ± 0,23	109,99 ± 38,23	0,27 ± 0,02

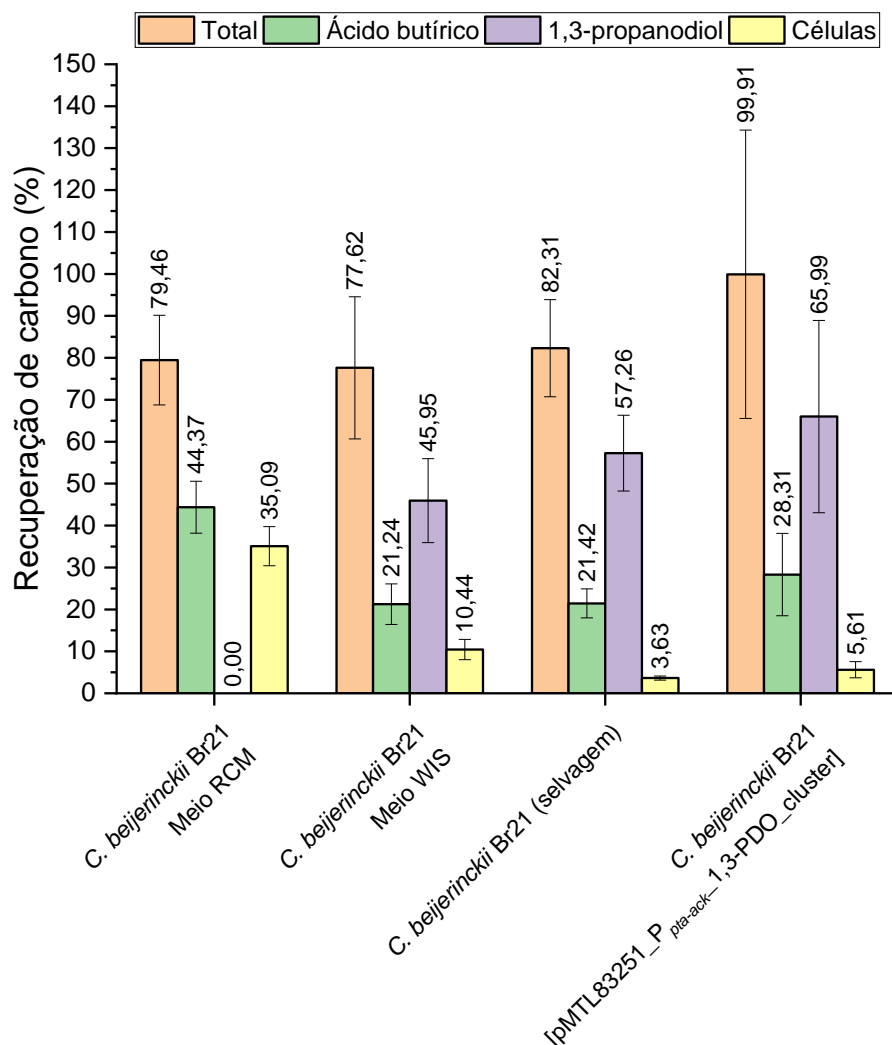


Figura 27 - Resumo dos resultados obtidos com o *C. beijerinckii* Br21, considerando a recuperação de carbono (%).

Em RCM, o carbono proveniente do glicerol foi direcionado principalmente (Figura 27) à biossíntese de ácido butírico (44,37 %) e massa celular (35,09 %), em *C. beijerinckii* Br21. Já em meio WIS, o carbono proveniente do glicerol foi direcionado principalmente (Figura 27) à biossíntese de 1,3-PDO (com valores acima de 45 %), seguido de ácido butírico e massa celular. Ou seja, a composição nutricional do meio WIS favorece a produção de 1,3-PDO, diminuindo a recuperação de carbono em outros subprodutos, como o ácido butírico e a massa celular.

Portanto, a produção de 1,3-PDO por *C. beijerinckii* Br21 é influenciada por um conjunto de fatores, nutricionais e genéticos. Ao longo do trabalho, ambas as estratégias foram exploradas e cada uma promoveu um resultado diferente. A alteração do meio nutricional possibilitou a biossíntese de 1,3-PDO por *C. beijerinckii* Br21; já a modificação genética da

cepa, para superexpressão da via reductiva de síntese deste composto, ocasionou o aumento da produtividade de 1,3-PDO (Tabela 17).

Em etapas posteriores, ambas as estratégias poderiam ser otimizadas. As condições de crescimento / nutricionais para a cepa transformada ainda devem ser otimizadas, para aumentar o consumo de glicerol, que foi relativamente baixo considerando a concentração inicial adicionada nos ensaios. No caso da cepa modificada, novos promotores poderiam ser testados, em substituição ao gene codificante da fosfotransacetilase em pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster, possivelmente aumentando a expressão dos genes alvo contidos no plasmídeo.

6. CONCLUSÕES

A cepa *C. beijerinckii* Br21, principal foco de estudo deste trabalho, ao consumir glicerol forma 1,3-PDO como um dos produtos de fermentação, como observado anteriormente em trabalhos do grupo de pesquisa. Entretanto, a composição do meio de cultura foi determinante na obtenção do composto de interesse. A cepa *C. beijerinckii* Br21 formou 1,3-PDO somente em meio WIS, enquanto *C. pasteurianum* DSM 525 produziu este composto tanto no meio WIS, como no RCM. A fermentação do glicerol foi provavelmente inibida em *C. beijerinckii* Br21 pela alta concentração de nutrientes do RCM, bem como pelo decaimento do pH neste meio, resultado da formação de ácidos orgânicos. Em meio WIS, foi possível comprovar a síntese de 1,3-PDO pela cepa Br21 em concentrações similares ao *C. pasteurianum* DSM 525. Ressalta-se, então, a importância da composição do meio cultura no direcionamento do metabolismo para o produto de interesse, bem como do controle do pH em biorreatores.

O perfil de produtos da fermentação do glicerol foi distinto para as espécies *C. beijerinckii* e *C. pasteurianum*. Enquanto *C. beijerinckii* gerou 1,3-PDO com apenas ácido butírico como subproduto, a espécie *C. pasteurianum* além de 1,3-PDO também formou ácido acético conjuntamente ao ácido butírico.

O nível de expressão da 1,3-propanodiol desidrogenase, que catalisa a última reação da via reductiva para a formação de 1,3-PDO, foi similar em ambas as cepas, corroborando com os resultados de concentração de 1,3-PDO. Entretanto, *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSM 525 apresentaram distintos níveis de expressão de glicerol-3-fosfato desidrogenase, supostamente envolvida na oxidação do glicerol. Devido à baixa expressão gênica de glicerol-3-desidrogenase, provavelmente *C. beijerinckii* Br21 realiza a oxidação de glicerol preferencialmente pelas enzimas glicerol desidrogenase e di-hidroxiacetona quinase.

O método de transformação para o *C. beijerinckii* Br21 foi selecionado e aperfeiçoado a partir da metodologia descrita por LITTLE et al. (2018). Tal método, após adaptações da concentração celular para a transformação e do tempo necessário para a regeneração celular das cepas transformadas, foi apropriado à transformação de *C. beijerinckii* Br21. Tais alterações no protocolo parecem ser necessárias de acordo com o tamanho do plasmídeo a ser transformado.

O plasmídeo pMTL83251 utilizado na superexpressão aparentemente é um bom vetor para a transformação de *C. beijerinckii* Br21. A superexpressão dos genes *dhaB1*, *dhaB2*, *CoT*

e *dhaT* resultou no aumento significativo da produtividade de 1,3-PDO por *C. beijerinckii* Br21 [pMTL83251_*P_{pta-ack}*_1,3-PDO_cluster] em comparação à cepa selvagem. Entretanto, não houve diferença na concentração final de 1,3-PDO por ambas as cepas.

REFERÊNCIAS

ABDUL RAMAN, A. A.; TAN, H. W.; BUTHIYAPPAN, A. Two-Step Purification of Glycerol as a Value Added by Product From the Biodiesel Production Process. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 774, 19 nov. 2019. Acesso em: 16 out. 2022.

AGU, C. V.; UJOR, V.; EZEJI, T. C. Metabolic engineering of *Clostridium beijerinckii* to improve glycerol metabolism and furfural tolerance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 9 mar. 2019. Disponível em: <<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-019-1388-9>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

ALBERTYN, J.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B. A. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 308, n. 2, p. 130–132, 17 ago. 1992. Acesso em: 12 nov. 2022.

ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: Opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1–16, 18 jul. 2012. Disponível em: <<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-5-48>>. Acesso em: 15 out. 2022.

ALTAFINI, R. de M. Otimização das condições de fermentação de glicerol por *Clostridium beijerinckii* Br21 para a obtenção de 1,3-propanodiol. 2022. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

ALTAFINI, R. de M.; MARTINS, T. M. T.; BRUNI, A. T.; REGINATTO, V. Upgraded medium composition highlights the relevance of iron sulfate for 1,3-propanediol production by a *Clostridium beijerinckii* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 43, p. 102388, 1 ago. 2022. Acesso em: 8 nov. 2022.

ANCHORDOQUY, T. J.; MOLINA, M. d. C.; KEMPNER, E. S. A radiation target method for size determination of supercoiled plasmid DNA. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 2, p. 229–233, 15 fev. 2009. Acesso em: 12 out. 2022.

AWASTHI, M. K.; SARSAIYA, S.; PATEL, A.; JUNEJA, A.; SINGH, R. P.; YAN, B.; AWASTHI, S. K.; JAIN, A.; LIU, T.; DUAN, Y.; PANDEY, A.; ZHANG, Z.; TAHERZADEH, M. J. Refining biomass residues for sustainable energy and bio-products: An assessment of technology, its importance, and strategic applications in circular bio-economy.

Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 127, p. 109876, 1 jul. 2020. Acesso em: 15 out. 2022.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; DE LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306–319, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/qn/a/NqSy7HhrLpMWnMpcHHXR5Js/?lang=pt>>. Acesso em: 15 out. 2022.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*--batch and continuous culture studies. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18–26, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11598806/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

BIEBL, H.; MARTEN, S.; HIPPE, H.; DECKWER, W. D. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. **Applied Microbiology and Biotechnology** **1992** **36:5**, v. 36, n. 5, p. 592–597, fev. 1992. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00183234>>. Acesso em: 30 jun. 2022.

BRACCO, S.; CALICIOGLU, O.; JUAN, M. G. S.; FLAMMINI, A. Assessing the Contribution of Bioeconomy to the Total Economy: A Review of National Frameworks. **Sustainability** **2018, Vol. 10, Page 1698**, v. 10, n. 6, p. 1698, 23 maio 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2071-1050/10/6/1698/htm>>. Acesso em: 15 out. 2022.

CHATZIFRAGKOU, A.; AGGELIS, G.; KOMAITIS, M.; ZENG, A. P.; PAPANIKOLAOU, S. Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10625–10632, 1 nov. 2011a. Acesso em: 16 out. 2022.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; DIETZ, D.; DOULGERAKI, A. I.; NYCHAS, G. J. E.; ZENG, A. P. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 101–112, 12 jul. 2011b. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3247-x>>. Acesso em: 16 out. 2022.

CHEN, Z.; LIU, H.; LIU, D. Regulation of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in *Klebsiella pneumoniae* by overexpression of dhaT and dhaD genes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 4, p. 305–309, 7 out. 2009. Acesso em: 13 out. 2022.

CHEN, Z.; LIU, H.; LIU, D. Metabolic pathway analysis of 1,3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumoniae* by overexpressing an

endogenous NADPH-dependent alcohol dehydrogenase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 3, p. 151–157, 15 maio 2011. Acesso em: 16 out. 2022.

CHOI, W. J.; HARTONO, M. R.; CHAN, W. H.; YEO, S. S. Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 1255–1264, fev. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21212944/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

CHONG, C. T.; LOE, T. Y.; WONG, K. Y.; ASHOKKUMAR, V.; LAM, S. S.; CHONG, W. T.; BORRION, A.; TIAN, B.; NG, J. H. Biodiesel sustainability: The global impact of potential biodiesel production on the energy–water–food (EWF) nexus. **Environmental Technology & Innovation**, v. 22, p. 101408, 1 maio 2021. Acesso em: 9 nov. 2022.

CHUNG, Y. C.; CHEN, Y. S.; LIN, S. H. Enhancement for gene transfection of low-descent-velocity bacteria using magnetic attraction in electroporation chip. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 213, p. 261–267, 5 jul. 2015. Acesso em: 16 out. 2022.

COMELLI, R. A.; COMELLI, R. A. Glycerol, the Co-Product of Biodiesel: One Key for the Future Bio-Refinery. **Biodiesel- Quality, Emissions and By-Products**, 16 nov. 2011. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/state.item.id>>. Acesso em: 16 out. 2022.

COSTA, M. W.; OLIVEIRA, A. A. M. Social life cycle assessment of feedstocks for biodiesel production in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 159, p. 112166, 1 maio 2022. Acesso em: 11 nov. 2022.

DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1233–1239, 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16348691/>>. Acesso em: 14 out. 2022.

DAVIS, I. J.; CARTER, G.; YOUNG, M.; MINTON, N. P. Gene Cloning in Clostridia. **Handbook on Clostridia**, p. 37–52, 29 mar. 2005. Acesso em: 15 out. 2022.

DOI, Y. Glycerol metabolism and its regulation in lactic acid bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 13, p. 5079–5093, 4 jul. 2019.

DOWER, W. J.; CHASSY, B. M.; TREVORS, J. T.; BLASCHEK, H. P. Protocols for the Transformation of Bacteria by Electroporation. **Guide to Electroporation and Electrofusion**, p. 485–499, 1 jan. 1992. Acesso em: 16 out. 2022.

DUARTE, S. H.; DE ANDRADE, C. C. P.; GHISELLI, G.; MAUGERI, F. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated

in raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 377–381, 1 jun. 2013. Acesso em: 16 out. 2022.

DÜRRE, P. Biobutanol: An attractive biofuel. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 12, p. 1525–1534, 1 dez. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/biot.200700168>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

EGOBURO, D. E.; DIAZ PEÑA, R.; KOLENDER, A.; PETTINARI, M. J. Optimization and Validation of a GC–FID Method for Quantitative Determination of 1,3-Propanediol in Bacterial Culture Aqueous Supernatants Containing Glycerol. **Chromatographia**, v. 80, n. 7, p. 1121–1127, 1 jul. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10337-017-3310-6>>. Acesso em: 10 out. 2022.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BATSOS, A.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 4, p. 573–580, 1 abr. 2009. Acesso em: 16 out. 2022.

FERNÁNDEZ-SOUSA, J. M.; GAVILANES, J. G.; MUNICIO, A. M.; PÉREZ-ARANDA, A. L-glycerol-3-phosphate dehydrogenase from the insect *Ceratitis capitata*. Purification, physicochemical and enzymic properties. **Biochimica et biophysica acta**, v. 481, n. 1, p. 6–24, 15 mar. 1977. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14695/>>. Acesso em: 11 nov. 2022.

FONSECA, B. C. Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de *Clostridium beijerinckii*. 2016. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

FONSECA, B. C.; BORTOLUCCI, J.; DA SILVA, T. M.; DOS PASSOS, V. F.; DE GOUVÊA, P. F.; DINAMARCO, T. M.; REGINATTO, V. Butyric acid as sole product from xylose fermentation by a non-solventogenic *Clostridium beijerinckii* strain under controlled pH and nutritional conditions. **Bioresource Technology Reports**, v. 10, 2020.

FONSECA, B. C.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; GUAZZARONI, M. E.; REGINATTO, V. Genome sequence of the H₂-producing *Clostridium beijerinckii* strain Br21 isolated from a sugarcane vinasse treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 139–144, 1 jan. 2019.

GALLARDO, R.; ALVES, M.; RODRIGUES, L. R. Influence of nutritional and operational parameters on the production of butanol or 1,3-propanediol from glycerol by a mutant *Clostridium pasteurianum*. **New Biotechnology**, v. 34, p. 59–67, 25 jan. 2017. Acesso em: 14 out. 2022.

GARLAPATI, V. K.; SHANKAR, U.; BUDHIRAJA, A. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 9–14, 1 mar. 2016. Acesso em: 15 out. 2022.

GUPTA, P.; KUMAR, M.; GUPTA, R. P.; PURI, S. K.; RAMAKUMAR, S. S. V. Fermentative reforming of crude glycerol to 1,3-propanediol using *Clostridium butyricum* strain L4. **Chemosphere**, v. 292, p. 133426, 1 abr. 2022. Acesso em: 16 out. 2022.

HAO, X.; AN, H.; QI, H.; GAO, X. Evolution of the exergy flow network embodied in the global fossil energy trade: Based on complex network. **Applied Energy**, v. 162, p. 1515–1522, 15 jan. 2016. Acesso em: 15 out. 2022.

HARTMANIS, M. G. N.; KLASON, T.; GATENBECK, S. Applied Microbiology Biotechnology Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. p. 66–71, 1984a.

HARTMANIS, M. G. N.; KLASON, T.; GATENBECK, S. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 1984 20:1, v. 20, n. 1, p. 66–71, jul. 1984b. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00254648>>. Acesso em: 21 set. 2022.

HEAP, J. T.; PENNINGTON, O. J.; CARTMAN, S. T.; MINTON, N. P. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 1, p. 79–85, 1 jul. 2009. Acesso em: 29 jun. 2022.

HIMMI, E. H.; BORIES, A.; BARBIRATO, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology**, v. 67, n. 2, p. 123–128, 1 fev. 1999. Acesso em: 16 out. 2022.

HONGWEN, C.; BAISHAN, F.; ZONGDING, H. Optimization of process parameters for key enzymes accumulation of 1,3-propanediol production from *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 47–53, 1 ago. 2005. Acesso em: 15 out. 2022.

JIN, P.; LI, S.; LU, S. guo; ZHU, J. guo; HUANG, H. Improved 1,3-propanediol production with hemicellulosic hydrolysates (corn straw) as cosubstrate: Impact of degradation products on *Klebsiella pneumoniae* growth and 1,3-propanediol fermentation. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1815–1821, jan. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21036601/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

JURGENS, G.; SURVASE, S.; BEREZINA, O.; SKLAVOUNOS, E.; LINNEKOSKI, J.; KURKIJÄRVI, A.; VÄKEVÄ, M.; VAN HEININGEN, A.; GRANSTRÖM, T. Butanol production from lignocellulosics. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 8, p. 1415–1434, ago. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22526420/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

KABIR, M. M.; SHIMIZU, K. Gene expression patterns for metabolic pathway in *pgi* knockout *Escherichia coli* with and without *phb* genes based on RT-PCR. **Journal of Biotechnology**, v. 105, n. 1–2, p. 11–31, 9 out. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14511906/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

KASHKET, E. R.; ZHI-YI CAO. Clostridial strain degeneration. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, n. 3, p. 307–315, 1 out. 1995. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article/17/3/307/513122>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

KAZMI, A.; CLARK, J. Biomass to Chemicals. **Comprehensive Renewable Energy**, v. 5, p. 395–410, 1 jan. 2012. Acesso em: 15 out. 2022.

KHANNA, S.; GOYAL, A.; MOHOLKAR, V. S. Production of n-butanol from biodiesel derived crude glycerol using *Clostridium pasteurianum* immobilized on Amberlite. **Fuel**, v. 112, p. 557–561, 1 out. 2013. Acesso em: 16 out. 2022.

KONGJAN, P.; JARIYABOON, R.; REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S. Co-fermentation of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol from crude glycerol derived from the biodiesel production process by newly isolated *Enterobacter* sp.: Optimization factors affecting. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, p. 100616, 1 fev. 2021. Acesso em: 16 out. 2022.

KOŚMIDER, A.; DROŹDŹYŃSKA, A.; BLASZKA, K.; LEJA, K.; CZACZYK, K. Propionic Acid Production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* Using Crude Glycerol and Whey Lactose Industrial Wastes. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, n. 6, p. 1249–1253, 2010. Disponível em: <<http://www.pjoes.com/Propionic-Acid-Production-by-Propionibacterium-r-nfreudenreichii-ssp-shermanii-Using,88503,0,2.html>>. Acesso em: 16 out. 2022.

LANDWEHR, K. R.; HILLAS, J.; MEAD-HUNTER, R.; KING, A.; O’LEARY, R. A.; KICIC, A.; MULLINS, B. J.; LARCOMBE, A. N. Biodiesel feedstock determines exhaust toxicity in 20% biodiesel: 80% mineral diesel blends. **Chemosphere**, p. 136873, 14 out. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653522033665>>. Acesso em: 16 out. 2022.

LEE, C. S.; AROUA, M. K.; DAUD, W. M. A. W.; COGNET, P.; PÉRÈS-LUCCHESI, Y.; FABRE, P. L.; REYNES, O.; LATAPIE, L. A review: Conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 963–972, 1 fev. 2015. Acesso em: 14 out. 2022.

LEJA, K.; CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biotechnological synthesis of 1,3-propanediol using *Clostridium* ssp. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 54, p. 11093–

11101, 31 out. 2013. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/96082>>. Acesso em: 15 out. 2022.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; DE OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138–145, 1 set. 2012. Acesso em: 9 nov. 2022.

LI, Z. L.; PAN, D. D.; LU, M. X.; DU, Y. Z. Identification of qRT-PCR reference genes for *Chilo suppressalis* (Walker) during parasitism by *Cotesia chilonis* (Matsumura). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 1, p. 107–112, 1 abr. 2020. Acesso em: 15 out. 2022.

LIBERATO, V.; BENEVENUTI, C.; COELHO, F.; BOTELHO, A.; AMARAL, P.; PEREIRA, N.; FERREIRA, T. *Clostridium* sp. as Bio-Catalyst for Fuels and Chemicals Production in a Biorefinery Context. **Catalysts** 2019, Vol. 9, Page 962, v. 9, n. 11, p. 962, 15 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4344/9/11/962/htm>>. Acesso em: 16 out. 2022.

LITTLE, G. T.; WILLSON, B. J.; HEAP, J. T.; WINZER, K.; MINTON, N. P. The Butanol Producing Microbe *Clostridium beijerinckii* NCIMB 14988 Manipulated Using Forward and Reverse Genetic Tools. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 11, p. 1700711, 1 nov. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/biot.201700711>>. Acesso em: 29 jun. 2022.

LOUREIRO-PINTO, M.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Valorization of crude glycerol from the biodiesel industry to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 10702: Influence of pretreatment with ion exchange resins. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 94, n. 7, p. 1242–1248, 1 jul. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cjce.22501>>. Acesso em: 16 out. 2022.

LUERS, F.; SEYFRIED, M.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 154, n. 2, p. 337–345, 15 set. 1997. Acesso em: 15 out. 2022.

MA, C.; ZHANG, L.; DAI, J.; XIU, Z. Relaxing the coenzyme specificity of 1,3-propanediol oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae* by rational design. **Journal of Biotechnology**, v. 146, n. 4, p. 173–178, 15 abr. 2010. Acesso em: 16 out. 2022.

MADDOX, I. S.; STEINER, E.; HIRSCH, S.; WESSNER, S.; GUTIERREZ, N. a; GAPES, J. R.; SCHUSTER, K. C. The cause of “acid-crash” and “acidogenic fermentations”

during the batch acetone-butanol-ethanol (ABE-) fermentation process. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 95–100, 2000.

MAERVOET, V. E. T.; DE MEY, M.; BEAUPREZ, J.; DE MAESENEIRE, S.; SOETAERT, W. K. Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. **Organic Process Research and Development**, v. 15, n. 1, p. 189–202, 21 jan. 2011. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/op1001929>>. Acesso em: 13 out. 2022.

MERMEJO, B. da C. Produção de 1,3-propanodiol por fermentação de glicerol por diferentes cepas de *Clostridium*. 2020. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

MERMEJO, B. da C.; BORTOLUCCI, J.; DE ANDRADE, A. R.; REGINATTO, V. The Non-solventogenic *Clostridium beijerinckii* Br21 Produces 1,3-Propanediol From Glycerol With Butyrate as the Main By-Product. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, p. 256, 7 jul. 2022. Acesso em: 14 out. 2022.

MERRICK, C. A.; WARDROPE, C.; PAGET, J. E.; COLLOMS, S. D.; ROSSER, S. J. Rapid Optimization of Engineered Metabolic Pathways with Serine Integrase Recombinational Assembly (SIRA). **Methods in enzymology**, v. 575, p. 285–317, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27417934/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

METSOVITI, M.; PARASKEVAIDI, K.; KOUTINAS, A.; ZENG, A. P.; PAPANIKOLAOU, S. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1872–1882, 1 dez. 2012. Acesso em: 16 out. 2022.

METSOVITI, M.; ZENG, A. P.; KOUTINAS, A. A.; PAPANIKOLAOU, S. Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 4, p. 408–418, 20 fev. 2013. Acesso em: 16 out. 2022.

MITREA, L.; TRIF, M.; CĂTOI, A. F.; VODNAR, D. C. Utilization of biodiesel derived-glycerol for 1,3-PD and citric acid production. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 6 nov. 2017. Disponível em: <<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0807-5>>. Acesso em: 15 out. 2022.

MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D. J.; WANG, W.; XIU, Z. L. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations.

Biotechnology Letters 2006 28:21, v. 28, n. 21, p. 1755–1759, 10 ago. 2006. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-006-9154-z>>. Acesso em: 16 out. 2022.

MURRAY, N. E. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 64, n. 2, p. 412–434, jun. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10839821/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

NAYLOR, R. L.; HIGGINS, M. M. The rise in global biodiesel production: Implications for food security. **Global Food Security**, v. 16, p. 75–84, 1 mar. 2018. Acesso em: 9 nov. 2022.

NGO, T. A.; KIM, M. S.; SIM, S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 10, p. 5836–5842, 1 maio 2011. Acesso em: 16 out. 2022.

OVERLAND, I.; JURAEV, J.; VAKULCHUK, R. Are renewable energy sources more evenly distributed than fossil fuels? **Renewable Energy**, v. 200, p. 379–386, 1 nov. 2022. Acesso em: 15 out. 2022.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 1, p. 60–71, 1 jan. 2008. Acesso em: 16 out. 2022.

PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHEZ, P.; PARISET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. **Journal of Biotechnology**, v. 77, n. 2–3, p. 191–208, 17 fev. 2000. Acesso em: 16 out. 2022.

PITT, F. D.; DOMINGOS, A. M.; BARROS, A. A. C. Purification of residual glycerol recovered from biodiesel production. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 42–51, 1 jul. 2019. Acesso em: 16 out. 2022.

POEHLEIN, A.; SOLANO, J. D. M.; FLITSCH, S. K.; KRABBEN, P.; WINZER, K.; REID, S. J.; JONES, D. T.; GREEN, E.; MINTON, N. P.; DANIEL, R.; DÜRRE, P. Microbial solvent formation revisited by comparative genome analysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-017-0742-z>>. Acesso em: 11 nov. 2022.

PROCENTESE, A.; RAGANATI, F.; OLIVIERI, G.; RUSSO, M. E.; SALATINO, P.; MARZOCHELLA, A. Continuous xylose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*-- Assessment of solventogenic kinetics. **Bioresource technology**, v. 192, p. 142–148, 1 set. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26025352/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

QI, X.; CHEN, Y.; JIANG, K.; ZUO, W.; LUO, Z.; WEI, Y.; DU, L.; WEI, H.; HUANG, R.; DU, Q. Saturation-mutagenesis in two positions distant from active site of a *Klebsiella pneumoniae* glycerol dehydratase identifies some highly active mutants. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 43–50, 12 out. 2009. Acesso em: 16 out. 2022.

QURESHI, N.; LI, X. L.; HUGHES, S.; SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology progress**, v. 22, n. 3, p. 673–680, maio 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16739948/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

ROBERTS, R. J.; BELFORT, M.; BESTOR, T.; BHAGWAT, A. S.; BICKLE, T. A.; BITINAITE, J.; BLUMENTHAL, R. M.; DEGTYAREV, S. K.; DRYDEN, D. T. F.; DYBVIK, K.; FIRMAN, K.; GROMOVA, E. S.; GUMPORT, R. I.; HALFORD, S. E.; HATTMAN, S.; HEITMAN, J.; HORNBY, D. P.; JANULAITIS, A.; JELTSCH, A.; JOSEPHSEN, J.; KISS, A.; KLAENHAMMER, T. R.; KOBAYASHI, I.; KONG, H.; KRÜGER, D. H.; LACKS, S.; MARINUS, M. G.; MIYAHARA, M.; MORGAN, R. D.; MURRAY, N. E.; NAGARAJA, V.; PIEKAROWICZ, A.; PINGOUD, A.; RALEIGH, E.; RAO, D. N.; REICH, N.; REPIN, V. E.; SELKER, E. U.; SHAW, P. C.; STEIN, D. C.; STODDARD, B. L.; SZYBALSKI, W.; TRAUTNER, T. A.; VAN ETTEN, J. L.; VITOR, J. M. B.; WILSON, G. G.; XU, S. Y. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 7, p. 1805–1812, 1 abr. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12654995/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

RODRIGUES, E. L. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido butírico por *Clostridium beijerinckii* Br21. 2021. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

ROER, L.; AARESTRUP, F. M.; HASMAN, H. The EcoKI type I restriction-modification system in *Escherichia coli* affects but is not an absolute barrier for conjugation. **Journal of bacteriology**, v. 197, n. 2, p. 337–342, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25384481/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

RUHAL, R.; AGGARWAL, S.; CHOUDHURY, B. Suitability of crude glycerol obtained from biodiesel waste for the production of trehalose and propionic acid. **Green**

Chemistry, v. 13, n. 12, p. 3492–3498, 1 dez. 2011. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2011/gc/c1gc15847c>>. Acesso em: 16 out. 2022.

SAHA, C. K.; CARTER, A. v. Phase-out or lock-in fossil fuels? Least developed countries' burning dilemma. **The Extractive Industries and Society**, v. 11, p. 101140, 1 set. 2022. Acesso em: 15 out. 2022.

SAINT-AMANS, S.; PERLOT, P.; GOMA, G.; SOUCAILLE, P. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. **Biotechnology Letters** **1994 16:8**, v. 16, n. 8, p. 831–836, ago. 1994. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00133962>>. Acesso em: 16 out. 2022.

SANDOVAL-ESPINOLA, W. J.; CHINN, M. S.; THON, M. R.; BRUNO-BÁRCENA, J. M. Evidence of mixotrophic carbon-capture by n-butanol-producer *Clostridium beijerinckii*. **Scientific Reports** **2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 6 out. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-12962-8>>. Acesso em: 24 out. 2022.

SCHIEL-BENGELSDORF, B.; MONTOYA, J.; LINDER, S.; DÜRRE, P. Butanol fermentation. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.827746>, v. 34, n. 13–14, p. 1691–1710, 1 jul. 2013. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330.2013.827746>>. Acesso em: 16 out. 2022.

SCHOLTEN, E.; DÄGELE, D. Succinic acid production by a newly isolated bacterium. **Biotechnology letters**, v. 30, n. 12, p. 2143–2146, dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18651227/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

SEO, M. Y.; SEO, J. W.; HEO, S. Y.; BAEK, J. O.; RAIKHWADA, D.; OH, B. R.; SEO, P. S.; CHOI, M. H.; KIM, C. H. Elimination of by-product formation during production of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumoniae* by inactivation of glycerol oxidative pathway. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 527–534, set. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19352645/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

SILVA, G. P. da; CONTIERO, J.; NETO, P. M. Á.; DE LIMA, C. J. B. 1,3-Propanodiol: produção, aplicações e potencial biotecnológico. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 527–534, 2014. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=51>. Acesso em: 15 out. 2022.

SINGH, R. S.; KAUR, N.; SINGH, D.; BAJAJ, B. K.; KENNEDY, J. F. Downstream processing and structural confirmation of pullulan - A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, p. 553–564, 31 maio 2022. Acesso em: 13 out. 2022.

SJÖBERG, G.; GUEVARA-MARTÍNEZ, M.; VAN MARIS, A. J. A.; GUSTAVSSON, M. Metabolic engineering applications of the *Escherichia coli* bacterial artificial chromosome. **Journal of biotechnology**, v. 305, p. 43–50, 10 nov. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31505217/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

SUN, J.; VAN DEN HEUVEL, J.; SOUCAILLE, P.; QU, Y.; ZENG, A. P. Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 263–272, mar. 2003. Acesso em: 13 out. 2022.

SUN, Y. Q.; SHEN, J. T.; YAN, L.; ZHOU, J. J.; JIANG, L. L.; CHEN, Y.; YUAN, J. L.; FENG, E. M.; XIU, Z. L. Advances in bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol: Prospects and challenges. **Process Biochemistry**, v. 71, p. 134–146, 1 ago. 2018. Acesso em: 16 out. 2022.

SUN, Y.; ZHENG, Y.; WANG, X.; ZHOU, J.; XIU, Z. Fermentation performance and mechanism of a novel microbial consortium DUT08 for 1,3-propanediol production from biodiesel-derived crude glycerol under non-strictly anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 27–34, 1 ago. 2019. Acesso em: 16 out. 2022.

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D.; BIAŁAS, W. Scale-up of anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSP1 from crude glycerol. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 20 fev. 2014. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-14-45>>. Acesso em: 16 out. 2022.

TAKKELLAPATI, S.; LI, T.; GONZALEZ, M. A. An Overview of Biorefinery Derived Platform Chemicals from a Cellulose and Hemicellulose Biorefinery. **Clean technologies and environmental policy**, v. 20, n. 7, p. 1615, 1 set. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31505217/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

TAO, H.; BAUSCH, C.; RICHMOND, C.; BLATTNER, F. R.; CONWAY, T. Functional Genomics: Expression Analysis of *Escherichia coli* Growing on Minimal and Rich Media. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 20, p. 6425, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31505217/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

TEE, Z. K.; JAHIM, J. M.; TAN, J. P.; KIM, B. H. Preeminent productivity of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* JKT37 and the role of using calcium carbonate as pH neutraliser in glycerol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 296–304, 1 jun. 2017. Acesso em: 16 out. 2022.

TUMMALA, S. B.; WELKER, N. E.; PAPOUTSAKIS, E. T. Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 1923–1934, mar. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12618456/>>. Acesso em: 21 set. 2022.

UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W. H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122585, 1 mar. 2020. Acesso em: 15 out. 2022.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W. R. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, v. 20, n. 7, p. 1736–1737, 25 ago. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/plcell/article/20/7/1736/6092392>>. Acesso em: 15 out. 2022.

UPRETY, B. K.; DALLI, S. S.; RAKSHIT, S. K. Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities. **Energy Conversion and Management**, v. 135, p. 117–128, 1 mar. 2017. Acesso em: 16 out. 2022.

UPRETY, B. K.; VENKATESAGOWDA, B.; RAKSHIT, S. K. Current Prospects on Production of Microbial Lipid and Other Value-Added Products Using Crude Glycerol Obtained from Biodiesel Industries. **BioEnergy Research** 2017 10:4, v. 10, n. 4, p. 1117–1137, 13 jul. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-017-9857-0>>. Acesso em: 16 out. 2022.

USMANI, Z.; SHARMA, M.; AWASTHI, A. K.; SIVAKUMAR, N.; LUKK, T.; PECORARO, L.; THAKUR, V. K.; ROBERTS, D.; NEWBOLD, J.; GUPTA, V. K. Bioprocessing of waste biomass for sustainable product development and minimizing environmental impact. **Bioresource technology**, v. 322, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33380376/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

VERAS, S. T. S.; ROJAS, P.; FLORENCIO, L.; KATO, M. T.; SANZ, J. L. Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 140–148, 1 maio 2019. Acesso em: 14 out. 2022.

VIVEK, N.; PANDEY, A.; BINOD, P. Biological valorization of pure and crude glycerol into 1,3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3. **Bioresource technology**, v. 213, p. 222–230, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26920628/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

WANG, W.; FAN, L. W.; ZHOU, P. Evolution of global fossil fuel trade dependencies. **Energy**, v. 238, p. 121924, 1 jan. 2022. Acesso em: 15 out. 2022.

WANG, Z.; WATSON, J.; WANG, T.; YI, S.; SI, B.; ZHANG, Y. Enhancing energy recovery via two stage co-fermentation of hydrothermal liquefaction aqueous phase and crude glycerol. **Energy Conversion and Management**, v. 231, p. 113855, 1 mar. 2021. Acesso em: 16 out. 2022.

WEI, X.; LIU, Q.; PU, A.; WANG, S.; CHEN, F.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; DONG, Z.; WAN, X. Knowledge Mapping of bioeconomy: A bibliometric analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 373, p. 133824, 1 nov. 2022. Acesso em: 15 out. 2022.

WERTZ, J. E.; LOW, K. B. Genetics, Microbial (general). **Reference Module in Biomedical Sciences**, 1 jan. 2017. Acesso em: 15 out. 2022.

WILKENS, E.; RINGEL, A. K.; HORTIG, D.; WILLKE, T.; VORLOP, K. D. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1057–1063, fev. 2012a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21972131/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

WILKENS, E.; RINGEL, A. K.; HORTIG, D.; WILLKE, T.; VORLOP, K. D. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1057–1063, 5 fev. 2012b. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3595-6>>. Acesso em: 16 out. 2022.

WILSON, M.; DERISI, J.; KRISTENSEN, H. H.; IMBODEN, P.; RANE, S.; BROWN, P. O.; SCHOOLNIK, G. K. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12833–12838, 26 out. 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10536008/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

WISCHRAL, D.; BARCELOS, C. A.; PEREIRA, N.; PELLEGRINI PESSOA, F. L. 1,3-PROPANEDIOL: STATISTICAL OPTIMIZATION OF MEDIUM TO IMPROVE PRODUCTION BY *Clostridium beijerinckii* DSM 791. **JOURNAL OF ADVANCES IN BIOTECHNOLOGY**, v. 5, n. 2, p. 614–624, 14 dez. 2015. Disponível em: <<https://rajpub.com/index.php/jbt/article/view/1560>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

WISCHRAL, D.; ZHANG, J.; CHENG, C.; LIN, M.; DE SOUZA, L. M. G.; PESSOA, F. L. P.; PEREIRA, N.; YANG, S. T. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 100–110, 1 jul. 2016. Acesso em: 2 maio. 2021.

WU, Z.; WANG, Z.; WANG, G.; TAN, T. Improved 1,3-propanediol production by engineering the 2,3-butanediol and formic acid pathways in integrative recombinant *Klebsiella*

pneumoniae. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 2, p. 194–200, 20 out. 2013. Acesso em: 16 out. 2022.

XIN, B.; WANG, Y.; TAO, F.; LI, L.; MA, C.; XU, P. Co-utilization of glycerol and lignocellulosic hydrolysates enhances anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium diolis*. **Scientific reports**, v. 6, 11 jan. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26750307/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

XIN, X.; CHENG, C.; DU, G.; CHEN, L.; XUE, C. Metabolic Engineering of Histidine Kinases in *Clostridium beijerinckii* for Enhanced Butanol Production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 214, 20 mar. 2020. Acesso em: 15 out. 2022.

XUE, G. P.; JOHNSON, J. S.; DALRYMPLE, B. P. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 34, n. 3, p. 183–191, 1 jan. 1999. Acesso em: 16 out. 2022.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 14 dez. 2012. Disponível em: <<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-5-13>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

YANG, X.; KIM, D. S.; CHOI, H. S.; KIM, C. K.; THAPA, L. P.; PARK, C.; KIM, S. W. Repeated batch production of 1,3-propanediol from biodiesel derived waste glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. **Chemical Engineering Journal**, v. 314, p. 660–669, 15 abr. 2017. Acesso em: 16 out. 2022.

YUAN, J.; ZHANG, X.; LIU, C.; CHANG, L.; XIE, J.; FENG, E.; YIN, H.; XIU, Z. Robust optimization for nonlinear time-delay dynamical system of *dha* regulon with cost sensitivity constraint in batch culture. **Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation**, v. 38, p. 140–171, 1 set. 2016. Acesso em: 15 out. 2022.

YULIANA, M.; TRISNA, L.; SARI, F.; LUNARDI, V. B. Glycerol purification using reactivated spent bleaching earth from palm oil refineries: Zero-waste approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 3, p. 105239, 1 jun. 2021. Acesso em: 16 out. 2022.

ZHANG, G. L.; MA, B. bin; XU, X. L.; LI, C.; WANG, L. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 3, p. 256–260, 15 dez. 2007. Acesso em: 16 out. 2022.

ZHANG, Y.; HUANG, Z.; DU, C.; LI, Y.; CAO, Z. Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. **Metabolic Engineering**, v. 11, n. 2, p. 101–106, 1 mar. 2009. Acesso em: 16 out. 2022.

ZHANG, Y.; LI, Y.; DU, C.; LIU, M.; CAO, Z. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: A key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. **Metabolic Engineering**, v. 8, n. 6, p. 578–586, 1 nov. 2006. Acesso em: 16 out. 2022.

ZHAO, L.; ZHENG, Y.; MA, X.; WEI, D. Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1,3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 3, p. 313–320, 6 abr. 2009. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-008-0250-4>>. Acesso em: 13 out. 2022.

ZHENG, P.; WEREATH, K.; SUN, J.; VAN DEN HEUVEL, J.; ZENG, A. P. Overexpression of genes of the *dha* regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 2160–2169, 1 out. 2006. Acesso em: 13 out. 2022.

ZHU, C.; FANG, B.; WANG, S. Effects of culture conditions on the kinetic behavior of 1,3-propanediol fermentation by *Clostridium butyricum* with a kinetic model. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 130–137, 1 jul. 2016. Acesso em: 16 out. 2022.

ANEXOS

ANEXO 1 - Sequências (5' 3') dos plasmídeos empregados durante as atividades de pesquisa.

a) pMTL83251

CCTGCAGGATAAAAAAATGTAGATAAAATTTTATAAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTTTATCAGGAAACAGCTAT
 GACCCGCGGCTGTATCCATATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCCTAGAGTCGACGTCACGCGT
 CCATGGAGATCTCGAGGCTGCAGACATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAACCCCTGGCG
 TTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
 CAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTAGCATAAAAAATAAGAAGCCTGCATTTGCAGGCTTCTTATTTTTATGGCG
 CGCCGCCATATTTTTTTGAACAATTGACAATTCATTTCTATTTTTTTATTAAGTGATAGTCAAAGGCATAACAGTGCTGAA
 TAGAAAGAAATTTACAGAAAAGAAAATTTATAGAATTTAGTATGATTAATTTACTCATTATGAATGTTTAAATGAATACAAA
 AAAAAACTTGTATGTATTCATTACGGGTTAAAATATAGACAAGTTGAAAAATTTAATAAAAAAATAAGTCTCAGCTCT
 TATATATTAAGCTACCAACTTAGTATATAAGCCAAAACCTAAATGTGTCTACCAACACATCAAGCCGTTAGAGAACTCTATCTA
 TAGCAATATTTCAAATGTACCGACATACAAGAGAAACCTTAACTATATATATTTCAATTTATGAGATTATCTTAAACAGATATAA
 ATGTAATTTGCAATAAGTAAGATTTAGAAGTTTATAGCCTTTGTGTATTGGAAGCAGTACGCAAAGGCTTTTTTATTTGATAA
 AAATTAGAAGTATATTTATTTTTTCATAATTAATTTATGAAAATGAAAGGGGGTGAGCAAAGTGACAGAGGAAAGCAGTATCT
 TATCAAATAACAAGGTATTAGCAATATCATTTACTTTAGCAGTAAACATTTATGACTTTTATAGTGCTTGTAGCTAAGTAG
 TACGAAAGGGGAGCTTTAAAAAGCTCCTTGAATACATAGAATTCATAAAATTAATTTATGAAAAGAAGGGCGTATATGAAA
 CTTGTAAAAATGCAAAGAGTTTATTAAGATACTGAAATATGCAAAATACATTCGTTGATGATTCATGATAAAAACAGTAGCA
 ACCTATTGCAGTAAATACAATGAGTCAAGATGTTTACATAAAGGAAAAGTCCAATGTATTAATTTGTTCAAAGATGAACCGATA
 TGGATGGTGTGCCATAAAAAATGAGATGTTTACAGAGGAAGAACAGAAAAAAGAAGCTACATGCATTAATATTTATGCAAGGA
 GCTTTAAAAAGCTCATGTAAGAAGAGTAAAAAGAAAAATAATTTATTTTATTAATTTAATTTAGAGTGCAGACACAGTA
 TGCATAAAAAATATATCTGTGGTGTAGTGAGCCGATACAAAAGGATAGTCACTCGCATTTTTCATAATACATCTTATGTTATG
 ATTATGTGTCCGGTGGGACTTCACGACGAAAACCCACAATAAAAAAAGAGTTCCGGGGTAGGGTTAAGCATAGTTGAGGCAACTA
 AACAATCAAGCTAGGATATGCAGTAGCAGACCGTAAGGTCGTGTTTAGGTGTGTTGTAATACATACGCTATTAAGATGTA
 AATACGGATACCAATGAAGGAAAAGTATAATTTTTGGATGTAGTTTTGTTTTCATCTATGGGCAAACTACGTCCAAAGCCG
 TTTCCAAATCTGCTAAAAAGTATATCCTTTCTAAAATCAAAGTCAAGTATGAAATCATAAATAAAGTTTAAATTTGAAGTTAT
 TATGATATTATGTTTTCTATTAATAAATTAAGTATATAGAATAGTTTAAATAAGTATATACTTAATGTGATAAGTGTCT
 GACAGTGTACAGAAAGGATGATTGTTATGGATTATAAGCGCCGGCCGAAGCAAACCTAAGAGTGTGTTGATAGTGCAGTAT
 CTTAAAAATTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAAGGAGTGATTACATGAACAAAA
 ATATAAAATATTCTCAAACCTTTTTAACGAGTGAAAAGTACTCAACCAAATAATAAAACAATTGAATTTAAAAAGAAACCGAT
 ACCGTTTACGAAATTTGAACAGGTAAGGGCATTAAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGCTATTGAATT
 AGACAGTCACTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATTAAACTGAATACTCGTGTCACTTTAATTCACCAAGATATTCTACAGT
 TTCAATTCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTTGTTGGGAGTATTCCTTACCATTAAAGCACACAAAATTTAAAAAAGTGGTT
 TTTGAAAGCCATGCGTCTGACATCTATCTGATTGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGG
 GTTGCTCTTGCACACTCAAGTCTCGATTTCAGCAATTGCTTAAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTTCATCTAAACCAAAGTAAACA
 GTGTCTTAATAAAACTTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAAATATTGGAAGCTATATACGTACTTTGTTTCAAATGG
 GTCATTCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAATGAAACACGCCAAAGTAACAATTTAAGTAC
 CGTTACTTATGAGCAAGTATGTCTATTTTTTAATAGTTATCTATTATTTAACGGGAGGAAATAATCTATGATCGCTTTTGT
 AAATTTGGAAAGTTACAGTCTACTAAAGGAAATGTGTTTTAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCTTAAACGTGA
 GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCT
 GCTTGCAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGTTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
 GGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACC
 GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA
 GACGATAGTTACCGGATAAGGGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC
 ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCAGAGGGAGAAAAGGGCAGAGGTATCCGGTAAG
 CGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCC
 ACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGGCCTTTTTTA
 CGGTTCCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC
 CTTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGGAAAGCGGAGCGCCCAA
 TACGCAAGGGCCCTGCTTCGGGGTCAATATAGCATTTTTTTCGGTATATCCATCCTTTTTTCGACAGATATACAGGATTTTTGC
 CAAAGGTTTCGTAGACTTTCTTGGTGTATCCAACGGCGTCAAGCCGAGGATAGGTGAAGTAGGCCACCCGCGAGCGG
 GTGTTCTTCTTCACTGTCTTATTCGACCTGCGGGTGTCAACGGGAATCCTGCTCTGCGAGGCTGGCCGGCTACCGCCG
 GCGTAACAGATGAGGGCAAGCGGATGGCTGATGAAACCAAGCCAACCAGGAAGGGCAGCCACCTATCAAGGTGTACTGCCTT
 CCAGACGAACGAAGAGCGATTGAGGAAAAGCGCGCGCGGCGGCATGAGCCTGTGCGCCTACCTGCTGGCCGTGGCCAGGG
 CTACAAAATCACGGGCGTCTGGACTATGAGCACGTCCGCGAGCTGGCCCGCATCAATGGCGACCTGGGCCGCTGGGCGGCC
 TGCTGAAACTCTGGCTCACCGACGACCCGCGCACGCGCGGGTTCCGGTATGCCACGATCCTCGCCCTGCTGGCGAAGATCGAA
 GAGAAGCAGGACGAGCTTGGCAAGGTGATGATGGCGTGGTCCGCCGAGGGCAGAGCCATGACTTTTTTAGCCGCTAAAACG
 GCCGGGGTGGCGCTGATTGCCAAGCAGTCCCCATGCGCTCCATCAAGAAGAGCGACTTCGCGGAGCTGGTGAAGTACATC
 ACCGACGAGCAAGGCAAGACCGATCGGGCC

b) pMTL83251

CCTGCTCTGCGAGGCTGGCCGGCTACCGCCGGCGTAACAGATGAGGGCAAGCGGATGGCTGATGAAACCAAGCCAA
 CCAGGAAGGGCAGCCACCTATCAAGGTGACTGCCTTCCAGACGAACGAAGAGCGATTGAGGAAAAGGCGCGCGGCCGGC
 ATGAGCCTGTGCGCCTACCTGCTGGCCGTCGGCCAGGGCTACAAAATCACGGGCGTCTGGACTATGAGCAGCTCCGCGAGCT
 GGCCCGCATCAATGGCGACCTGGGCGCCCTGGGCGGCCCTGCTGAAACTCTGGCTCACCGACGACCCGCGCACGGCGCGGTTCCG
 GTGATGCCACGATCCTCGCCCTGCTGGCGAAGATCGAAGAGAAAACGAGGACGAGCTTGGCAAGGTCATGATGGGCGTGGTCCGC
 CCGAGGGCAGAGCCATGACTTTTTTAGCCGCTAAAAACGGCCGGGGGGTGC GCGTGATTGCCAAGCACGTCCCCATGCGCTCCA
 TCAAGAAGAGCGACTTCGCGGAGCTGGTGAAGTACATCCCGACGAGCAAGGCAAGACCGATCGGGCCCCCTGCAGGATAAAA
 AAATTGTAGATAAAATTTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTTTATCAGGAAACAGCTATGACCGCGGCCGCTGTATCCAT
 ATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGTGCAGCTTACCCTCATAACTGCTATTACAGCATCACATTTTGTAG
 CAGAACGAGCACTTCAATATGATATTTATGTCCATTGTGAAAGGGATTATATCAACTATTATCCAGTTACGTTACATAGAA
 ATTTTCCTTCTAAAAATTTTATTCCATGTCAAGAACTCTGTTTATTTTCATTAAGAAGCTATAAGTACAAAGTATAGGGCAT
 TTTAACAAATTTACCTAGTATATTGATTGATATTTTATTTTAAAAATGCCTAAGTGAATATATACATATTTAACAATAAAAA
 AGTATTAGTGTAGGATTTTTAAATAGAGTATCTATTTTCAGATTAATTTTTGCTTATTTGATTACATTATATAATATTGAG
 TAAAGTATTGACTAGCAAAATTTTTGATACTTTAATTTGTGAAATTTCTTATCAAAAAGTTATATTTTGAATGATTTTTATT
 GAAAAATACAATAAAAAGGATTATAGTATAAGTGTGTGTAATTTTGTGTTAAATTTAAAGGGAGGACTCTAGAGATGATATC
 TAAAGGGTTTTCAAAAACCACTGAGAGGGTTGAAAGATTA AAAAGAATGATTGTGGATGCAATTCGGTATGTAGAATCAGAAA
 GAGCGGTTCTGTAAACAGAAATCATATAAGGAAAACAGAAGGCTATCTCCTATATTAAGACGTGCTAAAGCCGTAGAAAAATA
 TTTAACAAATTTACCTATTTCTGTAAGATGAATTAGTAGTTGGTGCAATTTACTAAAAATCCACGTTCTACTGAAATTTG
 TCCAGAATTTCTTATGATTGGGTAGCTAAAGAATTTGACACAATGGGAACAAGAATTGCAGATCCATTCCAATTTCCAAGG
 AAACAGCGGCAGAATTAAGTGAAGCATTTAAATATTGGGAAGGTAAGACCACAAGTGCACCTGCTGATTCTTACATGTCTCAA
 GAAGCAAAAGACTGTATGGCAAATGGAGTATTTACTGTAGGAAATTTTCTATGGTGGAGTTGGTTCACATTTGTGTTGATTA
 CGGAAAGATTTTAAAGAAAAGGGTTTTAAAGGCATTTATTGCTGAAGTTATTGAAGCAATGAGTAAAATGGACAAGAAGGACCTG
 ATTTATATAAAGAAAACAACAATTTTATAATGCTGTAGTAATTTCTTATAGCGCAGCAATAAATTTTGCACATAGATATGCTCAA
 AAAGCTAGAGATATGGCGGCTATAGAATTAACCCCTACTAGAAAAGCAGAATTTGTTACAAATAGCTGCTAACTGTGAAAGAGT
 ACCTGAAAATGGTGCAACAACCTTCTATGAAGCTTGCCAATCATTCTGGTTCATTCAAATAATGGTTCAAATTTGAATCTAATG
 GACACTCAATTTACCAGGACGTTTTGATCAATATATGTATCCTTACCTTAAAGAAGATAAAAAACATCTCAAAAAGAAATTTGCT
 CAAGAGTTAGTTGATTGTATTTGGATTAACATAATGATATTAATAAAAACCTGATGAAATTTACAGCTCAAGCTTTTGCAGG
 TTATGCTGTGTTCCAAAACCTATGTGTTGGTGGACAAAATGAAGAAGGGCTTGATGCCACAATGAAGTATCTTACATGTGTA
 TGGAAAGCAACAGCTCATGTTAAATACCAGCACCTTCAATCTCTATCCGTGATGGCAAGGGACTCCAGATGAATTTCTTGTTA
 AGAGTTGCGAAGTGCAGAAATAGGCCCTGGTGTACCTGCTATGCAATGATGAAGTTATAATCTCTGCATTAGTTAATAG
 AGGTGTTACTCTTAGAGATGCACGTAACTATGTGATTACTCGCTGTGTTGAACTCAATGTCCAACAAGCAGAAGGCTGGC
 ATGATGCACATTTCTTTAATGTAGCTAAGGTATTAGAAATTTACATTAATAATGGTAAAGTGAAGCAACAAGCAATTAGGTCCT
 ATCACAGGGGATATAACAACATTTAAGAATATAGATGATTTCTATGCAGCATTTAAGAAGCAAAATGGAATACCTTTGTTTACTA
 TCTTGTGTAAGCAGATAACTGTGTTGATTATGCTCATGCTGAAAGAGCGCCATTACCATTCTTATCAGCAATGGTTGATGATT
 GTATAGGAAGAGGTAATCAGTTCAAGAAGGTGGAGCAATTTATAACTTTACAGGACCACAAGCTTTTGGTATAGCAGATACA
 GGAGATTTCCGTATATGCAATTCAAAACATGTATTTGAAGATAAAAACCTATTGCAATGGATCAATTAAGAAGCAGCATTAGATGC
 AAATTTGGACATACTGGCGTTAATGCAGTTAGTACAAGCAATAACAATGCTGATGTTACTGAAATGCAGATATATCAAGCAG
 TTAAGAGAAATATAAGTAAATCTGGATCAATTTGATATATCTGAAATTTCAAAGCAGAATCTCTCAGAATTTACTCTTCACTAAA
 ACAACAGTTTCAGGAGATATTGATAATATAAGAAGACTTCTTGAAGTACTCCTTGTCTTTGGTAATGATATAGATGAAGTTGA
 TATGGTTGCTCGTAAATGTGCACAAATATACTGCTTCAAGTTGAAAAATATACTAACCCACGTGGAGGACAATTTCAAGCTG
 GAGTTTACCAGTATCTGCAATGTATTATTTGGTAAAGATGTTGGGGCATTACCAGATGGTAGATTAGCTAAGACTCCTCTT
 GCTGATGGTGTATCTCCTAGAGCAGGTAAAGATTGTGCAGGTCCAACCTGCAGCAGCAATTTCTGTTGCTAAGCTAGATCACTT
 TGTAGCATCAAAATGGTACACTTTATAATCAAAAATCTTACCATCTGCAGTTGCTGGAGATACAGGATTACAAAACCTTTGCTT
 CTGTAATAAGAAGTTACTTTGATCATAAAGGTATGCTATTTCAATTTAATGTAATGATAAGCAATTTATTATAGATGCTCAA
 AAGCACCCAGAAAATATAAAGACCTGGTTGTTGCTGTTGCAGGCTATAGTCTCAATTTACTGTTATTAGCAAAAGGAAGTACA
 AGATGACATTATAAATCGTACTGAACATTTCACTTTAAGCTTATTTGAACATAAATAAGTAGGCCAAAATTTTATCCCTTATAAG
 TTTTATTTGAAAAGTTACACTTTATAAGGTTAGGGGAGATGTGCATGATGGATACAATTAATATAGTATGGAAAGGAACAGT
 ATTTGATATACAGAGATTTCTTATACATGATGGCCAGGAATTCGTACAATAGTTTTTTTTAAAGGATGCTCTTTATCATGCT
 TATGGTGTAGCAATCCTGAATCACAGAAAATTAACCTGTCATAATGTATCAATCTGCGAATTTGATTCATTTGTGGAAGATGT
 ATTTACAGCTGCAAAATAGGTGCAATTAGTGTATAATAAAGGTTTTATAAATAGAGAAATTTGCACAGCATGTGGTGAATG
 TAGCAATGTTGTCCAAACAGCTCTTTAGTCTTAAAAGGTA AAAAATGACGATTGAACAAGTTATAAAAAGAACTCAAAAAG
 ATGCTATAAATATAGACGATCTGGTGGTGAATCACTTTATCAGGAGGAGAACCCTATTACAGTCAGATTTTTTCAAAAAGAA
 CTTTTTAAGGCATGTAAAGCACAAGGTTGGCATAACAGCTATTGAAACTACAGGTTATGCAAAATTCAGAACTATTGAAAAGT
 ATTTCCATATATAGATTTAGTGCTTATGGATATTAAGAGTACAAATCTTGAATTCACAGAAAATACACAGGAGTTTCTAACG
 AAATAATTTCAATAATGCAAAAGAGAATTTCTGAAATATCAAAAATGGTAGTTAGAGTACCATTAATACCAGACTTTAATTTCT
 TCAATTCAGATATTTTGGAAATATGTAGGTTTACTAAAACCTTTGAATAACATTTGATACGATTCATTTGTTACCATACCATA
 TTAGTGTGAAAATAAATATGAACCTCTTGAAGAGATATCTTATGAAAGACTCACGGTCATTAAGAAGATGAGATTGAAGT
 TCTTAAAAAGATTTATTAGGATCAGGGGATTAATGATATTTATTGGTGGTTAAAGATATAAATTTTAGAATGGAGGAGTCAAAA
 TGGATCAACAATTTGATTGAAAAGGTAATGAAACAGGTTTCTAGCGAACTTGGAAATATCTGTTAAAAATCAAAAATAATGATTCT
 CAAAATATAAGCAAAAATACTAGTGGAGGAATAGGTGTTACTGAATTTGTAGGTAAGTCAATAGGAGATACATTTGGACTAGT
 AATTGCAAGTGTAGATCCACTACTTACAGAACTATGAAATTAGGAAAAGTACCGTTCAATCGCTATCATAGGCGGAAGAAGCTG
 GAGCTGGACCTCAAAATATGGCTGTTGATGATGCTGTTAAAGCTACAAATACAGAAGTTATTTCTGTTGAATTACCTAGAGAT
 ACTAAAGCGGAGCAGGTCATGGAAGTTAATTTATATAGGAGCTGATGATGTTTTCAGATGCTAGACGTGCAGTTGAAATTCG
 ACTTTCAAGCTTAGATAAAATTTTGGAGATGTGTATGCAATGATGCAGGACATTTAGAATTTCAATACACAGCTAGAGCAA
 GTTATTGTTTAGAAAAAGCTTTTGGAACGCCATTAGGCAGAGCTTTTGGAAATGGTTTGTGCAGGACCAGCTGCAATTTGGAACA

GTTTTAGCTGATGTTGCTGTA AAAAGCTGCTAATGTTGATGTTGTAGGTTACTGTTACCAGGAAACGGAACAAGTTTCTCAA
 TGAGGTTATATTAAC TTT CAGTGGTGATT CGGGAGCTGTAAGACAAGCTGTAAAGAGCATCAATTGAAGTAGGTAAAAAATTAC
 TTGGTGCCTTAGGTGATGAACCTAAATCAACTACAACACCTTATATTTAATCGAGGCCTGCAGACATGCAAGCTTTGGCACTGG
 CCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCCCTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCCGCCAGC
 TGGCGTAATAGCGAAGAGCCCGCACCGGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTAGCATAAAAA
 TAAGAAGCCTGCATTTGCAGGCTTCTTATTTTTATGGCGCGCCGCTTATTTTTTTTTGAACAATTGACAATTCATTTCTTATT
 TTTTATTAAGTGATAGTCAAAGGCATAACAGTGCTGAATAGAAAGAAATTTACAGAAAAGAAAATATAGAAATTTAGTATGA
 TTAATTATACTCATTTATGAATGTTTAAATGAATACAAAAAAAATACTTGTATGTATTCAATTACGGGTAAAAATATAGAC
 AAGTTGAAAAATTTAATAAAAAAATAAGTCTCAGCTCTTATATATTAAGCTACCAACTTAGTATATAAGCCAAAACCTAAAT
 GTGCTACCAACACATCAAGCCGTTAGAGAACTCTATCTATAGCAATATTTCAAATGTACCGACATACAAGAGAAAACATTAAC
 ATATATATTC AATTTATGAGATTATCTTAAACAGATATAAATGTAATGCAATAAGTAAGATTTAGAAGTTTATAGCCTTTGT
 GTATTGGAAGCAGTACGCAAGGCTTTTTTATTTGATAAAAAATAGAAGTATATTTATTTTTTTCATAAATTAATTTATGAAAA
 GAAAGGGGGT GAGCAAAGTGACAGAGGAAAGCAGTATCTTATCAAATAACAAGGTATTAGCAATATCATTATTGACTTTAGCA
 GTAAACATTATGACTTTTTATAGTGCTTGTAGCTAAGTAGTACGAAAGGGGAGCTTTAAAAAGCTCCTTGGAAATACATAGAAT
 TCATAAATTAATTTATGAAAAGAAGGGCGTATATGAAAACCTGTAAAAATTGCAAAGAGTTTATTAAGATACTGAAATATGC
 AAAATACATTCGTTGATGATTCATGATAAAAACAGTAGCAACCTATTGCAGTAAATACAATGAGTCAAGATGTTTACATAAAGG
 GAAAGTCCAATGTATTAATTTGTTCAAAGATGAACCGATATGGATGGTGTGCCATAAAAAATGAGATGTTTTACAGAGGAAGA
 AGAAAAAGAAGCAGTACATGATTAATATTTATGCAAGGAGCTTTAAAAAGCTCATGTAAGAAGAGTAAAAAGAAAAAATAA
 TTTATTTTATTAATTTAATTTGAGAGTGCCGACACAGTATGCACATAAAAAATATATCTGTGGTGTAGTGAGCCGATACAAAAG
 GATAGTCACTCGCATTTTCATAATACATCTTATGTTATGATTATGTGTGCGTGGGACTTCACGACGAAAACCCACAATAAAAA
 AAGAGTTCGGGGTAGGGTTAAGCATAGTTGAGGCAACTAAACAATCAAGCTAGGATATGCAGTAGCAGACCCTAAGGTCGTTG
 TTTAGGTGTTGTAATACATACGCTATTAAAGATGTA AAAATACGGATACCAATGAAGGGAAAAGTATAATTTTTTGGATGTAG
 TTTGTTTGTTCATCTATGGGCAAACACTACGTCCAAAGCCGTTTCCAAATCTGCTAAAAAGTATATCCTTTCTAAAAATCAAAGT
 AAGTATGAAATCATAAATAAAGTTTAAATTTGAAGTTATTTATGATATTATGTTTTTCTATTAAAAATAAATTAAGTATATAGAA
 TAGTTTTAATAAGTATATACTTAAATGTGATAAGTGCTGCAGTGTCCACAGAAAGGATGATTGTTATGGATTATAAAGCGCC
 GGCCGAAGCAAACCTAAGAGTGTGTTGATAGTGAGTATCTTAAAAATTTTGTATAATAGGAATTTGAAGTTAAATTTAGATGCTA
 AAAATTTGTAATTAAGAAGGAGTGATTACATGAACAAAAATATAAATATTTCTCAAACCTTTTTAACGAGTGAAAAAGTACTC
 AACCAAATAATAAAACAATTGAATTTAAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTTGGAACAGGTAAAGGGCATTAAACGACGAA
 ACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCTATTGAATTTAGACAGTCTATCTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATTTAAACTGA
 ATACTCGTGTCACTTTAATTCACCAAGATATTTACAGTTTCAATTCCTTAACAAACAGAGGTATAAAAATGTTGGGAGTATT
 CCTTACCATTAAAGCACACAATTTATTA AAAAGTGGTTTTTGAAGCCATGCGTCTGACATCTATCTGATTGTTGAAGAAGG
 ATTCTACAAGCGTACCTTTGGATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGCCACACTCAAGTCTCGATTACGCAATTTGCTTAAGC
 TGCCAGCGGAATGCTTTTCATCTAAACCAAAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAAAACCTTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGAT
 AAATATTTGGAAGCTATATACGTACTTTGTTTCAAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCA
 TCAAGCAATGAAACACGCCAAAAGTAAACAATTTAAGTACCGTTACTTATGAGCAAGTATTGCTATTTTTTAATAGTTATCTAT
 TATTTAACGGGAGGAAATAATTTCTATGAGTCGCTTTTTGTAATTTGGAAAGTTACACGTTACTAAAGGGAATGTGTTAAACT
 CCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAG
 GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTG
 CCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATACTGTTCTTCTAGTGTA
 GCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG
 CCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGG
 GGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAC
 GCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG
 GAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTCGCCACCTCTGACTGTAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG
 CGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCTGCTGCTTGTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCC
 TGCGTTATCCCCTGATTCGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGC
 GCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGAGGGCCCCCTGCTTCGGGGTCATTATAGCGATTTTTTCG
 GTATATCCATCCTTTTTTCGCACGATATACAGGATTTTGCCAAAGGGTTCGTGTAGACTTTCTTGGTGTATCCAACGGCGTCA
 GCCGGCAGGATAGGTGAAGTAGGCCACCCGCGAGCGGGTGTCTCTTCTCACTGTCCCTTATTCGCACCTGGCGGTGCTCA
 ACGGGAAT

c) pMTL83251_P_{pta-ack}_1,3-PDO_cluster

CATAAAAATAAGAAGCCTGCATTTGCAGGCTTCTTATTTTTATGGCGCGCCGCATTATTTTTTTGAACAATTGAC
 AATTCATTTCTTATTTTTTATTAAGTGATAGTCAAAAAGGCATAACAGTGCTGAATAGAAAAGAAATTTACAGAAAAGAAAATTA
 TAGAATTTAGTATGATTAATTAATACTCATTATGAATGTTAATTGAATACAAAAAAAATACTTGTATGTATTTCAATTACG
 GGTAAAAATATAGACAAGTTGAAAAATTTAATAAAAAATAAGTCTCAGCTCTTATATATTAAGTCACTCACTTAGTATATA
 AGCCAAAACCTAAATGTGCTACCAACACATCAAGCCGTTAGAGAACTCTATCTATAGCAATATTTCAAATGTACCGACATACA
 AGAGAAACATTAATACTATATATATTCAATTTATGAGATTATCTTAACAGATATAAATGTAAATGCAATAAGTAAGATTTAGAA
 GTTTATAGCCTTTGTGTATTGGAAGCAGTACGCAAAGGCTTTTTTATTTGATAAAAAATTAGAAGTATATTTATTTTTTCATAA
 TTAATTTATGAAAATGAAAGGGGTGAGCAAAGTGACAGAGGAAAGCAGTATCTTATCAAATAACAAGGTATTAGCAATATCA
 TTATTGACTTTAGCAGTAAACATTATGACTTTTATAGTGCTTGTAGCTAAGTAGTACGAAAGGGGAGCTTTAAAAAGCTCCT
 TGGAATACATAGAATTCATAAATTAATTTATGAAAAGAAGGGCGTATATGAAAACCTTGTAATAATGCAAAGAGTTTATTA
 GATACGAAATATGCAAAATACATTCGTTGATGATTCTATGATAAAAACAGTAGCAACCTATTGCAGTAAATACAATGAGTCAAG
 ATGTTTACATAAAGGGAAGTCCAATGTATTAATTTGTTCAAAGATGAACCGATATGGATGGTGCATAAAAATGAGATGTT
 TTACAGAGGAAGAACAGAAAAAGAAGCTACATGCATTAATATTTATGCAAGGAGCTTTAAAAAGCTCATGTAAAGAAGAGT
 AAAAAGAAAAATAATTTATTTAATTTAATTTGAGAGTGCCGACACAGTATGCACTAAAAATATATCTGTGGTGTAGT
 GAGCCGATACAAAAGGATAGTCACTCGCATTTTCATAATACATCTTATGTTATGATTATGTGTCGGTGGGACTTCACGACGAA
 AACCCACAATAAAAAAGAGTTTCGGGGTAGGGTTAAGCATAGTTGAGGCAACTAAACAATCAAGCTAGGATATGCAGTAGCAG
 ACCGTAAAGTCTGTTTGGTGTGTTGTAATACATACGCTATTAAGATGTAATAACGGATACCAATGAAGGGAAAAGTAT
 AATTTTTGGATGTAGTTTGTGTTTCATCTATGGGCAAACFACGTCCAAAGCCGTTTCCAAATCTGCTAAAAAGTATATCCTT
 TCTAAAATCAAAGTCAAGTATGAAATCATAAATAAAGTTTAAATTTTGAAGTTATTATGATATTATGTTTTTCTATTAATAA
 ATTAAGTATATAGAATAGTTAATAATAGTATATACTTAATGTGATAAGTGTCTGACAGTGTACAGAAAGGATGATTGTTAT
 GGATTATAAGCGGCCGGCCGAAGCAAACCTAAGAGTGTGTTGATAGTGCAGTATCTTAAAATTTTGTATAATAGGAATTGAAG
 TTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAAGGAGTGTACATGAACAAAAATATAAATATTCTCAAACTTTTTAACC
 AGTGA AAAAGTACTCAACCAATAATAAACAATTTGAATTTAAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATGGAACAGGTAAGG
 GCATTTAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGCTTATTGAATTAGACAGTCACTATTCACTTATCGTCTAG
 AAAAATTAACCTGAATACCTGTCACCTTAAATCCCAAGATATTCTACAGTTTCAATTCCTTAACAAACAGAGGTATAAAA
 ATTTGTTGGGAGTATTCCTTACCATTTAAGCACACAAATTTAATAAAGTGGTTTTTGAAGCCATGCGTCTGACATCTATCT
 GATTGTTGAAGAAGGATTTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGACACTCAAGTCTCGATTC
 AGCAATTTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCCTAAACCAAAAGTAAACAGTGTCTTATAAAAATTTACCCGCCATACC
 ACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACGTACTTTGTTTTCAAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTAC
 TAAAAATCAGTTTTCATCAAGCAATGAAACACGCCAAAGTAAACAATTTAAGTACCGTTACTTATAGGCAAGTATTGTCTATTT
 TTAATAGTTATCTATTATTAAACGGGAGGAATAATTTCTATGATCGCTTTTGTAAATTTGGAATTTACAGTTTACAGTTACTA
 GAATGTTTAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCG
 TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCA
 GCGGTGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
 TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGT
 TACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGG
 TCGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAGCT
 ATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAAGCGGAGGTTCCGAAACAGGACGCGCAGCA
 GGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCTGATTTTTGTGA
 TGCTCGTACAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCCGCGCTTTTGTGCGCTTTTGC
 TCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCA
 GCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAGGGCCCCCTGCTTCGGGGTCAAT
 ATAGCCATTTTTTCGTTATATCCATCCTTTTTTCGCACGATATACAGGATTTTTGCCAAAGGTTTCGTGTAGACTTTCTTGGTG
 TATCCAACGGCTCAGCCGGCAGGATAGTGAAGTAGGCCCCACCGCGAGCGGGTGTCTTCTCAGTGTCCCTTATTCGC
 ACCTGGCGTGTCTCAACGGGAATCCTGCTGTGCGAGGCTGCGCGCTACCGCCGCGTAACAGATGAGGGCAAGCGGATGGCT
 GATGAAACCAAGCCAACAGGAAGGGCAGCCACCTATCAAGGTGACTGCTTCCAGACGAACGAAGAGCGATTGAGGAAAA
 GCGGCGCGCGCCGGCATGAGCCTGTGCGCTACCTGTGCGCTGCGCCAGGGCTACAAAATCACGGGCGTCTGGACTATG
 AGCACGTCGCGAGCTGGCCCGCATCAATGGCGACCTGGCGCGCTGGGCGCCTGCTGAAACTCTGGCTCACCGACGACCCG
 CGCAGCGCGGGTTCCGTGATGCCACGATCCTCGCCCTGCTGGCGAAGATCGAAGAGAAGCAGGACGAGCTTGCCAAGGTCA
 GATGGCGTGGTCCGCCAGGGCAGAGCCATGACTTTTTTAGCCGCTAAAACGGCCGGGGGTGCGCGTGAATTGCCAAGCAC
 GTCCCCATGCGCTCCATCAAGAAGAGCGACTTCGCGGAGCTGGTGAAGTACATCACCGACGAGCAAGGCAAGCAGGATCGGGC
 CCCCTGCAGGATAAAAAAATTTAGATAAATTTTATAAATAAGTTTTATCTACAATTTTTTTATCAGGAAACAGCTATGACCG
 CGGCCGCTGATCCATATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGTGCAGCTTACCCTCATAACTGCTATTACA
 GCATCACATTTGTAGCAGAACGAGCCTTCAATATGATAATTTATGTCCATGTGAAAGGGATTATATTCAACTATTATTCC
 AGTTACGTTTCATAGAAATTTTCTTTCTAAAATATTTTATCCATGTCAAGAACTCTGTTTATTTTCAATTAAGAAGCTATAAGT
 ACAAAGTATAGGGCATTGAAAAAATAGGCTAGTATATTGATTGATTATTTATTTAAAATGCCAAGTGAATATATACATA
 TTATAACAATAAAAATAGTATTAGTGTAGGATTTTAAATAGAGTACTATTTTTCAGATTAATTTTGTCTTATTTGATTTAC
 ATATATAATATTGAGTAAAGTATTGACTAGCAAAATTTTTTGATACCTTTAATTTTGTAAATTTCTTATCAAAAGTTATATTT
 TTGAATGATTTTTATTGAAAAATACAACAAAAAGGATTTATAGTATAAGTGTGTGTAATTTTGTGTTAAATTTAAAGGGAGGA
 CTCTAGAATGATAAGTAAAGGATTTAGTACCCAAACAGAAAGAAATAAATAATTTAAAAGCTCAAATATTAATGCTAAACCAT
 GTGTAGAGTCAGAGAGAGAGTATTAATAACAGAATCATTTAAAGAAACAGAAAGGGCAACCGCAATATTAAGAAGGGCATTG
 GCTTTAAAGCATATATTGAAAAATATCCCTATAACAATTAGAGAAGAAGAACTTATAGTAGGAAGCTTAACTAAAGAACCAAG
 ATCTTCTCAAGTATTTCTGAATTTTCTAATAAATGGTTACAAGATGAATTAGATAGACTAGACAAAAGGACTGGAGATGCAT
 TTCAAATTTCAAGAAAGTAAAGAAAAATTAAGCTGTATTTGAATATTGGAATGAAAAACAACAAGTGAATTAGCAACT
 TCATATATGACTGAAGAAACAAGAGAAGCAGTAAATTCGGATGTATTTACTGTAGGAAATTTACTATAATGGAGTGGGACA

TGTTCGTTAGTTATGAGAAAGTATTA AAAAATTGGATTTAATGGGATTATAAATGAAGCAAAGGAACAATTAGAGAAAAATA
 GAAGTATAGATCCTGATTTTATAAAGAAAGAGAAATTTTTAAATAGTGTATTATTTCCCTGCGAAGCAGCAATAATATATGCA
 AATAGATATGCTAAAAAGGCTAAAAGAGCTTGCGACAAATGCAAAATGATTTAAAAAGAAAATCTGAATTAATGAAATAGCAAA
 AATCTGTCTAAAGGTTCCAGCAGAAGGAGCAACTTCTTCTATGAAGCGTGTCAATCATTGTTGGTTGTTCCACGCAATAATA
 ATACAGAATCTAATGGCAATCTATTTTCGCCAGCTAGATTTGATCAATATATGTATCCATATTTATGAAAATGATGAAAATATA
 ACAGAGGAATTTGCTCAAGAGTTAATAGATTTGATATGGATTAATTAATTAATGATATTAATAAGTAAGAGATGAGATTTCAAC
 TAAGCATTGTTGGCGCTATCCAATGTACCAAAATTTAATCGTTGGAGGGCAAAAATTCAGAAGGAAAAGATGCAACAAATAAAA
 TATCATATATGGCATTAGAAGCAGCAGTACATGTTAAATTACCTCAACCATCTCTATCAGTAAGAATATGGAATAAGACTCCA
 GACGAATTTATGCTTAGAGCAGCAGAATTAAGTACTAGAGAAGGATTAGGACTTCCAGCTTATTTAATGATGAAGTTATTATCC
 AGCATTAGTTGCTAGAGGACTTACGTTAGAAGATGCAAGAGACTATGGAATAAATGGATGTGTTGAGCCACAAAAGCCAGGAA
 AAACAGAAGGATGGCATGATTCAGCATTCTTAACTTGTGTAAGATAGTAGAGTTAACTATGAATCTGGATTAGATAAAAAAT
 AAACAAATGAGACTAAAACCTCAAAGTTTTGAAGAAATGAAATCTTTTGATGAATTTATGAATGCCATAAAGATTCAAATGGA
 GTATTTTGTAAAACATATGTGTTGTGCTGATAAATTGTATAGATATTGCACATGCAGAAAGAGCACCATTACCTTTCTTGTGCT
 CTATGGTTGATGATTGTATTGGTAGAGGAAAAAGCCTTCAAGATGGTGGGGCAGAATATAACTTTAGTGGACCACAAGGTGTT
 GGGGTAGCTAATATAGGAGATTCATTAGTTGCTGTTAAAAAGTTGTGTTTGTGATAAATAAATACGCCCTTCAGAATTTAA
 GAAAGCATTAAATAATGATTTTGAAGATGCAAGAAATACAAGCATTACTAAAAAAGCTCCTAAGTTTGGAAATGATATTG
 ATGAAGTTGATGATTAGCTAGAGAAGGTGCATTAGTATACTGTAGGGAAGTTAATAAATATACAAACCCAAAGAGGTGGAAAA
 TTTCAACCAGGATTATATCCATCATCAATAAATGATACACTCGGAATTTAACAGGTGCTACTCCAGATGGTAGAAAATCTGG
 ACAACCATTAGCTGATGGGTTTTCTCCATCAAGAGGATGTGATGTCTGGCCCTACTGCAGCTTGTAAATTCAGTTGCTAAAT
 TGGATCATTATAGCTTCAAATGGAACTTTATTCAACCAAAAATTTTATCCATCAGCATTAAAAGGTGATAATGGATTAACA
 AATGTATCAGCATTGATAAGAAGTTATTTGATCAAAAAGTTTTTCATGTTCAATTTAATGTAATAGATAAACAATATTACT
 TGCAGCACAAAAAATCCTGAAAAGTATCAAGACTTAATTTGTAGAGTTGCTGGATATAGTGCAGCAATTCATTCTTTAGATA
 AATCTATACAAAATGATATCATTGCAAGAACAGAACATGTTATGTA AAAAAGTTTTCAGAGGGGATAAAAAGTATGAGTAAAG
 ATATTGAAGGTGTCATATTTAATATACAAAAATTTTATTACATGATGGACCGGGGATAAGAATATAGTATTTTCAAAGGT
 TGTAAATATGTCATGTTTTATGGTGTAGTAATCCAGAATCACAGAAGTTGCTCCTCAAATAATGTTTAAATAAAAATTTATGTG
 TAAATGTGGAAGATGTCAGTCAGTATGTGAACTTCAGCTATTGATATGAATTCAGTATATAGAATAGATAAAAAGTAAATGCA
 TTAATGTAAAAGATGTGTTGAAAGTTGTTTAAATGGAGCGCTTGTCTTGAAGGAAAGAAATACAGTGTGAAAGAGATCATT
 AAAGAATTA AAAAAGATAGTGTCCAATATAGAAGATCAAATGGTGGAAATTACATTATCTGGAGGCGAAGTGTACTCCAACC
 TGATTTTGCAGTAGAGCTTTTAAAAGAATGTAAGCATATGGATGGCATACTGCTATTGAAACAGCAATGTATGTGAATAGTG
 AAGCCGTAAAAAAGGTAATGCCATATATAGATTTAGCTATGATGATATAAAGAGTATGAATGATGAAGTTTATAAGAGATTT
 ACAGGCGTAAGCAATAATATATCTTAAAAACATCAAATTAAGCGATCAATGACTAAAGAAATAATAATTTAGAATTTCCCGT
 AATGAAGGATTTAATGCAGATTTACAAAGTATAGGAGAAATAGCTCAATTTCAAATCATTAACAAAATTTAAAAGAATTG
 ATCTTCTCCATACCACAATTTATGGAGAAAATAAGTATGAAGCTATTGGAAGAGATTATTTACTAGGAGAATTGAAATCTCCT
 AGTGAAGATAAAAATGGAGAGATTAAAAGCTTTAGTTGAAATTTATGGGAATACCTTGCACAATGGAGCGCAGTAAATTTCTGA
 AGGCGACTAAAAAATATGCCATATGAAAGGAGATGTGAATCTTGAAGAAGTTAAATGAAATAAACAATTAAGCCTTGATATAG
 TAAAGGAAATGGCTGTGGCAGCTGAAGCTAAAGCTGCTGAAATGAGTGTGCCAATAGTGTGTTGCGGCAGTAGATTCAGGGACA
 AATTTAATGCTTATGCACAGAATGGAGAAGCCTTTTATAACAAGTGTGATATAGCAATCAACAAAGCATTACCTCAGCAGC
 ATTA AAAATAGGAACCTCATGAAGTTACTCCAAGCATTACGCCAGGAGAAAGTCTTTATGGATTACAATTAACCAATAACTGCA
 GAATAATACCTTTTGGCGCGGTTTTCCCGATAATAGAAAATGGACAAGTTGTTGGAGCCGTGGGAGTAAGCGGAGGAAGTGT
 GAAGAAGATATGGCTATAGCAAAGGCTGCAGCAGAAAATTTTAAATAAATAATTTAAAATGAAAAGGAGAATAATTTATATGA
 GAATGTATGATTATTTAGTACCAAGTGTAACTTTATGGGAGCAAATTCAGTATCAGTAGTAGGCGAACGATGTA AAAATATTA
 GGTGGAAAAAAGCATTAAATAGTTACAGATAAATTTTTAAGAGACATGGAAGGTGGAGCTGTTGAATTAACAGTTAAATATTT
 AAAAGAAGCTGGATTAGATGTTGCATATTTATGACGGAGTTGAACCGAATCCAAAAGATGTTAATGTTATAGAAGGATTAAAA
 TATTTAAAAATGAAAATTTGATATGATAGTAACGTAGGTGGAGGGAGTTCTCATGATTGTGGTAAAGGAATAGGAATTTGCT
 GCAACACATGAAGGAGATCTTTATGATTACGCTGGAATAGAAAACACTTAGCAATCCATTACCACCAATAGTAGCAGTAAATAC
 TACTGCAGGAAGCTAGTGAAGTAACCTCGTCATTGCGTATTAACATAACAAAAGAAAAAATAAAAATTTGTTATAGTTAGCT
 GGAGAACTTACCATTAGTTTCTATAAATGATCCAATGCTTATGGTTAAAAAACCAGCAGGATTAACAGCAGCTACAGGAATG
 GACGCTTTAACTCATGCAATGGAAGCATATGTATCAAAAGATGCAAAATCCGGTGACAGATGCTTCAGCAATACAAGCTATTAA
 ACTAATATCACAAAATTTAAGACAAGCTGTAGCTTTAGGAGAAAATCTTGAAGCAAGGAAAAACATGGCTTATGCATCATTTGT
 TAGCTGGAAATGGCGTTTAAATAATGCCAATTTAGGATATGTACATGCAATGGCTCACC AATTAGTGGATTATATGATATGCCA
 CATGGTGTGCTAATGCTATGCTTTTACCTCATGTTGACAGTTATAATATGATATCAAATCCTAAGAAATTTGCGGATATAGC
 AGAATTTATGGGAGAAAATTTTTCAGGCCTTTCAGTAATAGAAGCAGCAGAAAAAGCTATAGATGCTATGTTTACTGACTTTCAA
 AAGACGTTGGAATCCAGCAAGTTTAAAAGAAATGGGAATTAAGAAAAAGACTTTGAATATATGGCAGAGCTAGCTCTTTTA
 GATGGAAATGCATTTAGTAATCCAAGAAAAGGAAATGAAAGAGATATCGTAAATATATTTAAAGCTGCTTATTAAGCTAG