

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Vanessa Zimmer da Silva

**CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM DE *Klebsiella pneumoniae*
GENETICAMENTE MODIFICADA PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE
ETANOL PELO CULTIVO EM GLICEROL RESIDUAL**

Porto Alegre

2015

**CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM DE *Klebsiella pneumoniae*
GENETICAMENTE MODIFICADA PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE
ETANOL PELO CULTIVO EM GLICEROL RESIDUAL**

VANESSA ZIMMER DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Coorientadora: Dra. Cíntia de David

Porto Alegre

2015

CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM DE *Klebsiella pneumoniae* GENETICAMENTE MODIFICADA PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ETANOL PELO CULTIVO EM GLICEROL RESIDUAL

RESUMO¹

Autora: Vanessa Zimmer da Silva

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientadora: Cíntia de David

A utilização de resíduos industriais para obtenção de produtos de alto valor agregado por processos biotecnológicos é muito importante para evitar seus acúmulos e problemas ambientais. Alguns microrganismos já são utilizados para a conversão de glicerol residual em etanol, e a *Klebsiella pneumoniae* Blh-1 é um desses. Este trabalho teve como objetivo alterar geneticamente esta linhagem, criando a nova linhagem *Klebsiella pneumoniae* Kp17, para aumentar a expressão do gene AdhE, que codifica as enzimas responsáveis pela conversão de glicerol a etanol. Com isso também pretendeu-se avaliar comparativamente a fisiologia da Blh-1 e desta nova linhagem criada. Foi inserido um vetor auto-replicativo, com o gene AdhE, na linhagem selvagem por competência de células por CaCl₂. As linhagens, transformada e selvagem, foram crescidas em biorreatores em meios previamente estabelecidos (contendo 30 e 65 g.L⁻¹ de glicerol residual). Utilizando 30 g.L⁻¹ de glicerol foi possível produzir até 4,49 g.L⁻¹ de etanol e aumentar o rendimento da produção de 8,5 para 14,9 % de etanol a partir do glicerol consumido. Também foi reduzida a produção de 1,3 PD, um dos maiores produtos e competidor por cofatores na produção de etanol. Resultados provaram a eficiente transformação de *Klebsiella pneumoniae* Kp17 e que a otimização dos meios é muito importante para a fisiologia dos microrganismos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (45p.) Agosto, 2015.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT *Klebsiella pneumoniae* STRAIN TO INCREASE ETHANOL PRODUCTION ON RAW GLYCEROL CULTIVATION

ABSTRACT¹

Author: Vanessa Zimmer da Silva

Advisor: Marco Antônio Záchia Ayub

Co-Advisor: Cíntia da David

Use of industrial residues to produce added-value products is very important to avoid their accumulation and environmental problems. Some microorganisms are already used to convert raw glycerol to ethanol, and *Klebsiella pneumoniae* Blh-1 is one of them. This study aimed at genetic manipulating this strain, creating a new strain, *Klebsiella pneumoniae* Kp17, to enhance expression of AdhE gene that encodes enzymes to convert glycerol to ethanol. We also physiologically compared to wild and this genetic modified strain. The strain was transformed using an auto-replicative vector, containing the AdhE gene, by CaCl₂ competent cells protocol. The strains were grown in previously established media (containing 30 and 65 g.L⁻¹ of raw glycerol). Using 30 g.L⁻¹ of raw glycerol the new strain was capable to produce 4.49 g.L⁻¹ of ethanol and increase the yield from 8.5 to 14.9 % of ethanol by consumed glycerol. It was also possible to reduce the production of 1,3 PD, one of the major byproduct and competitor for co-factors in ethanol production. Results prove the efficient transformation of *Klebsiella pneumoniae* Kp17 and that the media optimization is important to improve the microorganism physiological response.

¹Master of Science Dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (45p.) August, 2015.

SUMÁRIO

RESUMO ¹	iii
ABSTRACT ¹	iv
RELAÇÃO DE TABELAS.....	vii
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	viii
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Biodiesel e Glicerol residual	4
2.2 Fisiologia e síntese de produtos por <i>Klebsiella sp.</i>	7
2.3 Acetaldeído-CoA/Álcool desidrogenase (AdhE)	11
2.4 Microrganismos Geneticamente Modificados para a produção de etanol e 1,3 propanodiol.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.2 Material utilizado	18
3.3 Construção do plasmídeo	19
3.3.1 Células competentes	21
3.3.2 Transformação.....	21
3.3.3 Análise da expressão de proteína por SDS-PAGE	22
3.4 Produção de Etanol	22
3.4.1 Inóculo.....	23
3.4.2 Experimentos em Agitador orbital	24
3.4.3 Experimentos em Biorreatores em Batelada.....	25
3.5 Análise de metabólitos	25
3.6 Estabilidade plasmidial.....	25

3.7	Tratamento estatístico	26
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	Construção do plasmídeo.....	27
4.1.1	Análise da expressão de proteína em gel SDS-PAGE	29
4.2	Produção de Etanol	29
4.2.1	Cultivos em Agitador Orbital.....	29
4.2.2	Cultivos nos Biorreatores em Batelada	32
4.3	Estabilidade plasmidial.....	40
5.	CONCLUSÕES	41
6.	PERSPECTIVAS	42
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	APÊNDICE 1.....	48

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1: Teste t comparativo da produção de etanol em agitador orbital entre as linhagens Kp17 e BLh-1 nos diferentes meios de cultivo. (significância>95 %)	30
TABELA 2: Teste t comparativo entre as linhagens BLh-1 e Kp17 para a produção de etanol nos cultivos em biorreator utilizando 30 e 65 g.L ⁻¹ de glicerol residual inicial. (significância>95 %)	32
TABELA 3: Comparação do rendimento da produção de etanol entre as linhagens BLh-1 e Kp17, em batelada em biorreator, nas diferentes concentrações iniciais de glicerol residual	33

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1: Utilizações do glicerol na indústria (Arruda et al. 2007).	5
FIGURA 2: Produtos de alto valor agregado resultantes da conversão biológica do glicerol residual.....	6
FIGURA 3: Representação do metabolismo do glicerol em anaerobiose. Enzimas estão indicadas nas caixas transparentes. Quadro no alto representa metabolismo aeróbio. (elipses representam produtos analisados.) (Celinska 2010).	8
FIGURA 4: Esquema das reações catalisadas por AdhE para geração de etanol (Nnyepi et al. 2007 adaptado).....	12
FIGURA 5: vetor de clonagem em <i>Escherichia coli</i> TOPO 2.1 linearizado.	20
FIGURA 6: (A) vetor TOPO 2.1 linearizado para inserção do fragmento de PCR; (B) vetor pTOPOBL17 com as enzimas de restrição (XhoI e BamHI) indicadas.	28
FIGURA 7: Perfil de migração dos fragmentos de DNA (A) resultantes da PCR do gene AdhE incluindo as regiões promotora e terminadora (2,9 kb); (B) resultantes da clivagem do vetor pTOPOBL17 (TOPO 2.1 (3,9 kb) + fragmento de interesse (2,9 kb)) com as enzimas BamHI e Xho.....	28
FIGURA 8: Perfil de migração de AdhE em SDS-PAGE, evidenciando expressão aumentada na linhagem transformada Kp17, com banda de tamanho aproximado de 96,6 kDa, em comparação a linhagem selvagem, BLh-1. (A e B representam duplicatas).....	29
FIGURA 9: Comparação da produção de etanol no cultivo em agitador orbital, em diferentes meios de cultivo com as linhagens <i>K. pneumoniae</i> Kp17 e <i>K. pneumoniae</i> BLh-1.....	31
FIGURA 10: Cultivo em batelada de <i>K. pneumoniae</i> BLh-1 com 65 g.L ⁻¹ de glicerol residual.....	34
FIGURA 11: Cultivo em batelada de <i>K. pneumoniae</i> Kp17 com 65 g.L ⁻¹ de glicerol residual.....	35
FIGURA 12: Cultivo em batelada de <i>K. pneumoniae</i> BLh-1 com 30 g.L ⁻¹ de glicerol residual.....	36
FIGURA 13: Cultivo em batelada de <i>K. pneumoniae</i> Kp17 com 30 g.L ⁻¹ de glicerol residual.....	37

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1,3 PD	1,3 propanodiol
1,3 PD DH	1,3 propanodiol desidrogenase
2,3 BD	2,3 butanodiol
3-HPA	3-hidroxi propionaldeído
ADH	álcool desidrogenase
AdhE	acetaldeído-CoA/Álcool desidrogenase
ALDH	acetaldeído desidrogenase
ATP	adenosina trifosfato
Ca	cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CO ₂	dióxido de carbono
CoA	coenzima A
CoCl ₂ .6H ₂ O	cloreto de cobalto hexaidratado
CuSO ₄ .5H ₂ O	sulfato de cobre pentaidratado
DHA	diidroxiacetona
DHAK	diidroxiacetona quinase
DHAP	diidroxiacetona fosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleosídeos trifosfato
Fe ²⁺	íon ferro
FeSO ₄ .7H ₂ O	sulfato de ferro heptaidratado
g.L ⁻¹	gramas por litro
GDH	glicerol desidrogenase
GDHt	glicerol desidratase-coenzima B12 dependente
h	horas
H ₂	hidrogênio (forma estável)
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
H ₃ BO ₃	ácido bórico
HCl	ácido clorídrico
HPLC	cromatografia de alta eficiência
K	potássio
K ₂ HPO ₄	fosfato de potássio dibásico
kb	kilobases
kg	quilogramas
L	litros
LB	meio Luria Bertani
m ³	metros cúbicos
min	minutos

Mg	magnésio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
mL.L ⁻¹	mililitro por litro
mL.min ⁻¹	mililitro por minuto
mM	mili molar
MnCl ₂ .4H ₂ O	cloreto de manganês tetraidratado
Na	sódio
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	molibdato de sódio diidratado
NaCl	cloreto de sódio
NAD	dinucleotídeo de adenina nicotinamida
NADH	NAD na forma reduzida
NaOH	hidróxido de sódio
NiCl ₂ .6H ₂ O	cloreto de níquel hexaidratado
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amônio
nm	nanômetros
MGM	microrganismos geneticamente modificados
P	fósforo
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDH	piruvato desidrogenase
PFL	piruvato formato liase
pH	potencial hidrogeniônico
PEP	fosfoenolpiruvato
rpm	rotações por minuto (velocidade)
S	enxofre
s	segundos
U	unidade enzimática
ZnSO ₄ .7H ₂ O	sulfato de zinco heptaidratado
°C	graus Celsius (temperatura)
xg	aceleração da gravidade (velocidade)
µg.mL ⁻¹	microgramas por mililitro
µm	micrômetros
µM	micromolar
µL	microlitro
ng.µL ⁻¹	nanogramas por microlitro

1. INTRODUÇÃO

O crescente consumo de combustíveis fósseis e o atual apelo ambiental por alternativas cada vez mais limpas têm estimulado a pesquisa e produção de biocombustíveis. Um destes é o biodiesel que, através da legislação, vem ganhando destaque e espaço, tendo sua adição ao diesel aumentada gradativamente.

Porém, a cada tonelada de biodiesel produzido, cerca de 100 kg de glicerol residual é gerado, podendo acarretar em altos índices de contaminação ambiental se este for descartado inadequadamente. Dessa forma, novas propostas estão sendo estudadas no intuito de utilizar este resíduo ainda no seu estado bruto para a formação de produtos com alto valor agregado, através da sua conversão biológica. Como sua purificação é dispendiosa, a incorporação desta etapa não é apontada como uma alternativa rentável, encarecendo o processo como um todo. No entanto, o cultivo de microrganismos conhecidos, com destaque para a *Klebsiella pneumoniae*, utilizando este glicerol como fonte de carbono pode gerar produtos de alto valor agregado, como: 1,3-propanodiol (1,3-PD), 2,3-butanodiol (2,3-BD), etanol e ácidos orgânicos.

A produção de etanol pelo cultivo de microrganismos em glicerol residual torna-se atrativa por também ser um biocombustível e pela

possibilidade da sua utilização na transesterificação do biodiesel, voltando então para a cadeia de produção do mesmo.

Com os avanços dos estudos nesta área, começaram a ser percebidas limitações pré-existentes nos microrganismos utilizados para a conversão a produtos de alto valor agregado. Visando suprir estas limitações e para que haja um maior aproveitamento do glicerol residual e melhor conversão deste nos produtos de interesse, microrganismos geneticamente modificados (MGM) passaram a ser incorporados nestes estudos.

MGM são utilizados há vários anos, com o objetivo principal de suprir necessidades científico-sociais. Esta técnica utiliza-se de modificações no código genético dos microrganismos, visando alterar a produção e a expressão de proteínas e enzimas, para otimizar processos pelo aprimoramento destes microrganismos para determinadas funções.

O gene AdhE é o principal responsável pela produção de etanol no metabolismo anaeróbio de *K. pneumoniae*. Assim, o aumento da expressão deste gene e, conseqüentemente o aumento da produção das enzimas codificadas pelo mesmo, acetaldeído desidrogenase e álcool desidrogenase, poderiam aumentar a conversão de glicerol residual em etanol.

Assim, unindo conhecimentos sobre glicerol residual, MGM e a otimização de cultivo, este trabalho teve como objetivo principal alterar geneticamente o microrganismo *Klebsiella pneumoniae* BLh-1, pelo aumento da expressão do gene AdhE visando aumentar a produção de etanol pelo cultivo em glicerol residual e analisar seus efeitos.

Os objetivos específicos foram:

- Desenhar oligonucleotídeos (*primers*) para amplificar o gene que codifica a enzima AdhE, a partir do molde *K. pneumoniae* BLh-1;
- Clonar o gene em um vetor auto-replicativo a fim de aumentar o número de cópias e sua expressão no microrganismo em questão;
- Avaliar comparativamente a fisiologia do microrganismo selvagem e o transformado, de acordo com a síntese e o rendimento na produção de etanol;
- Estudar a rota metabólica e cultivos com as bactérias recombinante e selvagem em biorreatores, visando escalonar processos, e otimizar a conversão do glicerol a etanol.

Assim, pretende-se agregar valor ao processo de síntese de biodiesel através da recuperação do glicerol, além de contribuir para processos ambientalmente mais limpos e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para esta conversão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel e Glicerol residual

O Biodiesel é um biocombustível obtido através da transesterificação de óleos, vegetal ou animal, por um álcool, metanol ou etanol, na presença de um catalisador ácido ou básico. Esse desponta como uma alternativa ao diesel oriundo do petróleo. Está longe de ser um substituto completo aos combustíveis fósseis, mas auxilia na transição da total dependência da sociedade baseada no petróleo para uma alternativa mais sustentável (Nogueira 2011). Esta substituição deve-se principalmente à possibilidade de uso em motores programados para uso de diesel oriundo de petróleo, não apresentando necessidade de modificações, nem impactando negativamente no desempenho (Johnson e Taconi 2007).

O Brasil é um grande produtor de biodiesel, com capacidade de produção de aproximadamente 7,7 milhões de metros cúbicos por ano, tendo quase duplicado sua capacidade anual desde o ano de 2009 (MME 2015). O Rio Grande do Sul é o estado que apresenta maior produção, no entanto, a região Sul é a segunda maior produtora do país, com 35 % da produção nacional (ANP 2015; MME 2015). Porém toda esta produção acarreta também na geração de resíduos. Cada 10 m³ produzidos de biodiesel gera cerca de 1 m³ de glicerol residual, nem sempre destinados adequadamente, podendo

acarretar graves problemas ambientais (Johnson e Taconi 2007; Rivaldi et al. 2007; Yazdani e Gonzalez 2007; Clomburg e Gonzalez 2013). As características físicas, químicas e nutricionais, correspondentes à qualidade e composição, principalmente de contaminantes, dependem do tipo de ácido graxo e do tipo de catálise utilizados na produção do biodiesel. (Rivaldi et al. 2007). Composição esta que abrange impurezas como umidade, cinzas, sabão, cloretos, metanol e pequenas concentrações de metais, como Na, Ca, K, Mg, P e S (Ayoub e Abdullah 2012).

Algumas estratégias são utilizadas para destinação do glicerol residual, uma delas inclui a conversão química ou biológica em produtos de alto valor agregado, outra corresponde ao tratamento do resíduo e utilização na alimentação animal (Leoneti et al. 2012). O glicerol pode ainda ser altamente purificado para utilização na indústria em diversos setores (FIGURA 1), porém há custos elevados neste processo (Rivaldi et al. 2007; Mota et al. 2009).

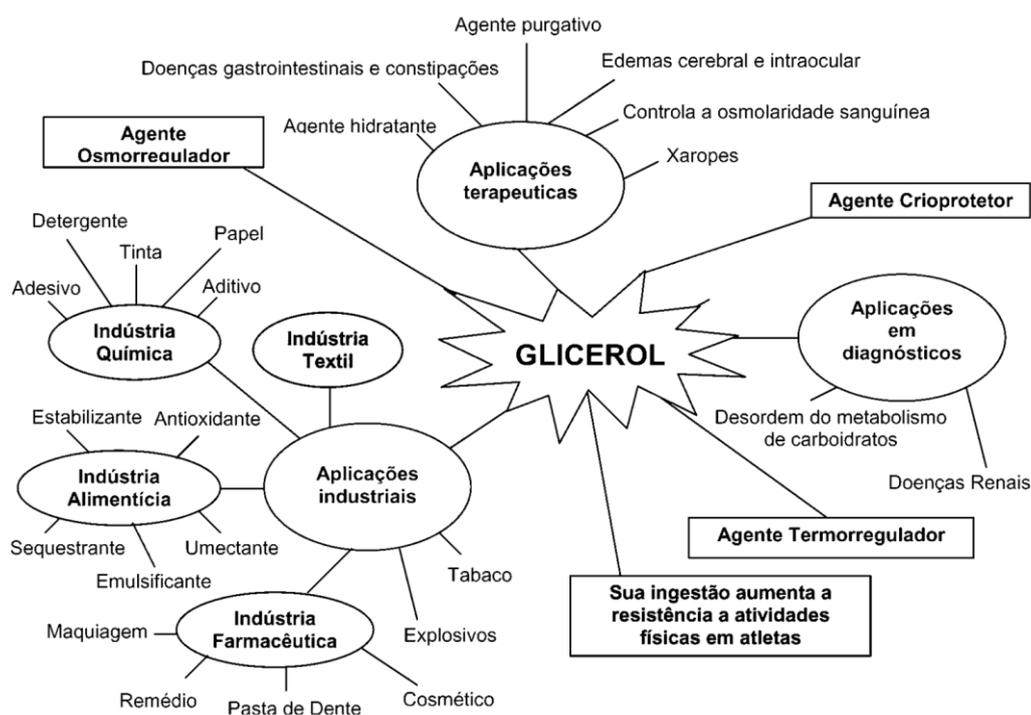


FIGURA 1: Utilizações do glicerol na indústria (Arruda et al. 2007).

A conversão biológica (FIGURA 2), no entanto, não obriga a utilização de nenhum processo de purificação e por isso vem sendo amplamente estudada principalmente para o uso de glicerol pelos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Bacillus*, principalmente para a produção de etanol e 1,3 propanodiol (Johnson e Taconi 2007; Yazdani e Gonzalez 2007). A utilização anaeróbia do glicerol para síntese de produtos por estes microrganismos apresenta um custo 40 % menor quando comparada a aeróbica, devido aos custos operacionais e energéticos necessários para fornecer e controlar a aeração (Johnson e Taconi 2007; Yazdani e Gonzalez 2007).

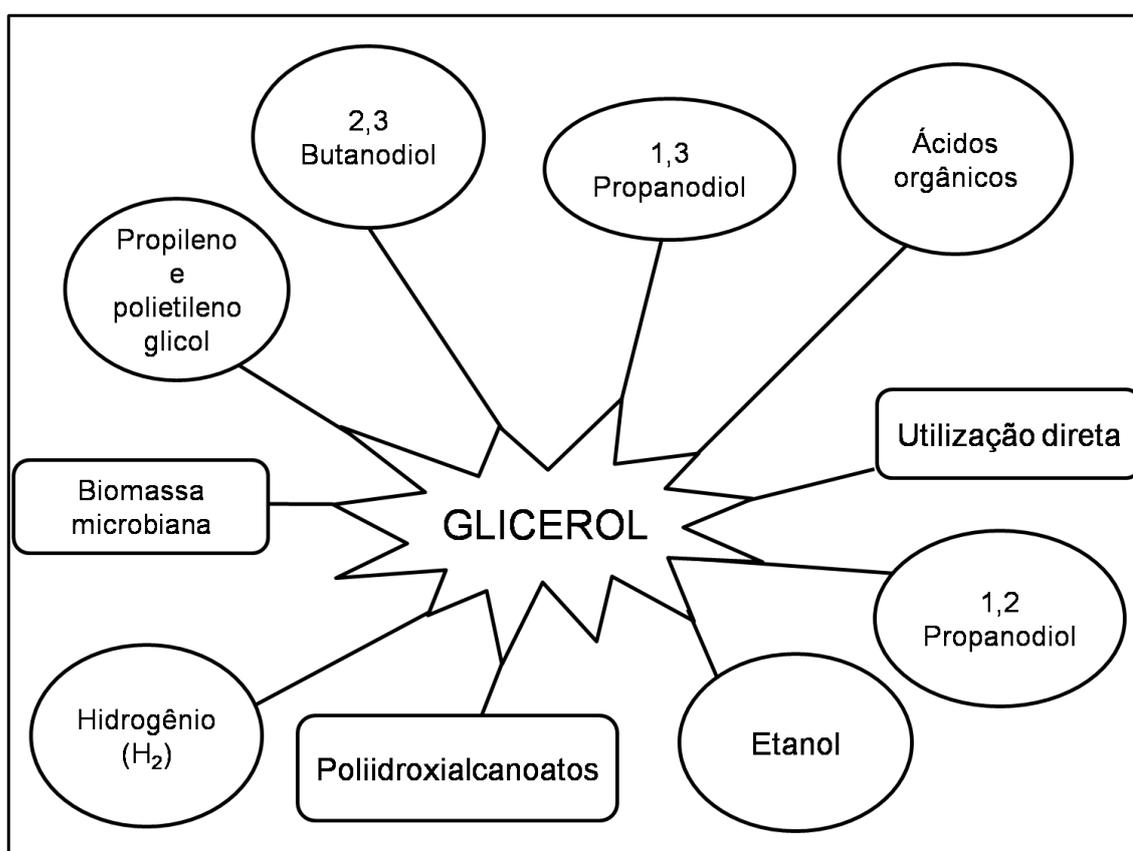


FIGURA 2: Produtos de alto valor agregado resultantes da conversão biológica do glicerol residual.

O glicerol desponta, portanto, como uma importante fonte de carbono em processos microbianos para obtenção de produtos de alto valor agregado (Rivaldi et al. 2007). Isto se deve à sua utilização sem nenhuma purificação e seu baixo custo quando comparado às tradicionais fontes de carbono, como açúcares e o glicerol puro e seu poder de formação de produtos de grande importância biotecnológica e industrial, como H₂, 1,3 PD e etanol (Rossi et al. 2011; Rossi et al. 2012; Rossi et al. 2013b; Rossi et al. 2013a).

A melhor maneira de aproveitar este resíduo pela conversão biológica seria sem a utilização de qualquer tipo de suplementação, tanto para diminuição de custos como para melhor recuperação de produtos. Porém, ainda se faz necessário o uso de, por exemplo, extrato de levedura, que compreende aminoácidos e vitaminas ainda não identificados, para total metabolização do glicerol (Ito et al. 2005).

Utilizações deste resíduo, principalmente sem qualquer tipo de tratamento, deverão continuar sendo estudadas para viabilizar e auxiliar no custeio da indústria do biodiesel, tornando-o competitivo no mercado de biocombustíveis (Rivaldi et al. 2007; Ayoub e Abdullah 2012).

2.2 Fisiologia e síntese de produtos por *Klebsiella sp*

A capacidade de metabolizar glicerol a subprodutos com alto valor agregado, como única fonte de carbono, em condições anaeróbias é uma condição para poucos microrganismos. Este metabolismo usualmente se dá por duas vias, oxidativa e redutiva (FIGURA 3). Ambas as vias envolvem uma série de enzimas e formam diversos intermediários e subprodutos que podem interagir como indutores, repressores e como controle alostérico do

Na via oxidativa, o glicerol é oxidado a diidroxiacetona (DHA) pela enzima glicerol desidrogenase dependente de NAD^+ (GDH), que é fosforilada a diidroxiacetona-fosfato (DHAP) pela diidroxiacetona kinase (DHAK) sendo então defosforilada a fosfoenolpiruvato (PEP) e, posteriormente a piruvato, de onde segue para ser metabolizado a seus subprodutos. O metabolismo do piruvato resulta em CO_2 , H^+ , acetato, butirato, lactato, etanol, butanol e 2,3 butanodiol (Celinska 2010; Menzel et al. 1998).

A partir da via oxidativa é que a produção de 1,3 PD é possível, visto que é onde ocorre a regeneração de NADH_2 , o que leva também a formação de seus subprodutos, que competem por carbono e pelo mesmo NADH_2 formado, além de apresentarem maior toxicidade (Celinska 2010).

Sob certas condições de cultivo podem ocorrer flutuações e/ou oscilações metabólicas, geralmente causadas por grandes perturbações na concentração de substrato, no pH e na taxa de diluição. As oscilações ocorrem em fermentações contínuas em *Klebsiella pneumoniae*, onde a concentração de biomassa, o crescimento específico e os subprodutos dissolvidos da fermentação oscilam e/ou flutuam, podendo demonstrar variações sutis ou variando entre concentrações mínimas e máximas. Sendo o metabolismo do piruvato o principal afetado pelas oscilações do metabolismo anaeróbio, seus subprodutos apresentam diferenças significativas em cultivos estáveis e oscilatórios (Menzel et al. 1996; Zeng et al. 1996; Ahrens et al. 1998; Menzel et al. 1998).

As vias podem sofrer desvios conforme disponibilidade de substrato devido à demanda energética. O excesso de glicerol no meio de cultivo

favorece a formação de produtos de menor toxicidade que fornecem quantidades energéticas menores, porém suficientes. Há um aumento da produção dos ácidos orgânicos (ácido acético e ácido láctico) e 1,3 PD, evitando assim a formação de etanol (aumento da enzima PDH e diminuição da enzima PFL – catalisa o fluxo do piruvato para acetil-coA). Porém, quando há limitação de glicerol, a produção energética passa a ser prioridade (diminui PDH e aumenta PFL) e há aumento da eficiência na formação de ATP e aumento da produção de etanol, por ser uma via energética mais eficiente (Zeng et al. 1993; Menzel et al. 1998; Metsoviti et al. 2012; Rossi et al. 2013b).

A razão $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ e a concentração de $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2$ também favorecem desvios de rota metabólica, pois a regeneração de NADH_2 constitui um problema para células em crescimento anaeróbio em glicerol. A baixa concentração e a baixa razão são favoráveis à produção de 1,3 PD (Menzel et al. 1998). Em *Klebsiella oxytoca* um sistema heterólogo de regeneração de NADH alterou a produção de subprodutos NADH-dependentes em diferentes níveis, sendo a produção de etanol a mais favorecida, demonstrando maior sensibilidade e flexibilidade ao fluxo de NADH (Zhang et al. 2009).

1,3 PD é o principal produto do metabolismo do glicerol, sendo *Klebsiella pneumoniae* o microrganismo mais amplamente estudado por sua alta produção e seu bom rendimento, que depende fortemente da linhagem utilizada (Celinska 2010; Rossi et al. 2013b). Sua produção compete principalmente com a produção de etanol, tanto na requisição de carbono quanto na regeneração de NADH_2 (Zhang et al. 2009; Rossi et al. 2013b). Além disto, diversos fatores podem influenciar na produção de etanol, como por

exemplo: aeração ou não do cultivo (favorecida em anaerobiose), concentração de substrato (favorecida em limitação de glicerol) e salinidade do meio (podendo inibir a produção) (Ito et al. 2005; Rossi et al 2013b).

Produções de etanol em glicerol residual já foram descritas como: 12,3 g.L⁻¹ em batelada, 19,2 g.L⁻¹ em batelada alimentada por *K. pneumoniae* BLh-1 (Rossi et al. 2013b); 31,1 g.L⁻¹ em batelada alimentada por *K. pneumoniae* geneticamente modificada através de radiação (Oh et al. 2013), porém há poucos os trabalhos que apresentam modificações na produção de etanol em *K. pneumoniae* pela inserção de plasmídeo. Esta produção por glicerol residual segue conquistando espaço por ser menos custosa que o valor comercial do etanol combustível, além de ser mais rentável do que a produção por resíduos de cana de açúcar (Posada e Cardona 2010). Porém, para que o processo de recuperação do etanol do cultivo, através de destilação, seja economicamente viável, sua produção deveria alcançar níveis próximos a 40 g.L⁻¹ (Oh et al. 2013).

Por mais que tenha avançado o conhecimento a respeito das vias fermentativas que levam à produção de etanol, ainda há lacunas a respeito da interação entre estas vias e o conhecimento segue prejudicado devido à possibilidade de uma enzima ser codificada por mais de um gene, o que muitas vezes impede o reconhecimento correto dos genes responsáveis para dadas reações (Olson et al. 2015).

2.3 Acetaldeído-CoA/Álcool desidrogenase (AdhE)

A AdhE é uma enzima bifuncional que catalisa a produção de etanol a partir de acetil-CoA por duas reações NADH dependentes (FIGURA 4)

através de dois domínios, o acetaldeído desidrogenase (ALDH – EC 1.2.1.10) e o álcool desidrogenase (ADH – EC 1.1.1.1). AdhE codifica uma proteína de 886 aminoácidos e massa molecular aproximada de 96,6 kDa (Kessler et al. 1992; Nair et al. 1994; Koo et al. 2005; Peng et al. 2008; Tolonen et al. 2015; Zheng et al. 2015), apresentando um papel importante na produção de etanol, e o faz com auxílio de co-fatores, sendo eles Fe^{2+} , NAD e CoA (Kessler et al. 1992; Oh et al. 2013; Olson et al. 2015). Estruturalmente a enzima apresenta dois fortes sítios de ligação: de NADH e entre os dois domínios ALDH e ADH, em um nucleotídeo de ligação da sequência GYGXXG. Esta sequência aparece conservada em diversas AdhEs e parece ter importância para seu reconhecimento (Zheng et al. 2015).

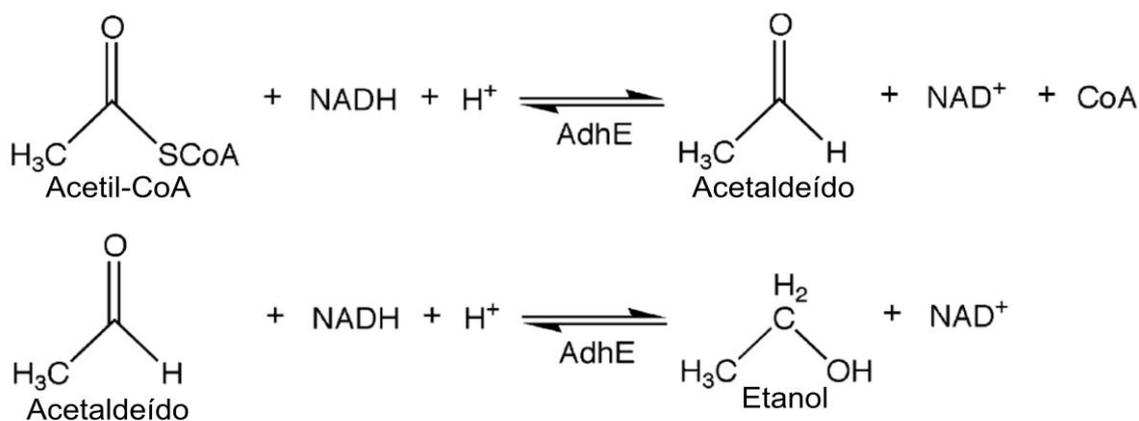


FIGURA 4: Esquema das reações catalisadas por AdhE para geração de etanol (Nnyepi et al. 2007 adaptado).

Estudos apontam uma alta evolução da enzima, que aparentemente resulta da fusão de uma acetaldeído oxidoredutase com uma etanol oxidoredutase, que provavelmente tenha acelerado a redução de acetil-CoA a etanol pela aproximação dos dois sítios ativos, resultando na diminuição do

intermediário acetaldeído, tóxico para a célula. A alta concentração de AdhE também aparece como tóxica, porém ainda não está claro se o que é tóxico é sua estrutura ou sua atividade catalítica (Membrillo-Hernandez et al. 2000).

A superexpressão da AdhE desponta como uma das alternativas para o aumento da produção de etanol. Essa foi testada em uma linhagem de *Escherichia coli* com outras alterações genéticas concomitantes. Após alguns testes foi constatado o aumento de 70 % da produção de etanol em condições microaeróbicas, alcançando produção de 46 g.L⁻¹ em batelada alimentada. Esta alteração aumentou a produção e também o rendimento por direcionar o fluxo de carbono para a via do etanol, diminuindo o fluxo da produção de subprodutos, e por ter sido realizada com seus promotores nativos ainda dispensou o uso de indutores (Wong et al. 2014; Olson et al. 2015).

Mutações não sinônimas em AdhE encontradas em locais distantes do sítio ativo e da ligação dos co-fatores foram estudadas em *Clostridium thermocellum*. Estas pareceram alterar o metabolismo, e com isso a tolerância a etanol pela linhagem mutante (Brown et al. 2011). Mesmo com o aumento da expressão da enzima e aumento da produção de etanol, ainda esbarra-se na intolerância das linhagens às altas concentrações de etanol.

2.4 Microrganismos Geneticamente Modificados para a produção de etanol e 1,3 propanodiol

O aumento do interesse em soluções biotecnológicas com o objetivo de suprir demandas de combustíveis e químicos a partir de fontes renováveis tem causado aumento das pesquisas que focam no desenvolvimento de sistemas microbianos para produção de bioprodutos. Com isso há aumento do

desenvolvimento de processos sustentáveis na produção de combustíveis e químicos diversos (Fávaro 2012).

Microrganismos apresentam limitações na conversão do substrato em produtos e até mesmo no crescimento. Assim, os avanços em engenharia metabólica têm possibilitado a manipulação genética de diversos microrganismos, incluindo termófilos, tornando-se uma alternativa de enriquecimento dos bioprocessos tanto por favorecer o crescimento quanto por melhorar a produção de um determinado produto (Olson et al. 2015).

Com a eliminação de produtos tóxicos, inativando vias chamadas “improdutivas”, é possível aumentar a síntese de produtos de interesse e seu rendimento pelo metabolismo microbiano. São necessários estudos prévios para que possa ser ajustada a formação de subprodutos a fim de aumentar o metabólito de interesse sem comprometer esse balanço redox (Celinska 2010). Essa simplificação de vias e eliminação de subprodutos também pode contribuir para a redução de custos com a recuperação de metabólitos de interesse (Yang et al. 2007).

Alterações vêm sendo feitas para a melhor conversão de glicerol residual em produtos de alto valor agregado, como etanol e 1,3 PD. Entre estas alterações podemos citar: eliminações de parte da via metabólica, introdução de sistemas de regeneração de co-fatores e superexpressão dos genes dos metabólitos de interesse.

Em *Klebsiella oxytoca* foi testada a deleção do gene *ldhA*, codificador da enzima lactato desidrogenase (LDH), que converte piruvato em ácido láctico. Com esta deleção foi possível aumentar a síntese de 1,3 PD e

2,3 BD em relação à linhagem selvagem (Yang et al. 2007). A deleção do gene *ldhA* é comum para o aumento na produção de outros metabólitos para produção de 1,3 PD, e de etanol, mas, por ser um subproduto de baixa toxicidade, não era destaque para a eliminação da via e passou a ser alvo de engenharia genética na última década. Em *K. pneumoniae* a deleção deste gene possibilitou o aumento de 32 % na produção de 1,3 PD (Zhang et al. 2006). Em *Clostridium thermocellum* a deleção de *ldhA* foi responsável por um aumento de 30 % na produção de etanol (Biswas et al. 2014) e, em outro estudo, aumentou 1,5 vezes a concentração de etanol para a produção por *Escherichia coli* (Nikel et al. 2010).

Outro estudo envolvendo *K. oxytoca* utilizou-se da deleção tripla dos genes *adhE*, *ldhA* e *ackA-pta* para o aumento da produção de 2,3 BD. Esta deleção eliminou vias de utilização de NADH, que competem diretamente com a síntese de 2,3 BD e possibilitou o aumento do rendimento da produção deste metabólito em aproximadamente 65 %, aproximando-se do seu rendimento teórico máximo (Jantama et al. 2015).

Porém, muitas vezes não há o aumento na produção como esperado, onde a manipulação genética é feita de maneira equivocada, causando desequilíbrio redox com a eliminação de uma das vias fundamentais. Um exemplo disto é quando, para aumento da produção de 1,3 PD, a via de produção de etanol é interrompida. Por ser uma das maiores responsáveis pela regeneração de NADH, causa diminuição de crescimento de biomassa pelo forte efeito inibitório da alta razão de NADH/NAD⁺ (Zhang et al. 2006; Jantama et al. 2015). Já em processos envolvendo esta mesma via, mas com a

superexpressão da enzima bifuncional AdhE foram obtidos resultados satisfatórios e não inibitórios, aumentando de 10 % a 40 % a produção de etanol em termófilos como *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Olson et al. 2015) e 1,4 vezes por uma expressão heteróloga do gene AdhE de *Leuconostoc mesenteroides* em *Escherichia coli* (Nikel et al. 2010).

Em virtude da alta competição intracelular por co-fatores na produção dos principais metabólitos (ácido láctico, etanol e 1,3 PD), há tentativa de introduzir um sistema de regeneração destes co-fatores. Com a regeneração de NADH foi possível aumentar 42 % da síntese de etanol e 17 % de 1,3 PD em *K. oxytoca* (Zhang et al. 2009), sendo a via de produção de etanol a mais sensível a variação deste co-fator.

Além dos empecilhos resolvidos com estudo das vias, também há problemas na relação custo-benefício. A inserção de vetores com a alteração metabólica desejada traz consigo o uso de indutores e de marcas de seleção como antibióticos. Porém, apesar de ser necessário para a seleção de transformantes, o uso de antibióticos não garantem a estabilidade do plasmídeo na linhagem transformada. Alternativas a isso seriam, por exemplo, deleções duplas no metabolismo do glicerol, onde foi percebida a manutenção de mais de 90 %, sem utilização de antibióticos nem decréscimo no desempenho do processo (Wong et al. 2014).

Percebe-se então que a otimização de vias metabólicas ou de um fenótipo é uma tarefa árdua, geralmente acompanhada de muitos ajustes (deleção ou superexpressão de vias biossintéticas, engenharia de proteínas para aumento da atividade, remoção de mecanismos regulatórios que impedem

o fluxo metabólico desejado, entre outros), de modo a maximizar a produção de um composto e diminuir o fluxo de carbono para vias indesejadas (Fávaro 2012).

A manipulação na síntese de metabólitos traz a possibilidade de valorizar processos biotecnológicos com o uso de resíduos agroindustriais e sua conversão em produtos de alto valor agregado, impedindo ou diminuindo a acumulação destes resíduos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia (BiotechLab), do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.2 Material utilizado

Foram utilizadas as linhagens *Escherichia coli* TOP 10 e *Klebsiella pneumoniae* BLh-1, isolada e caracterizada anteriormente (Rossi et al. 2012). A linhagem *E. coli* TOP 10 foi utilizada para construção do plasmídeo pTOPOBL17, e a linhagem *K. pneumoniae* BLh-1 serviu como molde do gene AdhE e para criação da linhagem transformada *Klebsiella pneumoniae* Kp17, pela inserção do plasmídeo pTOPOBL17.

O glicerol residual utilizado como fonte de carbono foi fornecido por uma empresa local de produção de biodiesel (Canoas, Brasil), sendo utilizado o mesmo lote para todos os experimentos. O biodiesel foi obtido por transesterificação de óleo de soja, usando metanol. A composição do glicerol residual foi determinada como sendo: 82,97 % de glicerol, 5,66 % de cinzas, 5,72 % de NaCl, 10,62 % de umidade e pH 5,39 (laudo no Anexo 1).

3.3 Construção do plasmídeo

Para as transformações e manipulação do plasmídeo foi utilizado o meio Luria Bertani, sendo composto de 10 g.L⁻¹ triptona, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ NaCl, e pH 7.0 e adicionado 15 g.L⁻¹ ágar bacteriológico, quando utilizado meio sólido e canamicina 50 µg.mL⁻¹ para o cultivo da linhagem transformada, Kp17. O cultivo foi incubado a 37 °C e agitação de 180 rpm em agitador orbital, sendo melhor detalhado nas metodologias seguintes (itens 3.3.1 e 3.3.2).

Os iniciadores foram desenhados utilizando como base a linhagem depositada no GenBank como MGH 78578, com o número de registro NC_009648.1, devido ao não seqüenciamento da linhagem utilizada neste estudo, e a linhagem MGH 78578 ser a linhagem sequenciada mais semelhante em estudos realizados anteriormente pelo grupo. O *primers* obtidos para amplificar a região de 2,9 kb, abrangendo gene AdhE (2,6 kb) juntamente com seu promotor e terminador, do DNA cromossomal de *K. pneumoniae* BLh-1 foram: AdhE F1 5'-ACATGGATCCTTACATGCAAGCTGT-3' e AdhE R1 5'-AATACTCGAAAACCAAGGTACAAA-3'.

Na reação de PCR foram utilizados: tampão de reação 1 x, 2,5 U Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, . A linhagem molde teve seu DNA extraído pela utilização do Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega), quantificado por espectrofotômetro (260 nm), sendo utilizado 100 ng na reação de PCR. A reação de PCR foi realizada em termociclador (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler) como segue: desnaturação inicial a 94 °C por

3 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento dos iniciadores a 49 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 3 min; e extensão final a 72 °C por 5 min.

A região amplificada foi visualizada em gel de agarose 1 %, e foi inserida no vetor de clonagem (FIGURA 5) de *E. coli* TOPO 2.1 TA (Invitrogen by Life Technologies), seguindo as normas do fabricante, sendo utilizados 0,5 µL de vetor e 1 µL de produto de PCR na reação de ligação. A construção correta do plasmídeo foi comprovada por reações de clivagem com as enzimas BamHI e XhoI que flanqueiam a região de clonagem e através de seqüenciamento (realizado pela ACTGene Análises Moleculares).

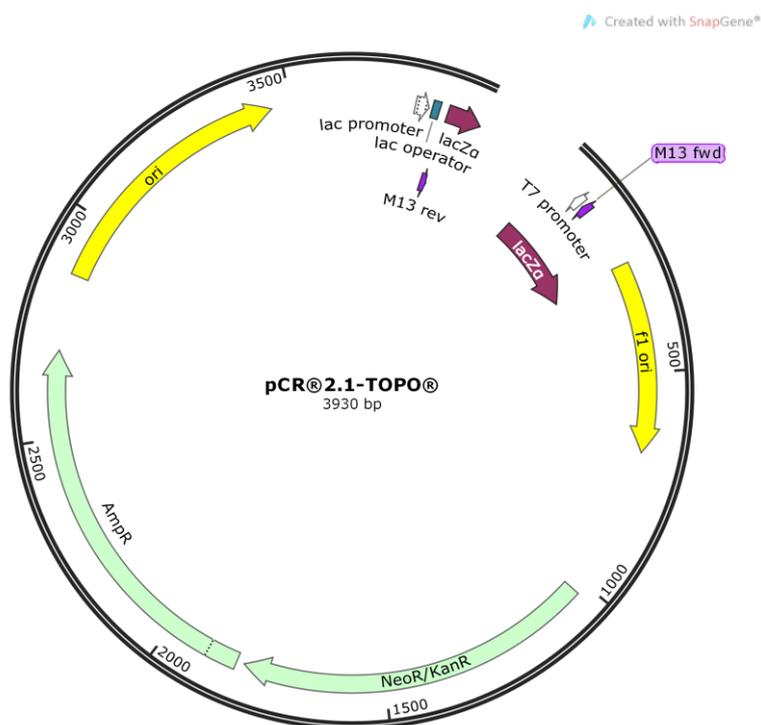


FIGURA 5: vetor de clonagem em *Escherichia coli* TOPO 2.1 linearizado.

3.3.1 Células competentes

Ambas as linhagens *Escherichia coli* TOP10 (para construção do plasmídeo) e *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 (para criação da linhagem transformada) foram tornadas competentes para transformação por CaCl₂. Foram inoculados 100 µL da cultura estoque, armazenada em 20 % de glicerol, mantida a -80 °C em ultrafreezer, em 25 mL de meio LB sem antibiótico sendo incubada a 37 °C, com agitação a 180 rpm, durante 12 - 16 h. Foram transferidos 250 µL do pré-inóculo para 25 mL de meio LB e incubados a 37 °C, com agitação a 180 rpm até que o valor de absorbância a 600 nm estivesse próximo de 0,6. Atingido este valor de absorbância a cultura foi arrefecida em gelo durante 20 min. Para o processo de competência as células foram mantidas em gelo e todos os reagentes utilizados foram arrefecidos. As células foram recolhidas por centrifugação a 5000 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuscitado em 10 mL de CaCl₂ 0,1 M. Esta suspensão celular foi incubada em gelo durante 20 min e posteriormente centrifugada a 5000 xg por 10 min a 4 °C. As células foram ressuscitadas em 1 mL de CaCl₂ 0,1 M, e então divididas por alíquotas de 100 µL em tubos de 1,5 mL (Green e Sambrook 2012).

3.3.2 Transformação

A transformação das células foi efetuada utilizando o método de choque térmico. Foram adicionados 4 µL de DNA plasmidial a 100 µL de células competentes, tanto em *E. coli* quanto em *K. pneumoniae*. Esta mistura foi incubada em gelo durante 30 min. Em seguida foi provocado um choque térmico transferindo as células rapidamente para um banho a 42 °C durante

1 min e 30 s, e novamente em gelo, onde foram mantidas por 2 min. Posteriormente foi adicionado 250 μL de solução SOC (glicose 1 M, MgCl_2 0,5 M e MgSO_4 0,5 M) e incubados a 37 °C durante 1 h e 30 min com agitação a 180 rpm. Alíquotas de 100 μL de células foram semeadas em placas com meio LB sólido suplementado com canamicina (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubadas a 37 °C durante 12 – 16 h (Green e Sambrook 2012).

3.3.3 Análise da expressão de proteína por SDS-PAGE

A fim de realizar a comparação da expressão da enzima AdhE entre as linhagens selvagem e transformada foi realizado a quantificação de gel de proteína por SDS-PAGE. As linhagens foram crescidas por 24 h em meio otimizado com 65 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicerol (descrito em 3.3.2) em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de volume de trabalho.

De cada cultivo foram retirados 2 mL de amostra, que foram centrifugados a 5000 \times g por 5 min a 4 °C e ressuspensos em 100 μL de tampão PBS. Destes, foram utilizados 4 μL com 5 μL de tampão de amostra e completados para um volume de 25 μL com água estéril. Esta solução foi submetida a 100 °C por 10 min para desnaturação e liberação de enzimas intracelulares.

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida com concentração de 12 % e, posteriormente, corado com “*Comassie Blue*” para possibilitar sua visualização (Green e Sambrook 2012).

3.4 Produção de Etanol

Os experimentos foram conduzidos sob anaerobiose a 37 °C com agitação de 150 rpm, tanto em agitador orbital, quanto em biorreator, utilizando

meios complexos e com diferentes concentrações de glicerol, de acordo com cada teste. Visando a otimização do meio de cultivo, foram realizados testes em agitador orbital com frascos Erlenmeyer de 125 mL (50 mL de meio de cultivo) com rolhas de silicone perfuradas que permitem saída de CO₂. Após a definição dos meios, os cultivos foram conduzidos em biorreator submerso de 2 L (1,5 L de meio de cultivo), marca Bioestat Braun (Alemanha). Todos os experimentos foram realizados em duplicata, com as linhagens selvagem e transformada, para fins de comparação.

As amostras dos cultivos foram preparadas por centrifugação a 3000 × g por 15 min para precipitar as células. O sobrenadante foi filtrado com membranas de acetato de celulose (poro de 0.22 µm) para análise. O precipitado de células foi utilizado para determinar a concentração de biomassa no cultivo através de medição gravimétrica expressa em peso seco de células, sendo mantido em estufa a 75 °C por até 5 (cinco) dias.

3.4.1 Inóculo

O inóculo foi padronizado para todos os experimentos, onde o microrganismo foi previamente crescido em frasco Erlenmeyer de 250 mL, sendo inoculados 100 µL da cultura mantida em glicerol 20 % (-80 °C) em 50 mL do mesmo meio do experimento (itens 3.4.2 e 3.4.3), mantido a 37 °C e 180 rpm por 16 –18 h. Uma alíquota (5 %) desta cultura foi transferida para um novo frasco contendo o mesmo meio de cultura, diminuindo o período de adaptação do microrganismo. A incubação se deu a 37 °C e 180 rpm por aproximadamente 3 h em agitador orbital, até atingir densidade ótica 1.0, lida em 600 nm por espectrofotômetro. Após atingir a densidade ótica desejada, o

volume a ser inoculado (10 % do volume total do experimento) foi centrifugado a 3000 \times g por 15 min a 4 °C, e o precipitado ressuspenso em mesmo volume por meio estéril a ser inoculado a 10 % (v/v).

3.4.2 Experimentos em Agitador orbital

Foram testadas duas concentrações de glicerol residual no meio de cultivo (65 e 30 g.L^{-1}) com e sem a suplementação do mesmo com uma solução de ferro (1 mL.L^{-1} da solução: 5 g.L^{-1} $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 4 mL.L^{-1} HCl 37 %) (Oh et al. 2011; Oh et al. 2013). Foi utilizado como base o meio já otimizado para a produção de 1,3 PD (Rossi et al. 2012) com composição semelhante a meios utilizados para a produção de etanol, composto por glicerol residual, 65 g.L^{-1} ; extrato de levedura, 5 g.L^{-1} ; peptona bacteriológica, 5 g.L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 g.L^{-1} ; K_2HPO_4 , 7 g.L^{-1} ; solução de elementos traço (contendo em g.L^{-1} : 0,1 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,06 H_3BO_3 , 0,004 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,2 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,035 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,14 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,9 mL HCl 37 %), 1 mL.L^{-1} . O teste foi realizado com 4 composições de meio: a) 65 g.L^{-1} de glicerol sem adição de ferro; b) 30 g.L^{-1} de glicerol sem adição de ferro; c) 65 g.L^{-1} de glicerol com adição de ferro; d) 30 g.L^{-1} de glicerol com adição de ferro; sendo adicionado o antibiótico canamicina, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quando inoculada a linhagem transformada.

O experimento foi conduzido por 24 h, sendo analisada a produção de etanol e seu rendimento nos tempos 0, 12 e 24 h, a fim de ser estabelecido o melhor meio para o escalonamento em biorreator.

3.4.3 Experimentos em Biorreatores em Batelada

Os cultivos desta etapa foram conduzidos, em biorreatores da marca Bioestat Braun (Alemanha), sendo utilizados o meio controle já otimizado e o meio definido pelo teste em agitador orbital, de 30 g.L⁻¹ de glicerol sem adição de ferro, sendo adicionado canamicina, 50 µg.mL⁻¹, quando inoculada a linhagem transformada. Foram utilizados vasos de 2 L, com volume de operação de 1,5 L e inóculo (descrito no item 3.3.1) a 10 % do volume total.

Ambos os cultivos em batelada foram mantidos e analisados por 24 h, sendo verificada a síntese e rendimento de produtos, além do consumo de glicerol a cada 3 h. Além disto, tiveram o pH controlado a 7,0 por adição automática de NaOH 10 M, devido a acidificação do meio durante o cultivo, agitação de 150 rpm e a temperatura mantida a 37 °C pela unidade.

3.5 Análise de metabólitos

O substrato principal (glicerol) e os produtos dos cultivos (ácido acético, ácido láctico, etanol e 1,3 propanodiol) foram determinados através do uso de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu (HPLC Shimadzu Corp., Japan), equipado com um detector de índice de refração RID-10A. As fases estacionária e móvel foram a coluna Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm, Bio-Rad, USA) e solução 5 mM H₂SO₄ sob um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, respectivamente, e a temperatura da coluna foi controlada a 65 °C.

3.6 Estabilidade plasmidial

Foram retiradas alíquotas, de aproximadamente 1 mL, dos biorreatores, de forma asséptica com o auxílio de seringas estéreis, e diluídas até 10⁻¹¹ em solução salina 0,9 %, sendo 100 µL desta diluição semeados em

placas de ágar LB, com e sem antibiótico, com auxílio de alça de Drigalsky. A estabilidade do plasmídeo (Tomazetto et al. 2007) foi determinada em triplicata através da contagem das células crescidas com e sem o antibiótico canamicina, marca de seleção do plasmídeo, sendo utilizada como referência a porcentagem obtida no tempo 0 h como 100 %.

3.7 Tratamento estatístico

Todos os testes e cultivos foram realizados em duplicatas, calculando o desvio padrão entre as amostras. No tratamento estatístico das amostras foi utilizado o programa Microsoft Excel 2007, com a análise de dados por Teste-t de duas amostras, presumindo variâncias equivalentes, utilizando como significância o valor de 95 %.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção do plasmídeo

O gene AdhE juntamente com sua região promotora e terminadora foi amplificado com a utilização dos oligonucleotídeos desenhados e resultou em uma banda de 2,9 kb observada em gel de agarose 1 % (FIGURA 7 A). Foi utilizada a própria região promotora e terminadora do gene para garantir a expressão do mesmo dentro do plasmídeo na *K. pneumoniae* sem a necessidade do uso de indutores. Este produto de PCR foi inserido no vetor TOPO 2.1 TA cloning, e as colônias transformadas, tanto em *Escherichia coli* TOP 10 quanto em *K. pneumoniae* BLh-1, foram crescidas em placas com canamicina, pois a *K. pneumoniae* BLh-1 apresentou resistência natural a ampicilina, impossibilitando a seleção dos transformantes com o uso deste antibiótico.

A composição do plasmídeo pTOPOBL17 (FIGURA 6), que corresponde à inserção correta do fragmento, foi comprovada por clivagem (FIGURA 7 B), PCR e sequenciamento. Pelo seqüenciamento foi possível verificar a inserção do fragmento no vetor de clonagem TOPO 2.1 através da comparação de

sequências de forma manual e com a ajuda do programa Blast (Zhang et al. 2000). A nova linhagem passou então a ser referida como *Klebsiella pneumoniae* Kp17.

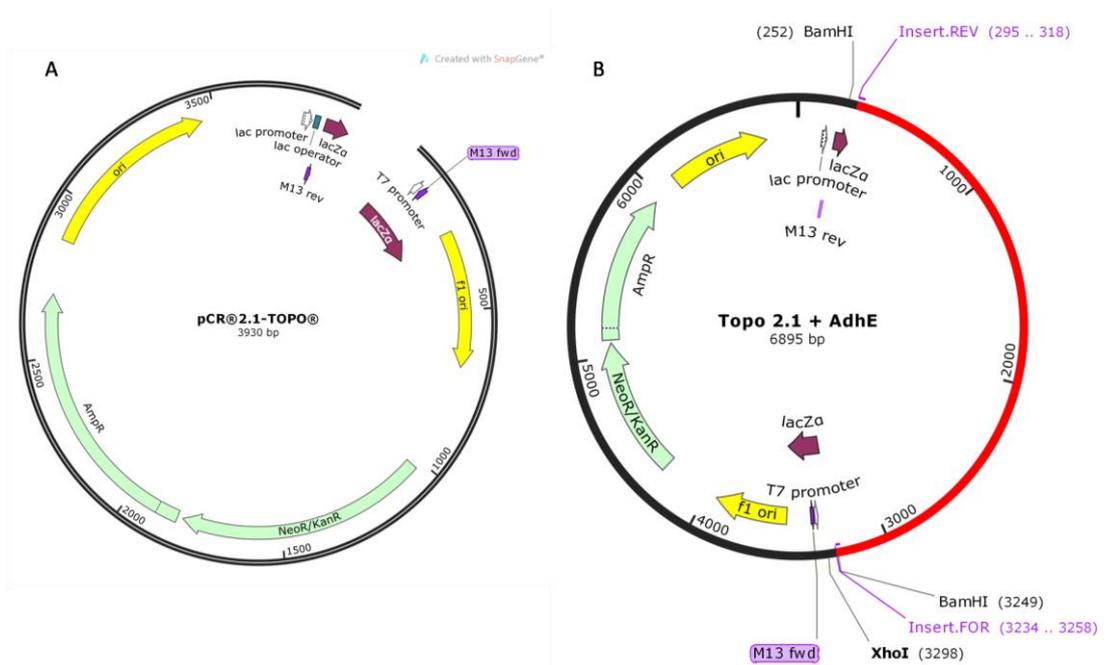


FIGURA 6: (A) vetor TOPO 2.1 linearizado para inserção do fragmento de PCR; (B) vetor pTOPOBL17 com as enzimas de restrição (XhoI e BamHI) indicadas.

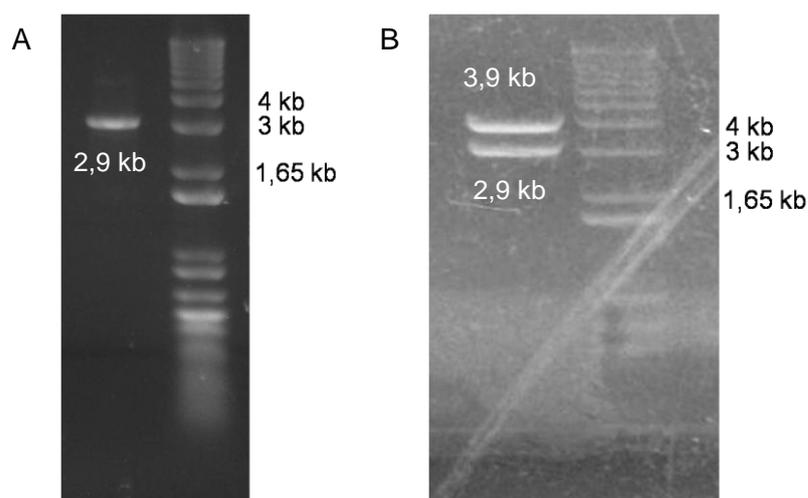


FIGURA 7: Perfil de migração dos fragmentos de DNA (A) resultantes da PCR do gene AdhE incluindo as regiões promotora e terminadora (2,9 kb); (B) resultantes da clivagem do vetor pTOPOBL17 (TOPO 2.1 (3,9 kb) + fragmento de interesse (2,9 kb)) com as enzimas BamHI e Xho.

4.1.1 Análise da expressão de proteína em gel SDS-PAGE

Com a análise da expressão de proteína foi possível perceber um aumento na expressão de uma enzima de massa molecular de aproximadamente 100 kDa em gel de SDS-PAGE (FIGURA 8), um forte indício de que a enzima AdhE teve sua expressão aumentada na linhagem *K. pneumoniae* Kp17.

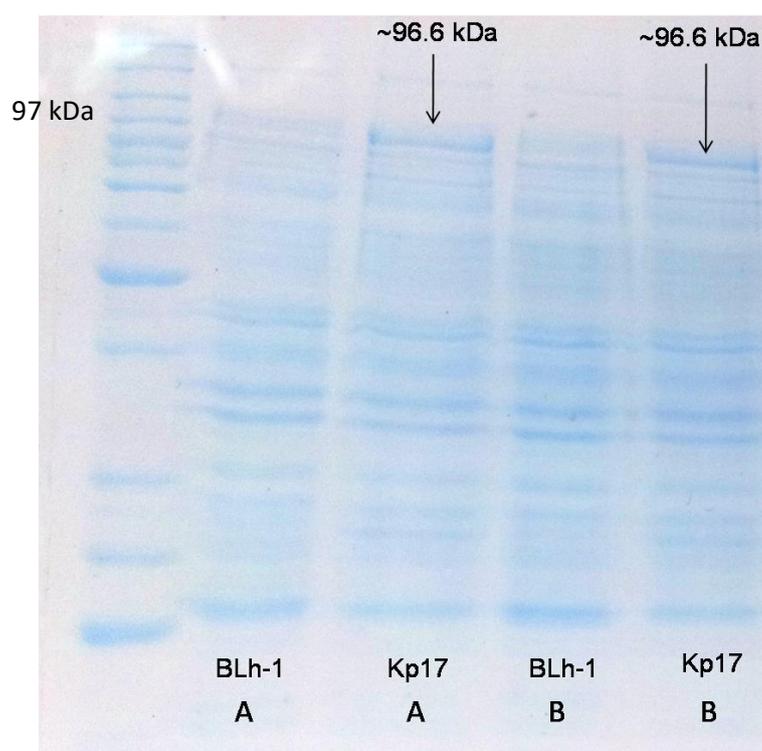


FIGURA 8: Perfil de migração de AdhE em SDS-PAGE, evidenciando expressão aumentada na linhagem transformada Kp17, com banda de tamanho aproximado de 96,6 kDa, em comparação a linhagem selvagem, BLh-1. (A e B representam duplicatas).

4.2 Produção de Etanol

4.2.1 Cultivos em Agitador Orbital

Foram testadas duas concentrações de glicerol residual no meio a fim de avaliar a resposta fisiológica de ambas as linhagens. Segundo a literatura, as condições ambientais, como concentração de substrato, produtos,

assim como intermediários, influenciam induzindo ou reprimindo diferentes respostas fisiológicas em *Klebsiella pneumoniae* (Zeng et al. 1993; Zeng et al. 1996).

Assim, no agitador orbital foi possível observar diferenças estatísticas significativas entre os meios de cultivo propostos (TABELA 1). A adição de Fe^{2+} foi testada pela necessidade do íon para o bom funcionamento da AdhE e outras desidrogenases, agindo como co-fator juntamente com NADH (Kessler et al. 1992).

TABELA 1: Teste t comparativo da produção de etanol em agitador orbital entre as linhagens Kp17 e BLh-1 nos diferentes meios de cultivo. (significância > 95 %)

	Condição inicial			
	65 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	65 g.L ⁻¹ + Fe	30 g.L ⁻¹ + Fe
T calculado	-0,993	-5,281	-2,939	3,740
T crítico	2,919	1,943	1,943	1,943

Nos cultivos com 30 g.L⁻¹ de glicerol residual sem a adição de ferro, e com 65 g.L⁻¹ de glicerol residual com adição de ferro houve diferença significativa para a maior produção de etanol pela linhagem transformada, *K. pneumoniae* Kp17 ($|T \text{ calculado}| > T \text{ crítico}$, sinal negativo). Já em 30 g.L⁻¹ de glicerol residual com adição de ferro houve maior produção de etanol pela linhagem selvagem BLh-1 ($|T \text{ calculado}| > T \text{ crítico}$, sinal positivo), porém, por ser co-fator para AdhE (Kessler et al. 1992), esperava-se perceber um aumento na produção de etanol pela adição de Fe^{2+} pela linhagem transformada. No entanto, este aumento na produção de etanol não foi alcançado, mas o resultado obtido é coerente com a literatura, pois não houve interferência na

produção de etanol (Wu et al. 2008), ou até mesmo obtendo efeito negativo nessa produção de H₂ (Chookaew et al. 2014), que também é sintetizado por desidrogenases. A falta de aumento da produção de etanol pode ser explicada pela adição de substratos complexos, como extrato de levedura, que poderia já estar suprindo a demanda de ferro, e também pela possibilidade de haver algum interferente desconhecido na composição do glicerol residual. No cultivo em 65 g.L⁻¹ de glicerol residual sem adição de ferro não houve diferença significativa entre as linhagens ($|T \text{ calculado}| < T \text{ crítico}$).

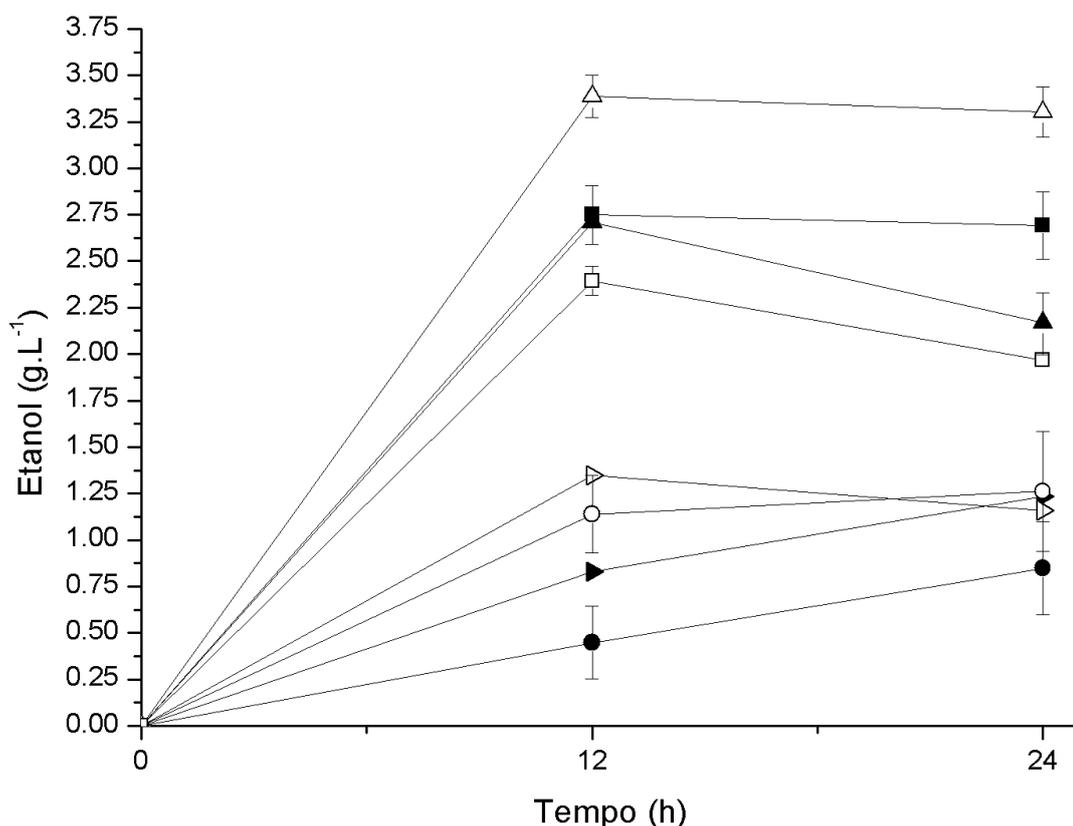


FIGURA 9: Comparação da produção de etanol no cultivo em agitador orbital, em diferentes meios de cultivo com as linhagens *K. pneumoniae* Kp17 e *K. pneumoniae* BLh-1. (—△—) Kp17, 30 g.L⁻¹ de glicerol residual; (—▲—) BLh-1, 30 g.L⁻¹ de glicerol residual; (—▷—) Kp17, 65 g.L⁻¹ de glicerol residual; (—▶—) BLh-1, 65 g.L⁻¹ de glicerol residual; (—□—) Kp17, 30 g.L⁻¹ de glicerol residual + solução de ferro; (—■—) BLh-1, 30 g.L⁻¹ de glicerol residual + solução de ferro; (—○—) Kp17, 65 g.L⁻¹ de glicerol residual + solução de ferro; (—●—) BLh-1, 65 g.L⁻¹ de glicerol residual + solução de ferro. Resultados representados em duplicatas.

Como o meio de cultivo com 30 g.L⁻¹ de glicerol apresentou os melhores resultados para a produção de etanol (FIGURA 9), este foi escolhido em biorreator. Por ter sido a condição já otimizada para a produção de 1,3 PD em *K. pneumoniae* BLh-1 (Rossi et al. 2013a), o meio de cultivo com 65 g.L⁻¹ de glicerol residual inicial foi conduzido igualmente em batelada para fins de ser referenciado como controle.

4.2.2 Cultivos nos Biorreatores em Batelada

Os experimentos conduzidos em biorreator foram realizados em duplicatas com ambas as linhagens, selvagem (BLh-1) e transformada (Kp17) e obtiveram diferenças significativas na produção de etanol, mostrando que a transformação da linhagem e a diminuição de glicerol inicial no meio de cultivo foram importantes alterações para a produção de etanol (TABELA 2).

TABELA 2: Teste t comparativo entre as linhagens BLh-1 e Kp17 para a produção de etanol nos cultivos em biorreator utilizando 30 e 65 g.L⁻¹ de glicerol residual inicial. (significância >95 %)

	Concentração de glicerol inicial	
	30 g.L ⁻¹	65 g.L ⁻¹
T calculado	-2,974	0,231
T crítico	1,69	1,69

Essa diferença também é evidenciada quando são comparados os rendimentos entre as concentrações iniciais de glicerol residual e entre as linhagens (TABELA 3). Assim, observa-se que a diminuição da concentração do glicerol residual corroborou para o aumento do rendimento da produção de etanol por *K. pneumoniae* Kp17, mesmo estando longe ainda do rendimento máximo teórico de 50 % (0,5 g_{Etanol}.g_{Glicerol}⁻¹) (Wong et al. 2014).

TABELA 3: Comparação do rendimento da produção de etanol entre as linhagens BLh-1 e Kp17, em batelada em biorreator, nas diferentes concentrações iniciais de glicerol residual.

Linhagem	Glicerol inicial (g.L⁻¹)	Glicerol consumido (g.L⁻¹)	Etanol produzido (g.L⁻¹)	Rendimento (%; m.m⁻¹)
BLh-1	~30	29,9	2,53	8,5
	~65	62,2	6,46	10,4
Kp17	~30	30,2	4,49	14,9
	~65	61,4	6,44	10,5

Muitos autores citam o acúmulo de glicerol como sendo um importante inibidor da produção de etanol, testando valores de até 40 g.L⁻¹ de glicerol para otimizar a produção (Cheng et al. 2005; Zhang et al. 2007; Metsoviti et al. 2012; Rossi et al 2012; Chookaew et al. 2014).

Esta inibição deve-se ao desvio da rota metabólica pelo microrganismo, que depende da concentração de substrato no meio de cultivo. Isso significa que, quando há excesso de substrato o microrganismo opta pela geração de ATP e regeneração de co-fatores (NAD⁺) por vias que produzam uma menor quantidade de intermediários tóxicos, ou seja, aumenta a produção de outros metabólitos e evita a formação principalmente de etanol, que em altas concentrações, inibe o crescimento celular (Zeng et al. 1993).

Na fisiologia das linhagens selvagem, BLh-1, em 65 g.L⁻¹ de glicerol (FIGURA 10) e 30 g.L⁻¹ de glicerol (FIGURA 12), e transformada, Kp17, em 65 g.L⁻¹ de glicerol (FIGURA 11) e 30 g.L⁻¹ de glicerol (FIGURA 13) pode-se observar diferentes respostas, não apenas na produção de etanol.

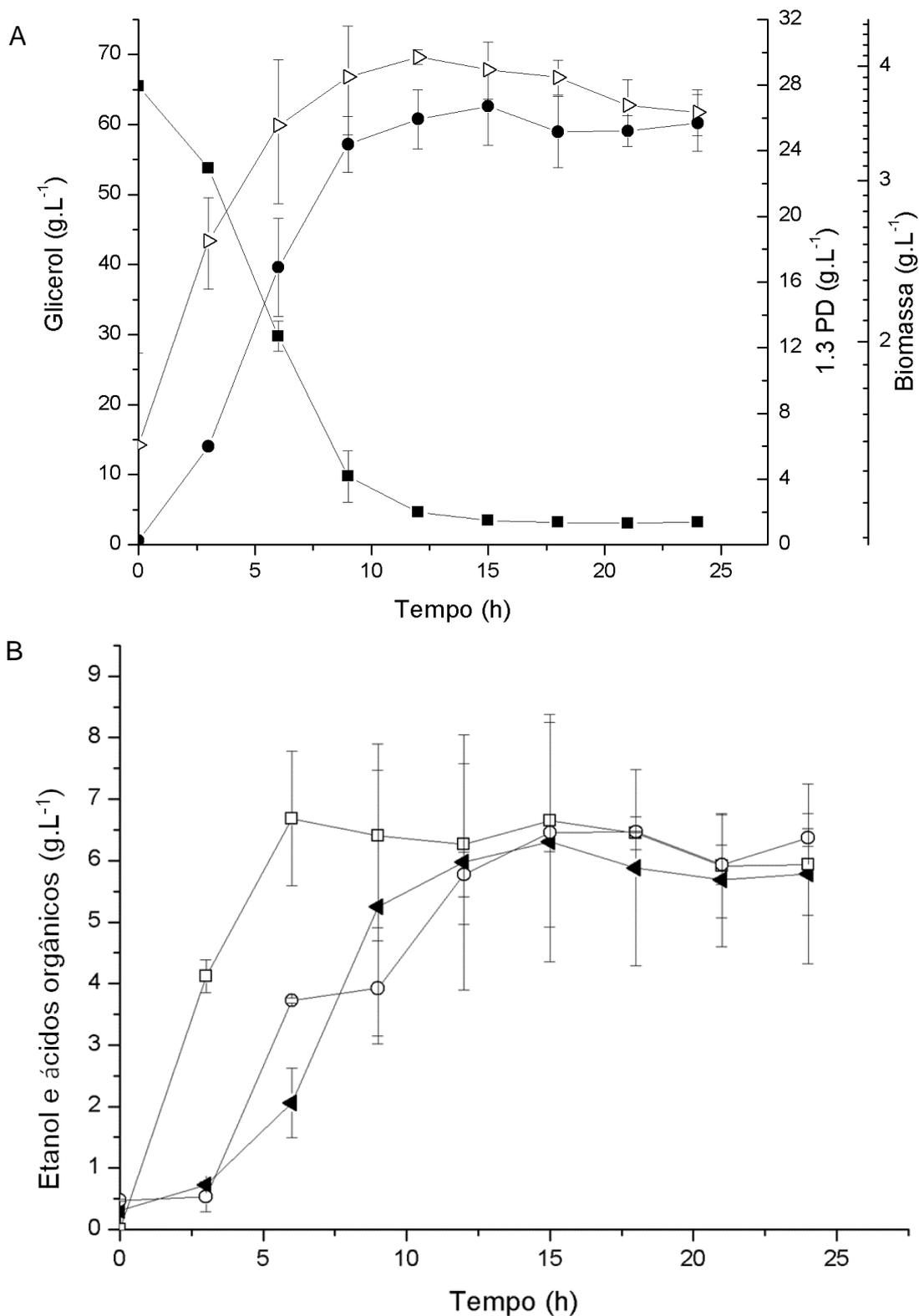


FIGURA 10: Cultivo em batelada de *K. pneumoniae* BLh-1 com 65 g.L⁻¹ de glicerol residual (A): (—■—) glicerol; (—●—) 1,3 PD; (—▷—) biomassa; (B): (—○—) etanol; (—□—) ácido láctico; (—◄—) ácido acético.

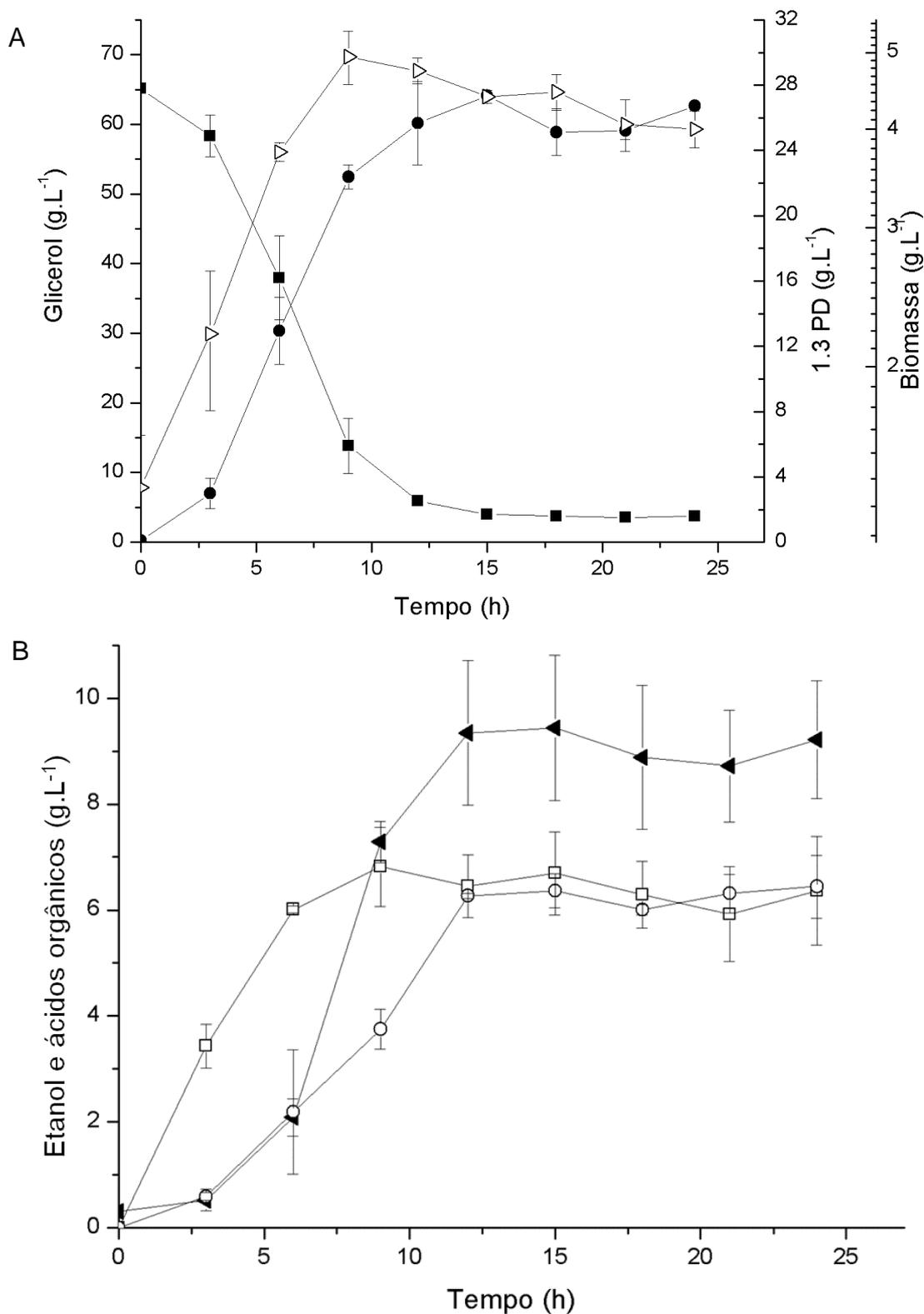


FIGURA 11: Cultivo em batelada de *K. pneumoniae* Kp17 com 65 g.L⁻¹ de glicerol residual. (A): (—■—) glicerol; (—●—) 1,3 PD; (—▷—) biomassa; (B): (—○—) etanol; (—□—) ácido láctico; (—◀—) ácido acético.

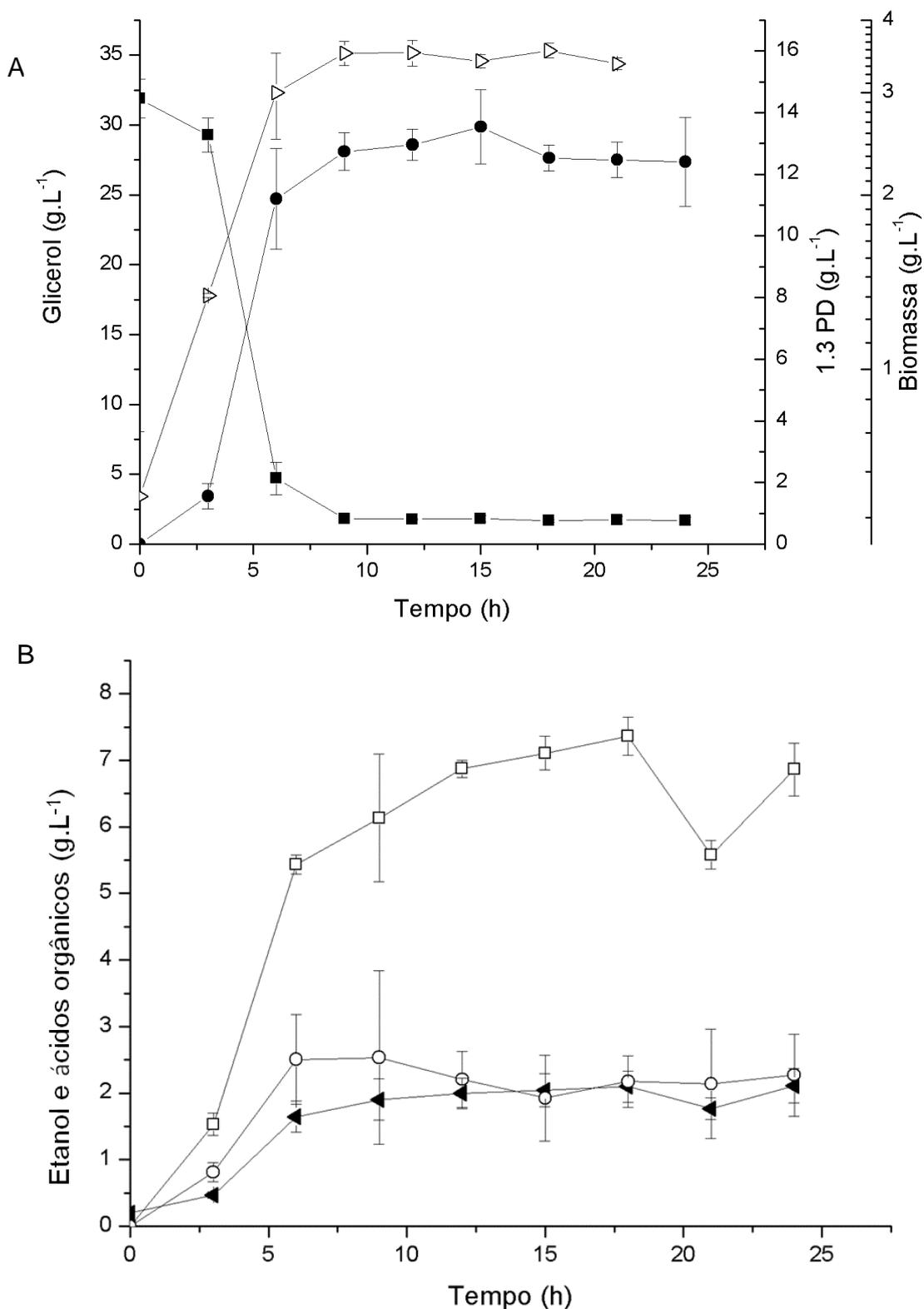


FIGURA 12: Cultivo em batelada de *K. pneumoniae* BLh-1 com 30 g.L⁻¹ de glicerol residual. (A): (—■—) glicerol; (—●—) 1,3 PD; (—▷—) biomassa; (B): (—○—) etanol; (—□—) ácido láctico; (—◄—) ácido acético.

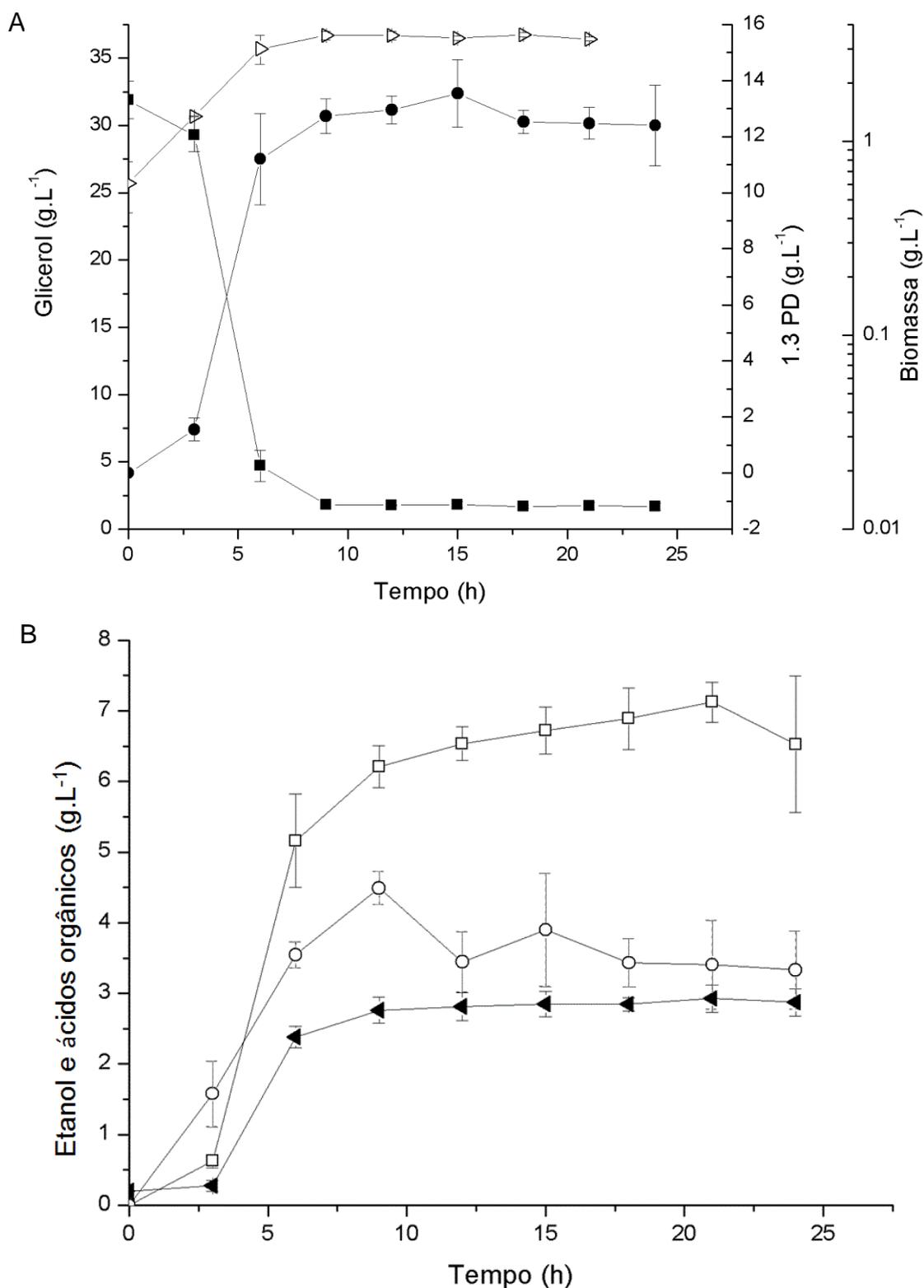


FIGURA 13: Cultivo em batelada de *K. pneumoniae* Kp17 com 30 g.L⁻¹ de glicerol residual. (A): (—■—) glicerol; (—●—) 1,3 PD; (—▷—) biomassa; (B): (—○—) etanol; (—□—) ácido láctico; (—◄—) ácido acético.

Comparando as duas linhagens na primeira condição de cultivo, a condição controle, pode-se observar o crescimento de biomassa e o consumo de glicerol sutilmente mais lento e um aumento na produção de ácido acético pela linhagem *K. pneumoniae* Kp17. Porém, estas diferenças não se caracterizam como significativas.

Na condição de 30 g.L⁻¹ de glicerol residual há a diminuição na produção de 1,3 PD pela linhagem transformada, que seria uma via de regeneração de NADH com intermediários metabólicos com menor toxicidade, mas com menor rendimento energético; e aumento na produção de etanol, via com intermediários mais tóxicos, mas com rendimento energético maior, ambos significativos (Zeng et al. 1993; Menzel et al. 1998; Metsoviti et al. 2012).

A alta produção de 1,3 PD é um problema pra a produção de etanol, sendo o maior competidor por co-fatores e também por carbono. Porém, se tratando do único produto final do metabolismo da via redutiva de *K. pneumoniae*, não pode ser eliminado por completo. Assim, uma das alternativas seria o desvio da rota manipulando condições ambientais, pela limitação de substrato, conduzindo experimentos em batelada alimentada, com a concentração do glicerol tendendo a zero e exigindo maior uso da via com maior rendimento energético, a conversão em etanol.

Quando comparadas as duas condições de cultivo, é possível observar que há aumento no rendimento da produção de ácido láctico, em ambas as linhagens, na condição de 30 g.L⁻¹ de glicerol residual inicial.

O ácido láctico é um dos principais produtos da rota metabólica de *K. pneumoniae* e compete pelo uso de NADH com 1,3 PD e etanol, interferindo na

produção e no rendimento destes (Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2009; Nikel et al. 2010; Oh et al. 2012; Biswas et al. 2014). A diminuição na concentração do substrato foi suficiente para deslocar o consumo de NADH para a produção de ácido lático, tratando-se de um produto com menor toxicidade que o etanol, mas ainda sendo mais tóxico que 1,3 PD (Yang et al. 2007).

O aumento na produção de etanol pela linhagem transformada pôde ser observado após a diminuição de glicerol no meio de cultivo. Porém, alternativas complementares de engenharia genética podem ser testadas para que a *K. pneumoniae* Kp17 seja uma produtora ainda mais eficiente de etanol. Sendo uma espécie que tolera até 40 g.L⁻¹ de etanol no meio de cultivo e que aumentar esta tolerância também se mostrou possível de acordo com alterações na enzima ADHE em *Clostridium thermocellum* (Brown et al. 2011).

Manipulações genéticas foram realizadas em outros estudos visando o aumento na produção de etanol. Um destes exemplos é a superexpressão de adhE em *K. pneumoniae* deficiente em IdhA, que resultou em aumento de aproximadamente 5 % em batelada (8,8 g.L⁻¹ na linhagem selvagem para 9,3 g.L⁻¹ na linhagem transformada) e produção de aproximadamente 32 g.L⁻¹ em batelada alimentada com 20 g.L⁻¹ de glicerol residual inicial (Oh et al. 2013).

Neste estudo, em batelada, foi possível aumentar aproximadamente 77 % (2,53 g.L⁻¹ na linhagem selvagem para 4,49 g.L⁻¹) a produção de etanol apenas com a superexpressão do gene. Porém, aliando a processos mais completos como batelada alimentada e outras alterações genéticas este aumento pode ser ainda mais significativo.

4.3 Estabilidade plasmidial

A manutenção do plasmídeo pela célula é fundamental para garantir bons resultados com a expressão gênica e, conseqüentemente, com a produção de etanol. Para tanto, durante a batelada com 30 g.L⁻¹ de glicerol, foram retiradas alíquotas a fim de testar a estabilidade plasmidial durante as 24 h do cultivo. A linhagem *K. pneumoniae* Kp17 mostrou-se geneticamente estável em relação à manutenção do vetor pTOPOBL17, mantendo o plasmídeo em aproximadamente 92,5 % das células ao final do cultivo (24 h), resultado semelhante à outro já apresentado na literatura, que apresenta 96 % de manutenção de plasmídeo ao longo do cultivo em batelada alimentada por 36 h, utilizando 20 g.L⁻¹ de glicerol residual inicial (Oh et al. 2012).

5. CONCLUSÕES

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* BLh-1, potencial produtora de etanol e 1,3 PD, foi alterada geneticamente com sucesso, tendo possivelmente aumentado a expressão do gene AdhE através da implantação de vetor estável auto-replicativo (TOPO 2.1 TA cloning) com o gene em questão (vetor pTOPOBL17), evidenciado pela maior produção de etanol.

Com a implantação do vetor houve aumento da produção e rendimento de etanol pela transformante quando crescida em glicerol residual, em comparação a linhagem selvagem. Outras diferenças fisiológicas também puderam ser observadas como desvios de rota metabólica e preferências de produtos devido a questões ambientais, como concentração de substrato no meio de cultivo.

6. PERSPECTIVAS

Este trabalho contribui para uma série de estudos que versam sobre melhoria genética e otimização de parâmetros para aumento da síntese de produtos de alto valor agregado, tendo resíduos como fonte nutricional.

É um tema que, apesar de ser bastante difundido, ainda deixa algumas lacunas a serem preenchidas, pelo aparecimento de respostas fisiológicas não tão previsíveis ao longo da manipulação.

Ainda há melhorias a serem feitas nessa linhagem desenvolvida, a *K. pneumoniae* Kp17, como silenciamento do gene que codifica a produção de ácido láctico (LDH), que já está em desenvolvimento. Além disso, também devem ser realizadas bateladas alimentadas, pois na grande maioria dos artigos utilizados como base é onde a produção de etanol atinge seu auge pelos microrganismos modificados, através da limitação do substrato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahrens, K. et al., 1998. 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*, 59(5), p.544–52.
- ANP, 2015. Boletim Mensal do Biodiesel. Available at: www.anp.gov.br [Acessado julho 1, 2015].
- Arruda, P.V. De, Rodrigues, R. de C.L.B. & Felipe, M. das G. de A., 2007. Glicerol : um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. , (3).
- Ayoub, M. & Abdullah, A.Z., 2012. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), p.2671–2686.
- Biswas, R. et al., 2014. Increase in Ethanol Yield via Elimination of Lactate Production in an Ethanol-Tolerant Mutant of *Clostridium thermocellum*. , 9(2), p.1–7.
- Brown, S.D. et al., 2011. Mutant alcohol dehydrogenase leads to improved ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), p.13752–13757.
- Celinska, E., 2010. Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. , 28, p.519–530.
- Cheng, K., Liu, H. & Liu, D., 2005. Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation. , p.19–22.
- Chookaew, T., O-thong, S. & Prasertsan, P., 2014. Statistical optimization of medium components affecting simultaneous fermentative hydrogen and ethanol production from crude glycerol by. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(2), p.751–760.
- Clomburg, J.M. & Gonzalez, R., 2013. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in biotechnology*, 31(1), p.20–8.
- Fávaro, L.C. de L., 2012. Melhoramento genético de microrganismos para produção de biocombustíveis e químicos renováveis. *Agroenergia em Revista*.

- Green, M.R. & Sambrook, J., 2012. *Molecular Cloning*,
- Ito, T. et al., 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(3), p.260–5.
- Jantama, K. et al., 2015. Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2, 3-butanediol by a combined deletion of alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered. *Metabolic Engineering*, 30, p.16–26.
- Johnson, D. & Taconi, K., 2007. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress*, 26(4).
- Kessler, D., Herth, W. & Knappe, J., 1992. Ultrastructure and Pyruvate Formate-lyase Radical Quenching Property of the Multienzymic AdhE Protein of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(25), p.18073–18079.
- Koo, O.K. et al., 2005. Cloning and characterization of the bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*) in *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *Biotechnology letters*, 27(7), p.505–10.
- Leoneti, A.B., Aragão-Leoneti, V. & de Oliveira, S.V.W.B., 2012. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, 45, p.138–145.
- Membrillo-Hernandez, J. et al., 2000. Evolution of the *adhE* Gene Product of *Escherichia coli* from a Functional Reductase to a Dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43), p.33869–33875.
- Menzel, K. et al., 1996. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: I. The phenomena and characterization of oscillation and hysteresis. *Biotechnology and bioengineering*, 52(5), p.549–60.
- Menzel, K. et al., 1998. Kinetic, Dynamic, and Pathway Studies of Glycerol Metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in Anaerobic Continuous Culture: IV. Enzymes and Fluxes of Pyruvate Metabolism. *Biotechnology and bioengineering*, 60(5), p.617–626.
- Metsoviti, M. et al., 2012. 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*, 47(12), p.1872–1882.
- MME, 2015. Boletim mensal dos combustíveis renováveis.

- Mota, C.J., da Silva, C.X.A. & Gonçalves, V.L.C., 2009. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova*, 32(3), p.639–648.
- Nair, R. V, Bennett, G.N. & Papoutsakis, E.T., 1994. Molecular Characterization of an Aldehyde / Alcohol Dehydrogenase Gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824-. , 176(3), p.871–885.
- Nikel, P.I. et al., 2010. Ethanol synthesis from glycerol by *Escherichia coli* redox mutants expressing adhE from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of applied microbiology*, 109(2), p.492–504.
- Nnyepi, M.R., Peng, Y. & Broderick, J.B., 2007. Role of AdhE and small molecules. , 459, p.1–9.
- Nogueira, L. a. H., 2011. Does biodiesel make sense? *Energy*, 36(6), p.3659–3666.
- Oh, B.-R. et al., 2011. Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. *Bioresource technology*, 102(4), p.3918–22.
- Oh, B.-R. et al., 2012. Enhancement of ethanol production from glycerol in a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain by the inactivation of lactate dehydrogenase. *Process Biochemistry*, 47(1), p.156–159.
- Oh, B.-R. et al., 2013. The role of aldehyde/alcohol dehydrogenase (AdhE) in ethanol production from glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of industrial ...*, 40(2), p.227–233.
- Olson, D.G. et al., 2015. Ethanol production by engineered thermophiles. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, p.130–141.
- Peng, H., Wu, G. & Shao, W., 2008. The aldehyde/alcohol dehydrogenase (AdhE) in relation to the ethanol formation in *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200. *Anaerobe*, 14(2), p.125–7.
- Posada, J. a. & Cardona, C. a., 2010. Design and analysis of fuel ethanol production from raw glycerol. *Energy*, 35(12), p.5286–5293.
- Rivaldi, J.D. et al., 2007. Glicerol de biodiesel. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*.
- Rossi, D.M. et al., 2012. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. *Renewable Energy*, 39(1), p.223–227.

- Rossi, D.M. et al., 2011. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. , 6, p.5–10.
- Rossi, D.M., Souza, E.A. De, Flôres, S.H., et al., 2013. Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1, 3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Renewable Energy*, 55, p.404–409.
- Rossi, D.M., Souza, E.A. De & Ayub, M.A.Z., 2013. Biodiesel Residual Glycerol Metabolism by *Klebsiella pneumoniae* : Pool of Metabolites Under Anaerobiosis and Oxygen Limitation as a Function of Feeding Rates. , p.1952–1964.
- Tolonen, A.C. et al., 2015. Tolerant Strain of *Clostridium phytofermentans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), p.5440–5448.
- Tomazetto, G. et al., 2007. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, p.821–827.
- Wong, M.S. et al., 2014. Microaerobic Conversion of Glycerol to Ethanol in *Escherichia coli*. , 80(10), p.3276–3282.
- Wu, K.-J. et al., 2008. Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. *Bioresource technology*, 99(17), p.7966–70.
- Yang, G., Tian, J. & Li, J., 2007. Fermentation of 1, 3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(5), p.1017–1024.
- Yazdani, S.S. & Gonzalez, R., 2007. Anaerobic fermentation of glycerol : a path to economic viability for the biofuels industry. , p.213–219.
- Zeng, A.-P. et al., 1993. Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(September), p.770–779.
- Zeng, A.-P., Menzel, K. & Deckwer, W.D., 1996. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: II. Analysis of metabolic rates and pathways under oscillation and steady-state conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 52(5), p.561–71.
- Zhang, G. et al., 2007. Fast conversion of glycerol to 1, 3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. , 37, p.256–260.

- Zhang, Y. et al., 2006. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: A key factor for engineering 1, 3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metabolic engineering*, 8(6), p.578–86.
- Zhang, Y. et al., 2009. Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. , 11, p.101–106.
- Zhang, Z. et al., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 7(1-2), p.213–214.
- Zheng, T. et al., 2015. Cofactor specificity of the bifunctional alcohol and aldehyde dehydrogenase (AdhE) in wild-type and mutants of *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Journal of Bacteriology*, (May).

APÊNDICE 1



CERTIFICADO DE QUALIDADE

Nº 040 – 14 – 08 de Setembro de 2014

Identificação do Cliente	Bianchini S/A Indústria Comércio e Agricultura – Planta de Biodiesel Rua Antônio João Bianchini, 1800 – Canoas – RS
Data de Entrada da Amostra:	05/09/14
Data de Realização dos Ensaios:	05/09/14 - 08/09/14

Dados do Produto

Produto:	Glicerina Comercial		
Identificação da Amostra:	Tanque: 1421		
Composição da Matéria Prima:	100% Óleo de Soja	Data de Produção:	05/09/14
Rota de Produção:	Metilica	Lacres da Amostra:	N/A
Lacres do Tanque:	N/A		

Característica	Resultado	Especificação	Método de Ensaio
Umidade (%)	10,62	Máx. 12,00%	AOCS Ca 2e-84
Glicerol (%)	82,97	Mín. 80,00%	AOCS Ea 6-94
Cinzas (%)	5,66	Máx. 7,00%	AOCS Tm1a-64
MONG (%)	0,75	Máx. 3,00%	Cálculo
Metanol (%)	0,02	Máx. 0,30%	EN 14110
Cloreto de Sódio (%)	5,72	Máx. 7,00%	AOCS Ea2-38
Densidade (g/cm3)	1,25	Máx. 1,29 g/cm3	ASTM D 1298

**FABIANA
ROGERIO
DE
MEDEIROS**

Assinado
digitalmente por
FABIANA
ROGERIO DE
MEDEIROS
Data: 2014.09.08
17:28:37 -0300

CRQ 05201925 – V Região
Signatário Autorizado

Os resultados acima se referem somente a amostra ensaiada. Este laudo só pode ser reproduzido na sua íntegra.

Laboratório de Controle de Qualidade
Rua Antônio João Bianchini, 1800 – Canoas – RS
Registro no CRQ-V nº 2340 – Cadastro na ANP nº 51