
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

Clonagem e expressão de genes de *Klebsiella pneumoniae* responsáveis pela produção de 1,3-propanodiol em cepa mutante de *Escherichia coli*.

LORENZO E. R. P. P. L. D. B. BRIGANTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada .

Junho - 2013

LORENZO E. R. P. P. L. D. B. BRIGANTI

Clonagem e expressão de genes de *Klebsiella pneumoniae* responsáveis pela produção de 1,3-propanodiol em cepa mutante de *Escherichia coli*.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do
Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista,
para obtenção do título de Mestre em Microbiologia
Aplicada.

Rio Claro
2013

576 Briganti, Lorenzo
B854c Clonagem e expressão de genes de *Klebsiella pneumoniae* responsáveis pela produção de 1,3-propanodiol em cepa mutante de *Escherichia coli*. / Lorenzo Briganti. - Rio Claro, 2013

46 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Jonas Contiero

1. Microorganismos. 2. Engenharia metabólica. 3. Glicerol. 4. Fermentação. 5. Biologia sintética. 6. Biodiesel. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico este trabalho a minha família,
que está aqui, e quem não está mais
também. A força sempre veio de
vocês.

Agradeço, primeiramente, a minha família, pois sem ela nada seria possível. Quem esta no dia-a-dia, ajudando, acompanhando, sofrendo e rindo, junto comigo, em todos os momentos. Também agradeço aos que não estão mais aqui, que fazem muita falta, mas são eternos.

Em especial, agradeço a minha mãe, sempre incentivando e apoiando, fundamental em todos os momentos. Amo muito você.

Agradeço aos companheiros de faculdade, em especial ao Emygdio (Coragem), companheiro de todas as horas, sempre ajudando nos momentos críticos, a Monizze, uma pessoa tão divertida que faz a gente esquecer um pouco os problemas que nos assolam, a Pâmela, grande incentivadora que faz falta nos cafés da vida, a Manu, a Eli (por incrível que pareça), a Maria Clara e a Van, uma pessoa tão séria quanto divertida. Amigos que ajudaram muito, sempre ouvindo, alegrando até mesmo à distancia, por Skype. Chico Bento, Reto, Pajé, grandes amigos da faculdade. Agradeço também aos companheiros de laboratório, Dra. Lovaglio, Dra. Luciana, Dr. de Paula (grande Bibi), Dra. Cortez, Formiga, Susan (Birtel), Vitor (Bubibu) e também ao Paulo (Manolo), que foi muito importante, na realização do trabalho e nas alegrias e nas dificuldades da empreitada no exterior.

Agradeço ainda os professores fundamentais para esse trabalho. Primeiramente, ao Prof. Jonas Contiero, por todo o apoio, confiança e amizade, e a Mônica Rossini também. Ao Prof. Henrique Ferreira, por toda a ajuda e ideias e, como não poderia deixar de faltar, a Professora Doralice Cella (Dora), que marcou a minha vida e a de todos os biólogos que tiveram a honra de ter aula com ela. Certamente sempre fará muita falta.

Agradeço aos amigos que fiz no exterior, que tornaram esse período mais fácil e agradável. Michael, Akshitha, Donovan, Katie, Morgan, Adam, Narayan...

Agradeço à família Mattos por todo o apoio e amizade (Sandra, Alexandre e especialmente a Jacqueline, que sempre esteve presente, com o melhor ombro e melhor colo que eu poderia encontrar... A melhor companheira do mundo, para todas as horas, incondicionalmente! Amo você!).

De uma maneira geral, gostaria de agradecer a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para que eu chegasse até aqui. Sempre vou lembrar de vocês, sem exceções.

Por fim, agradeço ainda a UNESP e a STPG (em especial a Josiele) e ao CNPq, pelo apoio na realização desse trabalho.

RESUMO

A crescente preocupação com o meio-ambiente requer alternativas para o consumo de combustíveis fósseis. O biodiesel, por exemplo, foi desenvolvido como alternativa ao óleo diesel mineral. Sua produção é bastante grande e tende a crescer ainda mais. Entretanto, em sua produção, o biodiesel produz glicerol, que necessita de purificação, em um processo bastante caro. Uma alternativa seria a utilização do glicerol bruto para a produção de outros compostos de maior valor, através de fermentação. Nesse caminho, uma das alternativas seria a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), um álcool de alto valor industrial, com diversos usos nas diversas áreas industriais, em especial na produção de um polímero similar ao PET, o PTT. A produção de 1,3-PDO a partir de glicerol é conhecida em alguns micro-organismos, como a *Klebsiella pneumoniae*, por exemplo. O presente trabalho teve por objetivo construir a via de produção de 1,3-PDO, presente em *K. pneumoniae*, em *Escherichia coli* geneticamente modificada, para a produção de 1,3-PDO através de um micro-organismo bastante utilizado na indústria, utilizando a engenharia metabólica.

Palavras-chave: 1,3-propanodiol, Glicerol, Engenharia Metabólica.

ABSTRACT

The growing concern with the environment requires the use of alternatives to fossil fuels. Biodiesel, for example, was developed as an alternative to mineral diesel. Its production is quite large and likely to grow even more. However, in its production, biodiesel produces glycerol, which needs purification, in a quite expensive process. An alternative would be the use of raw glycerol to produce other compounds of higher value by fermentation. In this way, an alternative would be the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO), an alcohol of high industrial value with many uses in several industrial fields, particularly in the production of a polymer similar to PET, the PTT. The production of 1,3-PDO from glycerol is known in some micro-organisms such as *Klebsiella pneumoniae*, for example. The present study aimed to build the pathway of the production of 1,3-PDO, present in *K. pneumoniae*, in *Escherichia coli* genetically modified, for the production of 1,3-PDO by a micro-organism widely used in industry, using metabolic engineering.

Keywords: 1,3-propanediol, glycerol, metabolic engineering.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Cepas estudadas e manutenção dos isolados.....	21
3.2 Preparação de células competentes	21
3.3 Clonagem de genes	22
3.4 Transformação e verificação.....	25
3.5 Fermentações	26
3.6 Detecção de metabolitos produzidos	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	39
6. ESTRATÉGIAS FUTURAS.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

Lista de Figuras

1.1 Esquematização da transesterificação na produção de biodiesel.....	12
1.2 Conversão do glicerol a 1,3-PDO.....	17
1.3 Vias metabólicas para a produção de 1,3-PDO e demais compostos.....	18
1.4 Comparação entre microorganismos selvagens e submetidos à engenharia metabólica para produção de 1,3-propanodiol.....	19
3.1 Estrutura do pSB1C3, mostrando as regiões de interesse.....	22
3.2 Ilustração do plasmídeo pSB1C3, com o gene da RFP (red fluorescent protein).....	23
3.3 Esquema de funcionamento da metodologia de Gibson.....	24
4.1 Construção do plasmídeo.....	28
4.2 Representação circular do plasmídeo construído.....	28
4.3 Teste de T _m para os primers e os respectivos genes.....	29
4.4 Gel de eletroforese do produto da PCR dos genes por Phusion.....	29
4.5 Overlapping PCR com Taq.....	30
4.6 Overlapping PCR utilizando Phusion.....	31
4.7 Placa de Petri, contendo meio LB com antibiótico (cloranfenicol), com colônias.....	32
4.8 Imagem do gel de agarose do resultado da Colony PCR	33
4.9 Confirmação dos candidatos através de PCR com Phusion, utilizando o plasmídeo extraído como template.....	34
4.10 Cromatograma referente à amostra de glicerol bruto, no início da fermentação (0 horas).....	35
4.11 Cromatograma referente à amostra de glicerol bruto, no final da fermentação (72 horas).....	36
4.12 Gráfico ilustrando a concentração de glicerol bruto, 1,3-PDO e a densidade óptica ao longo do tempo de fermentação.....	38
4.13 Gráfico ilustrando a concentração de glicerol P.A., 1,3-PDO e a densidade óptica ao longo do tempo de fermentação.....	38

Lista de Tabelas

4.1 Primers desenhados para amplificação dos respectivos genes.....	27
4.2 Normalização utilizada para a reação de Gibson.....	31
4.3 Amostras de glicerol bruto, na concentração de 60 g/L, mostrando as concentrações de glicerol e 1,3-PDO, e densidade óptica, ao longo de 72 horas.....	37
4.4 Amostras de glicerol P.A., na concentração de 60 g/L, mostrando as concentrações de glicerol e 1,3-PDO, e densidade óptica, ao longo de 72 horas.....	37

"Out of the night that covers me,
Black as the pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.

In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.

Beyond this place of wrath and tears
Looms but the Horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds and shall find me unafraid.

It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate,
I am the captain of my soul."

(William Ernest Henley - Invictus)

1. INTRODUÇÃO

Atualmente existe uma preocupação crescente com o meio-ambiente, em especial no que se refere ao consumo de recursos naturais. A chamada “Química Verde”, que possui como objetivo a produção de compostos menos nocivos ao meio-ambiente e o desenvolvimento de técnicas de produção que não sejam prejudiciais ao ecossistema, está em pleno desenvolvimento, com a utilização de matérias-primas que causem menores impactos ao meio ambiente. Essa "Química Verde" está, atualmente, presente em diversos setores industriais. Como exemplo, podemos citar o caso das tintas (com o desenvolvimento de formulações tendo a água como solvente, por exemplo), os plásticos, que possuem uma infinidade de alternativas aos modelos tradicionais, tais como os oxi-biodegradáveis, os biodegradáveis e também os que têm se tornado mais atrativos para as grandes indústrias: Os biopolímeros. Além disso, a "Química Verde" vem se preocupando, ultimamente, em desenvolver alternativas para os combustíveis também. Em relação aos combustíveis de origem fóssil, o alto grau de poluição atmosférica e a finitude da matéria necessária para sua produção exigiram que fossem criadas alternativas para sua produção. O Brasil, por exemplo, é um pioneiro em relação a combustíveis renováveis, com o desenvolvimento do etanol oriundo da cana-de-açúcar. Em 1925 foi desenvolvido o primeiro carro a álcool no país (INT, 2013). Posteriormente, na década de 1970 foi desenvolvido um programa governamental de incentivo ao desenvolvimento do álcool como combustível: O Pró-álcool. Apesar de o programa ter dado o incentivo necessário para que o álcool fosse utilizado como combustível em larga escala, fatores como a alta no preço internacional do açúcar fizeram com que o álcool como combustível ficasse em segundo plano. Entretanto, na década de 1990, a conjuntura econômica favoreceu a produção de etanol. Hoje ele é produzido em larga escala, e a indústria automotiva se adequou a essa realidade, com motores movidos a etanol e, posteriormente, os chamados motores “flex”, que operam tanto com etanol como com gasolina. Além disso, o Brasil adotou, através de medida política, a adição de etanol na gasolina automotiva, diminuindo o impacto ambiental causado pela emissão dos gases provenientes da combustão dessa mistura.

No caso do Brasil, a utilização excessiva do transporte rodoviário implica em um elevado consumo de combustíveis fósseis. O destaque, nesse quesito, fica para o Óleo Diesel, com uma produção total de cerca de 37,7 milhões de metros cúbicos

(ANP, 2011). Entretanto, o diesel originário das petroquímicas apresenta um potencial de poluição atmosférico muito grande, especialmente por causa do alto teor de enxofre presente nessa substância. O enxofre, quando liberado para a atmosfera, possui efeitos nocivos ao meio ambiente, como a chuva ácida. Além disso, trata-se de uma substância nociva para o sistema respiratório dos seres vivos, podendo causar diversas complicações.

A alternativa encontrada foi a produção do chamado biodiesel. De acordo com a definição técnica, biodiesel é um "combustível composto de mono-alkilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais, e designado B100." (BIODIESELBR, 2013). De acordo com a legislação brasileira, a definição de Biodiesel é "Biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil." (PORTAL SAO FRANCISCO, 2013). Trata-se, portanto, de um óleo originário do processamento de diversas oleaginosas, tais como a soja, dendê, amendoim, girassol e mamona, entre outras. Ele é produzido através da transesterificação dos ácidos graxos provenientes das oleaginosas, produzindo mono-alkil ésteres (figura 1.1). Esses ésteres produzidos possuem propriedades muito semelhantes ao óleo diesel comum, com diferenças em relação à viscosidade e incompatibilidade com alguns materiais, tais como a borracha natural e alguns compostos nitrilados, o que pode causar um desgaste maior em motores que não tenham as adaptações necessárias para operarem com o biodiesel (SILVA, 2010).

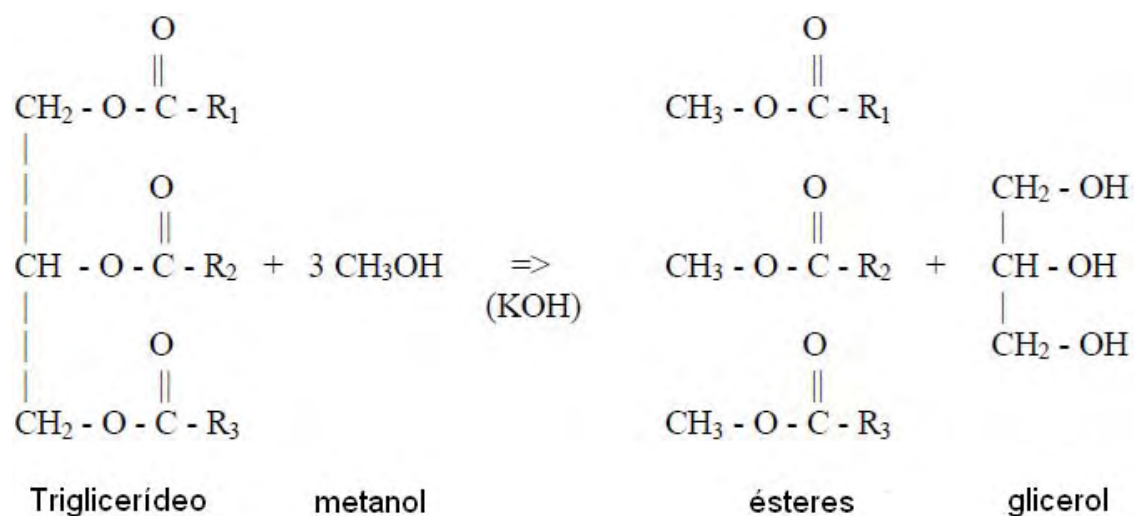


Figura 1.1: Esquemática da transesterificação na produção de biodiesel.

Esse biodiesel, além de possuir um teor de enxofre muito menor, é oriundo de fontes renováveis, o que conjuntamente com o corrente desenvolvimento da tecnologia para sua produção, torna-o mais viável ecologicamente, sendo amplamente aceito no mundo inteiro. Contudo, por questões operacionais, em razão do maior desgaste provocado pelo biodiesel em relação ao diesel petrolífero, os motores a diesel atuais estão configurados para operarem com misturas de biodiesel e diesel mineral. Essas misturas recebem a letra "B", seguida de um número, referente à porcentagem de biodiesel adicionada. Por exemplo, uma mistura composta de 5% de biodiesel e 95% de diesel mineral recebe a sigla de B5. Se a mistura contiver 20% de biodiesel, será chamada de B20. E quando não há a adição de diesel mineral, trata-se de um B100. Atualmente, os motores estão configurados para operarem com a B20, porém a maioria do biodiesel vendido hoje no Brasil é B2. Até a B5 não é necessária nenhuma adaptação no motor para utilização deste combustível (PORTAL SAO FRANCISCO, 2013). Ainda assim, a produção de biodiesel é bastante grande, e tende a aumentar. Somente no Brasil a produção de biodiesel chegou a 2,1 milhões de metros cúbicos em 2010, uma alta de 295 mil por cento em relação aos 736 metros cúbicos produzidos em 2005 (ANP, 2011).

A demanda mundial pelo biodiesel tende a aumentar, assim como a produção do mesmo. A tendência é que haja um aumento progressivo da porcentagem de biodiesel nas misturas, promovendo uma menor dependência em relação ao combustível fóssil. Entretanto, a produção de biodiesel, como podemos observar na figura 1, origina resíduos que nem sempre podem ser aproveitados. Um dos subprodutos da fabricação do biodiesel de maior importância, atualmente, é o glicerol.

Até 1949, todo o glicerol produzido no mundo era oriundo da indústria de sabão. Atualmente, cerca de 30% da produção norte-americana de glicerol é proveniente da fabricação do polipropileno, da produção de ácidos graxos e da produção de biodiesel (BODIESELBR, 2013). A produção de glicerol tende a crescer, acompanhando a tendência de crescimento do biodiesel. Entretanto, alguns fatores precisam ser considerados: Uma maior oferta de um produto implica em uma queda no preço do mesmo; O glicerol proveniente de biodiesel precisa passar por um custoso processo de purificação, para que seja utilizado como glicerina. O glicerol corresponde a cerca de 5 a 10% do produto bruto na produção do biodiesel. Apesar da oferta ser extremamente grande, a demanda é bastante grande também,

tendo em vista a ampla variedade de aplicações do glicerol na indústria. Ele é empregado em diversos setores, como o alimentício, onde ele pode substituir o sorbitol como umectante e conservante de bebidas e alimentos, tais como refrigerantes, balas, bolos e ração animal seca. Além disso, o glicerol pode, por suas características estruturais, ser empregado na produção de molhos para salada, coberturas de doces e sobremesas geladas (BIODIESELBR, 2013). O glicerol pode, ainda, ser utilizado na indústria farmacêutica (é atualmente um dos ingredientes mais utilizados na composição de capsulas, anestésicos, xaropes, emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e antissépticos). No setor de cosméticos, por suas características (não-tóxico, não-irritante, sem cheiro e sem sabor), o glicerol vem sendo utilizado como emoliente e umectante em diversos produtos, como pastas de dente, cremes de pele, loções, desodorantes, batons e maquiagens. Além disso, o glicerol é utilizado na indústria do tabaco (tornar as fibras mais resistentes e na composição do filtro do cigarro), na indústria têxtil (onde sua função é amaciar e aumentar a flexibilidade das fibras têxteis), entre outras aplicações, tais como fabricação de tintas e resinas, além de lubrificantes para máquinas, por exemplo (BIODIESELBR, 2013).

Porém, o glicerol oriundo da produção do biodiesel excede a demanda do produto, causando um considerável impacto ambiental. A Europa, por exemplo, possui incentivos para a produção do biodiesel, o que aumentou a oferta de biodiesel na região, aumentando, conseqüentemente, a produção do glicerol. De acordo com Anand e Saxena (2011), existe uma projeção de uma produção de 37 bilhões de galões de biodiesel em 2016, gerando 4 bilhões de galões de glicerol. O aumento na produção de biodiesel causará grande impacto no mercado do glicerol, de acordo com Yang et al. (2012). Segundo esse estudo, o preço do glicerol refinado, em 2007, era bastante baixo (US\$ 0,30 por libra), se comparado ao preço do produto antes da expansão da produção de biodiesel (US\$ 0,70), nos Estados Unidos. Quando se analisa o glicerol bruto, a queda do preço se torna ainda mais acentuada, de US\$ 0,25 para US\$ 0,05 por libra do produto (KERR et al., 2007).

Uma das soluções encontradas para esse excedente na oferta é a biotransformação desse glicerol. A biotransformação consiste na utilização de agentes microbianos para a transformação de um determinado substrato em um produto de interesse comercial. O processo de biotransformação vem sido desenvolvido, com a descoberta e isolamento de diversos microorganismos,

utilização de diferentes substratos e desenvolvimento de diversas estratégias de biotransformação. Atualmente há uma tendência para a busca de biotransformações a partir de substratos baratos, tais como rejeitos agroindustriais. No caso do glicerol, existem varias alternativas para sua biotransformação. Dentre essas alternativas, destaca-se a conversão de glicerol a 1,3-propanodiol (1,3-PDO). O 1,3-PDO é um poliálcool utilizado como matéria prima de diversas indústrias, possuindo utilização, entre outros, na indústria plástica, como monômero para a produção do polipropileno tereftalato (PPT), um termoplástico com propriedades físico-químicas superiores ao polietileno tereftalato (PET) (SILVA, 2010). Ele também pode ser utilizado na produção de lubrificantes e solventes, além de ser utilizado também na indústria farmacêutica.

A biotransformação é interessante, pois permite a utilização de compostos renováveis e não gera intermediários tóxicos. Entretanto, os processos fermentativos possuem limitações quando comparados aos processos de síntese: a variedade de produtos é relativamente pequena, o rendimento é baixo e a recuperação e purificação dos produtos é frequentemente difícil (CAMERON et al., 1998). Para contornar esses problemas, foram desenvolvidas técnicas, como as utilizadas na engenharia metabólica. Nesse caso, as rotas metabólicas são alteradas para aumentar a variedade de compostos biossintetizados e aumentar a taxa de produção do composto de interesse, possibilitando, assim, uma facilitação nos procedimentos de recuperação e purificação do composto (CAMERON et al., 1998).

O conhecimento de uma via metabólica permite modificações na mesma para que haja um aumento na produção de um determinado composto da via, ou o decréscimo de outro composto. Essa tecnologia é conhecida como engenharia metabólica. A engenharia metabólica é a alteração racional da arquitetura gênica de um organismo para conseguir um fenótipo específico (STEPHANOPOULOS E VALLINO, 1991). De um modo geral, o primeiro passo no processo de alteração é identificar o “passo-limitante” (VEMURI E ARISTIDOU, 2005). A solução para superar esse gargalo pode ser tanto a superexpressão de um gene como a inativação da rota que leva a outros intermediários diferentes do desejado (KEASLING et al., 2003).

Para que um micro-organismo se desenvolva em um meio contendo glicerol como única fonte de carbono, é necessário uma via metabólica específica para a conversão do glicerol. Dentre eles, pode-se citar a *Clostridium butyricum*

(CÁRDENAS et al., 2006), *Citrobacter* T3, além de *Enterobacter*, *Lactobacillus* e *Klebsiella* (BIEBL et al., 1999). Em 1999, Darbon e colaboradores caracterizaram tal via na bactéria *Thermus flavus*. Foram descritos dois genes, *glpK* e *glpF*, que codificam, respectivamente, a glicerol cinase, responsável pela fosforilação do glicerol, convertendo-o em glicerol-3-fosfato, e o facilitador de glicerol, que tem por função auxiliar o transporte do glicerol através da membrana plasmática. Em outros tipos de bactérias, essa entrada pode se dar através de difusão facilitada (HELLER; LIN; WILSON, 1980).

Após a absorção do glicerol pela célula, o mesmo necessita ser metabolizado. O glicerol, então pode seguir por duas vias: Através da glicerol desidratase, culminando com a formação de 1,3-PDO ou através da glicerol desidrogenase em direção ao ciclo do ácido cítrico. A produção de 1,3-PDO é, portanto, uma consequência do crescimento anaeróbio em glicerol através de uma via redutora. Esse crescimento ocorre através do consumo oxidativo do glicerol para produzir aumento da biomassa concomitante com o acúmulo de intermediários, tais como o acetato, e a geração de excesso de NADH. Esse NADH não pode ser acumulado e deve ser convertido a NAD⁺ para manter uma concentração constante de ambos na célula. Além disso, o NAD⁺ é regenerado através da conversão redutora do glicerol em 1,3-PDO em dois passos. O primeiro passo é uma desidratação do glicerol a 3-HPA (3-hidroxiopropionaldeído), catalisada pela enzima glicerol desidratase, codificada pelos genes *dhaB1-3*. O segundo passo é uma redução dependente de NADH do aldeído para 1,3-PDO, catalisada pela 1,3-propanodiol oxidoreductase, codificada pelo gene *dhaT* (NAKAMURA; WHITED, 2003) (figura 1.2).

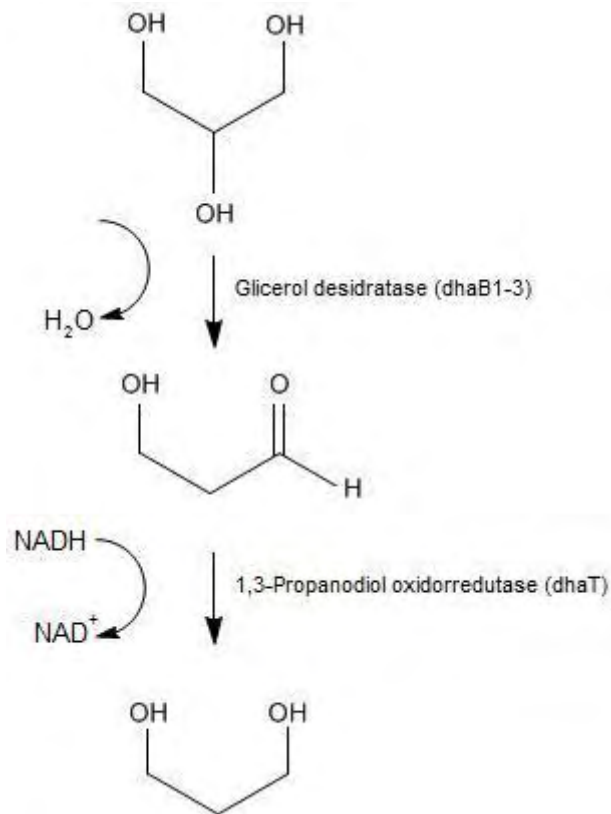


Figura 1.2: Conversão do glicerol a 1,3-PDO.
 Fonte: Adaptado de Nakamura e Whited, 2003.

De acordo com Nakamura e Whited (2003), a glicerol desidratase é uma enzima composta de três polipeptídeos dependente da coenzima B12 e que catalisa a conversão de glicerol a 3-hidroxiacetaldéido (3-HPA). Essa coenzima normalmente se encontra inativa, bastante próxima à desidratase, o que impede a catálise. Uma enzima auxiliar, a glicerol desidratase reativase facilita a dissociação dessa coenzima inativa, para a formação da apoenzima glicerol desidratase. Essa apoenzima religa-se à coenzima, agora ativa, dando continuidade à conversão para 3-HPA, prosseguindo na via metabólica. Descobriu-se que a glicerol desidratase reativase é codificada por dois genes, em *Clostridium freundii*: dhaF e dhaG (SEIFERT, C. et al, 2001).

No caso do glicerol, a fermentação pode seguir basicamente por dois caminhos (figura 1.3). Como mencionado anteriormente, há a via redutora, que originará o 1,3-PDO e a via oxidativa, que levará à produção de outros compostos.

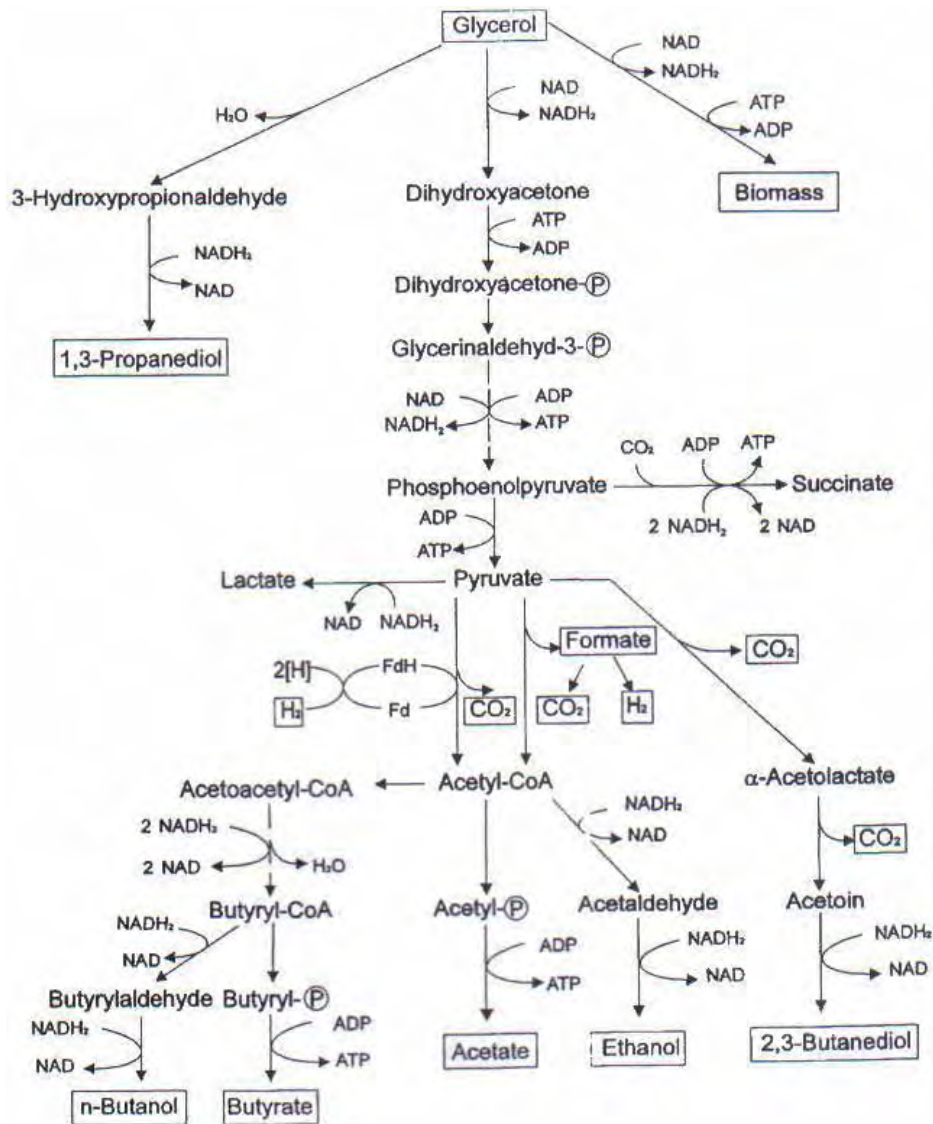


Figura 1.3: Vias metabólicas para a produção de 1,3-PDO e demais compostos. Fonte: Biebl, 1999.

Para um aumento na produção do 1,3-PDO, utilizando a engenharia metabólica, seria necessária a realização de modificações que privilegiassem a via redutora em detrimento da via oxidativa. Uma superexpressão do gene que codifica a enzima glicerol desidratase, aliada a uma supressão do gene codificador da enzima glicerol desidrogenase, responsável pela via oxidativa, poderia, em princípio, levar a uma maior produção de 1,3-PDO. Entretanto, na via redutora, a necessidade de $NADH$ é primordial para a reação de redução, exigindo assim outras alternativas. A figura 1.4 mostra um esquema com as vias metabólicas em micro-organismos produtores de glicerol (A), produtores de 1,3-PDO (B) e outros (C), e suas vias

quando submetidos a determinadas modificações através da engenharia metabólica (D, E e F).

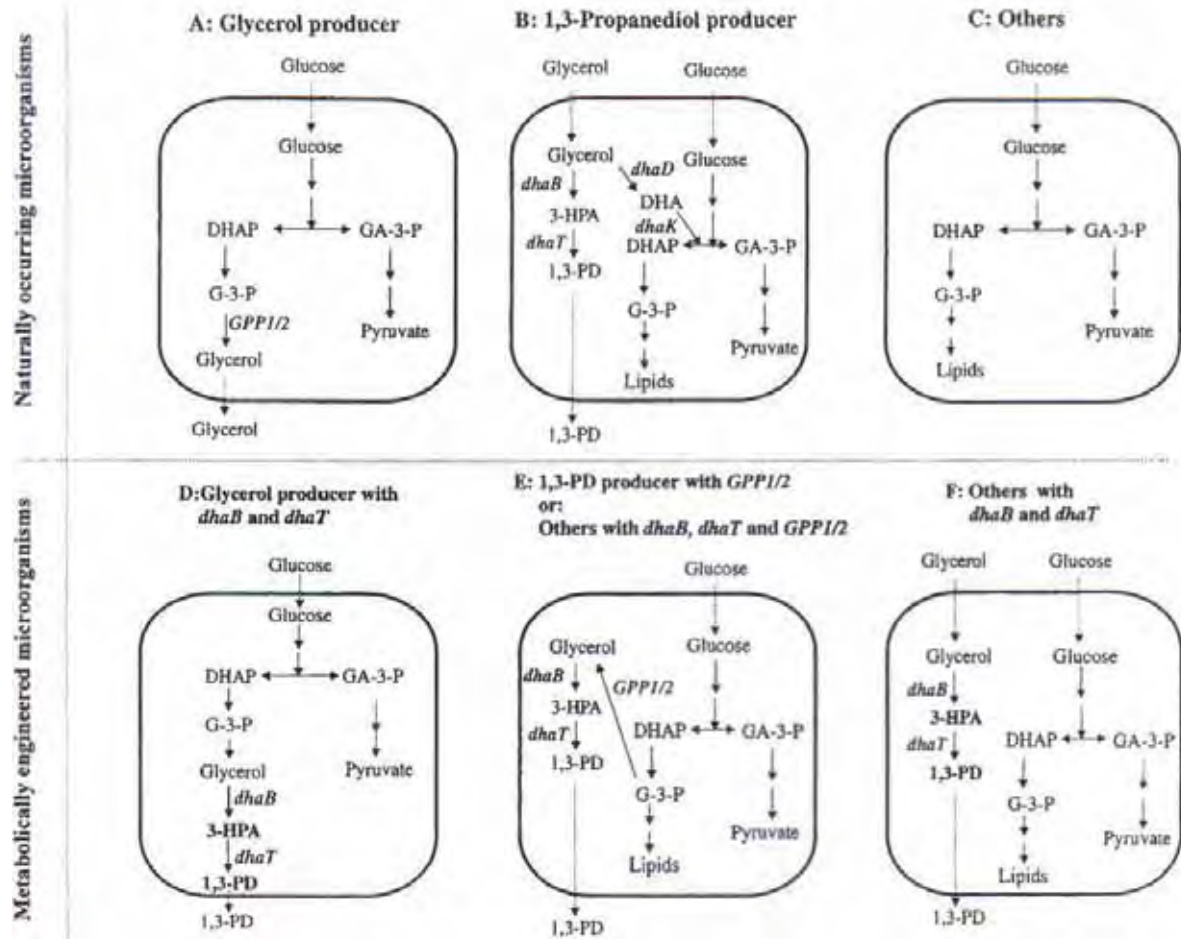


Figura 1.4: Comparação entre microorganismos selvagens e submetidos à engenharia metabólica para produção de 1,3-propanodiol
Fonte: Biebl, 1999.

Verifica-se, portanto, que os genes *dhaB* e *dhaT*, responsáveis pela codificação da glicerol desidratase e pela 1,3-propanodiol oxidorreductase, levam o micro-organismo a produzir o 1,3-PDO.

Entretanto, como verificaram Nakamura e Whited (2003), a engenharia metabólica pode ser utilizada como ferramenta para o aumento na produção de 1,3-PDO, através da síntese de enzimas mais resistentes, no caso, à concentração de glicerol e de 1,3-PDO. Knietsch et al. (2003) isolou desidratases com maior resistência à inativação pelo glicerol e inibição pelo 1,3-PDO. Um conjunto de genes responsável pela desidratase foi isolado e a porção incompleta foi complementada com o DNA correspondente de *Salmonella enterica*, produzindo uma desidratase

com maior resistência. Essa técnica pode ser utilizada, portanto, para resolver os passos limitantes da via. Na figura 4, a figura E mostra um micro-organismo com os genes GPP1 e GPP2, genes isolados de *S. cerevisiae* que codificam duas isoenzimas de glicerol-3-fosfatase, que catalisam a conversão de glicerol-3-fosfato em glicerol em micro-organismos produtores de glicerol. A superexpressão desse gene em outros organismos poderia ligar o metabolismo da glicose e a formação de 1,3-PDO, porque o glicerol-3-fosfato é um intermediário na síntese de lipídeos em todos os micro-organismos (BIEBL et al., 1999).

Para fins industriais, seria interessante que o microorganismo em questão utilizasse, como fonte de carbono, o resíduo industrial bruto, ou com o mínimo de tratamento possível. Isto seria importante, pois diminuiria o custo final de produção, aumentando a viabilidade econômica. Como foi citado anteriormente, o custo de refino de alguns produtos são bastante altos, inviabilizando algumas formas de produção.

Para que isso ocorra, seria importante encontrar a combinação ideal entre organismo hospedeiro e enzimas (e consequente vias metabólicas) a serem clonadas, mais eficientes. Tal importância decorre do fato que o organismo a ser modificado geneticamente precisa se desenvolver bem no determinado substrato e pode ser desfavorável eventuais conflitos entre as vias metabólicas pré-existentes e as inseridas no microorganismo (uma vez que pode haver desvios no fluxo de carbono na célula).

2. Objetivo

O objetivo desse trabalho foi clonar os genes de *Klebsiella pneumoniae* em *Escherichia coli* para obtenção de mutante produtor de 1,3-PDO e verificar a produção de 1,3-PDO pela cepa mutante de *E. coli* utilizando glicerol bruto de biodiesel e glicerol P.A. (Para Análise).

3. Materiais e Métodos

3.1 Cepas estudadas e manutenção dos isolados

O microrganismo *E. coli* TOP10 (F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ) (Invitrogen) encontra-se isolado e mantido em ultrafreezer -86°C em solução de 20% de glicerol, sendo realizado repiques para manutenção da viabilidade das culturas regularmente, e também liofilizada mantida sob refrigeração. Os mutantes foram conservados da mesma forma e liofilizados. As culturas depois de descongeladas foram reativadas em tubos de ensaio com 5 mL de meio LB (Tryptona 10g.L⁻¹; Extrato de levedura 5 g.L⁻¹; NaCl 10 g.L⁻¹) estéril e incubadas em estufa a 37°C por 12-24h. Em seguida, repiques foram realizados a cada 24h, durante 72h, em erlenmeyers contendo 25-50 mL de meio LB estéril com cloranfenicol, e cultivados em shaker a 150rpm e 37°C.

3.2 Preparação de células competentes

A *E.coli* TOP10 passou por um processo para se tornar quimicamente competente, para que o plasmídio pudesse ser inserido. Esse tratamento consistiu no cultivo do microorganismo por cerca de 12 horas a 150 rpm e 36 °C, seguido de um repique, cultivando esse mesmo microorganismo nas mesmas condições, até atingir uma densidade óptica de aproximadamente 0,4. Posteriormente foi realizada a transferência para tubos de polipropileno previamente resfriados. Esses tubos permaneceram no gelo por cerca de 10 minutos e depois foi realizada a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 10°C. O pellet foi ressuspensão em CaCl₂ 0,1M gelado, utilizando 10 mL de CaCl₂ por cada 50 mL de meio cultivado. O volume foi reunido em apenas um tubo de polipropileno, e deixado por cerca de 30 minutos em gelo. Após este tempo, o tubo foi novamente centrifugado, nas mesmas condições, e o pellet dessa vez foi ressuspensão em CaCl₂ 0,1M com glicerol 10%, utilizando 1 mL dessa solução para cada 50 mL de meio cultivado. As células foram então aliquotadas em tubos eppendorf e armazenados no freezer -80 °C.

3.3 Clonagem de genes

O vetor escolhido para este estudo foi o pSB1C3 (iGEM). Este se trata de um plasmídio com alto número de cópias (high copy number plasmid) e possui o gene de resistência ao cloranfenicol. A sequência e estrutura deste vetor pode ser observada na figura 3.1 e a ilustração do plasmídio pode ser observada na figura 3.2.

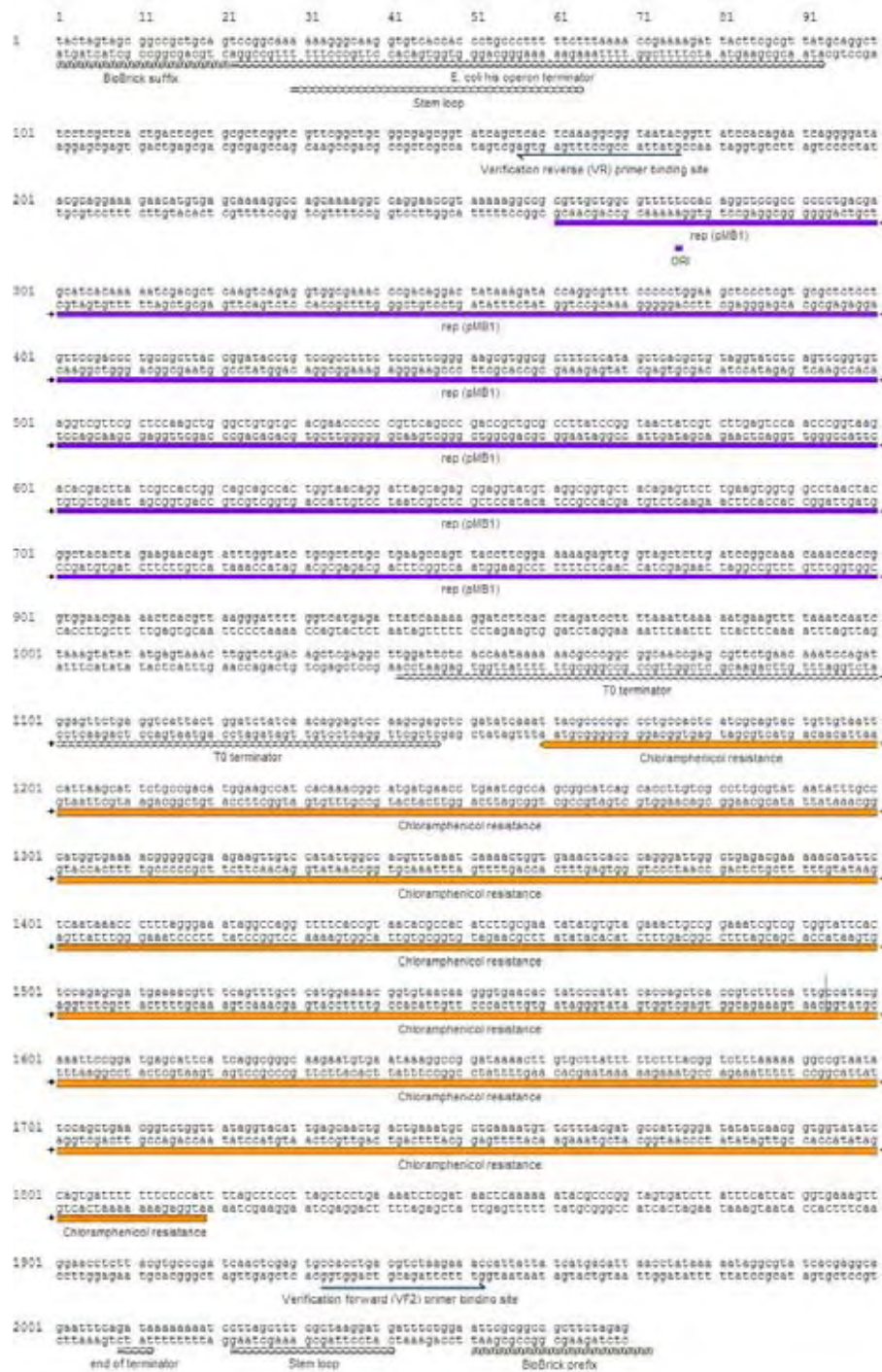


Figura 3.1: Estrutura do pSB1C3, mostrando as regiões de interesse (iGEM).

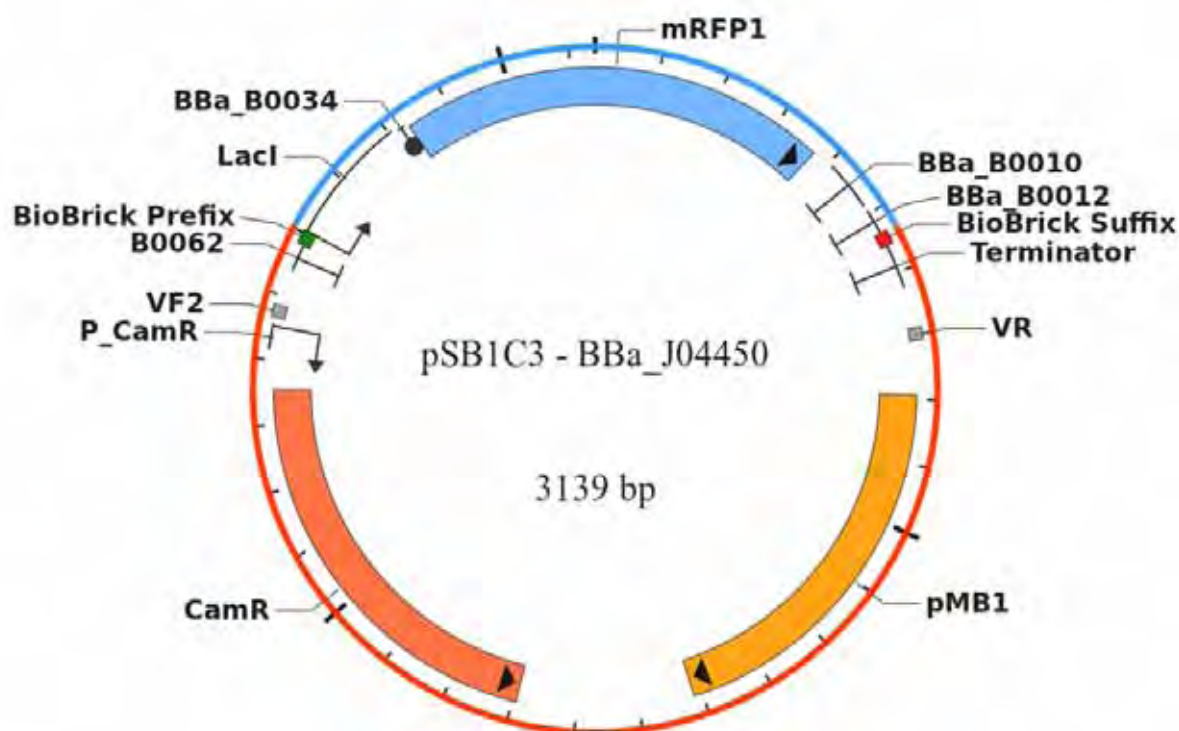


Figura 3.2: Ilustração do plasmídeo pSB1C3, com o gene da RFP (red fluorescent protein) (iGEM).

A metodologia de clonagem foi realizada baseando-se em metodologia descrita em Marin et al.(2002). Foram desenhados primers correspondentes aos genes *dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3* (glicerol desidratase), *dhaT* (1,3-propanodiol oxidoreductase) e *dhaF* e *dhaG* (fator de reativação).

Foi realizado um PCR com gradiente de temperatura para verificar a T_m dos primers utilizados. Basicamente, o programa utilizado no termociclador, para esse teste, foi utilizado o programa "Econotaq", utilizando o kit EconoTaq[®] PLUS GREEN (Lucigen). Esse programa consiste em uma temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 7 minutos e meio, seguida de 32 ciclos da seguinte sequência: 94 °C por 30 segundos, 62 °C (foi realizado um gradiente de temperatura, com 45, 56,5 e 65,1 °C) por 30 segundos, 72 °C por 2 minutos (tempo variável), e em seguida, a reação permaneceu a 72 °C por 10 minutos e depois, 4 °C, temperatura final.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador utilizando Phusion DNA polimerase de alta processividade. Para visualização do produto amplificado (amplicon), foi realizada corrida eletroforética da mistura de PCR em gel de agarose a 2%, utilizando-se azul de bromofenol 0,25% em 40% de sacarose, seguido de coloração do gel em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL. O tamanho das

bandas foi determinado por comparação com marcador para peso molecular 1kb DNA Ladder (NEB).

Após a escolha do vetor, foram desenhados primers para a amplificação do mesmo, porém sem o gene da RFP. Ficou estabelecido que o operon construído seria inserido na região onde originariamente estava o gene da RFP. O vetor foi então submetido a técnica de PCR, para amplificação do mesmo, e purificado, para posterior utilização.

A montagem do operon e inserção do mesmo no vetor foi realizada utilizando a técnica de Gibson (isotérmica, por 1 hora), seguindo a metodologia do artigo (GIBSON, D. G. 2009). O mastermix foi feito com 3 enzimas: Uma exonuclease T5 (NEB), uma polimerase Phusion (NEB) e uma ligase Taq (NEB). Os genes foram normalizados e adicionados ao mastermix e a reação ocorreu em um termociclador, por 1 hora, a 50 °C. O esquema pode ser visualizado na figura 3.3.

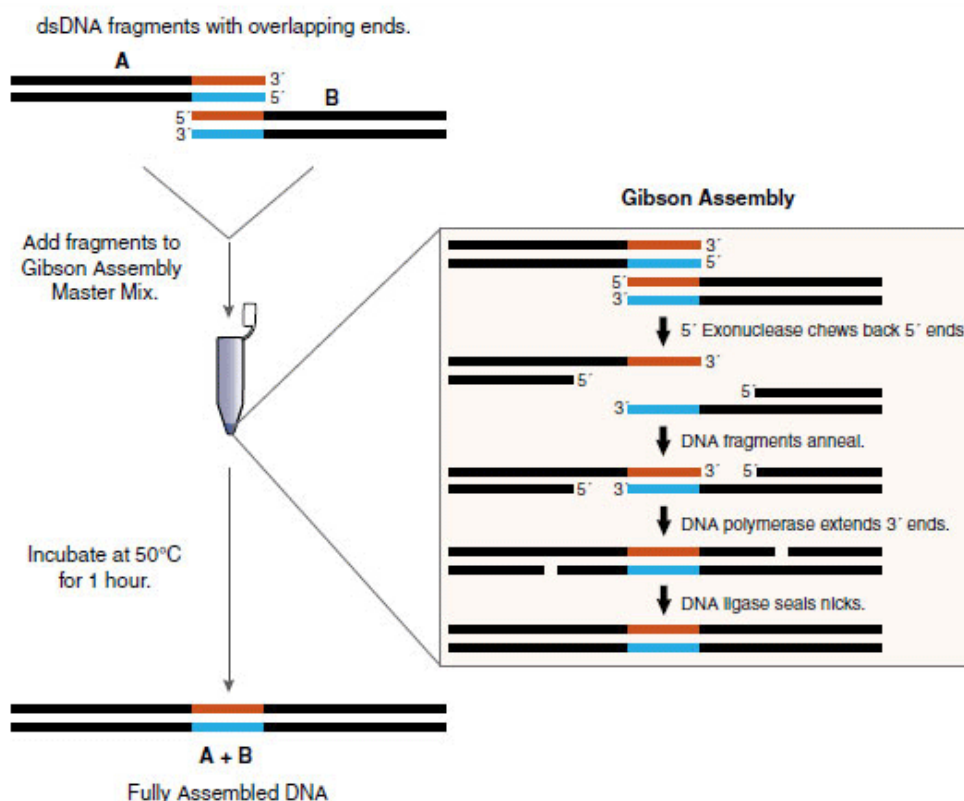


Figura 3.3: Esquema de funcionamento da metodologia de Gibson.

Fonte: New England Biolabs® Inc.

A metodologia de Gibson foi utilizada para a construção do plasmídeo contendo os 6 genes. Os fragmentos para a construção (genes e vetor) foram normalizados quanto ao comprimento e concentração, e utilizados em apenas um

tubo, na mesma reação de Gibson. Esta técnica consiste na utilização de um mix, contendo tampão, polimerase, nuclease e ligase, na quantidade de 15 μL , e 5 μL de uma mistura contendo os genes a serem montados e o vetor utilizado. A quantidade adicionada de cada gene é normalizada, de acordo com o comprimento do gene e a sua concentração, em relação ao maior fragmento utilizado (que no caso, é o vetor). Foram testadas diferentes concentrações e proporções gene:vetor, como 5:1 e 10:1. O volume final de reação foi de 50 μL , sendo 5 μL do mix de fragmentos e água, e 45 μL de mastermix. Foi realizado o controle negativo, com apenas o vetor e o mix de enzimas.

3.4 Transformação e verificação

A *E. coli* TOP10 competente foi transformada utilizando o procedimento de choque térmico. Este procedimento consistiu em deixar o tubo contendo as células competentes descongelar em um isopor contendo gelo, aliquotar 100 μL dessa solução em um microtubo previamente resfriado em gelo e adicionar 2 μL da solução contendo o plasmídio. Esse microtubo foi retirado do gelo, colocado em banho-maria a 42 °C, com leve agitação, por 2 minutos e posteriormente recolocado no gelo, por 45 segundos. Após isto, a solução do microtubo foi colocada em 500 μL de meio LB e incubadas a 37 °C, com 150 rpm, por 2 horas.

Para verificação, o tubo foi centrifugado a 12.000 rpm, por 10 minutos, e o pellet foi gentilmente ressuspenso em 100 μL de meio LB. Após isso, essa solução foi plaqueada em placas de LB com ágar 10%, contendo cloranfenicol (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Foi realizado um controle positivo, com o plasmídio sem modificações, expressando a RFP (red fluorescent protein), e um controle negativo, com o plaqueamento apenas das células competentes, sem o plasmídio inserido. Foram selecionadas as colônias presentes na placa, indicando a presença do plasmídeo. As colônias enriquecidas foram analisadas através de Colony PCR e PCR por Phusion, este último utilizando os plasmídeos extraídos, através de kit, da cultura de células. A confirmação do amplicon inserido no plasmídeo foi realizada em gel de agarose por comparação de peso molecular com o plasmídeo sem inserção.

3.5 Fermentações

As cepas foram cultivadas em shaker a 37°C 150rpm por 72h em erlenmeyer de 125 mL contendo 45 mL de meio de composição (g.L⁻¹): NH₄H₂PO₄ 5,0; K₂HPO₄ 1,0; MgSO₄·7H₂O 0,2; NaCl 1,0; extrato de levedura 5,0; glicerol (P.A. e Bruto) 20,0, 40,0 e 60,0; 100 µl de solução concentrada de elementos traço, de composição (g.L⁻¹): EDTA 0,5; CaCl₂·2H₂O 0,5; CoCl₂·6H₂O 0,16; MoNH₄·4H₂O 0,1; CuSO₄·5H₂O 0,16; FeSO₄·7H₂O 0,5; MnSO₄·H₂O 0,5; ZnSO₄·7H₂O 0,22; NiCl₂·6H₂O 0,03; H₃BO₃ 0,12; Vitamina B12 0,25 mg/mL; IPTG 100 µM e Cloranfenicol 50 µg/mL.

As fermentações ocorreram em frasco erlenmeyer. Foram testadas as concentrações de 20, 40 e 60 g/L, utilizando glicerol bruto e glicerol P.A., em duplicata. As fermentações foram realizadas por 72 horas, com as amostras sendo retiradas nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 horas. As amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi separado, diluído na proporção 1:1 e filtrado, para posterior análise no HPLC. O pellet de células foi lavado em solução salina (0,85% NaCl) e posteriormente ressuspensionado na mesma, para leitura de absorbância em 600nm.

3.6 Detecção de metabólitos produzidos

Periodicamente foram retiradas alíquotas para avaliar a produção de 1,3-PDO. Alíquotas de 1 mL das culturas foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante livre de células foi transferido para microtubos e armazenados a -20°C, para posterior análise em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com coluna de troca iônica Phenomenex – Rezex Organic Acids (300 mm x 7,8 mm) a uma temperatura de 60°C, e solução de H₂SO₄ 0,005M a 0,5 mL/min como fase móvel. Foram utilizados padrões externos de etanol, propanol, butanol, lactato, propionato, citrato, succinato, acetato, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, e glicerol.

4. RESULTADOS

As sequencias gênicas de dhaB1, dhaB2, dhaB3, dhaT, dhaF e dhaG foram obtidas através do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir delas, foram desenhados primers (tabela 4.1) para amplificação dos genes utilizando o programa ApE (freeware - <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>). Esses primers já foram desenvolvidos com a intenção de construir o operon, em um plasmídeo, através da técnica de Gibson. O operon foi construído de duas formas: dhaB123T e dhaB123TFG. A construção foi feita para inserção no plasmídeo pSB1C3 (high copy plasmid, com marcador de resistência de cloranfenicol), com um promotor e um RBS (sítio de ligação do ribossomo) antes do primeiro gene, e um RBS entre cada gene. Após o último gene, localiza-se a sequência de terminação (ter). A construção pode ser vista nas figuras 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1: Primers desenhados para amplificação dos respectivos genes.

dhaB1_F	For	aattgtgagcggataacaatttcacacaaaagaggagaaaATGAAAAGATCAAACGATT
dhaB1_R	Rev	GTTGTCTGTTGCATtttctcctcttTTATTCAATGGTGTGTCAGGCTG
dhaB2_F	For	ACACCATTGAATAAaaagaggagaaaATGCAACAGACAACCCAAATTC
dhaB2_R	Rev	GTTTTCTCGCTCATtttctcctcttTCACTCCCTTACTAAGTCGAC
dhaB3_F	For	TAGTAAGGGAGTGAAaagaggagaaaATGAGCGAGAAAACCATGCGCG
dhaB3_R	Rev	ATACGATAGCTCATtttctcctcttTTAGCTTCCTTACGCAGCTTATG
dhaT_F	For	GTAAAGGAAGCTAAaaagaggagaaaATGAGCTATCGTATGTTTGATTATC
dhaT_R	Rev	GCTATTAACGGcattttctcctcttTCAGAATGCCTGGCGAAAATC
dhaF_F	For	GCCAGGCATTCTGAAaagaggagaaaatgCCGTTAATAGCCGGGATTG
dhaF_R	Rev	GGTGAAAGCGAcattttctcctcttTTAATTCGCCTGACCGGCCAG
dhaG_F	For	GTCAGGCGAATtaaaaagaggagaaaatgTCGCTTTCACCGCCAGGCG
dhaG_R	Rev	agtccttcgactgagccttcgcttttatttgatgcctggtcaGTTTCTCTCACTTAACG

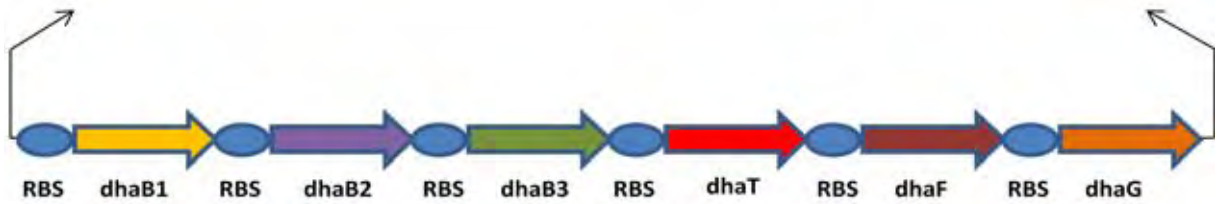


Figura 4.1: Construção do plasmídeo.

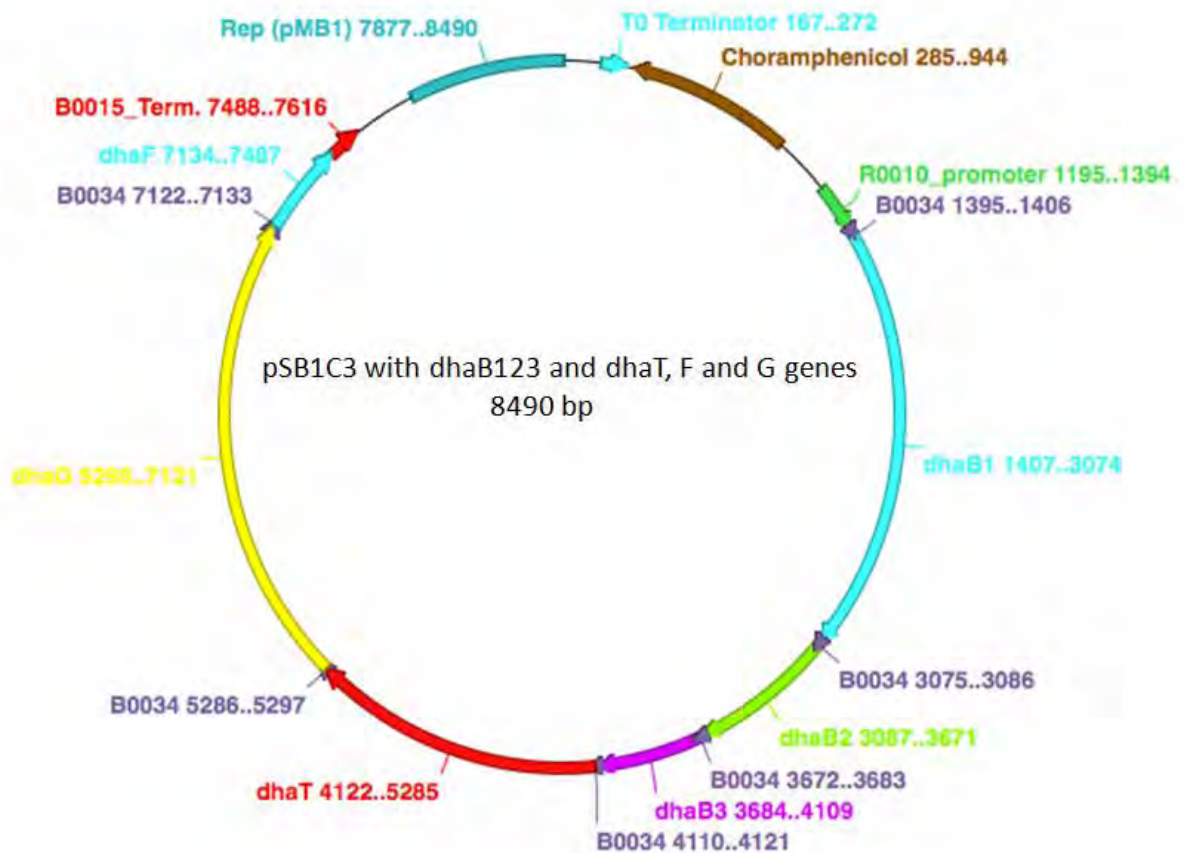


Figura 4.2: Representação circular do plasmídeo construído.

Primeiramente, foi realizado o teste de T_m , para verificar a temperatura correta de anelamento do primer ao gene alvo. As temperaturas utilizadas variaram de acordo com a T_m calculada do primer. O resultado do teste de T_m está ilustrado na figura 4.3.

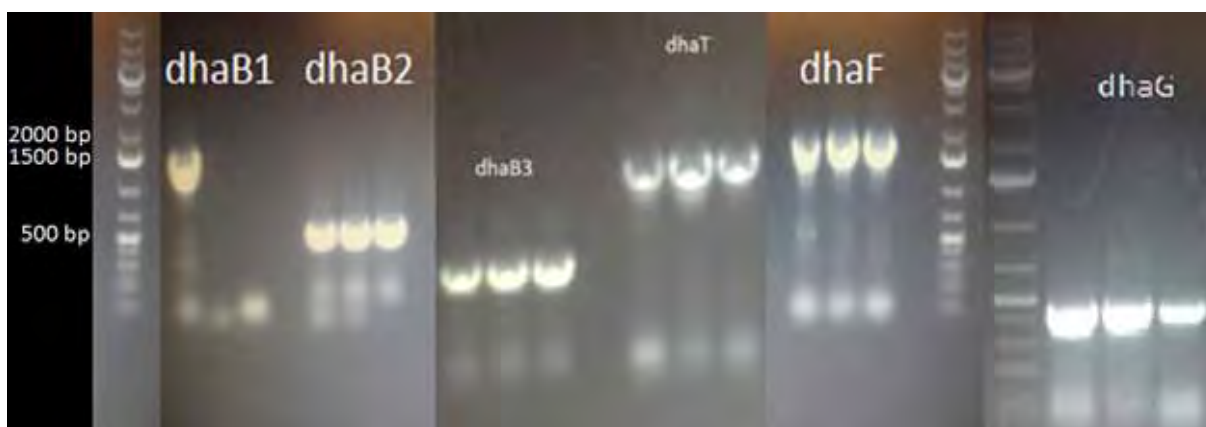


Figura 4.3: Teste de T_m para os primers e os respectivos genes. As temperaturas testadas variaram de acordo com a temperatura indicada no primer (teórica). Para os genes *dhaB1* e *dhaG*, foram utilizadas as temperaturas de 46, 51 e 56,5 °C. Para os genes *dhaB2*, *dhaB3*, *dhaT* e *dhaF*, foram testadas as temperaturas 56,5, 61 e 65 °C.

Após o teste de T_m , foi estabelecida a T_m de cada gene. A melhor temperatura foi escolhida de acordo com a intensidade da banda exibida no gel de agarose, tentando ao mesmo tempo deixar as temperaturas o mais próximas possível umas das outras. Essa temperatura foi selecionada para uma amplificação com Phusion (high fidelity), para posterior extração e purificação do gene, a partir do gel de eletroforese. O resultado pode ser observado na figura 4.4.

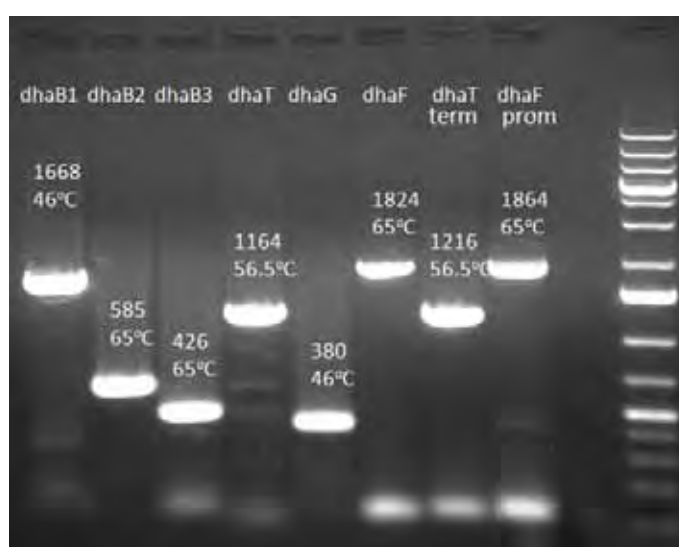


Figura 4.4: Gel de eletroforese do produto da PCR dos genes por Phusion. Os valores estão em bp (pares de base). Pode-se observar na figura o tamanho das bandas e as T_m dos genes.

Os genes foram então excisados do gel e purificados através de kit específico (Qiagen). Após esta etapa, os genes foram analisados quanto a pureza e concentração através do NanoDrop. A concentração e pureza foram consideradas suficientes, então se partiu para a etapa seguinte, a montagem dos genes pela metodologia de Gibson. O experimento com a montagem dos genes e do vetor, através da técnica de Gibson, não obteve resultados satisfatórios, pois não houve crescimento na placa. Optou-se, então, por outra abordagem: Diminuir o número de fragmentos, através da técnica de overlapping PCR. Nessa técnica, foi realizada a PCR dos fragmentos, dois a dois. A execução do experimento ocorreu da seguinte forma: Uma reação de PCR com Phusion, com o primer F do primeiro gene e o R do segundo gene, um tempo de elongação maior, e foram utilizados os dois genes como molde de DNA. Além disso, foi realizada uma overlapping PCR com Econotaq (figura 4.5), para efeito de comparação. Foram realizados os overlapping PCRs para dhaB1 e dhaB2, dhaB3 e dhaT, dhaF e dhaG, totalizando 3 fragmentos. Após isso, os genes passaram pela eletroforese em gel de agarose (resultando na figura 4.6), e as bandas de tamanho correto, excisadas e purificadas, para nova realização de montagem por Gibson.

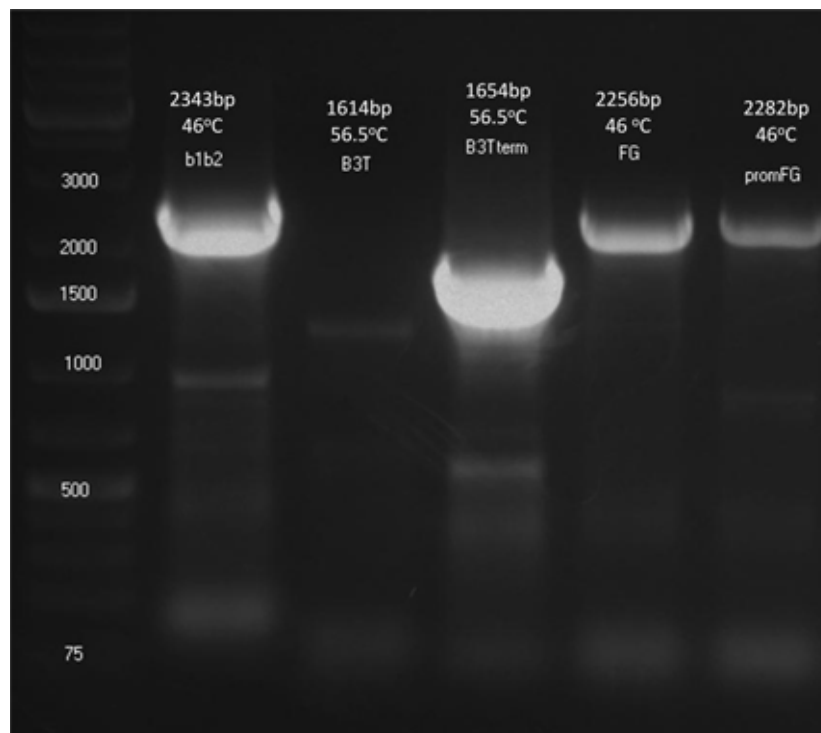


Figura 4.5: Overlapping PCR com Taq.

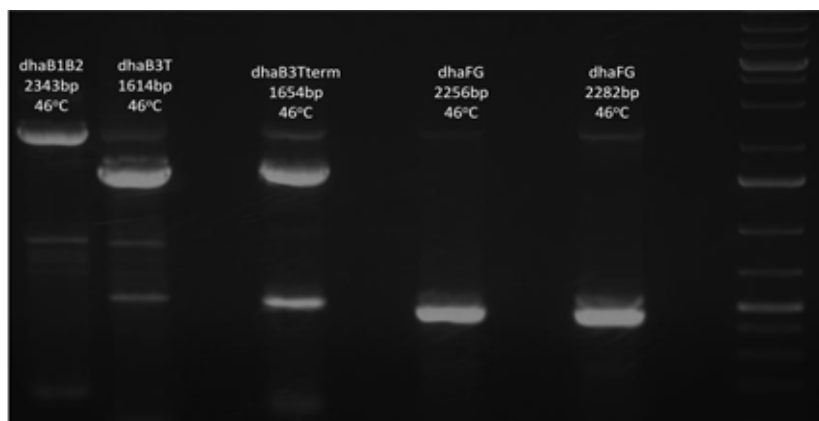


Figura 4.6: Overlapping PCR utilizando Phusion.

Após a extração e purificação dos fragmentos, a partir do gel, os mesmos foram analisados no NanoDrop, para verificação da pureza e concentração das amostras. Após isso, foi montada uma nova reação de Gibson. A normalização pode ser observada na tabela 2.

Tabela 4.2: Normalização utilizada para a reação de Gibson.

Fragmento	Concentração (ng/uL)	Tamanho (bp)	Razão	5 ng vetor	10 ng vetor
pSB1C3	16,1	2409	1	0,31	0,62
B1B2	12	2331	1,03	0,43	0,86
B3T	9,6	1668	1,44	0,75	1,50
água				3,50	2,01

Após a realização do procedimento de Gibson, transformação das células e cultivo das mesmas em placas, foi observado o surgimento de colônias na placa do experimento (figura 4.7).

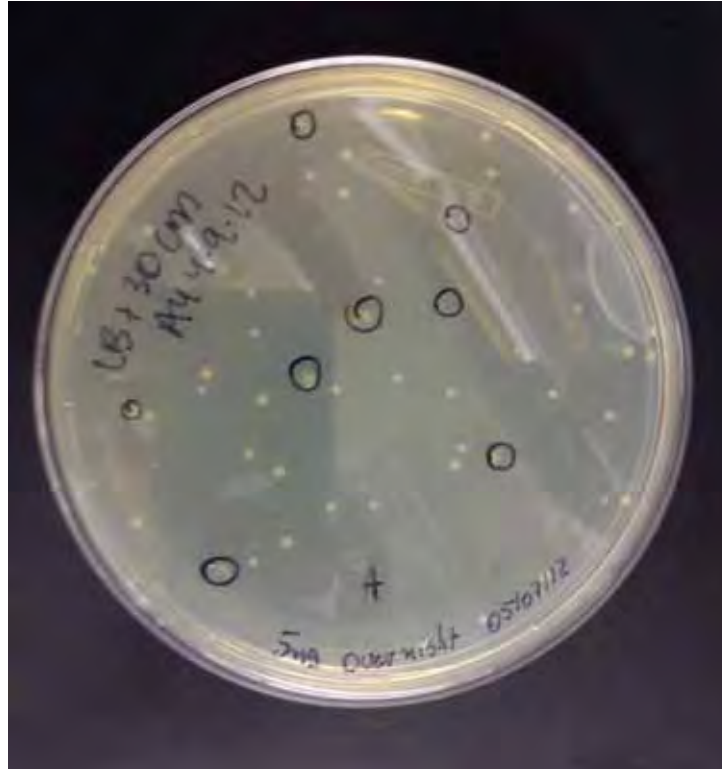


Figura 4.7: Placa de Petri, contendo meio LB com antibiótico (cloranfenicol), com colônias.

Após o surgimento das colônias, foram escolhidas colônias isoladas aleatoriamente para confirmação. Esta foi feita através de Colony PCR (figura 4.8) e posterior extração do plasmídeo para confirmação por Phusion. No Colony PCR, foi selecionado um gene aleatório, no meio da construção, para uma triagem inicial dos candidatos. No caso, utilizaram-se os primers do gene *dhaF*, para confirmação do mesmo. Após essa triagem inicial, o plasmídeo foi extraído, através de kit comercial, para confirmação dos candidatos. Foram selecionados os genes *dhaB23* e *dhaTF*. O gel de eletroforese do produto dessa PCR está ilustrado na figura 4.9.

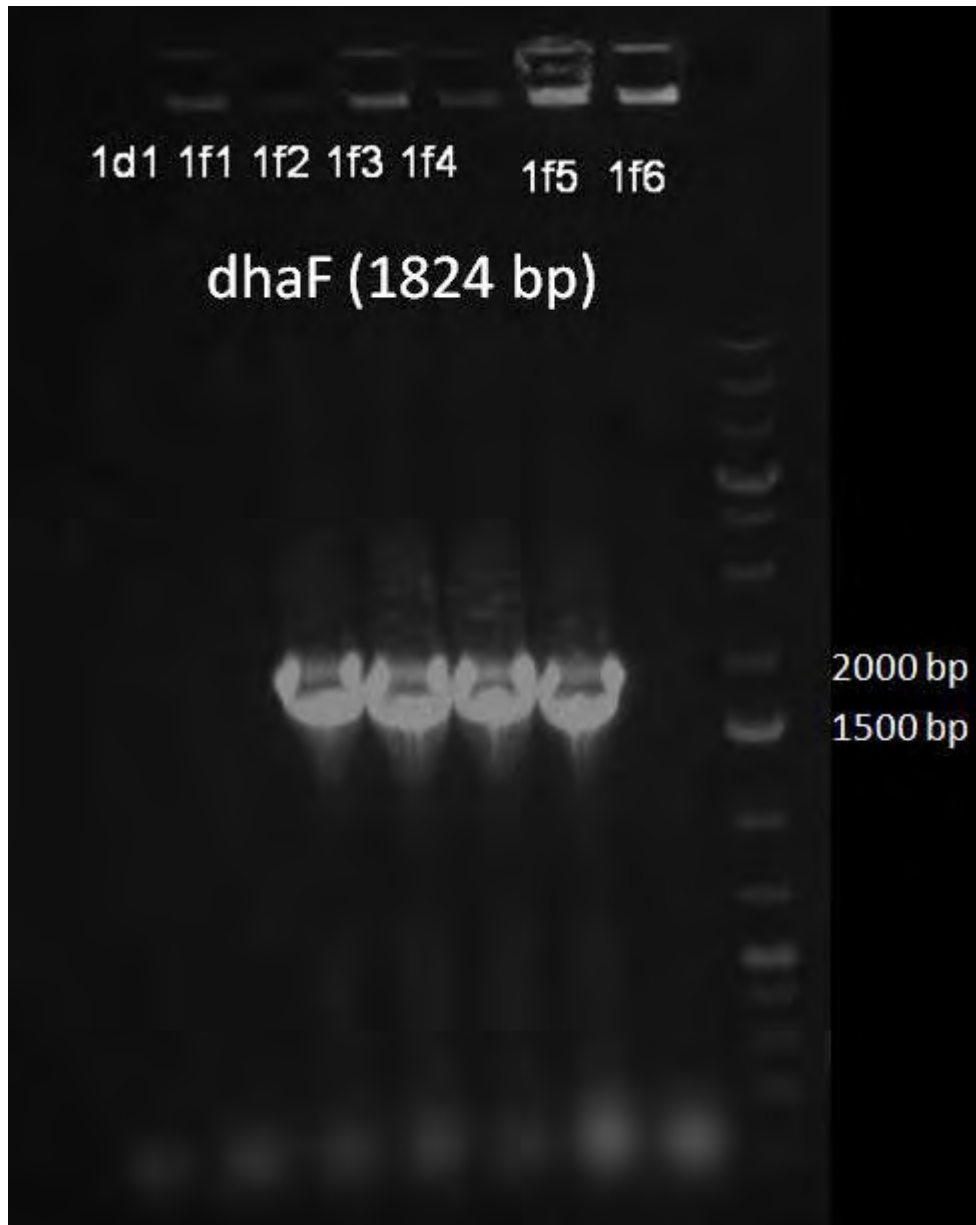


Figura 4.8: Imagem do gel de agarose do resultado da Colony PCR. O gene alvo para amplificação foi o dhaF (1824 bp). Os candidatos 1f2, 1f3, 1f4 e 1f5 seguiram para a extração de plasmídeo e confirmação da construção.

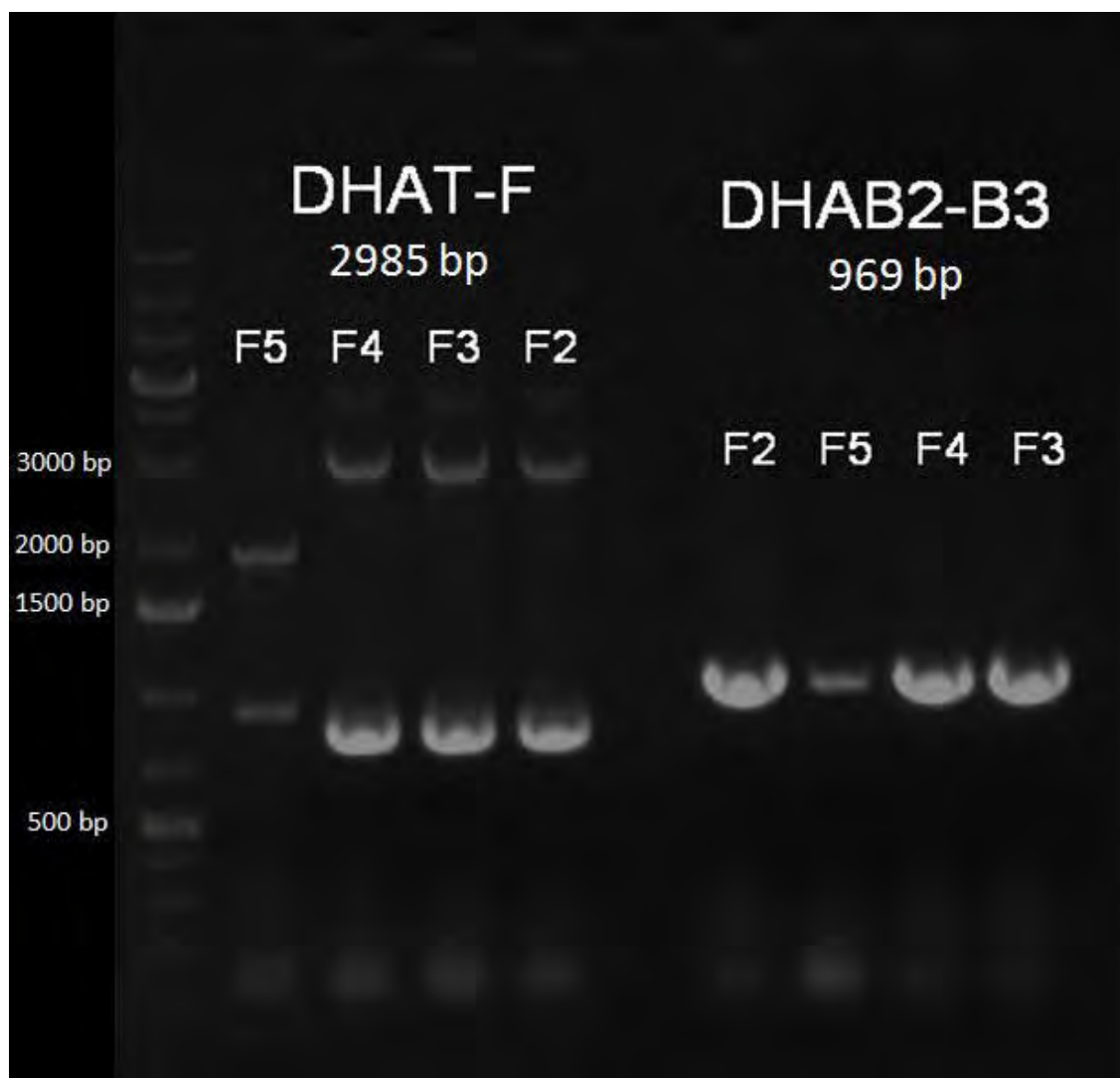


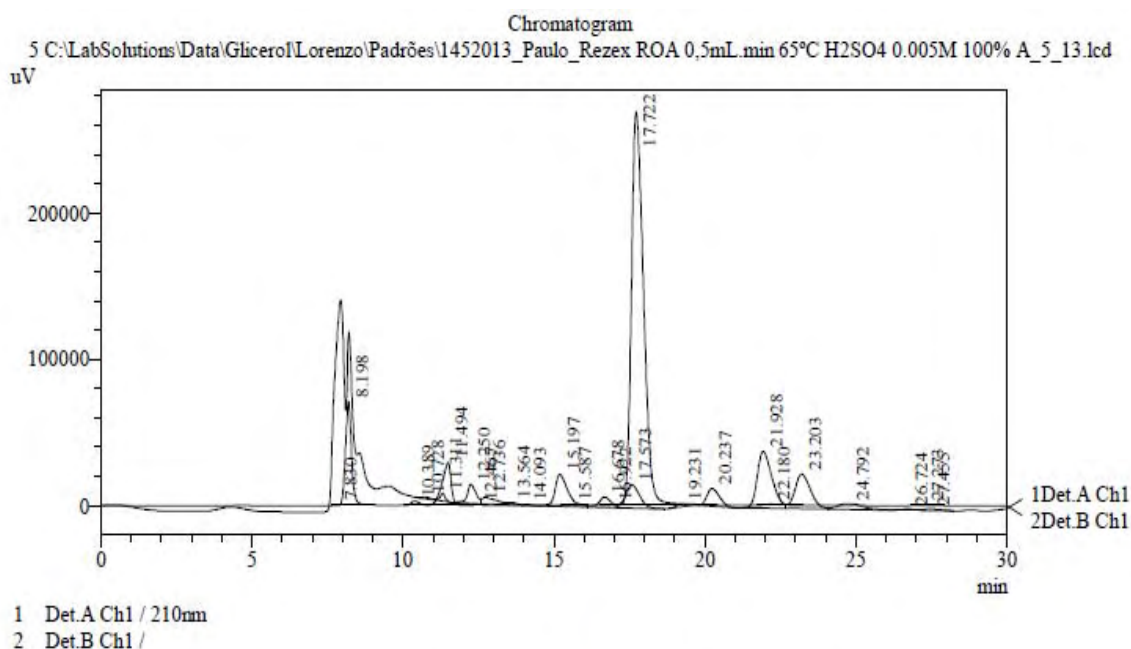
Figura 4.9: Confirmação dos candidatos através de PCR com Phusion, utilizando o plasmídeo extraído como template.

Após estes passos, confirmaram-se as colônias F2, F3 e F4. As mesmas foram repicadas em meio contendo cloranfenicol e estocadas em glicerol no ultrafreezer.

Após a etapa de construção do plasmídeo, com posterior confirmação, o microorganismo seguiu para a etapa de fermentação. Após realizada a fermentação, as amostras seguiram para análise por HPLC.

No total, foram 120 amostras a serem analisadas pelo HPLC. Dois cromatogramas foram selecionados para ilustrar essa etapa. O primeiro (figura 4.10), é referente à amostra do glicerol bruto, no tempo 0 horas. Ele indica, através de análise feita a partir da curva de calibração, a concentração de glicerol e de 1,3-PDO

nesse tempo. Como a diluição foi na proporção de 2:1, então o resultado apresentado na figura deve ser multiplicado por 2. O segundo (figura 4.11), é referente à amostra do glicerol bruto, no final da fermentação (72 horas). Ele indica a concentração de glicerol e de 1,3-PDO no meio, indicando a queda da concentração de glicerol e aumento na concentração de 1,3-PDO. Foram quantificadas as concentrações de glicerol e de 1,3-PDO em todas as amostras. Os resultados mais significativos foram os obtidos com glicerol bruto, na concentração de 60 g/L e com glicerol P.A., de 60 g/L. Esses resultados podem ser observados nas tabelas 4.3 (glicerol bruto, 60 g/L) e 4.4 (glicerol P.A., 60 g/L).

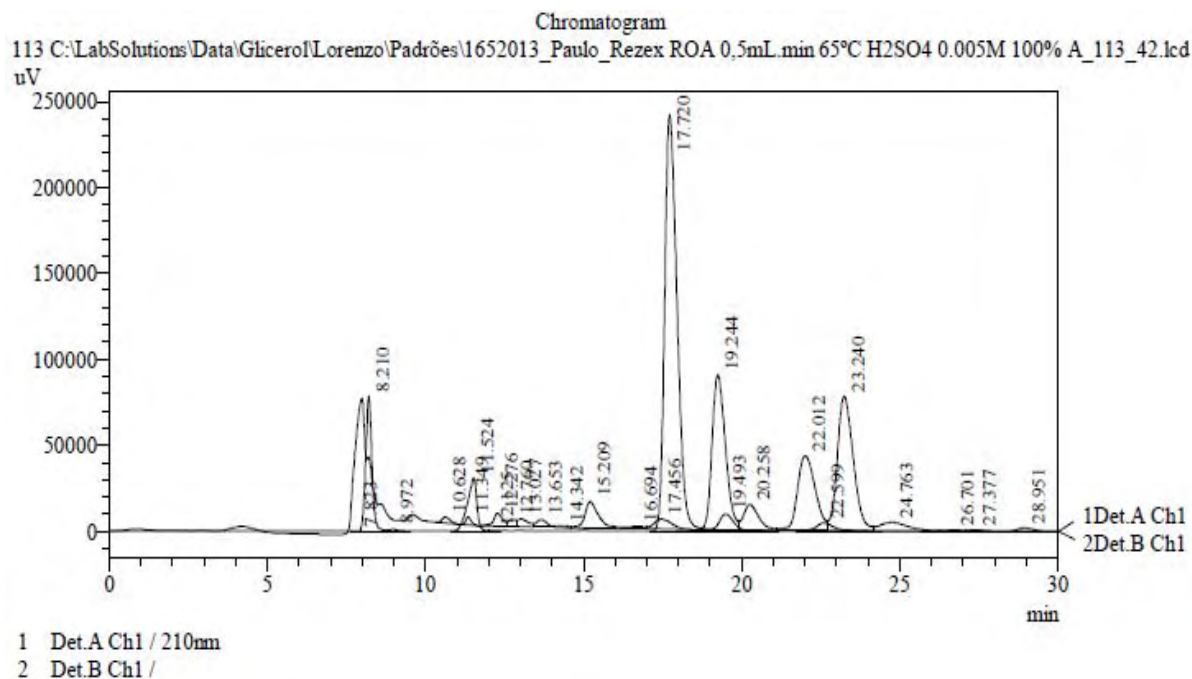


PeakTable

Detector B Ch1

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1		7.830	1989	263	0.000	
2		8.198	1000780	70940	0.000	
3		10.389	60156	2973	0.000	
4		11.494	626193	29598	0.000	
5		12.467	16269	636	0.000	
6		15.587	14082	456	0.000	
7		16.922	11129	472	0.000	
8	Glicerol	17.722	7474379	269032	28.374	g/L
9	1,3-PDO	22.180	48972	901	0.217	g/L
10		27.273	10925	308	0.000	
Total			9264874	375579		

Figura 4.10: Cromatograma referente à amostra de glicerol bruto, no início da fermentação (0 horas).



PeakTable

Detector B Ch1

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1		7.823	1455	203	0.000	
2		8.210	1078918	78672	0.000	
3		8.972	23912	1100	0.000	
4		11.524	649525	30845	0.000	
5		12.125	7701	393	0.000	
6	Glicerol	17.720	6601271	242472	25.060	g/L
7		19.493	342900	10015	0.000	
8	1,3-PDO	22.599	219763	4832	0.976	g/L
Total			8925446	368532		

Figura 4.11: Cromatograma referente à amostra de glicerol bruto, no final da fermentação (72 horas).

Tabela 4.3: Amostras de glicerol bruto, na concentração de 60 g/L, mostrando as concentrações de glicerol e 1,3-PDO, e densidade óptica, ao longo de 72 horas.

Tempo	Glicerol	1,3-PDO	D.O.
0	57.786	0.385	0.097
3	56.748	0.434	0.602
6	52.176	1.004	1.59
9	51.626	1.359	1.815
12	47.782	1.416	2.82
18	48.484	1.831	2.8
24	47.66	1.846	2.935
36	48.422	1.886	3.025
48	49.378	1.93	3.075
72	49.404	1.964	2.835

Tabela 4.4: Amostras de glicerol P.A., na concentração de 60 g/L, mostrando as concentrações de glicerol e 1,3-PDO, e densidade óptica, ao longo de 72 horas.

Tempo	Glicerol	1,3-PDO	O.D.
0	64.342	0.4	0.11
3	64.048	0.674	0.775
6	62.102	0.76	2.13
9	63.884	0.828	2.35
12	61.414	0.976	2.51
18	60.356	1.06	2.57
24	60.494	1.02	2.96
36	59.34	0.974	2.91
48	56.637	0.992	3.05
72	53.326	0.826	3.49

Os gráficos resultantes das tabelas 4.3 e 4.4 podem ser visualizados nas figuras 4.12 e 4.13.

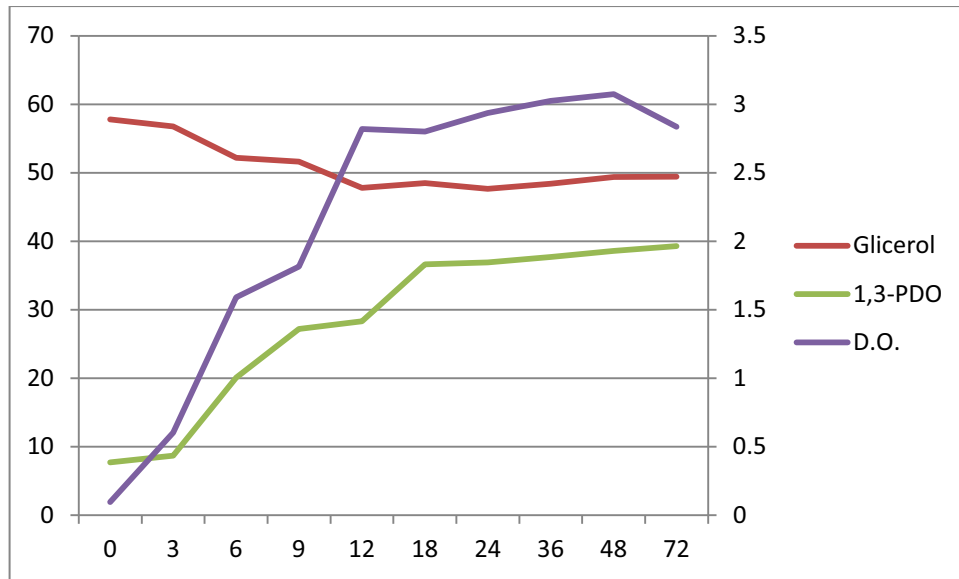


Figura 4.12: Gráfico ilustrando a concentração de glicerol bruto, 1,3-PDO e a densidade óptica ao longo do tempo de fermentação.

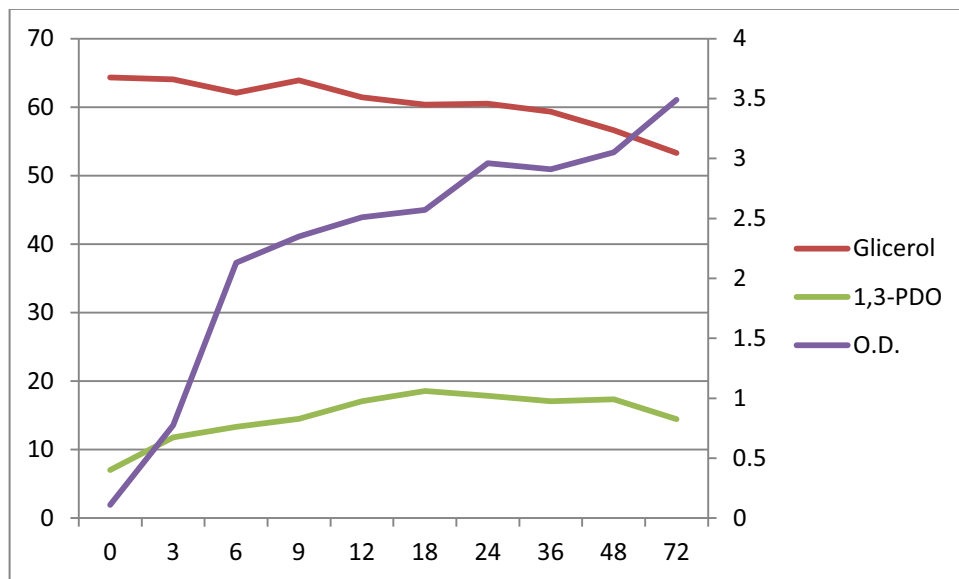


Figura 4.13: Gráfico ilustrando a concentração de glicerol P.A., 1,3-PDO e a densidade óptica ao longo do tempo de fermentação.

Os resultados obtidos indicaram a produção de 1,3-PDO, confirmando a correta inserção do operon na cepa em questão, uma vez que esta não produz, naturalmente, o 1,3-PDO. A produção parece ser associada ao crescimento microbiano, dando indicativos de uma possível melhoria na eficiência utilizando a batelada alimentada como estratégia de fermentação.

Alem disso, os resultados indicaram que o glicerol bruto foi a melhor fonte de carbono testada, na concentração de 60 g/L. Entretanto, os resultados indicam que pouco glicerol foi consumido, sugerindo que a cepa utilizada não tem adaptações fisiológicas suficientes para um bom metabolismo do mesmo.

O fato do glicerol bruto ter apresentado um resultado superior ao glicerol P.A. (cerca de 2 g/L, contra cerca de 1 g/L), indica que, algo na composição do glicerol bruto, proveniente do processo de fabricação do biodiesel, promoveu, ou ao menos facilitou, a produção do 1,3-PDO. A composição do glicerol bruto não foi definida nesse estudo, mesmo porque ela é variável, dependendo do processo produtivo adotado.

6. CONCLUSÃO

O resultado obtido nesse estudo é bastante promissor, visto que sob o aspecto do processo industrial, é mais viável, economicamente, a utilização do glicerol bruto, uma vez que este não precisa passar por um custoso processo de refino. Tendo em vista, ainda, que o glicerol é um resíduo subaproveitado na industria, a produção de 1,3-PDO por um organismo comum e inócuo se faz bastante interessante.

7. ESTRATÉGIAS FUTURAS

Outras estratégias podem ser adotadas para um aumento da produção de 1,3-PDO. Entre elas, outras modificações genéticas, tais como a expressão heteróloga da *glpK* e *glpF* (facilitadores do transporte de glicerol) ou da identificação e superexpressão da proteína responsável pela difusão facilitada do glicerol em *E. coli*. Poderiam ser consideradas também outras modificações genéticas, tais como nas vias responsáveis pela produção de etanol, acetato e outros metabólitos que influenciam negativamente a produção de 1,3-PDO. Alem disso, outras estratégias podem ser adotadas, tais como a otimização do meio e das condições para essa cepa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP – Agência Nacional do Petróleo. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?pg=14685>. Acesso em 12 fev. 2011.

AHRENS, K.; MENZEL, K.; ZENG, A.-P.; DECKWER, W.-D. Kinetic, Dynamic, and Pathway Studies of Glycerol Metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in Anaerobic Continuous Culture: III. Enzymes and Fluxes of Glycerol Dissimilation and 1,3-Propanediol Formation. **Biotechnology and Bioengineering**. Vol. 59, Nº5, p.544-552, 1998.

ALMEIDA, M. M. T.; PINTO, G. A. S. Utilização do glicerol para a produção de biomassa por fermentação submersa de *Rhodoturula glutinis*. VII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, UFSCar, São Carlos, 2007. Disponível em: <http://www.ufscar.br/cobeqic07/pdf/poster_iii/piii40.pdf > Acesso em 25 fev. 2008.

ANAND, P.; SAXENA, R. K. A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. **New Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 19-23. 2011.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. Revista Analytica, Nº26, 2007. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm>> Acesso em 25 fev. 2011.

ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. **Biomacromolecules**, Washington, v. 6, p. 2106-2112, 2005.

BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: Comparison with conventional substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology** vol.47, nº4, p.441–446, 1997.

BIEBL, H.; ZENG, A.-P.; MENZEL, K.; DECKWER, W.-D. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 50, p. 24-29, 1998.

BIODIESELBR.COM. Disponível em < <http://www.biodieselbr.com/biodiesel.htm>>. Acesso em 01/06/2013.

BRASIL. Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. DOU de 14 de janeiro de 2005.

BULHÕES, R. O Biodiesel e sua relação com a incorporação de novas áreas e produção de soja no Paraná. Encontro de Economia Paranaense, V. Curitiba, PR. Brasil, 2007. Disponível em: http://www.ecopar.ufpr.br/artigos/a4_070.pdf. Acesso em 28 de Fevereiro de 2010.

CÁRDENAS, P.; PULIDO, C.; ARAGÓN, Ó. L.; ARISTIZÁBAL, F. A.; ROCÍO, S. Z.; MONTOYA, D. Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium* sp. mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiésel. **Revista Colombiana de Ciências Químico- Farmacéuticas**. Vol. 35, p. 120-137, 2006.

CARVALHO, G.D. A indústria dos hidrocarbonetos no Brasil: o problema com o caso gasoduto Bolívia- Brasil e a solução com os combustíveis renováveis. **Papel Político Bogotá** (Colombia). Vol. 11, . pp. 739-760, 2006.

CHENG, K.; LIU, D.; SUN, Y.; LIU, W. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. **Biotechnology Letters**. vol. 26, p. 911-915, 2004.

DANIEL, R.; BOBIK, T. A.; GOTTSCHALK, G. Biochemistry of coenzyme B-12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. **FEMS Microbiology Reviews**. Vol. 22, nº5, p.553–566, 1999.

DECKWER, W. D.. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. **FEMS Microbiology Reviews**. Vol. 16, p.143-149, 1995.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and bioengineering**. Vol. 94, nº5, p. 821-829, 2006.

FARIA, R. C. M.; REZENDE, M. J. C.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel:diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**, Vol. 30, No. 8, p. 1900-1905, 2007.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, Vol. 28, no. 1, p. 19-23, 2005

FERREIRA, J.R.; CRISTO, C.M. O Futuro da Indústria: biodiesel. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior – MDIC Instituto Euvaldo Lodi – IEL/Núcleo Central. p. 145, 2006.

FISCHER, G.; SCHRATTENHOLZER, L. Global bioenergy potentials through 2050. **Biomass & Bioenergy**, Pergamon, Vol. 20, p. 151-159, mar., 2001.

FREDLUND, E.; BROBERG, A.; BOYSEN, M.E.; KENNE, L.; SCHNÜRER, J. Metabolite profiles of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121 grown under oxygen limitation. **Applied microbiology and biotechnology**. Vol. 64, p. 403-9, 2004.

GALDEANO-VILLEGAS, C.; SANTOS, V.; ZAZO, M.; GARCIA, J.; GARCIAOCHOA, F. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella oxytoca* NRTL B-199: Study of product inhibition. **Journal of Biotechnology**. Vol. 131, p. S102-S102, 2007.

GERIS, R.; SANTOS, N.A.; AMARAL, B.A.; MAIA, I.D.; CASTRO, V.D.; CARVALHO, J.R. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**. Vol. 30, p. 1369-1373, 2007.

GIBSON, D. G.; YOUNG, L.; CHUANG, R.-Y.; VENTER, J. C.; HUTCHISON III, C. A.; SMITH, H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, n. 6, p 343-345. 2009.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; SOUCAILLE P.; VASCONCELOS, I. Microbial conversion of glycerol to 1,3-Propanediol: Physiological Comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an Engineered Strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5) **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 72, p. 96–101, 2006.

HERETSCH, P.; THOMAS, F.; AURICH, A.; KRAUTSCHEID, H.; SICKER, D.; GIANNIS, A. Syntheses with a chiral building block from the citric acid cycle: (2R,3S)-isocitric acid by fermentation of sunflower oil. **Angewandte Chemie** (International edition in English). Vol. 47, p. 1958-60, 2008.

HOMANN, T.; TAG, C.; BIEBL, H.; DECKWER W.-D.; SCHINK, B. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Volume 33 Issue - 2 , p. 121 – 126, 1990.

INT - Instituto Nacional de Tecnologia. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/sobre/ciencia-e-tecnologia/unidades-de-pesquisa/instituto-nacional-de-tecnologia-int/>>. Acesso em 01/06/2013.

KAJIURA, H.; MORI, K.; TOBIMATSU, T.; TORAYA, T. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamindependent glycerol dehydratase. **Japanese Journal of Biological Chemistry**. Vol. 276, nº39, p.36514– 36519, 2001.

KERR, B.J.; DOZIER, W.A., III; BREGENDAHL, K. Nutritional value of crude glycerin for nonruminants; p. 6–18. **Proceedings of the 23rd Annual Carolina Swine Nutrition Conference**. Raleigh, NC; 2007.

LEE, P.C.; LEE, W.G.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Succinic acid production with reduced byproduct formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. **Biotechnology Bioengineering**. Vol. 72, p. 41-48, 2001.

LIMA, S.A. Desenvolvimento Rural Biodiesel: combustível sustentável? **Revista Brasileira de Agroecologia**. Vol. 2, p. 359-362, 2007.

LIN, R.; LIU, H.; HAO, J.; CHENG, K.; LIU, D. Enhancement of 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* with fumarate addition. **Biotechnology Letters**. Vol. 27, p.1755–1759, 2005.

MA, F; HANNA, M. A. Biodiesel production: A review. **Bioresource Technology**. Vol. 70, p. 1-15, 1999.

MA, Z.; RAO, Z. M.; XU, L. Y.; LIAO, X. R.; FANG, H. Y.; ZHUGE, B.; ZHUGE, J. Production of 1,3-propanediol from glycerol by engineered *Escherichia coli* using a novel coexpression vector. **African Journal of Biotechnology**. Vol.8, nº 20, p.5500–5505, 2009.

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 & Development**. Vol. 15, p.189–202, 2011.

MARIN, L. J.; CUNHA, A. A.; AQUINO, V. H. FIGUEIREDO, L. T. M. Desenvolvimento de uma metodologia de pcr semiquantitativa utilizando plasmídeo clonado com parte do gene gb de citomegalovírus descrição de métodos, técnicas e instrumentais. *Medicina, Ribeirão Preto*. Vol. 35, p.85-94, 2002.

MCCOY, M. Glycerin surplus. *Chemical & Engineering News*. Vol.84, n.6 p.7, 2006. 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**. Vol. 28, p.1755–1759, 2006.

PACHAURI, N., HE, B. Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production. A Survey of Current Research Activities American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE), Paper No. 06622, 2006. Disponível em: <<http://www.webpages.uidaho.edu/~bhe/pdfs/asabe066223.pdf>> Acesso em 25 fev. 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous. **Bioresource technology**. Vol. 82, p. 43-49, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology** Vol. 92 p.737-744. 2002.

PARENTE, E.J. Uma aventura tecnológica num país engraçado. *TECBio*. Fortaleza, CE. 2003. 68p. Disponível em: <www.iadb.org/intal/intalcdi/PE/2008/01430.pdf>. Acesso em 29 jan. 2010.

PINTO, Alice Regina et al. Manual de normalização de trabalhos acadêmicos. Viçosa, MG, 2011. 70 p. Disponível em:<<http://www.bbt.ufv.br/>>. Acesso em: 10 Out 2012.

PORTAL SAO FRANCISCO. BIODIESEL. Disponível em <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/biodiesel/biodiesel-5.php>>. Acesso em 01/06/2013.

RATHMANN, R.; BENEDETTI, O.; PLÁ, J.; PADULA, A. Biodiesel: uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira? **Seminário de Gestão de Negócios**, II. Curitiba – PR. Vol. 1, 2005.

RYMOWICZ, W.; CIBIS, E. Optimization of citric acid production from glucose syrup by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**. Vol. 9, p. 1-12, 2006.

RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A.; GLADKOWSKI, W. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. **Chemical Papers**. Vol. 62, p. 239-246, 2008.

SEIFERT, C.; BOWIEN, S.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of the coenzyme B12-dependent Glycerol Dehydratase of *Citrobacter freundii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 8, p. 2369-2378. 2001.

SHIBATA, N.; MASUDA, J.; MORIMOTO, Y.; YASUOKA, N.; TORAYA, T. Substrate-Induced Conformational Change of a Coenzyme B12-Dependent Enzyme: Crystal Structure of the Substrate-Free Form of Diol Dehydratase. **Biochemistry (Moscow)**. Vol. 41, nº42, p.12607–12617, 2002.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**. Vol. 27, p. 30-39, 2009.

SILVA, G. P. Bioconversão do glycerol em 1,3-propanodiol pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* GLC29. Rio Claro: UNESP. 2010. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Microbiologia Aplicada, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2010.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. A New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology and Biotechnology**. Vol. 44, p. 141-149, 2006.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 71, p.783–789, 2006.

TANG, X. M.; TAN, Y. S.; ZHU, H.; ZHAO, K.; SHEN, W. Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol by an Engineered Strain of *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**. Vol.75, nº 6, p.1628– 1634, 2009.

VOLLENWEIDER, S.; LACROIX, C. 3-Hydroxypropionaldehyde: Applications and Perspectives of Biotechnological Production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 64, p. 16-27, 2004.

WANG, Z.-X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**. Vol. 19 p. 201-223, 2001.

YANG, F.; HANNA, M. F.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**. Vol. 5, n. 13. 2012.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 18, p. 213–219, 2007.

ZHANG, X. M.; LI, Y.; ZHUGE, B.; TANG, X. M.; SHEN, W.; RAO, Z. M.; FANG, H. Y.; ZHUGE, J. Construction of a novel recombinant *Escherichia coli* strain capable of producing 1,3-propanediol and optimization of fermentation parameters by statistical design. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. Vol. 22, n° 9, p.945–952, 2006.