

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Utilização dos recursos genéticos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 para o desenvolvimento de enzima quimérica glicerol desidrogenase - acetoína redutase

MAURICIO SCHIAVO

Caxias do Sul, 2018

MAURICIO SCHIAVO

Utilização dos recursos genéticos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 para o desenvolvimento de enzima quimérica glicerol desidrogenase - acetoína redutase

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Caxias do Sul, 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

S329u Schiavo, Mauricio
Utilização dos recursos genéticos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 para o desenvolvimento de enzima quimérica glicerol desidrogenase - acetoína redutase / Mauricio Schiavo. – 2019.
viii, 118 f. : il. ; 30 cm
Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.
Orientação: Sergio Echeverrigaray.
Coorientação: Mauricio Moura da Silveira.
1. Bactérias anaeróbias. 2. Fermentação. 3. Microorganismos. I. Echeverrigaray, Sergio, orient. II. Silveira, Mauricio Moura da, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 561.23

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

MAURICIO SCHIAVO

Utilização dos recursos genéticos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 para o desenvolvimento de enzima quimérica glicerol desidrogenase - acetoína redutase

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25 DE ABRIL DE 2019

Orientador: _____

(Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray)

Coorientador: _____

(Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira)

Banca Examinadora:

(Prof. Dra. Marli Camassola)

(Prof. Dra. Suelen O. Paesi)

(Dr. Marco Antônio Záchia Ayub)

(Dr. Arnaldo Zaha)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio, pelo carinho e por acreditar nos meus sonhos.

Agradeço meus colegas de laboratório pelo suporte nos experimentos, pela motivação e momentos de descontração.

Agradeço meus professores por serem meus guias e mentores e por abrirem os portões do conhecimento para que eu mesmo com meus próprios pés os tenha atravessado.

Agradeço meu orientador e coorientador pelo auxílio, pela paciência e por aceitarem desenvolver este projeto.

Stay hungry, stay foolish.
Steve Jobs and the Whole Earth Catalog

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Biodiesel.....	3
2.2 Mercado do biodiesel	4
2.3 Glicerol.....	5
2.4 Glicerol como fonte de carbono e energia em processos fermentativos.....	7
2.5 2,3-butanodiol (BDO)	9
2.5.1 Aplicações de BDO na indústria.	10
2.6 Produção bacteriana do 2,3-butanodiol.....	11
2.6.1 Estratégias para produção de BDO a partir de glicerol.....	12
2.7 Genoma de <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048.....	15
2.7.1 Metabolismo de glicerol por <i>E. aerogenes</i>	15
2.7.2 Produção de BDO por <i>Enterobacter aerogenes</i>	17
2.8 Engenharia metabólica.....	19
2.8.1 Enzimas de fusão	20
2.9 Biologia sintética.....	22
2.10 <i>Escherichia coli</i> como <i>chassis</i> para biologia sintética e engenharia metabólica.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1. Capítulo I: Search and description of annotated genes related to glycerol and butanediol metabolism on <i>Klebsiella aerogenes</i> KCTC 2190: a search for genetic resources.	27
3.2 Capítulo II: Development of a glycerol dehydrogenase – acetoin reductase fusion enzyme for increased glycerol conversion and BDO production.	58
4. CONCLUSÕES GERAIS	84
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	86
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	87
7. ANEXOS	101
7.1 Capítulo de livro submetido para publicação.....	101
7.2 Referência imagens adaptadas	117

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
(p/p)	peso por peso total
(w/w)	peso por peso total
g/L	gramas por litro
g/mol	gramas por mol
AA	Aminoácidos
BDO	2,3-butanodiol
G3P	Glicerol-3-fosfato
GLDH	Proteína Glicerol desidrogenase
BDH	Proteína Acetoína redutase
α-ALS	Proteína α-acetolactato sintase
ALDC	Proteína α-acetolactato decarboxilase
DHA	Diidroxiacetona
DHAP	Diidroxiacetona fosfato
1,3-PDO	1,3-Propanodiol
<i>glda</i>	Gene Glicerol desidrogenase
<i>budA</i>	Gene α-acetolactato descarboxilase
<i>budB</i>	Gene α-acetolactato sintase
<i>budC</i>	Gene Acetoína redutase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
mRNA	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
sp.	Epíteto específico
spp.	Todas as espécies dentro do gênero
v/v	Volume/volume
α	Alfa
β	Beta

CAGR	<i>Compound Annual Growth Rate</i>
SDS-PAGE	Géis de poliacrilamida SDS
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen base</i>
ORF	<i>(Open Reading Frame)</i> quadro de leitura aberto
<i>fed-batch</i>	Fermentação descontínua alimentada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de composição de 11 amostras de glicerol bruto obtidas de diferentes indústrias de biodiesel. (Adaptado de Hansen et al. (2009)).	6
Tabela 2. Relação de produtos obtidos a partir de glicerol por oxidação ou redução, dihidroxiacetona apresenta um valor aproximado de quatro a quarenta vezes o valor de mercado de glicerol e o 2,3-butanodiol de 5,5 vezes. (Adaptado de Johnson e Taconi (2007)).	7
Tabela 3. Descrição de estudos recentes utilizando diferentes cepas bacterianas em fermentação de batelada alimentada em diferentes condições de cultivo e com suas respectivas produções de BDO em g/L. Adaptado de Parate, Rode e Dharne (2018).	14
Tabela 4. Níveis de engenharia metabólica (Adaptado de Erb, Jones e Bar-even (2017)).	19
Capítulo I Table 1. Genes related to glycerol metabolism in <i>K. aerogenes</i> KCTC 2190.	39
Capítulo I Table 2. Genes related to acetolactate, acetoin and BDO metabolism in <i>K. aerogenes</i> KCTC 2190.	50
ANEXOS 7.1 Tabela 1: Empresas e startups que utilizam o conceito de biologia sintética e que alcançaram investimento de 25.000.000,00 US\$ a 150.000.000,00 US\$ em 2018 (SYNBIOBETA, 2018).	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do processo de transesterificação utilizando triglicerídeos de óleos e gorduras e um álcool para formação de ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol residual. (Adaptado de Li, Du e Liu (2008).).....	3
Figura 2 - Estereoisômeros de BDO. (Adaptado de Ji, Huang e Ouyang (2011) e Faghieh-mirzaei et al. (2016)).....	10
Figura 3. Aplicação e usos do butanodiol em variadas indústrias (Adaptado de Parate et al., 2018).	11
Figura 4. Vias metabólicas de conversão de glicerol em <i>E. aerogenes</i>	16
Figura 5. Via metabólica de conversão de piruvato em BDO de <i>E. aerogenes</i> , <i>K. aerogenes</i> . (Adaptado de Rivaldi et al. (2008), Silva et al. (2009), Kaur, Srivastava e Chand (2012) e Kanehisa Laboratories, (2017)).	18
Figura. 6 Cascatas de reações acopladas em sistemas vivos como paradigmas para modelos artificiais. (Adaptado de Elleuche (2014)).	21
Capítulo I: Fig. 1 Schematic representation of the conversion of glycerol into dihydroxyacetone-phosphate, a precursor for the pyruvate synthesis and the production of BDO from two molecules of pyruvate.....	30
Capítulo I: Fig. 2: Schematic representation of the gene organization for the <i>dhaR</i> , hypothetical <i>gldA</i> and <i>dhaKLM</i> genes.....	35
Capítulo I: Fig. 3: Schematic representation of the gene organization for the Sigma 54 gene.....	35
Capítulo I: Fig. 4: Organisation of a possible operon containing the <i>gldA</i> gene. The glycerol dehydrogenase gene is close by to a fructose-6-phosphate aldolase and a putative AraC-type protein.	36
Capítulo I: Fig 5. Representation of the glycerol uptake facilitator protein and glycerol kinase genes possible operon.	36
Capítulo I: Fig 6. Possible operon and gene organization for aquaporin Z.	37
Capítulo I: 7. Possible operon and gene organization for a putative glycerol kinase gene.	37
Capítulo I: Fig 8. Representation of the <i>glpTQ</i> and <i>glpABC</i> genes possible operons.	38
Capítulo I: Fig 9. Representation of the <i>glpD</i> and <i>glpEGR</i> genes possible operons.	39
Capítulo I Fig. 10. Representation of the <i>gpsA</i> gene and its close by related protein genes.	40
Capítulo I Fig 11. Representation of the G3P transport and <i>ugpCQ</i> genes operon. In red, proteins related to BCAA transport and metabolism.	41
Capítulo I Fig. 12: Representation of the glycerophosphoryl diester phosphodiesterase gene	42

Capitulo I Fig 13: Representation of acetolactate synthase gene, possibly in an operon with a protein gene annotated as a auxin efflux pump.....	46
Capitulo I Fig 14: Representation of acetolactate synthase gene, possibly in an operon with a proteins genes related to dehydrogenases, xylose and sugar phosphate metabolism and myo-inositol metabolism and transport.	46
Capitulo I Fig. 15: Representation of acetolactate synthase gene, possibly in an operon with proteins genes related to different dehydrogenases.	47
Capitulo I Fig. 16: Possible operon for acetolactate synthase I.	48
Capitulo I Fig. 17: Possible operon for acetolactate synthase II.....	48
Capitulo I Fig 18. Possible operon for acetolactate synthase III.	49
Capitulo I Fig. 19: The <i>budABC</i> operon organisation.	49
Capitulo I Fig. 20: Acetoin utilization protein on its possible operon.....	50
Capitulo II Fig. 1:Design of the fusion enzyme insert. 2116 bp DNA containing from 5' to 3': tac promoter; lac operator; first RBS; start codon of the fusion enzyme and CDS of GLDH; in-frame spacer; in-frame CDS of BDH and two stop codons; second RBS; cloning ORF 1 (in-operon start codon followed by two restriction enzyme sites and one stop codon); lac promoter; lac operator; third RBS; cloning ORF 2 (start codon followed by two restriction enzyme sites and one stop codon). Figure created using the snapgene software	70
Capitulo II Fig. 2: O.D. 600 of <i>E. coli</i> DH5 α growth after 8 hours on different acetoin/glycerol concentration. The statistical analysis showed 3 distinct groups (a,b,c) with significative difference ($p \leq 0,05$) and correlation with different glycerol/acetoin ratios.....	71
Capitulo II Fig 3. SDS-PAGE analysis of the fusion enzyme present only on <i>E. coli</i> pGLDH-BDH. MW: Molecular weight marker. 1: <i>E. coli</i> pET28a+ extract. 2: <i>E. coli</i> pGLDH-BDH extracts.	72
Capitulo II Fig. 4: Growth experiment with <i>E. coli</i> pET28a+, <i>E. coli</i> pGLDH-BDH induced after 4h of growth and pGLDH-BDH non-induced on YNB media containing 25g/L glycerol and 0.2g/L casein hydrolysate pH 7.0 (A) or 25g/L glycerol, 5g/L acetoin and 0,2g/L casein hydrolysate pH 7.0 (B).	73
Capitulo II Fig. 5: Acetoin and BDO concentration profile for the growth experiment. Acetoin concentration: <i>E. coli</i> pET28a+, <i>E. coli</i> pGLDH-BDH induced after 4h of growth and pGLDH-BDH uninduced. BDO concentration: <i>E. coli</i> pET28a+, <i>E. coli</i> pGLDH-BDH induced after 4h of growth and pGLDH-BDH uninduced. YNB media containing an initial concentration of 25g/L glycerol and 5g/L acetoin.....	74
Capitulo II Fig. 6: Enzymatic reaction using <i>E. coli</i> pet28a+ and <i>E. coli</i> pGLDH-BDH extracts after 10 and 30 minutes. A) Total glycerol conversion. Significative difference ($p \leq 0.05$) between pGLDH	

and pET28a+ extracts only after 30 minutes of reaction B) Total acetoin conversion. Significant difference ($p \leq 0.05$) between pGLDH and pET28a+ extracts at 10 and 30 minutes of reaction.	76
ANEXOS 7.1 Figura 1: sistemas de modificação gênica utilizados para alterações a nível cromossomal ou outras aplicações de edição gênica in vivo. Adaptado de Warejoncas et al. (2018). Sistemas representados: (a) Zinc Finger; (b) TALENs e CRISPR-Cas9.....	108
ANEXOS 7.1 Figura 2: Exemplo de plasmídeo ou vetor para clonagem de sequências de DNA específico. Imagem adaptada de vetor plasmidial pET-11a e desenvolvida utilizando software Snapgene (GSL Biotech LLC. 2017).....	110
ANEXOS 7.1 Figura. 3 Cascatas de reações acopladas em sistemas vivos como paradigmas para modelos artificiais. Adaptado de Elleuche (2014).	111

RESUMO

2,3-butanodiol (BDO) é um composto orgânico de fórmula $C_4H_{10}O_2$ que possui três estereoisômeros e que vem sendo amplamente utilizado na fabricação de 1,3-butanodieno, anticongelantes, espumas de poliuretano, polímeros plásticos, combustíveis líquidos e outras matérias-primas químicas normalmente produzidas a partir de derivados de gás natural e petróleo bruto. Devido às suas diversas aplicações na indústria, a demanda por BDO aumenta a cada ano sendo que o mercado potencial global de BDO é de cerca de 32 milhões de toneladas por ano. Todos os três estereoisômeros de BDO podem ser produzidos por microrganismos em processos fermentativos, sendo que alguns microrganismos são capazes de produzir BDO utilizando glicerol como fonte de carbono e energia. Dentre estes microrganismos destaca-se *E. aerogenes*, capaz de produzir BDO em grande quantidade a partir de glicerol, sendo o glicerol uma alternativa de interesse econômico por ser o principal resíduo da produção de biodiesel e que atualmente é exportado como matéria prima com baixo valor agregado.

O objetivo deste projeto foi identificar os recursos genéticos de *Klebsiella aerogenes* KCTC 2190 (cepa sinônimo de *E. aerogenes* ATCC 13048) para consumo de glicerol e sua conversão em diidroxiacetona e produção de BDO e a organização destes genes em operons e proximidade com outros genes relacionados com estas vias metabólicas e desenvolver estratégias de aumento na produção de BDO a partir de glicerol pela construção de uma enzima quimérica utilizando biologia sintética, que seja capaz de atribuir vantagem em três gargalos para aumento da capacidade de conversão de glicerol em BDO, sendo estes: o aumento da conversão de glicerol em DHA; o aumento da conversão de acetoína em BDO; e o reciclo mútuo de cofatores NAD e NADH utilizados em ambas as vias. O gene para a enzima quimérica desenvolvida foi clonado em *Escherichia coli* DH5 α para avaliar seu efeito no consumo de glicerol e formação de biomassa e formação de BDO a partir de acetoína. Os extratos brutos de *Escherichia coli* contendo a enzima quimérica foram avaliados em reação enzimática para investigar sua atividade sobre a conversão de glicerol e conversão de acetoína em BDO. O gene para a enzima quimérica desenvolvida pode ser utilizada em estudos futuros envolvendo sua clonagem em cepas bacterianas produtoras de acetoína e BDO como as espécies da família *Enterobacteriaceae*. O plasmídeo construído para expressão do gene para a enzima quimérica também permite a clonagem de genes em operon com a enzima quimérica e em promotor individual, ampliando as possibilidades de seu uso na engenharia metabólica de microrganismos para consumo de glicerol e produção de BDO.

Palavras-chave: **Glicerol residual, 2,3-butanodiol, *E. aerogenes***

ABSTRACT

2,3-butanediol (BDO) is an organic compound with formula $C_4H_{10}O_2$ which has three stereoisomers, and that has been widely used in the manufacture of 1,3-butadiene, antifreeze additives, polyurethane foams, plastic polymers, liquid fuels and other chemicals usually produced from natural gas and crude petrol derivatives. Due to its diverse applications in the industry, the demand for BDO increases every year, and the overall potential market of BDO is around 32 million tonnes per year. All three stereoisomers of BDO can be produced by microorganisms consuming different reduced carbon sources as substrate. These microorganisms, especially *E. aerogenes* ATCC 13048, are capable of using other carbon sources for fermentation and BDO formation, with glycerol being of economic interest for it is the major residue of biodiesel production and currently is exported as a low-value compound. This project aims to identify genetic resources for consumption of glycerol and its conversion to dihydroxyacetone and production of 2,3-butanediol from pyruvate. The genes identified, present in the genome of *Klebsiella aerogenes* KCTC 2190 (synonym strain of *E. aerogenes* ATCC 13048) and its organization in operons and proximity to other related genes and metabolic pathways were used to develop a strategy of increasing the production of 2,3-butanediol from glycerol by constructing a fusion enzyme using synthetic biology. The fusion enzyme designed aims to confer an advantage on three bottlenecks for increasing the fermentative capacity of glycerol in BDO, the solutions for those bottlenecks being the increased consumption of glycerol in DHA, increased conversion of acetoin to BDO and the mutual recycle of NAD and NADH cofactors used in both pathways. The developed fusion enzyme was cloned in *Escherichia coli* DH5 α to evaluate its effect on glycerol consumption and biomass formation and production of BDO from acetoin. The crude extracts of *Escherichia coli* containing the fusion enzyme were evaluated in an enzymatic reaction to investigate their activity on the conversion of glycerol and conversion of acetoin to BDO. The developed fusion enzyme can be used in future studies involving its cloning in bacterial strains that already produce acetoin and BDO as the species of the family *Enterobacteriaceae*. The plasmid constructed for the fusion enzyme expression also allows the cloning of genes in the operon with the fusion enzyme and under an individual promoter, expanding the possibilities of its use in the metabolic engineering of microorganisms for consumption of glycerol and production of BDO.

key words: **residual glycerol, 2,3-butanediol, *E. aerogenes***

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores de biocombustíveis do mundo, sendo que possui uma indústria estabelecida de produção de biodiesel. Para a produção de biodiesel são utilizados óleos compostos principalmente de lipídios de origem vegetal e animal que passam por um processo de transesterificação utilizando-se um álcool metílico ou etílico e um catalisador enzimático, ácido ou alcalino. Como produto deste processo são obtidos ésteres metílicos e etílicos (biodiesel) e como subproduto grandes quantidades de glicerol residual.

O glicerol residual da produção de biodiesel apresenta baixo valor agregado por possuir grande teor de impurezas como sais, ésteres e óleos residuais que impedem a sua comercialização nas principais indústrias que o utilizam ou tornam sua comercialização dispendiosa por depender de equipamentos e técnicas custosas para purificação do glicerol bruto.

O glicerol residual pode ser utilizado em bioprocessos fermentativos ou em reações enzimáticas como fonte de carbono e energia, entrando na via de formação de piruvato pela sua conversão em DHA (Diidroxiacetona) e DHAP (Diidroxiacetona-fosfato). Desta forma, o glicerol pode ser utilizado na produção de componentes químicos de maior valor agregado.

Um destes componentes é o BDO, produzido a partir de piruvato por três conversões enzimáticas, e é um composto líquido inodoro e incolor que possui variadas aplicações nas indústrias de solventes, plásticos, aromatizantes e na produção de borracha sintética, podendo ser um substituinte de derivados de petróleo bruto e gás natural. BDO também possui valor calorífico comparável a outros combustíveis líquidos como metanol e etanol, o que o caracteriza como um biocombustível potencial.

O BDO é produzido por gêneros de bactérias fermentadoras facultativas como *Klebsiella* e *Enterobacter* quando em cultivo sob microaeração. O BDO é produzido a partir de piruvato, seguindo três conversões enzimáticas, a primeira envolve a síntese de α -acetolactato pela α -acetolactato sintase, utilizando duas moléculas de piruvato, em seguida o α -acetolactato é convertido em acetoína pela α -acetolactato descarboxilase e a acetoína convertida em BDO pela acetoína redutase, reciclando NADH em NAD.

Cepas de bactérias como *Escherichia coli* pela sua versatilidade genética e *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter aerogenes* pelas suas capacidades de produção de BDO vem sendo estudadas visando o aprimoramento de vias metabólicas para consumo de glicerol e produção de BDO. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver a partir de engenharia metabólica e biologia sintética uma enzima quimérica (cadeia peptídica contendo sequência de aminoácidos para duas enzimas distintas), visando aumentar o consumo de glicerol, a produção de BDO e manter o balanço de cofatores NAD e NADH em microrganismos fermentadores, estabelecendo-se os seguintes objetivos

específicos:

- analisar as sequências de genes envolvidos no metabolismo de glicerol e na conversão de piruvato em BDO no genoma de *Klebsiella aerogenes* KCTC2190 (accession number NCBI: NC_015663.1) para seleção dos genes de interesse para construção da enzima quimérica;
- construir inserto para expressão de enzima quimérica códon otimizada contendo os genes das enzimas selecionadas;
- clonar o plasmídeo sintético obtido em *Escherichia coli* DH5 α ;
- avaliar a indução de expressão da enzima quimérica em géis SDS-PAGE;
- avaliar as cepas transformadas quanto a sua capacidade de consumo de glicerol e produção de BDO em fermentação;
- avaliar o consumo de glicerol e acetóina e produção de BDO dos extratos celulares contendo a enzima quimérica em reações enzimáticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

O biodiesel é um biocombustível produzido a partir de triglicerídeos de óleos vegetais ou gordura animal, como óleos de soja, colza, palma e resíduos de óleo de cozinha, sendo que representa uma fonte renovável de energia em comparação com combustíveis de origem fóssil como os obtidos do craqueamento do petróleo ou o gás natural (CHHETRI; WATTS; ISLAM, 2008; LI; DU; LIU, 2008; SILVA; FREITAS, 2008). O biodiesel é composto primariamente por uma combinação de ésteres formados entre a ligação de um ácido graxo com um grupo álcool pequeno como o metanol ou etanol (CHHETRI; WATTS; ISLAM, 2008; LI; DU; LIU, 2008; SILVA; FREITAS, 2008). O processo de produção do biodiesel envolve a utilização de óleo vegetal ou óleos de variadas fontes em uma reação de transesterificação (SILVA; FREITAS, 2008).

As principais fontes de triglicerídeos utilizados na produção de biodiesel no Brasil são respectivamente: o óleo de soja (71,82%), a gordura bovina (15,03%) e óleos de diferentes origens, como óleo de cozinha usado (5,28%), gordura suína (4,75%) e gordura de aves (1,47%) (ANP, 2018). A transesterificação é o processo de formação de ligação éster entre um grupo álcool de moléculas como o metanol ou o etanol e o grupo carboxílico de ácidos graxos, como exemplificado na figura 1 (SILVA; FREITAS, 2008).

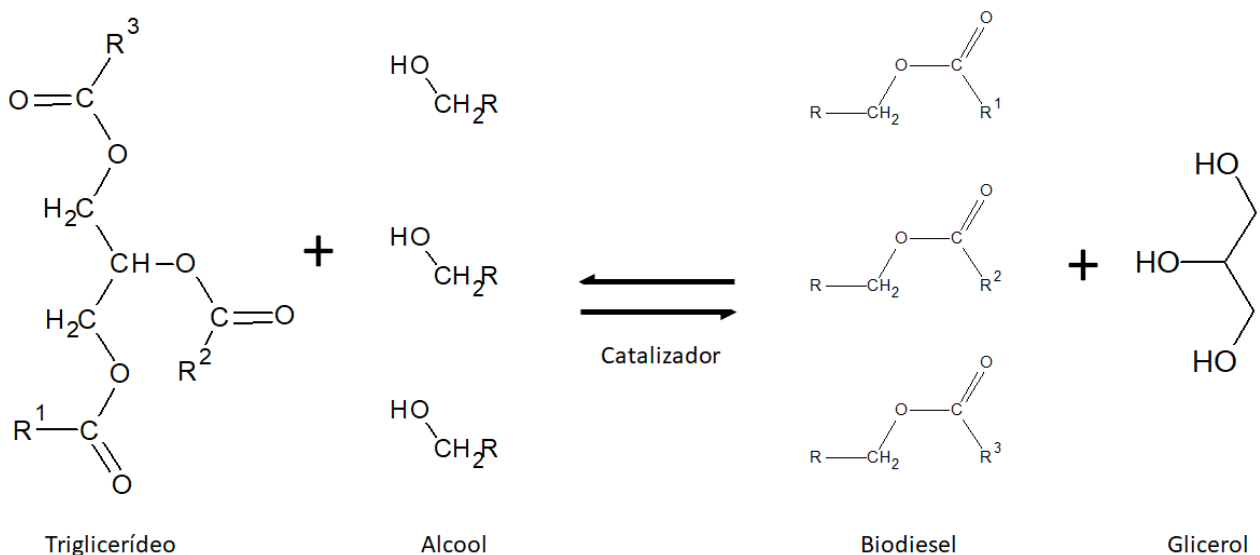


Figura 1. Representação do processo de transesterificação utilizando triglicerídeos de óleos e gorduras e um álcool para formação de ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol residual. (Adaptado de Li, Du e Liu (2008)).

As cadeias de ácidos graxos são provenientes de lipídios obtidos de óleos vegetais e gordura animal, sendo que no processo de transesterificação, os ácidos graxos ligados ao grupo glicerol, que formam os lipídios, são transferidos para uma ligação com o grupo álcool.

A reação ocorre sobre o efeito de um catalisador ácido ou básico como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Enzimas como lipases também podem ser utilizadas como catalisadores na transesterificação, evitando processos mais complexos para extração de glicerol e remoção de sais e outros resíduos da reação (DU et al., 2004; LI; DU; LIU, 2008; SILVA; FREITAS, 2008).

Como produtos finais da transesterificação obtém-se 10%(p/p) de glicerol residual, sendo que o glicerol residual obtido contém em média 85%(p/p) de glicerol ou glicerina puros, (YANG; A HANNA; SUN, 2012; ROMIO, 2014, KALIA; PRAKASH; KOUL, 2016). O biodiesel produzido em larga escala chega a representar 65% a 70% (p/p) da concentração final da reação de transesterificação (SIQUEIRA; COLUSSE; ZAPPAROLI, 2018), sendo que trabalhos como os de Cerro-alarcón et al. (2008) relatam que no processo de transesterificação as titulações finais de biodiesel podem chegar a 93-95% mol em processos otimizados.

2.2 Mercado do biodiesel

O biodiesel apresenta grande potencial como combustível renovável e sua produção vem sendo estudada desde as primeiras décadas do século XX. A produção de biodiesel pode ser realizada a partir de várias matérias-primas, catalisadores e tecnologias. No âmbito mundial, o Brasil se destaca como uma das primeiras nações a buscar a diversificação de suas fontes de energia e combustíveis, sendo que o biodiesel já é utilizado em mistura ao diesel de origem fóssil em concentração de 10% (SIQUEIRA; COLUSSE; ZAPPAROLI, 2018; BRASIL, 2018).

A planta industrial de biodiesel do Brasil é representada em sua grande maioria (71,14%) por unidades de produção em larga escala, sendo que as análises de mercado apontam que a produção brasileira de biodiesel aumentará em um ritmo maior do que o de etanol nos próximos anos (SIQUEIRA; COLUSSE; ZAPPAROLI, 2018).

No mundo, a produção de biodiesel é representada em sua maior parte pelos Estados Unidos, responsável por 15,9% da produção global, seguido pelo Brasil responsável por 12,9%, Alemanha 9,3% e França 7,9% (CARDOSO; SHIKIDA; FINCO, 2017).

Segundo o relatório Research And Markets (2017), um dos principais impulsionadores do mercado de biodiesel é o aumento da demanda por biocombustíveis. O mercado global de biocombustíveis deverá crescer a uma taxa de crescimento composto anual (CAGR) de 4,57% durante 2017 a 2021, o que impulsionará o crescimento do mercado global de biodiesel.

Com aumento da produção de biodiesel, também há o aumento na produção de seus subprodutos, em especial o glicerol, sendo que o glicerol pode ser utilizado em biorrefinarias para aumentar a rentabilidade de produção de biodiesel e diversificar as plantas industriais (LARI et al., 2018).

2.3 Glicerol

Com aumento da produção de biodiesel, também há o aumento na produção de seus subprodutos, o que representa um problema, em especial o glicerol, sendo que atualmente, a maior parte do glicerol obtido no processo de transesterificação é incinerado para produção de energia ou comercializado como matéria prima de baixo valor agregado (LARI et al., 2018).

Como uma alternativa, o glicerol pode ser utilizado em biorrefinarias para aumentar a rentabilidade de produção de biodiesel e diversificar as plantas industriais (LARI et al., 2018).

Glicerol é um composto orgânico, também conhecido como glicerina, 1,2,3-propanotriol (nomenclatura IUPAC), 1,2,3-trihidroxipropano, glicil-álcool ou gliceril, presente em vegetais e animais (LAGES; LUCAS, 1997; MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009; ROMIO, 2014). Apresenta massa molar de 92,09 g/mol e é caracterizado como um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico, solúvel em água e álcool e insolúvel em éter e clorofórmio (WANG et al., 2001; ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007; ROMIO, 2014).

O glicerol está presente em várias espécies de seres vivos e se encontra em geral na forma de triglicerídeos. Os triglicerídeos são ésteres de glicerol ligado a três cadeias de ácidos graxos (CHHETRI; WATTS; ISLAM, 2008; DU et al., 2004; LI; DU; LIU, 2008; SILVA; FREITAS, 2008, ROMIO, 2014).

O glicerol foi descoberto pelo farmacêutico Carl W. Scheele em 1779, obtido como resultado de uma reação de saponificação de azeite de oliva com óxido de chumbo (RIVALDI et al., 2008; MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009; KONG; AROUA; DAUD, 2016). Pasteur também relatou a formação de glicerol como um subproduto na fermentação de açúcares e produção de álcool em 1857 (KONG; AROUA; DAUD, 2016).

O glicerol residual obtido da transesterificação pode variar na sua composição, dependendo principalmente do tipo de catalisador utilizado na reação, a eficiência da transesterificação, eficiência na extração e separação do biodiesel e a presença de outras impurezas na matéria-prima utilizada (YANG; A HANNA; SUN, 2012). Segundo Hansen et al. (2009), de 11 amostras coletadas de glicerol residual, a presença de glicerol puro varia de 38% a 96%. De maneira geral, o glicerol residual apresenta impurezas como, álcool residual, óleo residual, ésteres residuais, sais de sódio e potássio,

compostos saponáceos e água que podem compreender até 62% do glicerol bruto obtido nos processos de transesterificação (CHHETRI; WATTS; ISLAM, 2008; DU et al., 2004; LI; DU; LIU, 2008; SILVA; FREITAS, 2008; YANG; A HANNA; SUN, 2012). A variabilidade da composição do glicerol residual observada por Hansen et al. (2009) está exemplificada na tabela 1 (HANSEN et al., 2009).

Tabela 1. Análise de composição de 11 amostras de glicerol bruto obtidas de diferentes indústrias de biodiesel. Adaptado de Hansen et al. (2009).

Amostras de diferentes indústrias	pH	Densidade (g/cm³)	Glicerol (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Metanol (%)	Matéria orgânica excluindo glicerol (%)
A	3,3	1,25	77	16,1	2,3	<0,01	4,6
B	5,4	1,25	94,8	2	0	<0,01	3,2
C	7,6	1,21	96,5	1,3	0	<0,01	1
D	9	1,07	38,4	0,3	4,2	0,14	57
E	2,3	1,2	61,1	2,5	29,4	0,23	6,8
F	10,6	1,13	66,7	0,2	2,9	11,4	18,8
G	10,8	1,12	64,5	0	3,4	13,94	18,1
H	2,7	1,25	83,4	10,7	1,5	0,18	4,2
I	2	1,26	76,1	11,7	3,5	1,83	6,9
J	2,4	1,25	74,5	14,3	4,6	0,55	6,7
K	8,6	1,19	63,4	1	5,6	4,72	25,3

O glicerol tem aplicações nas indústrias de cosméticos, de tintas, automotiva, de alimentos, farmacêutica, de papel, têxtil e de couro. A maior demanda se dá em produtos de higiene pessoal e alimentos, correspondendo a 64% da total (WANG et al., 2001; DHARMADI; MURARKA; GONZALEZ, 2006; MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

O glicerol residual da produção de biodiesel, subproduto obtido em grandes quantidades, mantém um crescimento constante e está previsto para alcançar uma produtividade mundial anual de 4 bilhões de litros em 2020 (NOMANBHAY; HUSSEIN; ONG, 2018). No Brasil, em 2016 foram produzidos 341911 m³ de glicerol residual (ANP, 2018). O constante aumento na produtividade vem diminuindo o preço do glicerol de forma drástica, criando um problema no seu descarte e comercialização (KALIA; PRAKASH; KOUL, 2016).

2.4 Glicerol como fonte de carbono e energia em processos fermentativos

Para produtores de biodiesel, o glicerol bruto gerado durante o processo de transesterificação é um subproduto e um potencial passivo financeiro e ambiental, para o qual as indústrias em operação são confrontadas com limitadas opções para sua utilização e descarte (JOHNSON; TACONI, 2007).

O aumento substancial do glicerol bruto criou a necessidade de converter rapidamente grandes quantidades de glicerol em produtos úteis. Embora a combustão de glicerol para produção de calor e energia seja uma solução que consuma grandes quantidades de glicerol, não é ideal do ponto de vista econômico (JOHNSON; TACONI, 2007). É desejável converter o glicerol em um produto químico de *commodities* de maior interesse econômico. Dessa forma, a conversão biológica de glicerol é uma alternativa de relevância para utilização e reaproveitamento deste subproduto e pode ser empregada na obtenção de compostos químicos de maior valor. No entanto, devido ao volume de glicerol a ser utilizado e a baixa eficiência dos processos de conversão biológica aplicadas, muito provavelmente técnicas mistas envolvendo a conversão de glicerol por catalisadores e por fermentação e conversão biológica deverão ser empregados para que biorrefinarias deste tipo se tornem viáveis (JOHNSON; TACONI, 2007).

O glicerol residual pode ser utilizado como fonte de carbono em processos fermentativos industriais em substituição a carboidratos como sacarose, glicose e amido, para a formação de compostos de interesse por via biológica, como o hidrogênio, etanol, BDO entre outros (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012; ROMIO, 2014). Bactérias e leveduras, em condições aeróbias e anaeróbias, são capazes de obter energia pela assimilação de glicerol e sua conversão em dihidroxiacetona e dihidroxiacetona-fosfato, precursores de entrada na via de formação de piruvato e que podem ser utilizados para produção de NADH e ATP (DILLS et al., 1980; ROSSI et al., 2012; ROMIO, 2014). Os possíveis produtos obtidos a partir de glicerol estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Relação de produtos obtidos a partir de glicerol por oxidação ou redução, dihidroxiacetona apresenta um valor aproximado de quatro a quarenta vezes o valor de mercado de glicerol e o 2,3-butanodiol de 5,5 vezes. Adaptado de Johnson e Taconi (2007).

Nome	Formula	Preço US\$/Kg
Glicerol	C ₃ H ₅ O ₃	aprox. 0,1 a 1,00

ácido Tartrônico	C ₃ H ₃ O ₃	N/A
dihidroxiacetona	C ₃ H ₆ O ₃	aprox. 4,00
ácido mesoxálico	C ₃ H ₂ O ₅	Provavelmente alto, aplicações na industria farmaceutica, anti-HIV
gliceraldeído	C ₃ H ₅ O ₃	N/A
ácido glicérico	C ₃ H ₆ O ₄	Provavelmente alto, aplicações na industria farmaceutica
ácido malônico	C ₃ H ₄ O ₄	aprox. 28,00
ácido hidroxipirúvico	C ₃ H ₄ O ₄	Alto, usado na produção de aminoácidos
ácido láctico	C ₃ H ₆ O ₃	Aprox. 1,4 a 1,7
ácido pirúvico	C ₃ H ₄ O ₃	Alto
propilenoglicol	C ₃ H ₈ O ₂	Aprox. 0,88 a 2,00
ácido propiônico	C ₃ H ₆ O ₂	Aprox. 0,92 a 1,24
Glicidol	C ₃ H ₆ O ₂	Aprox. 22000,00
ácido acrílico	C ₃ H ₅ O ₂	Aprox. 0,9 a 2,02
propanol	C ₃ H ₈ O	Aprox. 1,04
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	Aprox. 0,56 a 0,98
acetona	C ₃ H ₆ O	Aprox. 0,27 a 0,85
óxido de propileno	C ₃ H ₆ O	Aprox. 1,28 a 1,59
propionaldeído	C ₃ H ₆ O	Aprox. 0,8
Álcool alílico	C ₃ H ₅ O	Aprox. 2,00
Acroleína	C ₃ H ₄ O	Aprox. 1,28
1,3-Propanodiol (*)	C ₃ H ₈ O ₂	Aprox. 0,5 a 2,8
2,3-butanodiol (#)	C ₄ H ₁₀ O ₂	Aprox. 5,5

(*) 1,3-Propanodiol, obtido pelo processo de desidratação do glicerol. (#) 2,3-butanodiol (BDO) obtido pela condensação de duas moléculas de piruvato e sua subsequente descarboxilação e redução, BDO pode ser obtido em processos fermentativos utilizando glicerol.

Considerando as vias microbiológicas de conversão de glicerol como única fonte de carbono, as opções são de certa forma limitadas. Várias espécies de leveduras, fungos e outros microrganismos podem utilizar glicerol como fonte de carbono, porém a maior parte do substrato consumido é convertido em biomassa celular e proteínas para homeostase destes organismos. Espécies de *Yarrowia*, *Candida* e *Rhodotorula* vêm sendo estudadas para produção de ácido cítrico, soforolipídios e óleos (JOHNSON; TACONI, 2007; ASHBY et al., 2005; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002). Glicerol também pode ser degradado anaerobicamente em metano e gás carbônico por via de acidogênese e metanogênese. *E. aerogenes* também vem sendo estudada para produção de hidrogênio e etanol, porém a inibição por substrato em concentrações superiores de 25g/L de glicerol ocasionou uma diminuição drástica na obtenção destes produtos, limitando seu uso para este fim (JOHNSON; TACONI, 2007; ITO et al., 2005).

Assim como outras moléculas sem carga, o glicerol pode atravessar a membrana plasmática de microrganismos por difusão facilitada. O glicerol então é convertido em glicerol-3-fosfato pela enzima glicerol quinase, o glicerol-3-fosfato fica aprisionado no interior da célula para posteriormente

ser metabolizado.

O glicerol também apresenta potencial como substrato na sua bioconversão por espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae, como *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. Foi observada a obtenção de quantidades significativas de 1,3-propanodiol, ácido acético, ácido butírico, butanol, acetona, etanol, ácido lático, ácido succínico, formato, hidrogênio e 2,3-butanodiol. Espécies do gênero *Klebsiella* apresentam uma maior tolerância a altas quantidades de glicerol e são capazes de produzir 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol (JOHNSON; TACONI, 2007).

Para microrganismos como *E. aerogenes* e *K. aerogenes*, em condições de microaeração, grande parte do glicerol é convertido em 2,3-butanodiol (JI; HUANG; OUYANG, 2011; GIRARDI, 2014). A conversão de glicerol em 2,3-butanodiol envolve a entrada de glicerol na célula por uma proteína facilitadora de difusão de membrana, seguido de sua conversão em dihidroxiacetona e dihidroxiacetona-fosfato sendo que estes são convertidos em piruvato pela via glicolítica. Por sua vez, duas moléculas de piruvato são utilizadas para conversão em 2,3-butanodiol por três passos enzimáticos (LU et al., 2016; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

2.5 2,3-butanodiol (BDO)

O BDO é um composto quiral, que também é conhecido como 2,3-butilenoglicol ou 2,3-dihidroxibutano. Sua fórmula química é $C_4H_{10}O_2$, possui massa molecular de 90,12 g/mol e valor calorífico de 27,198 J/g. Se apresenta como um líquido incolor e inodoro (SYU, 2001). BDO existe em três formas isoméricas, sendo que a sua forma de apresentação vai depender do microrganismo produtor. Os três estereoisômeros também apresentam pontos de ebulição diferentes que variam de 168°C a 182°C, todos acima do ponto de ebulição da água e o levo-isômero de BDO possui baixa temperatura de congelamento de aproximadamente -60°C. As três formas isoméricas de BDO estão representadas na Figura 2 (JI; HUANG; OUYANG, 2011; FAGHIIH-MIRZAEI et al., 2016; GIRARDI, 2014).

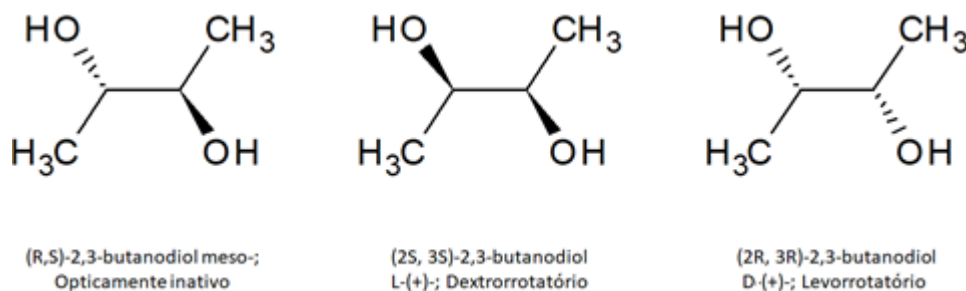


Figura 2 - Estereoisômeros de BDO. Adaptada de Ji, Huang e Ouyang (2011) e Faghieh-mirzaei et al. (2016).

2.5.1 Aplicações de BDO na indústria.

O BDO pode ter variados usos na indústria, seu levoisomero, por possuir baixo ponto de congelamento é utilizado como anticongelante (GARG; JAIN, 1995; SYU, 2001; CELIŃSKA; GRAJEK, 2009; GIRARDI, 2014). BDO também possui valor calorífico comparável ao de combustíveis líquidos como o metanol (22,081 J/g) e o etanol (29,055 J/g), indicando a possibilidade de sua utilização como biocombustível (FLICKINGER, 1980).

Outras aplicações incluem a produção de solventes utilizados na indústria de plásticos. O composto diacetil, fruto do processo de desidrogenação de BDO é utilizado como aromatizante, por atribuir sabor amanteigado em produtos alimentares (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2004).

O processo de desidratação de BDO resulta na produção de metil-etil-cetona, composto utilizado em resinas, vernizes e como aditivo de combustíveis. A esterificação de BDO leva à formação de precursores de espumas de poliuretano para uso em variados produtos cosméticos e farmacêuticos (GARG; JAIN, 1995; GIRARDI, 2014). Os usos de BDO e seus derivados estão representados na Figura 3.

Em estudos recentes foi observada a capacidade de indução de fechamento estomatal em plantas por presença de acetoína ou BDO no solo próximo a raiz, ampliando a aplicação do BDO para agroindústria como um potencial agente preventivo (WU et al., 2018).

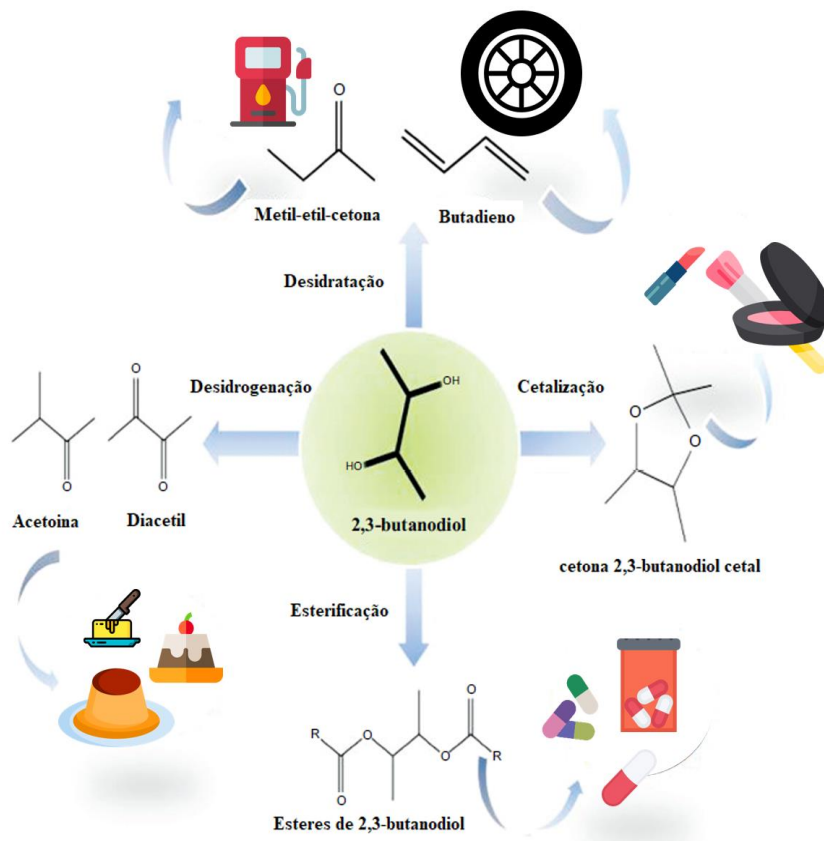


Figura 3. Aplicação e usos do butanodiol em variadas indústrias (Adaptado de Parate et al., 2018).

2.6 Produção bacteriana do 2,3-butanodiol

Segundo Ji, Huang e Ouyang (2011) e Girardi (2014), a produção microbiológica de BDO vem sendo estudada e desenvolvida por mais de cem anos sendo que as primeiras pesquisas de produção deste composto foram realizadas em 1906 por Harden & Walpole, que utilizaram uma cepa de *Aerobacter aerogenes* (atualmente identificada como *Klebsiella pneumoniae*) para a produção de BDO a partir de glicose e manitol.

O interesse na produção fermentativa de BDO foi intensificado durante a segunda guerra mundial por haver escassez de matérias-primas para produção de borracha que era amplamente utilizada nos esforços de guerra das nações beligerantes. O principal objetivo era a obtenção de 1,3-butadieno, composto intermediário na produção de borracha sintética. O interesse diminuiu após o período de guerra pois a obtenção de 1,3-butadieno a partir de derivados de petróleo se tornou mais atrativa por ter um custo menor (CELIÍNSKA; GRAJEK, 2009; GIRARDI, 2014).

Com o aumento nos preços do petróleo na década de 1970, houve um novo aumento no

empenho para a produção de BDO a partir de fermentação microbiana (JI; HUANG; OUYANG, 2011).

À medida que as reservas de petróleo bruto se tornam cada vez mais escassas, os sistemas de biorrefinaria que integram processos e equipamentos de conversão de biomassa para produzir combustíveis, energia e produtos químicos a partir de recursos renováveis estão sendo implementados em vários países, sendo que a indústria de biorrefinarias ainda se encontra em seus estágios iniciais. Muitos compostos que só poderiam ser produzidos por processos químicos tradicionais estão passando a ser gerados biologicamente, usando recursos renováveis (DANNER; BRAUN, 1999; HATTI-KAUL et al., 2007; GIRARDI, 2014).

2.6.1 Estratégias para produção de BDO a partir de glicerol

O glicerol é um substrato de interesse para conversão em BDO por possuir baixo custo e servir como fonte de carbono e energia, conforme descrito anteriormente. Entretanto os processos ainda não alcançaram custo benefício suficiente devido a baixas quantidades de obtenção de BDO, altos custos de *downstream*, separação e purificação e inibição por produção de compostos acídicos. Estas dificuldades tornam necessária a busca por cepas de microrganismos capazes de produzir BDO eficientemente a partir de glicerol e que pertençam a classe I de biossegurança, assim como a utilização de técnicas de engenharia metabólica e biologia sintética que garantam uma diminuição dos efeitos inibitórios de glicerol, acetoína e 2,3-butanodiol e um balanço redox intracelular para acelerar os processos de obtenção de BDO, e que impeçam ou diminuam a obtenção de subprodutos por desvios de rotas metabólicas no consumo de glicerol. Existem relatos bem estabelecidos em que se utilizam diferentes fontes de carbono como glicose ou melão de milho para produção fermentativa de BDO (JANTAMA et al., 2015; WANG et al., 2010;), entretanto existem poucos estudos descrevendo o uso de glicerol para tal finalidade (PARATE; RODE; DHARNE, 2018).

Petrov e Petrova (2009) estudaram uma série de processos fermentativos de batelada alimentada utilizando uma cepa isolada de *K. pneumoniae* que mostrou resistência a acidificação do meio, mesmo tendo glicerol como única fonte de carbono a uma concentração de 30g/L. Previamente, glicose era utilizada como única fonte de carbono e o uso de glicerol necessitava adição de sacarose como co-substrato.

Petrov e Petrova (2010) ainda investigaram a influência de variações no pH partindo de 30 g/L de glicerol como substrato e obtiveram 70 g/L de BDO com controle do pH inicial do meio, sendo que sem o controle, alcançaram titulações de 52,5g/L de BDO em fermentações do tipo batelada alimentada (PETROV; PETROVA, 2010; PARATE; RODE; DHARNE, 2018). Petrov e Petrova

(2010) também identificaram que o pH era um dos fatores mais importante afetando a mudança do metabolismo de *K. pneumoniae* da produção de ácido acético para produção de 2,3-butanodiol, sendo que o metabolismo e formação de 2,3-butanodiol são resultado de mecanismos de adaptação à mudança de pH e acidificação do meio.

O glicerol também apresenta efeito inibitório quando em altas quantidades em processos fermentativos. O problema de inibição por substrato pode ser contornado pela utilização de fermentações do tipo batelada alimentada. Estudos desenvolvidos por Cheng et al. (2004) envolvendo fermentações combinadas aeróbicas e anaeróbicas do tipo batelada alimentada obtiveram produções finais de 70g/L de 1,3-PDO e 16 g/L de BDO utilizando de 15 a 40 g/L de glicerol como substrato (CHENG et al., 2004).

Mu et al. (2006) realizaram estudos em frascos sob agitação e em fermentação do tipo batelada alimentada em condições anaeróbicas de *Klebsiella pneumoniae* DSM2026 em que foram obtidos 51,3 a 61,9 g/L de 1,3-PDO e 5,3g/L de BDO, com formação de ácido acético e etanol (MU et al., 2006). Fermentações em batelada alimentada, apesar de ainda não garantirem uma produção economicamente viável de compostos de interesse a partir de glicerol, apresentam vantagens às alternativas existentes, sendo que em fermentações de batelada se observa uma baixa produção volumétrica e em fermentações contínuas alimentadas, a concentração de BDO obtida é baixa, o que encarece sua extração e purificação em processos de downstream e levam a maior desperdício do substrato (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009).

Portanto, apesar dos avanços realizados, ainda é necessário desenvolver métodos para total consumo do glicerol como substrato e produção eficiente de compostos de alto valor agregado (PARATE; RODE; DHARNE, 2018). Sistemas otimizados ainda podem ser utilizados em estudos envolvendo cepas de microrganismos modificados ou melhorados (PARATE; RODE; DHARNE, 2018).

Em fermentações de batelada sob condições aeróbicas, *K. variicola* SRP3 foi capaz de converter 50g/L de glicerol em 25,33 g/L de BDO com uma atividade de 558,2 umol/min/mg da enzima glicerol desidrogenase. *K. variicola* SRP3 foi utilizada em um processo de seleção em cultivos com concentrações ascendentes de glicerol, alcançando a concentração de 200g/L. A cepa obtida por este processo de seleção, denominada pelos autores *K. variicola* SRM3 apresentou 721,5 unidades/mg de atividade enzimática para glicerol desidrogenase, um aumento de 1,3 vezes, alcançando uma concentração final de 29,87 g/L de BDO. Esta é a maior concentração de BDO alcançada em cultivos de batelada e a maior quantidade relatada por Rahman e Ma (2015) com 100% de consumo de glicerol após 120 horas (RAHMAN; MA, 2015; PARATE; RODE; DHARNE, 2018). A relação dos estudos recentes em fermentação de batelada alimentada e as cepas bacterianas utilizadas estão descritas na

Tabela 3.

Tabela 3. Descrição de estudos recentes utilizando diferentes cepas bacterianas em cultivo de batelada alimentada em diferentes condições e com suas respectivas produções de BDO em g/L. Adaptado de Parate, Rode e Dharne (2018).

Cepa bacteriana	pH inicial	Temp. (°C)	Agitação (rpm)	Substrato glicerol (g/L)	Tempo de fermentação (h)	Condição de aeração	Produção de BDO (g/L)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> G31	8	37	200	30	280	condição aeróbia	49,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> G31	não descrito	37	200	30	150	condição aeróbia	70
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	não descrito	37	150	20	68	condição aeróbia	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	não descrito	37	150	20	68	condição combinada aeróbia e anaeróbia	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 2026	7	37	200	40	32	condição anaeróbia	5,3
<i>Klebsiella variicola</i> SRP3	5	35	200	50	96	condição aeróbia	25,3
<i>Klebsiella variicola</i> SRP3 geneticamente melhorada	5	35	200	50	96	condição aeróbia	29,8
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B10-127 $\uparrow dhaD$; $\uparrow budC$; <i>PbdhA-alsR</i>	6,5	37	180	20 a 50	88	condição aeróbia	103
<i>Klebsiella oxytoca</i> M3 Δlha ; $\Delta pduC$	7	30	200	35 a 40	160	Condição não descrita	131,5

*(Δlha ; $\Delta pduC$) deleção dos genes lactato desidrogenase *ldha* e glicerol desidratase *pduC*. ($\uparrow dhaD$; $\uparrow budC$; *PbdhA-alsR*) superexpressão plasmidial dos genes para glicerol desidrogenase *dhaD* e acetoína redutase *budC*; *PbdhA-alsR* representa a expressão do regulador transcricional de acetoína e glicerol ALSR (indutor de expressão dos genes de metabolismo de piruvato em BDO) sob promotor de expressão moderada *PbdhA*.

Levando em consideração que um processo fermentativo é um sistema de múltiplas variáveis, a otimização de parâmetros é fundamental na otimização de processos produtivos.

Pesquisas envolvendo engenharia metabólica de microrganismos para produzir BDO também já foram desenvolvidas. Yang et al. (2015) desenvolveram uma estratégia manipulando o fluxo de carbono para produção de BDO em *Bacillus amyloliquefaciens* por método fermentativo em dois estágios, com controle de pH e oxigênio dissolvido. Superexpressão da enzima de regeneração NADH / NAD⁺ permitiu minimizar eficientemente a obtenção de subprodutos e levar ao aumento da produção de BDO, alcançando titulação de 102,3 g/L (YANG et al., 2015).

Wang, Tao e Xu (2014) clonaram os genes *dhaD* e *gldA*, ambos genes para glicerol desidrogenases, de *Klebsiella pneumoniae* em *Escherichia coli*. Eles afirmam que a glicerol desidrogenase (DhaD) de *Klebsiella pneumoniae* desempenha um duplo papel na metabolização de glicerol e formação de BDO, sendo que esta enzima é capaz de atuar como glicerol desidrogenase e acetoína redutase em *K. pneumoniae* (WANG; TAO; XU, 2014). Estudos semelhantes foram

realizados por Cho et al. (2015) em que foi realizada engenharia metabólica de *Klebsiella oxytoca* M3 em que os genes *pduC* (glicerol desidratase) e *ldhA* (lactato desidrogenase) foram deletados, levando a uma redução na formação de 1,3-PDO e ácido lático. A cepa mutada apresentou produção de 131,5 g/L de BDO (CHO et al., 2015). Pelo aprimoramento da via oxidativa e supressão da via redutiva, os problemas associados com a fermentação de diferentes ácidos devem ser contornados. Uma das alternativas que podem ser exploradas para aumento na produção de BDO é clonar enzimas que possam realizar o reciclo de cofatores, deleção de genes que levam ao desvio de piruvato para outras rotas e aumento na expressão de genes envolvidos no consumo do substrato (PARATE; RODE; DHARNE, 2018).

Além disso, estereoisômeros puros de diol também podem ser obtidos a partir de engenharia genética e biologia sintética (UI et al., 2004; FU et al., 2016). Assim sendo, processos eficientes e de baixo custo precisam ser desenvolvidos para minimizar desvios na formação de produtos secundários e para alcançar larga escala produtiva de BDO (PARATE; RODE; DHARNE, 2018).

2.7 Genoma de *E. aerogenes* ATCC 13048

Enterobacter aerogenes ATCC 13048, cepa sinônimo de *Klebsiella aerogenes* KCTC 2190, é uma bactéria gram-negativa anaeróbia facultativa que produz preferencialmente hidrogênio sob condições estritamente anaeróbias e que se torna produtora de BDO quando em fermentação estimulada por microaeração. Seu genoma foi sequenciado e publicado em 2012 na revista “Journal of Bacteriology” sob o título “Complete Genome Sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190”, seu genoma completo é composto por um cromossomo circular de aproximadamente 5.280 Kpb (quilo pares de base) contendo 54,8% de GC, 4.912 ORFs (*open reading frames*), sendo destes, 84 tRNAs e 25 rRNAs. Um total de 3.824 genes (77,85% do total) têm suas possíveis funções atribuídas com base em anotações (SHIN et al., 2012).

2.7.1 Metabolismo de glicerol por *E. aerogenes*

O glicerol é transportado para o interior da célula por ação de proteínas facilitadoras de difusão de glicerol e classes de aquaporinas específicas para trióis (HOHMANN et al., 2000; TREFZ et al., 2018; VOEGELE; SWEET; BOOS, 1993). A entrada de glicerol é citada como o único exemplo de transporte mediado por difusão facilitada em *E. coli* (VOEGELE; SWEET; BOOS, 1993). O glicerol pode ser metabolizado de forma aeróbia e anaeróbia por várias espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter* e outros microorganismos da família *Enterobacteriaceae* (GARG; JAIN, 1995).

Pela via oxidativa, glicerol é convertido em dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.6) utilizando como coenzima NAD^+ e em seguida dihidroxiacetona é fosforilada em dihidroxiacetona-fosfato pela enzima dihidroxiacetona quinase (EC 2.7.1.29), utilizando uma molécula de ATP. Dihidroxiacetona-fosfato é uma molécula que participa da via metabólica de formação de piruvato, que pode ser utilizado para síntese de outras moléculas do metabolismo bacteriano ou como fonte de energia (PARATE; RODE; DHARNE, 2018).

O glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato pela enzima glicerol quinase, utilizando uma molécula de ATP, evitando sua saída e difusão pela membrana, em seguida, glicerol-3-fosfato pode ser convertido em dihidroxiacetona-fosfato pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, utilizando como coenzima uma molécula de NAD^+ (ZHANG; SHANMUGAM; INGRAM, 2010; RIVALD et al., 2008; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; KAUR; SRIVASTAVA; CHAND, 2012).

Pela ação da enzima glicerol desidratase o glicerol também pode ser convertido em 3-hidroxipropionaldeído com a perda de uma molécula de água. Por sua vez 3-hidroxipropionaldeído pode ser convertido em 1,3-propanodiol pela enzima 1,3-propanodiol oxidoreductase utilizando cofator NADH (PARATE; RODE; DHARNE, 2018; RIVALD et al., 2008; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; KAUR; SRIVASTAVA; CHAND, 2012).

Todas as enzimas supracitadas e as vias metabólicas com seus produtos finais estão representados na Figura 4.

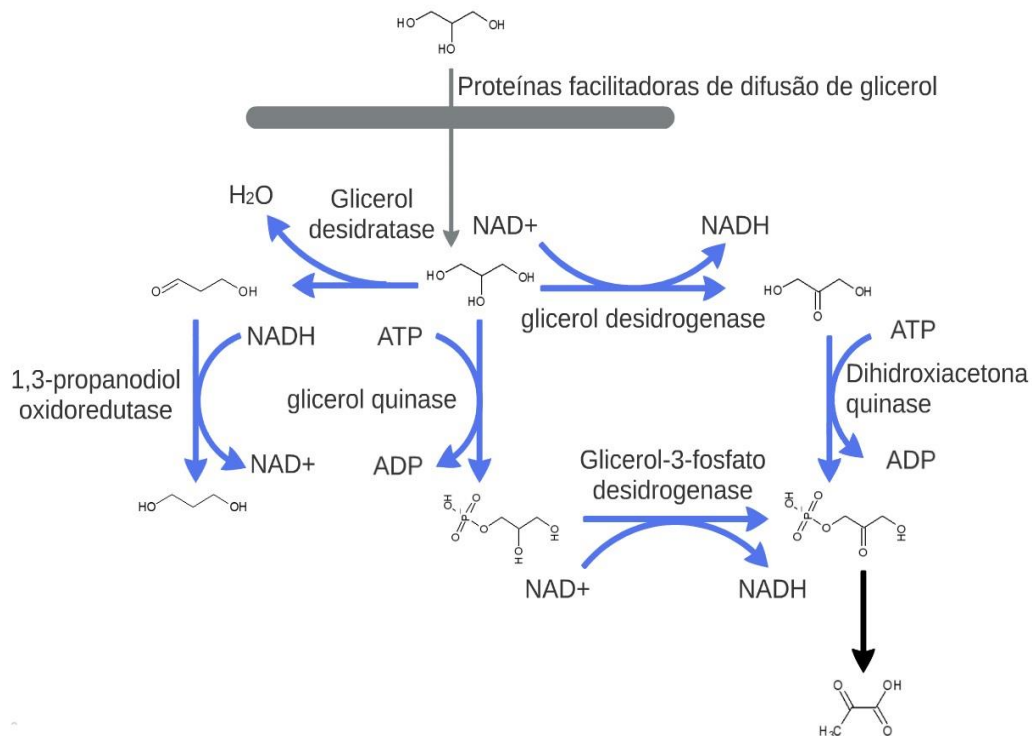


Figura 4. Vias metabólicas de conversão de glicerol em *E. aerogenes*. O glicerol é transportado para o interior da célula por proteínas facilitadoras de difusão de glicerol. O glicerol pode ser convertido

em 1,3-propanodiol por uma enzima desidratase e uma oxidoreductase. O glicerol pode ser convertido em G3P por uma quinase ou em DHA por uma desidrogenase. G3P pode ser utilizado no metabolismo e formação de fosfolípidos de membrana ou convertido em DHAP por uma desidrogenase, DHA pode ser convertida em DHAP por uma quinase. DHAP é uma molécula de entrada na via de produção de piruvato. Adaptado de Rivaldi et al. (2008), Silva et al. (2009), Kaur, Srivastava e Chand (2012) e Kanehisa Laboratories, (2017).

2.7.2 Produção de BDO por *Enterobacter aerogenes*

Os genes envolvidos na síntese de 2,3-butanodiol encontram-se organizados em um operon contendo da região 5' para 3' os genes *budA*, *budB* e *budC*. Os genes *budA*, *budB* e *budC* estão organizados de forma diferente a sua organização nos passos enzimáticos de produção de BDO. O primeiro gene do mRNA resultante da transcrição, *budA*, é traduzido para acetolactato descarboxilase, responsável pelo passo de conversão de α -acetolactato em acetoína. O segundo gene, *budB*, está separado por um possível RBS de 9 nucleotídeos de *budA* e é traduzido em acetolactato sintase, responsável pela primeira etapa de conversão de piruvato em BDO, a conversão de duas moléculas de piruvato em uma molécula de α -acetolactato. O terceiro gene presente no mRNA, *budC*, está separado de *budB* por um possível RBS de 22 nucleotídeos e é traduzido em acetoína redutase, responsável pela conversão de acetoína em BDO. A ordem de separação dos genes em operon pode influenciar seu nível de tradução, sendo que os primeiros genes presentes no mRNA podem possuir um nível de tradução maior. O tamanho das regiões de ligação ribossomal também podem estar envolvidas no nível de tradução dos genes em um operon (KANEHISA LABORATORIES, 2018; NCBI, 2017; SHIN et al., 2012).

O gene *budB* é responsável pela produção da enzima α -ALS, que converte duas moléculas de piruvato em uma molécula de α -acetolactato em uma reação irreversível. α -acetolactato é o primeiro composto a entrar na via de produção de BDO, existem vinte cópias de genes relacionados a produção de α -acetolactato no genoma de *E. aerogenes* sendo que *budB* é o segundo gene a ser traduzido no operon *budABC* (KANEHISA LABORATORIES, 2018; NCBI, 2017; SHIN et al., 2012).

A segunda reação é irreversível e realizada pela enzima produto do gene *budA*. *budA* é o primeiro gene a ser transcrito no operon *budABC* e não existem outras cópias anotadas com esta mesma função no genoma de *E. aerogenes*, sendo que a enzima produto é a única que *E. aerogenes* possui para realizar a reação de descarboxilação de α -acetolactato em acetoína (KANEHISA LABORATORIES, 2018; NCBI, 2017; SHIN et al., 2012).

A terceira e última reação é realizada pela enzima produto do gene *budC* acetoína redutase (BDH), que converte acetoína em BDO em uma reação reversível dependente do potencial redox no interior da célula utilizando NADH e produzindo NAD⁺ (KANEHISA LABORATORIES, 2018;

NCBI, 2017; SHIN et al., 2012). As reações estão exemplificadas na figura 5.

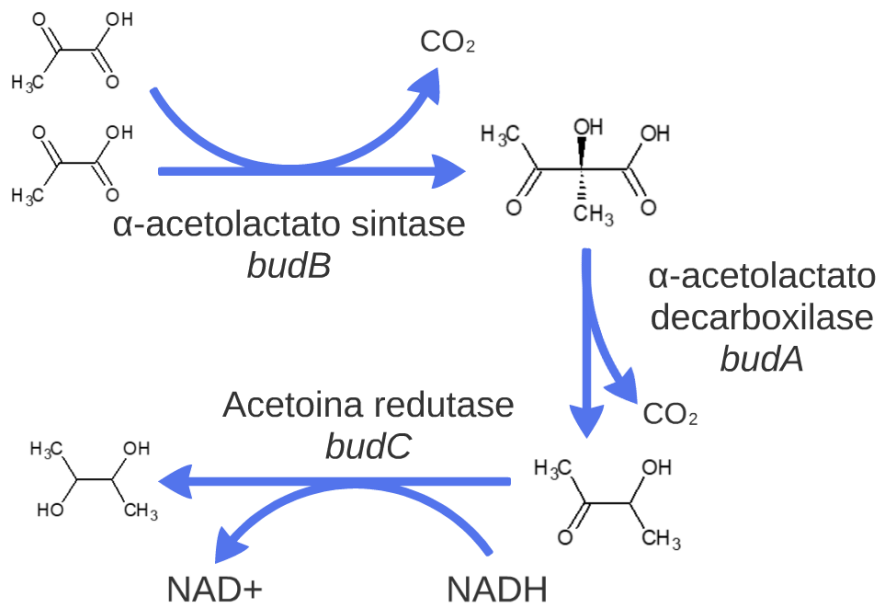


Figura 5. Via metabólica de conversão de piruvato em BDO de *E. aerogenes*, *K. aerogenes*. Adaptado de Rivaldi et al. (2008), Silva et al. (2009), Kaur, Srivastava e Chand (2012) e Kanehisa Laboratories, (2017).

Embora a produção biológica de acetoína ou BDO ofereça uma forma renovável e de baixo impacto ambiental para obtenção de seus derivados químicos, como butadieno e solventes como metil-etil-cetona, a viabilidade econômica de obtenção de BDO por via microbiológica é prejudicada por vários inconvenientes, sendo eles: baixo rendimento, formação simultânea de subprodutos e o alto custo de substrato e componentes de meios de cultivo. As principais abordagens para solução destes problemas envolvem a otimização de meios de cultivo e a otimização e engenharia metabólica de cepas bacterianas (YANG et al., 2017).

Considerando as abordagens de engenharia metabólica, os principais sistemas explorados envolvem: a otimização da via glicolítica e de formação de piruvato, adaptando a expressão de enzimas para acelerar a conversão de substratos como glicose e glicerol; a otimização da via de formação de BDO, pela clonagem e superexpressão dos genes acetolactato sintase, acetolactato decarboxilase e acetoína redutase e a expressão moderada de genes para reguladores transcricionais de genes relacionados à formação de BDO e a expressão ou substituição de genes específicos para acetoína redutase para produção de formas opticamente puras de BDO também vem sendo explorados; a expressão de enzimas para diminuir o efeito de desbalanço redox, como a expressão de genes como NADH oxidase, ou genes relacionados a via de síntese de nicotinamida; a deleção de

genes de desvio de piruvato para formação de lactato, acetato e etanol, e no caso de utilização de glicerol como substrato, a deleção do gene de formação de 1,3-propanodiol (YANG et al., 2017).

2.8 Engenharia metabólica

A engenharia metabólica é um campo tecnológico em expansão que visa modificar o sistema metabólico endógeno de um organismo para aproveitá-lo em uma tarefa biotecnologicamente útil como, por exemplo, a produção de um composto de interesse (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Tem sido um dos objetivos finais da biologia chegar ao mesmo nível conceitual e sintético alcançado na química, desde o princípio das pesquisas em “engenharia metabólica” desenvolvidas no início dos anos 90. No entanto, as células ainda estão longe de serem pequenas fábricas para obtenção de produtos químicos (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017; WOOLSTON; EDGAR; STEPHANOPOULOS, 2013), sendo que a engenharia metabólica continua sendo limitada na sua capacidade sintética, dependendo primariamente da transposição de vias metabólicas de um organismo para outro seguido por otimização desta via (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

A engenharia metabólica pode ser separada em cinco níveis, dependendo da complexidade das vias metabólicas desenvolvidas e das modificações realizadas nas suas enzimas (tabela 4).

Tabela 4. Níveis de engenharia metabólica (Adaptado de Erb, Jones e Bar-even (2017)).

Níveis	Definição	Característica típica	Exemplo
Nível 1	Otimização da via existente no organismo natural	knock-out ou superexpressão de genes originais no organismo natural	Ciclo de Calvin para fixação de CO ₂ : Superexpressão de transacetolase para aumentar o fluxo da via (LIANG; LINDBLAD, 2016).
Nível 2	Transferencia e troca de (sub-) vias conhecidas para um novo hospedeiro ou chassis	Vias naturais trocadas ou modificadas para maior eficiência nas reações realizadas	Transferencia do ciclo de Calvin para fixação de CO ₂ : Em <i>E. coli</i> para produção de açúcares a partir de CO ₂ (ANTONOVSKY et al., 2016).
Nível 3	Novas vias metabólicas criadas de reações conhecidas	Via não natural construída a partir de enzimas naturais	Via MOG para fixação de CO ₂ : recombinação de enzimas conhecidas em uma via sintética (BAR-EVEN et al., 2010).
Nível 4	Novas vias criadas a partir de novas reações baseadas em mecanismos e enzimas conhecidos	Via não natural contendo enzimas com especificidade ao substrato modificada	Ciclo CETCH para fixação de CO ₂ : recombinação de enzimas conhecidas e enzimas modificadas com novas especificidades de substrato e reação em uma via sintética (SCHWANDER et al., 2016).
Nível 5	Novas vias criadas a partir de novas reações baseadas em novas enzimas e mecanismos	Vias não naturais contendo enzimas de novo designed	Um ciclo de fixação de CO ₂ baseado em cofator Ni-Ga ainda não-desenvolvido contendo metaloproteínas artificiais ainda não desenvolvidas (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Em contraste com as estratégias exemplificadas na tabela 3, que são construídas baseadas em

vias metabólicas conhecidas e abordagens envolvendo o uso de diferentes enzimas com funções conhecidas de diferentes vias metabólicas são expressas em conjunto para criação de uma nova via metabólica sintética expandem as possibilidades de soluções envolvendo engenharia metabólica (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Nestes esforços, diferentes enzimas existentes, de diferentes organismos ou de diferentes vias metabólicas conhecidas e que podem ser responsáveis por um passo específico de uma nova via metabólica sintética são integradas para realizar uma determinada tarefa metabólica com maior eficiência ou nova funcionalidade (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017). Um exemplo recente é o de uma via desenhada para a biossíntese de propano a partir da glicose (KALLIO et al., 2014; ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017), uma via de glicólise não oxidativa para conservação total de carbono (BOGORAD; LIN; LIAO, 2013; ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017), ou vias artificiais C1 de assimilação de carbono projetadas pela recombinação livre de reações enzimáticas existentes, ainda que esta via ainda não tenha sido realizada experimentalmente (BAR-EVEN et al., 2010; BAR-EVEN, 2016; ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017). Tais esforços de design combinatório podem ser automatizados por programas de software (RODRIGO et al., 2008; CARBONELL et al., 2013; ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017), embora seja importante ter em mente que bancos de dados como KEGG não são completos em relação à literatura existente (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Para identificar os caminhos mais promissores dentre muitas rotas possíveis, uma análise abrangente das vias metabólicas existentes é recomendada (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017). Tal análise compara diferentes candidatos à via de acordo com suas propriedades físico-químicas, incluindo consumo de recursos e substrato, viabilidade termodinâmica, proficiência cinética, toxicidade e hidrofobicidade dos intermediários, bem como sobreposição com o metabolismo endógeno (BAR-EVEN et al., 2012; ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

2.8.1 Enzimas de fusão (enzimas quiméricas)

As enzimas são os principais participantes de um amplo portfólio de cascatas de reações complexas que organizam respostas aos estímulos ambientais, inter-celulares e intracelulares em todos sistemas vivos (ELLEUCHE, 2014).

Para permitir rotas de reação controláveis, a natureza desenvolveu várias soluções para aproximar fisicamente diferentes enzimas que participam em rotas metabólicas ou processos catabólicos integrados, incluindo compartimentos de reação subcelular, complexos associados a membranas em superfícies celulares e proteínas organizadas por *scaffold* ou aglomerados de proteínas, enzimas conjugadas e enzimas fusionadas (Figura 6) (ELLEUCHE, 2014).

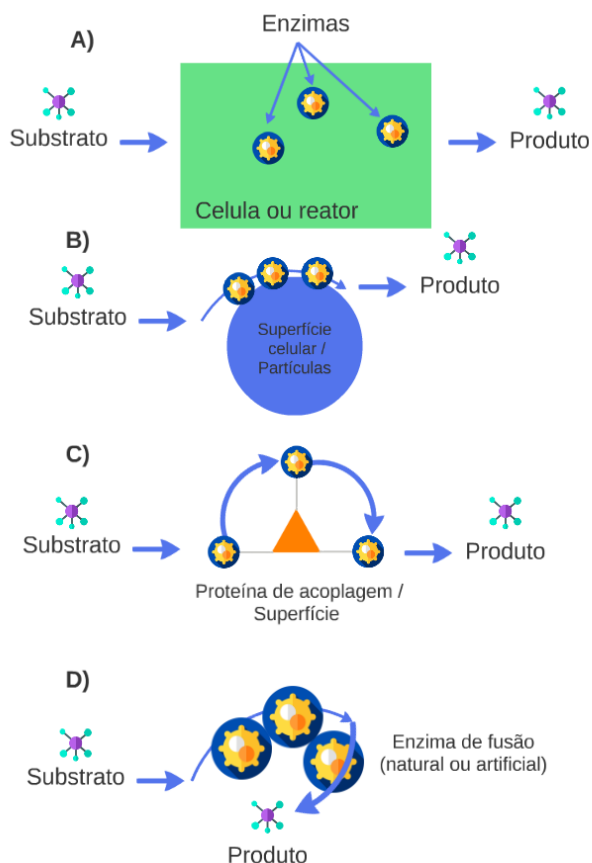


Figura. 6 Cascatas de reações acopladas em sistemas vivos como paradigmas para modelos artificiais. A) Ação combinada de três diferentes enzimas em um compartimento específico, como uma célula (natureza) ou em um reator de um único recipiente (sistema artificial) catalisa a conversão de um substrato para formação de um dado produto. B) As enzimas estão representadas na superfície celular, *cell-surface display*, (natureza) ou imobilizadas em partículas (sistema artificial). C) Enzimas são orientadas por uma proteína de suporte *scaffold*, como por exemplo em celulosomas (natureza) ou imobilizadas em uma superfície (sistema artificial). D) Uma enzima modular composta por três regiões ou domínios catalíticos (natureza) ou enzimas artificialmente fundidas (sistema artificial) catalisam três etapas de reação. Setas ilustram uma reação hipotética catalisada por três enzimas para converter um substrato em um produto. Adaptado de Elleuche (2014).

Enzimas naturais e recombinantes são rotineiramente produzidas e recicladas em sistemas celulares ou em reações industriais, e também são aplicadas em sistemas micelares (Figura 6A). A produção de *scaffolds* protéicos como celulosomas e xilanosomas são bem conhecidos e podem ser copiados e artificialmente modificados, por ligação cruzada ou imobilização de complexos multienzimáticos em superfícies ou partículas (Figura 6B, C). Outra abordagem que tem sido usada para diferentes propósitos em uma variedade de campos de pesquisa científica é a geração de proteínas acopladas com habilidades distintas por fusão genética ao nível de DNA ou fusão pós-translacional (Figura 6D). Neste contexto, sistemas enzimáticos modulares bi- ou multifuncionais

contêm capacidades catalíticas combinadas na mesma cadeia polipeptídica (ELLEUCHE, 2014).

Desde o desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante, quase todas as proteínas quiméricas desenvolvidas foram geradas pela tecnologia de fusão gênica em que dois peptídeos estão ligados entre si através da porção C-terminal da primeira proteína e N-terminal da segunda. Portanto, dois quadros de leitura abertos são geneticamente fundidos ao nível de DNA, resultando em um único transcrito contínuo de mRNA que codifica uma cadeia polipeptídica, sem elementos reguladores internos como códon de parada ou sítio de ligação ribossomal (RBS) das enzimas individuais (ELLEUCHE, 2014).

2.9 Biologia sintética

A biologia sintética é um novo termo para uma ideia antiga. Em seu livro de 1912, *The Mechanistic Conception of Life*, o biólogo alemão-americano Jacques Loeb propôs que os organismos vivos fossem considerados a partir de uma perspectiva de engenharia - não apenas como entidades “projetadas” pela evolução, mas como dispositivos passíveis de intervenção humana, manipulação e alteração (BALL, 2018).

Essa foi uma visão nascida em parte por pura ingenuidade. De onde vinha a vitalidade da vida havia sido um profundo mistério para os cientistas, mas apenas nas décadas seguintes à proposta de Loeb é que os biólogos começaram a perceber que as origens surgiam da capacidade da matéria viva de se organizar em escalas microscópicas e essa organização se mostrou incrivelmente complicada (BALL, 2018).

As esperanças de total compreensão dos mecanismos de herança de controle genéticos - a transmissão, a mutação e a tradução de informações codificadas no DNA - para levar a compreensão das células e os organismos em termos de sua maquinaria molecular deram lugar a uma apreciação da complexidade desconcertante dos sistemas vivos (BALL, 2018).

Mesmo assim, evidentemente podemos intervir na genética de maneiras que às vezes são previsíveis. Entende-se muito sobre como os genes tendem a funcionar em redes, regulando a atividade uns dos outros para direcionar o destino da célula. Essa análise dos genomas em termos de redes funcionais envolvendo *feedback*, *switching* e amplificação é aquela que soa familiar aos engenheiros, e as esperanças e sonhos da biologia sintética seguem em frente (BALL, 2018).

Dessa forma, a biologia sintética se caracteriza como um campo tecnológico emergente que envolve a construção orientada por engenharia de entidades biológicas cada vez mais complexas para novas aplicações. Os principais aspectos de uma abordagem de engenharia são a orientação para propósitos específicos, a percepção profunda dos princípios científicos subjacentes, uma hierarquia

de abstração incluindo interfaces adequadas entre e dentro dos níveis da hierarquia, padronização e separação entre projeto e fabricação. A biologia sintética investiga as possibilidades de implementar esses requisitos no processo de engenharia de sistemas biológicos (HEINEMANN; PANKE, 2006).

O advento da biologia de sistemas, o constante desenvolvimento de tecnologias fundamentais, como a síntese de novo de DNA (TIAN et al., 2004; HEINEMANN; PANKE, 2006), experimentos importantes, como o redesenho computacional de enzimas (DWYER, 2004; HEINEMANN; PANKE, 2006), a oportunidade de recombinar amplamente sistemas utilizando tecnologias como CRISPR-Cas9 (MAO, 2018), proteínas zinc-finger (DREIER et al., 2001; HEINEMANN; PANKE, 2006) e proteínas TALENs (WOOD et al., 2011) para reprogramar a especificidade do local de ligação ao DNA, e ainda a disponibilidade de sistemas regulatórios modelo bem definidos para o design de dispositivos moleculares inspirados em engenharia, fornecem uma base de conhecimento e tecnologia muito poderosa para a construção de novas entidades biológicas.

Aplicações encorajadoras vêm de áreas tão diversas quanto o desenho de redes de genes artificiais (SPRINZAK; ELOWITZ, 2005; HEINEMANN; PANKE, 2006), a refatoração de pequenos genomas (CHAN; KOSURI; ENDY, 2005; HEINEMANN; PANKE, 2006), a reprogramação de vias de sinalização (DUEBER, 2003; HEINEMANN; PANKE, 2006) ou engenharia metabólica (MARTIN et al., 2003; HEINEMANN; PANKE, 2006). Em conjunto, estas abordagens têm sido referidas como "biologia sintética".

2.10 *Escherichia coli* como *chassis* para biologia sintética e engenharia metabólica

A engenharia de organismos vivos, especialmente microrganismos, como bactérias, para obtenção de produtos úteis tem uma longa história, e tem sido um dos objetivos da biotecnologia desde seus primórdios. A insulina humana para o tratamento da diabetes foi primeiro expressa em bactérias *E. coli* geneticamente modificadas em 1979 e comercializada desde 1982 como a primeira droga licenciada produzida pela então nova tecnologia de DNA recombinante. Hoje, centenas de produtos farmacêuticos são obtidos por fermentação utilizando microrganismos modificados (BALL, 2018).

A bactéria *Escherichia coli* teve papel importante no desenvolvimento dos campos científicos da genética e biologia molecular. Dessa forma, a biologia sintética também vem sendo construída baseada no uso do *chassis E. coli*, sendo que este microrganismo continua a dominar os estudos neste campo (ADAMS, 2016).

No que diz respeito a este estudo proposto, *E. coli* se qualifica como uma cepa experimental modelo para aplicação dos conceitos discutidos até então visando a construção de novas estratégias

para obtenção de produtos de maior valor agregado como o BDO a partir de glicerol residual como fonte de carbono em processos fermentativos. *E. coli* pode ser utilizada para estudos prévios visando a aplicação destas estratégias em outros organismos *chassis* que são conhecidos produtores naturais de BDO como *K. pneumoniae* e *K. aerogenes*.

A bactéria *E. coli* é capaz de produzir quantidades vestigiais de acetoína, no entanto, não produz BDO. A principal limitação do uso de uma cepa de *E. coli* para a produção de BDO e acetoína é o fato de não possuir uma via metabólica de produção destes compostos, dessa forma, engenharia metabólica e biologia sintética são disciplinas a serem aplicadas na investigação e desenvolvimento de cepas de *E. coli* para produção de BDO (YANG et al., 2017).

Estudos visando o desenvolvimento de vias alternativas já vem sendo desenvolvidos. Em estudos recentes, foram clonados diferentes genes heterólogos relacionados a formação de BDO em plasmídeos controlados por diferentes promotores, assim como a deleção de genes de desvio de direcionamento da fonte de carbono utilizada como substrato. Como estratégia para clonagem e expressão de genes heterólogos, foram utilizados promotores com diferentes níveis de expressão, visando a melhor regulação nos níveis plasmáticos das enzimas clonadas, como *Pspac* (OLIVEIRA; NICHOLSON, 2015; YANG et al., 2017), *T7* e *Pabc* (XU et al., 2014; YANG et al., 2017), em *E. coli*. Genes de conversão de piruvato em BDO *budABC* de diferentes microrganismos foram clonados em *E. coli* para avaliar a produção de BDO. Além da clonagem heteróloga destes genes, a codon otimização para expressão em *E. coli* e adaptação de sítios de ligação ribossomal (RBS) resultou em um aumento na produtividade de BDO em 60,6% em cepas de *E. coli* modificada expressando estas vias metabólicas (PARK et al., 2014; YANG et al., 2017). Mazumdar, Lee e Oh (2013) deletaram múltiplos genes (*pflB*, *pta*, *adhE*, *frdA* e *ldh*) e expressaram um operon dos genes para α -acetolactato sintase, acetolactato descarboxilase e acetoína redutase em *E. coli*, produzindo 18,8 g / L de BDO e acetoína a partir de um substrato misto de glicose e manitol (YANG et al., 2017).

Utilizando *E. coli* como organismo *chassis* também foi possível realizar expressão de genes para a produção de (2R, 3R)-, (2S, 3S)- e meso- formas enantiomericamente puras de BDO (YANG et al., 2017).

Ui et al. (2004) introduziram três genes, respectivamente para, α -acetolactato sintase, α -acetolactato descarboxilase e acetoina redutase, de *K. pneumoniae* IAM 1063 em *E. coli* JM109. A *E. coli* modificada resultante produziu 17,7 g/L de meso-BDO (0,177 g/g de glucose) (UI et al., 2004; YANG et al., 2017). Lee et al. (2012) introduziram as enzimas acetolactato descarboxilase e acetoina redutase de *K. pneumoniae* KCTC2242 em *E. coli*, produzindo uma cepa capaz de converter competentemente glicose e glicerol em meso-BDO; alcançando máximo de 15,7 g/L de meso-BDO a partir de glicose (YANG et al., 2017). Nielsen et al. (2010) desenvolveram uma cepa de *E. coli*

sistematicamente modificada para aumento de produção de piruvato para facilitar a produção de acetoína, bloqueando as vias de geração de subprodutos, elevando os níveis de acetolactato intracelular e superexpressando *ilvBN* exógeno (codificando α -acetolactato sintase) de *E. coli* e *aldB* (codificando acetolactato descarboxilase) de *Lactococcus lactis*; a *E. coli* modificada foi capaz de produzir até 84,8 g/L de acetoína, com pequenas quantidades de meso-BDO. Por fim, a co-expressão de *bdh1* (que codifica acetoina redutase) de *Saccharomyces cerevisiae* aumentou a titulação final de meso-BDO para 1,12 g/L (YANG et al., 2017). Li et al. (2010) também projetaram uma linhagem de *E. coli* para a produção de meso-BDO utilizando uma estratégia semelhante, incluindo bloqueio de vias de subproduto e montagem de genes exógenos responsáveis pela formação de BDO. O título máximo de BDO alcançado foi de 14,50 g/L utilizando 1% de oxigênio dissolvido (YANG et al., 2017).

Utilizando um sistema de expressão induzível por biomassa, inserido no cromossomo, Nakashima, Akita e Hoshino (2014) construíram uma cepa de *E. coli* produtora de meso-BDO. Eliminaram os genes *ldh*, *adhE*, *pflB* e *ackA-pta* e introduziram o operon *alsSD* da estirpe 168 de *B. subtilis*. A cepa de *E. coli* recombinante (mlc-XT7-LAFC) sintetizou um máximo de 31 g/L de acetoína a partir de 66 g/L de glicose e 1,2 g/L de xilose (YANG et al., 2017). Nakashima, Akita e Hoshino (2014) então selecionaram um gene acetoína redutase *butA* de *L. lactis* NBRC100933 e o clonaram na cepa de *E. coli* modificada. O rendimento máximo de meso-BDO da cepa resultante foi de 54 g/L a partir de 99 g/L de glicose e 11 g/L de xilose (YANG et al., 2017).

Considerando os esforços supracitados, é possível afirmar que *E. coli* vem sendo utilizada para o desenvolvimento de biocatalisadores alternativos para produção de acetoína e BDO. Além de possuir uma taxa de multiplicação mais acelerada, sua genética é muito bem compreendida e muitas ferramentas de edição gênica foram desenvolvidas para este microrganismo (LI et al., 2010; YANG et al., 2017). Portanto, *E. coli* é um *chassis* heterólogo promissor para a produção em larga escala de acetoína e BDO (YANG et al., 2017) e para desenvolvimento de modelos de testes para estratégias que podem ser aplicadas em outros microrganismos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão separados em dois capítulos representando dois artigos que serão submetidos para publicação. O primeiro capítulo envolve o processo de prospecção de recursos genéticos para otimização do consumo de glicerol e produção de BDO. O segundo capítulo apresenta a construção e aplicação de uma estratégia visando aprimorar o processo de produção de BDO a partir de glicerol.

3.1. Capítulo I: Search and description of annotated genes related to glycerol and butanediol metabolism on *Klebsiella aerogenes* KCTC 2190: a search for genetic resources.

Mauricio Schiavo¹, Mauricio M. da Silveira², Sergio Echeverrigaray^{1*}

¹ Laboratory of Microbiology and Applied Biotechnology, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Laboratory of Bioprocesses, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

Abstract

The main by-product from biodiesel production is glycerol, a poly-alcohol molecule that can serve as a source of energy and carbon for microbial growth and employed for bioconversion for more valuable chemicals as 2,3-butanediol (BDO). One of the most studied species of microorganisms related to the production of BDO is *Klebsiella aerogenes* a microorganism that can use glycerol for growth and production of BDO. The genome of *K. aerogenes* KCTC 2190 (*K. aerogenes*) was sequenced in 2012 and was submitted on the NCBI database under the accession number NC_015663.1 by Shin, et al. (2012). The genome of *K. aerogenes* is characterized as a circular chromosome of approximately 5.28 million base pairs (bp). The genome of *K. aerogenes* can be used as a source of genetic resources aiming to increase the consumption of glycerol and conversion of pyruvate on BDO, these genetic resources can be used for the development of metabolically engineered microorganisms aiming higher production of fine chemicals based on

glycerol as carbon source. In this work, an extensive search for *K. aerogenes* annotated genes related to glycerol transport and conversion to precursors of the pyruvate forming pathway was performed as well as a search for genes annotated for pyruvate to acetoin and BDO production. After these genes were identified, a second search was performed to find other genes that express proteins from the same family as the proteins for glycerol and BDO metabolism. A total of 25 genes for glycerol metabolism and 13 genes for acetolactate, acetoin, and BDO metabolism were identified, and more 39 genes that express proteins of related families. The possible organization of genes in operons and close by to other genes of interest were assessed and displayed on this article, showing an interesting organization and a relation between glycerol and BDO metabolism. The genes described in this paper can be studied as genetic resources to be used on future metabolic pathway constructions and improvements on glycerol consumption and BDO production.

Key-words: *Klebsiella aerogenes*; genetic resources; glycerol; 2,3-butanediol

Introduction

Glycerol is a renewably obtained compound, present in lipids of plants and animals. It is a by-product of biodiesel production and glycerol supply is predicted to increase as most nations look for diversify their energy production systems with renewable options [1-4]. Glycerol can serve as carbon source for microbial growth and bioconversion into more valuable fine chemicals such as 2,3-butanediol [1][5], 2,3-butanediol having a variety of applications in the industry, ranging from the rubber and methyl ethyl ketone production to applications on food and pharmaceuticals [1][6] [7]. Recently, it has become of interest to pursue metabolic engineering of microorganism aiming at a faster growth, substrate consumption and product of interest formation [1]. Most of the attempts to develop new routes for increased product formation have been explored, in which heterologous and

homologous peptides are expressed on different *chassis* organisms. Companies as DuPont, Genencor Inc., Amyris and Gevo already biologically produce 1,3-propanediol, lactic acid and isobutanol respectively [1]. Synthetic biology is an emergent technological field that aims the application of the engineering concepts of modularization and componentization on genetic resources to allow more predictable and easy assembly of those genetic resources, called biobricks, for a variety of purposes, including metabolic engineering for higher production of valuable chemicals [8-10]. Some of the major techniques are the ligation-free assembly of novel operons which increase scalability and automation for novel complex gene configurations [8][10][11]. In this context, the understanding of the natural organization of genes of interest in a given microorganism is important when designing novel combinatorial enzymes and strategies for metabolic engineering. *Klebsiella aerogenes*, a well-studied microorganism for glycerol conversion in 2,3-butanediol, was selected in this work for a meticulous search for its genes related to glycerol metabolism and acetolactate, acetoin and BDO conversion. *Klebsiella aerogenes* is a gram-negative facultative anaerobe, preferentially fermenting hydrogen on anaerobic conditions. Its complete genome is composed of a 5.280 Kbp circular double strand DNA, containing 54.8% GC bonds, approximately 4912 genes, 84 tRNAs and 25 rRNAs. A total of 3824 genes (77.85% of total) have its possible function attributed by annotations [12].

The online tools present on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) site were utilized and the possible operons and genes related to glycerol conversion on precursors of the pyruvate forming pathway and acetolactate, acetoin and BDO related genes were schematically represented. All the genes identified for proteins of interest related to glycerol, acetolactate, acetoin and butanediol metabolism were organized on three tables. The overall metabolism of glycerol into 2,3-butanediol inside the cell is represented on figure 1.

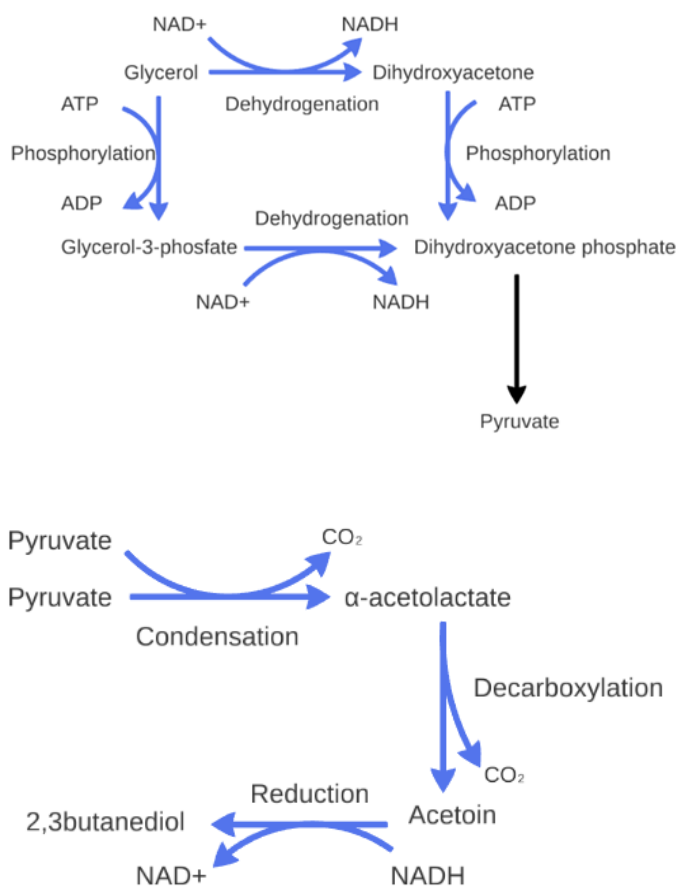


Fig. 1 Schematic representation of the conversion of glycerol into dihydroxyacetone-phosphate, a precursor for the pyruvate synthesis and the production of BDO from two molecules of pyruvate.

2. Materials and methods

2.1 Search for genes of interest on *K. aerogenes* genome

The genome of *K. aerogenes* KCTC 2190 (*K. aerogenes*) submitted on the NCBI under the accession number CP002824.1 (NC_015663.1) was utilised for search of possible genes related to glycerol metabolism, by searching on the database for proteins annotated as glycerol dehydrogenase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, dihydroxyacetone kinase, glycerol uptake, glycerol transport, glycerol-3-phosphate transporter, glycerophosphodiester phosphodiesterase, *gldA*, *gpsA*, *glpA*, *glpB*, *glpC*, *glpD*, *glpQ*, *glpT*, *ugpC*, *ugpQ*, *dhaK*. Genes for proteins related to acetoin

and butanediol metabolism annotated as acetolactate synthase, acetolactate decarboxylase, acetoin reductase, acetoin utilization, *budA*, *budB*, *budC*. For the proteins encountered for both glycerol and butanediol metabolism, the protein family described was utilized for a third search on the genome, aiming at finding other genes that could play a role on the metabolic pathways of glycerol, acetolactate, acetoin, and butanediol.

2.2 Organization of operons and genes associated to the operons

For every gene identified for glycerol and butanediol metabolism, the graphics feature present on NCBI was employed to access genes close by, possibly sharing an operon or a promoter with the genes of interest. The possible organization of the genes was represented on schemes and images, in blue or yellow are genes related to or in close proximity with genes for glycerol and BDO metabolism, in red are represented genes not directly related with glycerol or BDO.

2.3 Organization of tables reporting the genes of interest

The genes found for Glycerol metabolism, table 1, and for butanediol metabolism, table 2, were organized representing the gene name, its protein NCBI ID number, its annotated protein product, its protein family in “note”, an organisational given number on the table, possible operon related genes, and possible genes sharing their operon promoter. The genes identified on a third search, in which the protein products belong to the same family as the glycerol and butanediol metabolism genes, were organized on table 3 on columns representing the protein family, the number of gene copies containing the annotated protein family, and the NCBI protein IDs. On table 3, all genes, including the ones present on tables 1 and 2 were included.

3. Results and discussion

3.1 Genes of interest for glycerol transport and metabolism

The genome of *K. aerogenes* under the accession number NC_015663.1 was utilized for a search of glycerol genes of interest. There were identified 25 genes for transport, gene expression, regulation and metabolism of glycerol (table1). The genes found were evaluated for possible relation with genes close by, expressed possibly under the same promoter or in the same operon.

Table 1. Genes related to glycerol metabolism in *K. aerogenes* KCTC 2190.

Genes	Protein_ID	Product	NCBI Note	n°	In operon with or close with	Close to the operon of or sharing promoter with
Glycerol dehydrogenase	AEG96447.1	glycerol dehydrogenase	COG0371 Glycerol dehydrogenase and related enzymes	1	AEG96448.1: fructose-6-phosphate aldolase; AEG96449.1: putative AraC-type regulatory protein;	AEG96450.1: zinc/cadmium-binding protein
	AEG95698.1	hypothetical protein	COG0371 Glycerol dehydrogenase and related enzymes	2	3	4; 5; 6; 7
DhaR transcriptional regulator	AEG95697.1	DNA-binding transcriptional regulator DhaR	COG3284 Transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism	3	2	4; 5; 6; 7
dihydroxyacetone kinase	AEG95699.1	dihydroxyacetone kinase subunit DhaK	COG2376 Dihydroxyacetone kinase	4	5; 6; 7	2; 3
	AEG95700.1	dihydroxyacetone kinase subunit DhaL	COG2376 Dihydroxyacetone kinase	5	4; 6; 7	2; 3
	AEG95701.1	dihydroxyacetone kinase subunit M	COG3412 Uncharacterized protein conserved in bacteria	6	4; 5; 7	2; 3
	AEG95702.1	dihydroxyacetone kinase	COG2376 Dihydroxyacetone kinase	7	4; 5; 6	2; 3
glycerol kinase	AEG96226.1	glycerol kinase	COG0554 Glycerol kinase	8	10	AEG96224.1: Septal ring assembly protein ZapB; AEG96223.1: Sulfate transporter subunit; AEG96222.1: CDP-diacylglycerol pyrophosphatase; AEG96221.1: Sodium:sulfate symporter family protein
	AEG97630.1	putative glycerol kinase	COG0554 Glycerol kinase	9	AEG97629.1: periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator; AEG97628.1: periplasmic lipoprotein; AEG97627.1: Putative ribose ABC transport system ATP-binding component; AEG97626.1: Inner-membrane translocator; AEG97625.1: Short chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase; AEG97624.1: Short chain dehydrogenase;	AEG97631.1: DeoR family transcriptional regulator
Glycerol uptake facilitator	AEG96225.1	glycerol uptake facilitator protein	COG0580 Glycerol uptake facilitator and related permeases	10	8	AEG96224.1: Septal ring assembly protein ZapB; AEG96223.1: Sulfate transporter subunit; AEG96222.1: CDP-diacylglycerol pyrophosphatase;

			(Major Intrinsic Protein Family)			AEG96221.1: Sodium:sulfate symporter family protein
	AEG97915.1	aquaporin Z	COG0580 Glycerol uptake facilitator and related permeases (Major Intrinsic Protein Family)	11	AEG97914.1: hypothetical protein COG2431 Predicted membrane protein; AEG97913.1: hybrid cluster protein COG1151 6Fe-6S prismatic cluster-containing protein; AEG97912.1: HCP oxidoreductase, NADH-dependent COG1018 Flavodoxin reductases (ferredoxin-NADPH reductases) family 1	AEG97916.1: putative ATP-dependent endonuclease of the OLD family; AEG97917.1: macrolide transporter subunit MacA COG0845 Membrane-fusion protein; AEG97918.1: macrolide transporter ATP-binding /permease protein COG1136 ABC-type antimicrobial peptide transport system, ATPase component
glycerol-3-phosphate dehydrogenase	AEG96001.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	COG0578 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	12	-	AEG96000.1: glpE - thiosulfate sulfurtransferase; AEG95999.1: intramembrane serine protease GlpG; AEG95998.1: DNA-binding transcriptional repressor GlpR transcriptional regulators of sugar metabolism;
	AEG96174.1	gpsA - NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	COG0240 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	13	AEG96177.1: rhodanese COG0607 Rhodanese-related sulfurtransferase; AEG96175.1: preprotein translocase subunit SecB; AEG96173.1: serine acetyltransferase;	AEG96178.1: phosphoglyceromutase; AEG96179.1: AmiB activator COG4942 membrane-bound metallopeptidase; AEG96180.1: hypothetical protein COG2861 Uncharacterized protein conserved in bacteria
	AEG99746.1	glpA - sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A	COG0578 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	14	15; 16	17; 22
	AEG99747.1	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit B	COG3075 Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	15	14; 16	17; 22
	AEG99748.1	glpC - sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit C	COG0247 Fe-S oxidoreductase	16	14; 15	17; 22
sn-glycerol-3-phosphate transporter	AEG99745.1	glpT - sn-glycerol-3-phosphate transporter	COG2271 Sugar phosphate permease	17	22	14; 15; 16
	AEG96019.1	ugpC - glycerol-3-phosphate transporter ATP-binding subunit	COG3839 ABC-type sugar transport systems, ATPase components	18	19; 20; 21; 23	-
	AEG96020.1	glycerol-3-phosphate transporter membrane protein	COG0395 ABC-type sugar transport system, permease component	19	18; 20; 21; 23	-
	AEG96021.1	glycerol-3-phosphate transporter permease	COG1175 ABC-type sugar transport systems, permease components	20	18; 19; 21; 23	-
	AEG96022.1	glycerol-3-phosphate transporter	COG1653 ABC-type sugar transport system,	21	18; 19; 20; 23	-

		periplasmic binding protein	periplasmic component			
glycerophosphodiester phosphodiesterase	AEG99744.1	glpQ - glycerophosphodiester phosphodiesterase	COG0584 Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	22	17	14; 15; 16
	AEG96018.1	ugpQ - cytoplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase	COG0584 Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	23	18; 19; 20; 21	-
	AEG97299.1	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	COG0584 Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	24	-	AEG97300.1: DNA polymerase IV COG0389 Nucleotidyltransferase/DNA polymerase involved in DNA repair; AEG97301.1: putative acyltransferase COG0454 Histone acetyltransferase HPA2 and related acetyltransferases
sigma-54 dependent transcriptional regulator	AEG95205.1	sigma-54 dependent transcriptional regulator	COG3284 Transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism	25	-	AEG95204.1: aldehyde dehydrogenase (NAD(+)) COG1012 NAD-dependent aldehyde dehydrogenases

3.1.2 Regulatory proteins DhaR and Sigma-54 dependent transcriptional regulator (Sigma-54tr), glycerol dehydrogenases and the *dhaKLM* operon

The operons and gene organization for the hypothetical glycerol dehydrogenase, DhaR (transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism) and four dihydroxyacetone kinase genes are represented on figure 2. Apparently, two gene operons are organized separated by an hypothetical bidirectional promoter of 556 nucleotides, in one direction, the hypothetical *gldA* is expressed separated by a 113 nucleotides RBS or independent promoter from *dhaR*. On the other direction the first three genes, *dhaK* (Dihydroxyacetone kinase subunit K), *dhaL* (Dihydroxyacetone kinase subunit L) and *dhaM* (Dihydroxyacetone kinase subunit M) are all separated by a 10 nucleotide RBS, followed by a 74 nucleotide RBS or independent promoter for a protein gene annotated as a dihydroxyacetone kinase. The Dihydroxyacetone kinases are a sequence-conserved group of enzymes that catalyze the phosphorylation of dihydroxyacetone utilizing ATP or the phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase system (PTS) [13][14]. In *E. coli*, the PTS-dependent system consists of three subunits that have its orthologs in *K. aerogenes*: *dhaK* that binds to dihydroxyacetone, DhaL contains ADP as a cofactor for the double displacement of phosphate from the *dhaM* to DHA, *dhaM* possess a phospho-histidine relay between the PTS and *dhaL* bound ADP

[13-16]. the *dhaR* is a transcription activator of the *dhaKLM* operon [13][17]. *dhaR* also binds with the *dhaL* and *dhaK* in which they can act as both coactivator or corepressor of *dhaR* [13]. When dihydroxyacetone is produced, *dhaL* is dephosphorylated and *dhaL* ADP decouple with *dhaK* that in turn activates *dhaR*. In turn, *dhaL* containing ATP does not bind to *dhaR* [13].

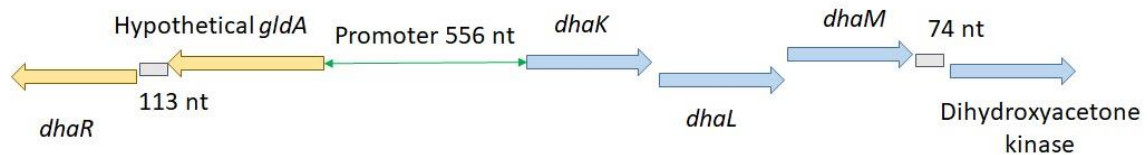


Fig. 2: Schematic representation of the gene organization for the *dhaR*, hypothetical *gldA* and *dhaKLM* genes. Adapted from NCBI.

Glycerol metabolism genes were remarkably well organized on close clusters of operons sharing the same promoter and containing regulators as sigma-54tr and DhaR acetoin/glycerol activator. The gene for Sigma-54tr is expressed by a possible 256 nucleotides bidirectional promoter that also express an aldehyde dehydrogenase (NAD⁺ dependent). Both genes represented on figure 3.



Fig. 3: Schematic representation of the gene organization for the *sigma-54tr* gene. Adapted from NCBI.

Interestingly, the gene annotated as a glycerol dehydrogenase *gldA* was close to the gene for fructose-6-phosphate (F6P) aldolase, which utilises glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone to form F6P. The operon also could possess a regulation by the AraC-type

regulatory protein expressed, which in turn make the putative *gldA* represented on figure 2 probably the one directly related to glycerol metabolism and the annotated *gldA* a gene oriented for the fructose-6-phosphate synthesis from dihydroxyacetone figure 4.

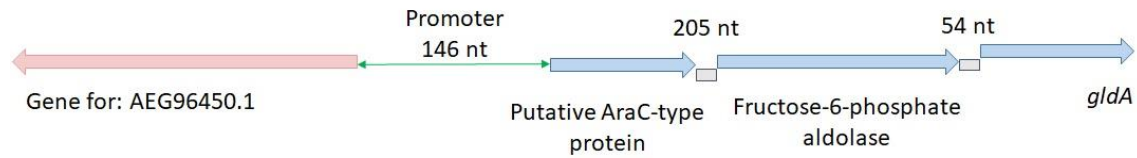


Fig. 4: Organisation of a possible operon containing the *gldA* gene. The glycerol dehydrogenase gene is close by to a fructose-6-phosphate aldolase and a putative AraC-type protein. Adapted from NCBI.

3.1.3 Glycerol uptake, glycerol transport and glycerol kinases

The glycerol uptake facilitator protein gene is possibly expressed under a promoter region of 444 nucleotides followed by a possible RBS of 21 nucleotides and a glycerol kinase (GK) protein gene. On the other direction of the promoter region other genes not directly related to glycerol metabolism are present with the exception of the gene for AEG96222.1 representing a CDP-diacylglycerol pyrophosphatase, possibly related to membrane and phospholipid formation figure 5.



Fig 5. Representation of the glycerol uptake facilitator protein and glycerol kinase genes possible operon. Adapted from NCBI.

Other glycerol transport related gene is the Aquaporin Z protein, a major glycerol uptake facilitator protein. The gene for aquaporin z is expressed under a 396 nucleotides possible promoter

region. The promoter region also express the proteins AEG97916.1 (OLD endonuclease gene), AEG97917.1, AEG97918.1(macrolide transporter related genes). The Aquaporin Z gene may also be expressed in an operon in which, after a 117 possible RBS or independent promoter region, the genes for AEG97914.1 (transport membrane protein), AEG97913.1, AEG97912.1 (possible nitrite/nitrate metabolism genes) are present. Figure 6.

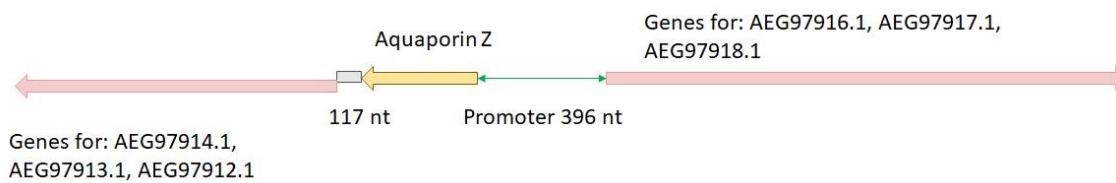


Fig 6. Possible operon and gene organization for aquaporin Z. Adapted from NCBI.

The putative glycerol kinase (GK) gene, a second copy for glycerol kinase, is expressed under a possible promoter region of 348 nucleotides followed by a possible RBS or second unidirectional promoter of 170 nucleotides and the operon or genes for other proteins not directly related to glycerol metabolism and separated by stretches of DNA ranging from 88 nucleotides to 17 nucleotides, the two last genes for the proteins, AEG97625.1 and AEG97624.1 are annotated as short chain dehydrogenases (AEG97625.1 short chain dehydrogenase/reductase alcohol dehydrogenases; AEG97624.1 short chain dehydrogenase) that could be related to glycerol conversion to DHA or in the acetoin metabolism. AEG97631.1 express a DeoR regulatory protein (regulators of sugar and nucleoside metabolic systems). Figure 7.

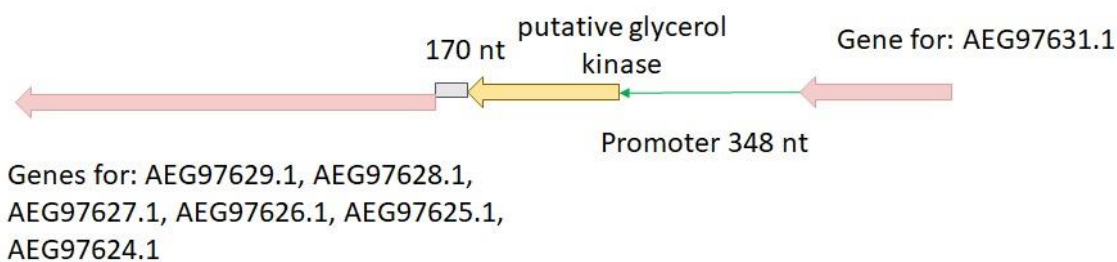


Fig 7. Possible operon and gene organization for a putative glycerol kinase gene. Adapted from NCBI.

3.1.4 Glycerol-3-phosphate transport, dehydrogenases and glycerophosphodiester phosphodiesterases.

Genes for G3P anaerobic dehydrogenase subunits *glpABC* were present in an operon and possibly sharing promoter with the *glpTQ* operon. The genes *glpA*, *glpB* and *glpC* are organized under overlaps of sequences on the same strand, the *glpB* gene first CDS nucleotide start 11 nucleotides before the *glpA* last nucleotide stop codon and the *glpC* first CDS nucleotide start 4 nucleotides before the *glpB* last nucleotide stop codon.

In *E. coli*, the GlpABC protein has been characterized by having fumarate as final electron acceptor and the utilization of vitamin K as cofactor [35]. Previous analysis on the GlpB protein revealed the possible presence of iron-sulfur centers on the enzyme core [35]. [35] also showed that the enzyme centers are reduced by dithionite ($[S_2O_4]^{2-}$) and by G3P as substrate, but not by lactate or formate and that the centers can be oxidized by fumarate. The GlpC protein contains two cysteine clusters typical of iron-sulfur binding domains [34].

The *glpT* gene is separated by a 9 nucleotides RBS from *glpQ*. The *glpQ* gene encodes a glycerophosphodiester phosphodiesterase, an enzyme involved in glycerophospholipid metabolism and produces a glycerol-3-phosphate and an alcohol from glycerophospholipids, *glpQ* is possibly expressed to act on membrane phospholipids, as G3P needs to be carried inside the cell for its consumption by *glpT* that encodes a G3P transporter. finally, the genes for *glpABC* express the proteins that convert G3P into DHAP for its utilization on the pyruvate formation pathway. Figure 8.

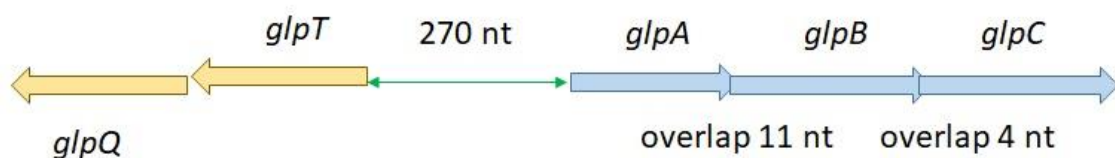


Fig 8. Representation of the *glpTQ* and *glpABC* genes possible operons. Adapted from NCBI.

Another G3P dehydrogenase, *glpD* (aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase) protein gene is present on the genome of *K. aerogenes* KCTC 2190 and is close to or related to the operon *glpEGR* (figure 9). The *glpD* gene is under a possible bidirectional promoter of 206 nucleotides that can possibly also regulate the *glpEGR* operon. *glpE* encodes a thiosulfate sulfurtransferase and is separated by a 52 nucleotides possible RBS from *glpG*. The gene for *glpE* has a function similarity to the rhodanese present on the *gpsA* related operon on figure 10 (in *E. coli*, *glpE* was classified as a rhodanese enzyme [18]). *glpG* encodes an intramembranous serine protease and is separated by a possible 19 nucleotides RBS from *glpR*. *glpG* was first characterized on *E. coli* for its function as a serine protease belonging to the rhomboid family [19]. *glpR* encodes a DNA-binding transcriptional repressor/regulator related to sugar metabolism, *glpR* is also described as the glycerol-3-phosphate metabolism transcriptional regulator.

glpE and *glpG* are genes for proteins that does not have its functions or associations with glycerol fully understood, however they seem to be important for the maintenance of the redox homeostasis on the cell.

Both GlpE and GlpG enzymes associations with sulphur can be related to the regulation of GlpB and GlpC activity on the anaerobic metabolism of G3P. GlpE, GlpG, thiosulfate sulfurtransferases, rhodanese enzymes, glutaredoxin and other Rhomboid serine proteases and serine acetyltransferases may play a role on the GlpABC function, to enable a fast alternation from anaerobic to aerobic glycerol metabolism.



Fig 9. Representation of the *glpD* and *glpEGR* genes possible operons. Adapted from NCBI.

It was found a third gene annotated as a G3P dehydrogenase, the *gpsA* gene (NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase). The *gpsA* gene is apparently on an operon containing a Rhodanese sulfurtransferase, a glutaredoxin 3 gene and a serine acetyltransferase, similar to the *glpD* associated operon and genes. Glutaredoxin 3 functions as an electric carrier in the glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by the enzyme ribonucleotide reductase. It also act on reducing disulfide bonds in a coupled system with glutathione reductase [20]. The Rhodanese enzymes belongs to a protein family present in all three domains of life. Rhodanese catalyses the transfer of sulfur atom from thiosulfate to cyanide [21-23]. Rhodanese enzymes can also catalyze similar reactions with other sulfur donors (like polysulfide for sud) transferring the sulfur to a sulfur nucleophilic acceptor. Rhodanese and rhodanese like enzymes are known to act on sulfur traffic, delivering sulfur in the form of "safe" chemical species for biosynthetic pathways. Rhodanese enzymes may also be related to maintenance of redox homeostasis, elimination of toxic cyanide and in several other biosynthetic pathways for metabolites as vitamins, enzymes, and cofactors that include a step of sulfur transfer [23-29]. Finally, the serine acetyltransferase, which acts on cystein formation and sulfur metabolism. Interestingly *gpsA* is in frame with a preprotein translocase Sec-B coding region, not annotated on the genome, present only on the NCBI graphics feature. On the other direction of the possible promoter, an operon containing the genes for a phosphoglyceromutase, separated by 96 nucleotides from a AmiB activator protein (a metalloproteinase with function on cell division) gene and finally separated by a 18 nt RBS region from an hypothetical peptide without a function assigned. Figure 10. This possible operon has some level of similarity to the *glpD glpEGR* operon and genes.

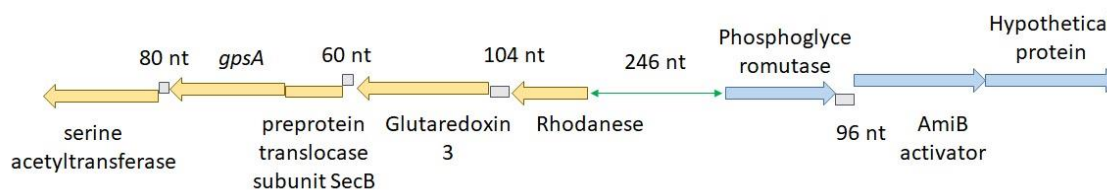


Fig. 10. Representation of the *gpsA* gene and its close by related protein genes. Adapted from NCBI.

Another cluster of genes was identified for glycerol-3-phosphate transport, the *ugp* genes. The possible operon encompass five genes, all related with G3P transport, with the exception of the *ugpQ* gene that encodes a glycerophosphodiester phosphodiesterase. The glycerol-3-phosphate transport operon is separated by a 271 possible promoter region and is preceded by a branched chain amino acid transport operon (represented in red on fig. 11). The first gene of the operon, Glycerol-3-phosphate periplasmic binding protein, is separated by a 106 nucleotides possible RBS or independent promoter region from the second gene. The second gene annotated as glycerol-3-phosphate permease overlaps with the first 4 nucleotides of the glycerol-3-phosphate transporter gene, which in turn is separated by 1 nucleotide from the *ugpC* (G3P importer ATP binding protein) gene and the *ugpC* gene overlaps with the first four nucleotides for *ugpQ* (cytosolic glycerophosphodiester phosphodiesterase). Adjacent to the *ugpCQ* operon, another operon expressing genes related to branched chain amino acids transport is present (AEG96027.1: ABC transporter subunit substrate-binding protein LivK; AEG96026.1: branched-chain amino acid transporter permease subunit LivH; AEG96025.1: leucine/isoleucine/valine transporter permease subunit; AEG96024.1: leucine/isoleucine/valine transporter ATP-binding subunit; AEG96023.1: leucine/isoleucine/valine transporter ATP-binding subunit). The operons are represented in figure 11.

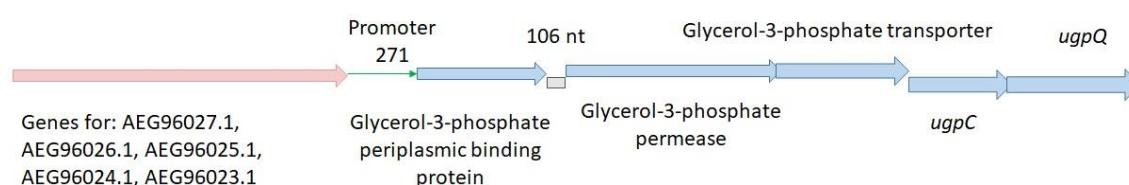


Fig 11. Representation of the G3P transport and *ugpCQ* genes operon. In red, genes for proteins related to BCAA transport and metabolism. Adapted from NCBI.

Finally, there was identified a third copy of a glycerophosphodiester phosphodiesterase. The Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase gene is apparently not expressed in an operon with other genes and is expressed under a possible bidirectional 158 nucleotides promoter. The promoter could also express two genes for the proteins AEG97300.1 and AEG97301.1 representing a type 4 DNA polymerase and a histone-like protein respectively (Figure 12). These genes may be expressed during cell duplication and the Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase gene may play an important role in the separation of the two new cells.

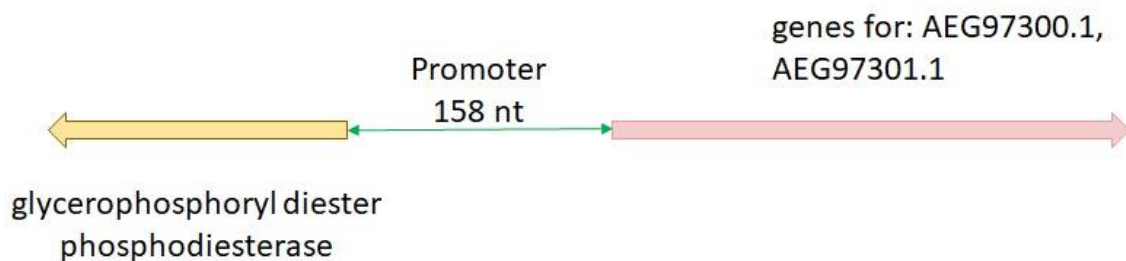


Fig. 12: Representation of the glycerophosphoryl diester phosphodiesterase gene. Adapted from NCBI.

3.2 Genes of interest for acetolactate, acetoin and BDO metabolism

There were identified 13 genes related to pyruvate conversion on acetolactate, acetoin, BDO, and acetoin utilization (Table 2).

Table 2. Genes related to acetolactate, acetoin and BDO metabolism in *K. aerogenes* KCTC

2190.

Genes	Protein_ID	Product	NCBI Note	n°	Possibly in operon with or close with	Close to the operon of or sharing promoter with
Acetolactate synthase	AEG95284.1	acetolactate synthase catalytic subunit	COG0028 Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase]	1	AEG95283.1: Auxin Efflux Carrier COG0679 Predicted permeases	AEG95282.1: transcriptional regulator, LysR family protein COG0583 Transcriptional regulator; AEG95281.1: hypothetical protein (nitrous oxide-stimulated promoter family protein similar to <i>Escherichia coli</i> YgbA)
	AEG95533.1	hypothetical protein	COG0028 Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase]	2	AEG95536.1 short chain dehydrogenase COG1028 Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases); AEG95535.1: L-aspartate dehydrogenase COG1712 Predicted dinucleotide-utilizing enzyme; AEG95534.1: putative aldehyde dehydrogenase COG1012 NAD-dependent aldehyde dehydrogenases;	-
	AEG96301.1	acetolactate synthase 1 regulatory subunit	COG0440 Acetolactate synthase, small (regulatory) subunit	3	4	-
	AEG96302.1	acetolactate synthase catalytic subunit	COG0028 Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase]	4	3	-
	AEG96466.1	acetolactate synthase 2 catalytic subunit	COG0028 Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase]	5	Table number 6; AEG96468.1: branched-chain amino acid aminotransferase COG0115 Branched-chain amino acid aminotransferase/4-amino-4-deoxychorismate lyase; AEG96469.1: dihydroxy-acid dehydratase COG0129 Dihydroxyacid dehydratase/phosphoglucuronate dehydratase; AEG96470.1: threonine dehydratase	AEG96465.1: putative 2-component regulator COG0606 Predicted ATPase with chaperone activity

					COG1171 Threonine dehydratase	
AEG96467.1	acetolactate synthase 2 regulatory subunit	COG3978 Acetolactate synthase (isozyme II), small (regulatory) subunit	6	Table number 5; AEG96468.1: branched-chain amino acid aminotransferase COG0115 Branched-chain amino acid aminotransferase/4-amino-4-deoxychorismate lyase; AEG96469.1: dihydroxy-acid dehydratase COG0129 Dihydroxyacid dehydratase/phosphoglucuronate dehydratase; AEG96470.1: threonine dehydratase COG1171 Threonine dehydratase	AEG96465.1: putative 2-component regulator COG0606 Predicted ATPase with chaperone activity	
AEG96881.1	acetolactate synthase	COG3962 Acetolactate synthase	7	AEG96882.1: putative NADH-dependent dehydrogenase COG0673 Predicted dehydrogenases and related proteins; AEG96883.1: xylose isomerase COG1082 Sugar phosphate isomerases/epimerases ; AEG96884.1: myo-inositol-2 dehydratase COG1082 Sugar phosphate isomerases/epimerases ; AEG96885.1: major myo-inositol transporter iolT COG0477 Permeases of the major facilitator superfamily	AEG96880.1: putative myo-inositol catabolism protein COG0524 Sugar kinases, ribokinase family; AEG96879.1: putative helix-turn-helix protein	
AEG97154.1	acetolactate synthase 3 catalytic subunit	COG0028 Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboxylase, phosphonopyruvate decarboxylase]	8	Table number 9; AEG97156.1: DNA-binding transcriptional regulator FruR COG1609 Transcriptional regulators	AEG97153.1: hypothetical protein (44 amino acids hypothetical peptide)	
AEG97155.1	acetolactate synthase 3 regulatory subunit	COG0440 Acetolactate synthase, small (regulatory) subunit	9	Table number 8; AEG97156.1: DNA-binding transcriptional regulator FruR COG1609 Transcriptional regulators	AEG97153.1: hypothetical protein (44 amino acids hypothetical peptide)	

	AEG98410.1	acetolactate synthase	COG0028 Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase]	10	11; 12	AEG98412.1: putative LysR-family transcriptional regulator COG0583 Transcriptional regulator
Acetolactate decarboxilase	AEG98411.1	alpha-acetolactate decarboxylase	COG3527 Alpha-acetolactate decarboxylase	11	10; 12	AEG98412.1: putative LysR-family transcriptional regulator COG0583 Transcriptional regulator
acetoin reductase	AEG98409.1	acetoin reductase	COG1028 Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	12	10; 11	AEG98412.1: putative LysR-family transcriptional regulator COG0583 Transcriptional regulator
acetoin utilization protein	AEG97590.1	putative deacetylase	COG0123 Deacetylases, including yeast histone deacetylase and acetoin utilization protein	13	AEG97588.1: putative regulatory protein COG2771 DNA-binding HTH domain-containing proteins; AEG97589.1: major facilitator superfamily MFS_1 COG0477 Permeases of the major facilitator superfamily; AEG97591.1: hypothetical protein COG4680 Uncharacterized protein conserved in bacteria (type II toxin-antitoxin (TA) system HigB family toxin similar to <i>Escherichia coli</i> mRNA interferase HigB, the toxin component of the HigB-HigA TA system; induced by amino acid starvation); AEG97592.1: XRE family transcriptional regulator COG5499 Predicted transcription regulator containing HTH domain	AEG97587.1: putative iron-sulfur modifier protein COG0641 Arylsulfatase regulator (Fe-S oxidoreductase); AEG97586.1: arylsulfatase COG3119 Arylsulfatase A and related enzymes; AEG97585.1: putative 3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase COG1028 Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases); AEG97584.1: hypothetical protein (Molybdenum cofactor biosynthesis protein F)

For acetolactate synthases, there were identified 10 related genes. The number of genes related to acetolactate synthase show its importance in the BCAA synthesis and metabolism.

The first copy of acetolactate synthase was identified. This copy express a catalytic subunit of acetolactate synthase and may not be directly related to BCAA synthesis. Interestingly, the acetolactate gene is in operon with an Auxin Efflux carrier that possess similarity to an uncharacterized protein carrier *yfdV* from *E. coli*. The acetolactate synthase and auxin efflux carrier genes possibly share the 183 nucleotide promoter with a LysR (AEG95282.1) regulator protein gene

(figure 13). LysR-type transcriptional regulators (LTTRs) regulate a diverse set of genes, including those involved in virulence, metabolism, quorum sensing and motility [30]. Another hypothetical protein, similar to the nitrous oxide promoter related protein *ygbA* (AEG95281.1) may be expressed together in an operon with LysR. Major efflux pumps are related to antibiotic and xenobiotic resistance, so the operon may be related to resistance to some antimicrobial chemicals [31].

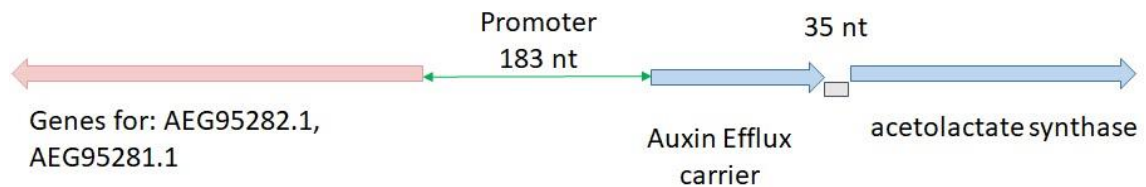


Fig 13: Representation of acetolactate synthase gene, possibly in an operon with a protein gene annotated as a auxin efflux pump. Adapted from NCBI.

A second gene for a acetolactate synthase was identified in a possible operon and possibly sharing a promoter with a NADH-dependent dehydrogenase, a xylose isomerase, a Myo-inosose-2 dehydratase, a major myo-inositol transporter *iolT*, a myo-inositol catabolism protein and a possible helix-turn-helix regulator protein (related to sugar phosphate metabolism *ripR* or N-acetylmuramate degradation *murR*) genes (respectively: AEG96882.1, AEG96883.1, AEG96884.1, AEG96885.1 and AEG96880.1, AEG96879.1) (figure 14).

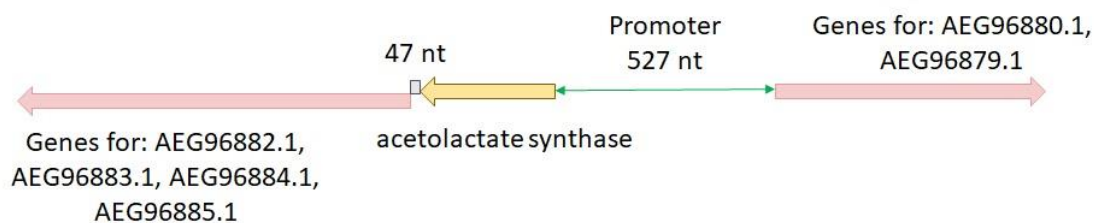


Fig 14: Representation of acetolactate synthase gene, possibly in an operon with a proteins genes related to dehydrogenases, xylose and sugar phosphate metabolism and myo-inositol metabolism and transport. Adapted from NCBI.

There was one gene annotated as a putative acetolactate synthase. This putative acetolactate synthase possibly shares an operon with an aspartate dehydrogenase an aldehyde dehydrogenase and a short chain dehydrogenase, which could be related to acetoin and glycerol metabolism. The gene for the short chain dehydrogenase is separated by a 9 nucleotide RBS from the aspartate dehydrogenase, which is separated by a 15 nucleotides RBS from the aldehyde dehydrogenase and the aldehyde dehydrogenase is separated by a 13 nucleotides RBS from the putative acetolactate synthase. The putative aspartate dehydrogenase may be responsible for production of oxaloacetic acid from aspartate. The possible operon was located after a long region of 763 nucleotides, possibly containing its operon promoter (figure 15).

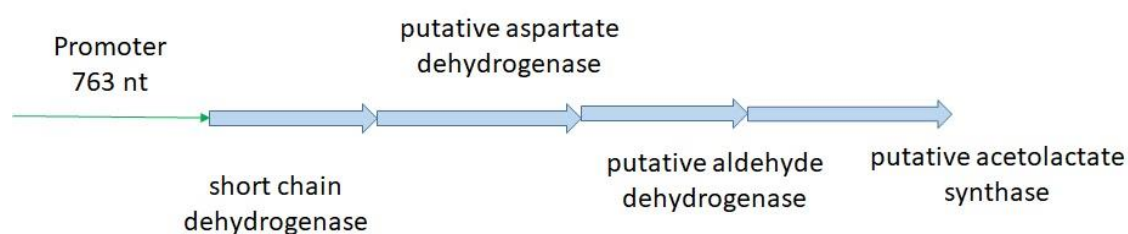


Fig. 15: Representation of acetolactate synthase gene, possibly in an operon with proteins genes related to different dehydrogenases. Adapted from NCBI.

3.2.1 The acetolactate synthase enzymes I, II and III.

There are three major acetolactate synthase enzymes related to the BCAA synthesis on microbial and plant cells (*alsS*). *Klebsiella aerogenes* KCTC 2190 possess all the three enzymes with its respective catalytic subunits and small regulatory subunits. The acetolactate synthase I genes are

expressed under a 960 nucleotides region which contains its promoter. The catalytic subunit gene is separated by 2 nucleotides from the regulatory subunit gene (Figure 16).

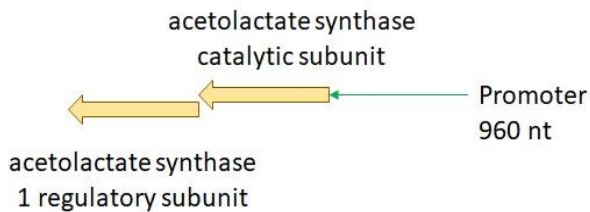


Fig. 16: Possible operon for acetolactate synthase I. Adapted from NCBI.

The operon for acetolactate synthase II subunits. The catalytic subunit gene stop codon is overlapped with the first 4 nucleotides of the regulatory subunit CDS. After a 19 nucleotides RBS, three genes for Branched chain amino acids metabolism are present in the operon (AEG96468.1, AEG96469.1 and AEG96470.1). On the other direction of the possible 592 nucleotides promoter, a putative 2-component regulatory protein (AEG96465.1) (possibly a magnesium chelatase *chlI* gene) is present. (Figure 17).

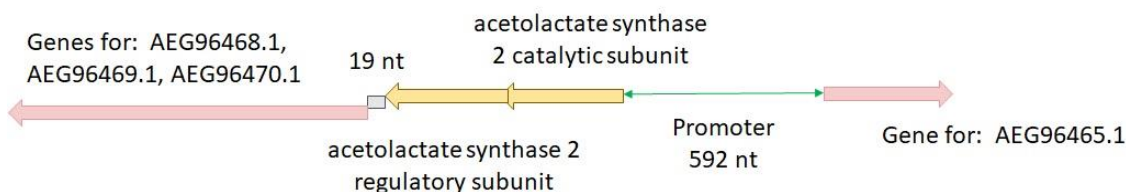


Fig. 17: Possible operon for acetolactate synthase II. Adapted from NCBI. Adapted from NCBI.

The operon for acetolactate synthase III subunits. The catalytic subunit for acetolactate synthase is separated by 2 nucleotides from its regulatory subunit. The regulatory subunit is separated by 197 nucleotides from a FruR regulatory protein gene, FruR (DNA-binding transcriptional regulator) is the global regulatory protein that modulates the direction of carbon flow in *Escherichia*

coli, and possibly have an important role in regulating oxidative and fermentative glycolytic and gluconeogenic pathways [33]. The gene for AEG97153.1 express a small hypothetical protein with 44 amino acids (Figure 18).

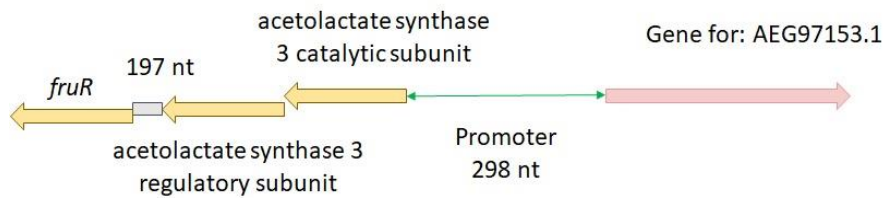


Fig 18. Possible operon for acetolactate synthase III. Adapted from NCBI.

Finally, the genes that convert pyruvate to 2,3-butanediol are expressed in a three gene operon *budABC*. The *budABC* operon is under a possible bidirectional promoter of 106 nucleotides that possibly express both the *budABC* operon and the LysR regulatory protein gene (AEG98412.1). The first gene, *budA* (acetolactate decarboxylase) is separated by 9 nucleotides from the second gene *budB* (acetolactate synthase) and *budB* is separated by 22 nucleotides from *budC* (acetoin reductase) (figure 19). The genes *budA* and *budC* are the only copy annotated with enzymes related to BDO formation on the genome of *Klebsiella aerogenes* KCTC 2190. however, other genes for proteins with functions as dehydrogenases and decarboxylases may also be involved on BDO formation.

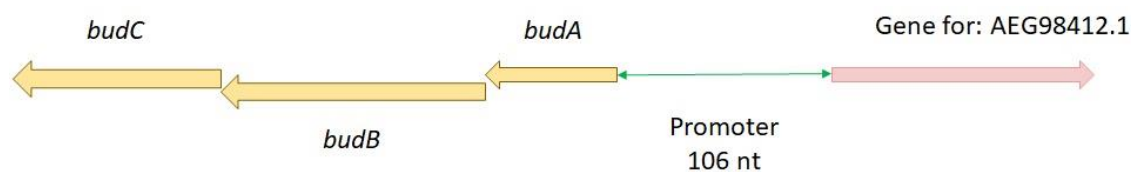


Fig. 19: The *budABC* operon organisation. Adapted from NCBI.

The last gene for acetolactate, acetoin and BDO metabolism, identified as a histone-like acetoin utilization protein was organized into its possible operon and close by genes. The acetoin

utilisation protein (COG0123 Deacetylases, including yeast histone deacetylase and acetoin utilization protein) CDS first nucleotide is positioned 4 nucleotides prior to the last nucleotide of AEG97589.1 gene (figure 20). The relation with acetoin is not clear.



Fig. 20: Acetoin utilization protein on its possible operon. Adapted from NCBI.

3.3 Search for proteins sharing its family classification with the 25 glycerol genes and 13 acetolactate, acetoin and BDO genes.

Following the identification of 38 genes related to glycerol and BDO metabolism, the protein family of the proteins identified were used for a third search on the *K. aerogenes* genome for genes of proteins that can perform similar enzymatic conversions. 77 genes containing the protein family equal to the 38 genes previously identified were found (table 3), revealing a vast number of genetic resources to be explored for metabolic engineering for glycerol and BDO using *K. aerogenes* genes.

Table 3. Genes that express proteins with the same families as the proteins identified on tables 1 and 2 in *K. aerogenes* KCTC 2190.

Protein domain family	n° of genes containing the protein domain family	Genes protein_ID
COG0371 Glycerol dehydrogenase and related enzymes	2	AEG96447.1; AEG95698.1

COG3284 Transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism	2	AEG95205.1; AEG95697.1
COG2376 Dihydroxyacetone kinase	3	AEG95699.1; AEG95700.1; AEG95702.1
COG3412 Uncharacterized protein conserved in bacteria	1	AEG95701.1 (<i>dhaM</i>)
COG0554 Glycerol kinase	2	AEG96226.1; AEG97630.1
COG0580 Glycerol uptake facilitator and related permeases (Major Intrinsic Protein Family)	2	AEG96225.1; AEG97915.1
COG0578 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	2	AEG96001.1; AEG99746.1
COG0240 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1	AEG96174.1
COG3075 Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1	AEG99747.1
COG0247 Fe-S oxidoreductase	1	AEG99748.1
COG2271 Sugar phosphate permease	4	AEG95441.1; AEG96297.1; AEG96298.1; AEG99745.1
COG3839 ABC-type sugar transport systems, ATPase components	3	AEG96019.1; AEG96603.1; AEG96887.1
COG0395 ABC-type sugar transport system, permease component	2	AEG96020.1; AEG96889.1
COG1175 ABC-type sugar transport systems, permease components	3	AEG96021.1; AEG96601.1; AEG96890.1
COG1653 ABC-type sugar transport system, periplasmic component	2	AEG96022.1; AEG96886.1
COG0584 Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	3	AEG96018.1; AEG97299.1; AEG99744.1
COG0028 Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase]	7	AEG95284.1; AEG95533.1; AEG96302.1; AEG96466.1; AEG97154.1; AEG97909.1; AEG98410.1
COG0440 Acetolactate synthase, small (regulatory) subunit	2	AEG96301.1; AEG97155.1
COG3978 Acetolactate synthase (isozyme II), small (regulatory) subunit	1	AEG96467.1

COG1028 Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	32	AEG95192.1; AEG95249.1; AEG95322.1; AEG95383.1; AEG95402.1; AEG95511.1; AEG95536.1; AEG95543.1; AEG95603.1; AEG95979.1; AEG95983.1; AEG96058.1; AEG96100.1; AEG97321.1; AEG97439.1; AEG97531.1; AEG97585.1; AEG97624.1; AEG97625.1; AEG97647.1; AEG97653.1; AEG97878.1; AEG98186.1; AEG98377.1; AEG98409.1; AEG98413.1; AEG98527.1; AEG98621.1; AEG98667.1; AEG98855.1; AEG98883.1; AEG99176.1
COG0123 Deacetylases, including yeast histone deacetylase and acetoin utilization protein	1	AEG97590.1

4. Discussion

The genome of *K. aerogenes* showed a well organized, well-regulated system of genes that perform glycerol transport and metabolism and acetolactate, acetoin and BDO production. Two annotated sequences for regulatory proteins (Sigma-54tr and DhaR) were identified as possible genes of interest for the overall promoter regulation of acetoin and glycerol metabolism, the dual regulation under the same mechanism may explain the increased capacity of *Enterobacter* and *Klebsiella* species to produce BDO from glycerol. Genes related to glycerol metabolism were also associated or close by to regulatory protein genes as *deoR*, *fruR*, *glpR*, *dhaR*, *lacI*, *lysR*, *sigma-54tr* and *araC* (table 1). Other genes for sulfur transferases and rhodanese enzyme, serine proteases, and serine acetyltransferase were associated with enzymes involved in glycerol uptake, glycerol kinase and G3P dehydrogenases on the aerobic metabolism of glycerol (table 1, figures 9 and 10).

Various peptide, sulfur, carbohydrate, macrolide, ribose, and glycerol permeases and translocases were also associated with glycerol metabolism genes (table 1).

It is also important to notice the presence of a branched chain amino acids gene cluster close to the glycerol-3-phosphate transport operon (figure 11), indicating a possible association of the metabolism of such amino acids with glycerol genes expression, and possibly with acetolactate

synthase expression, as acetolactate is a key metabolite related to both branched-chain amino acids synthesis and acetoin and BDO production.

For the pyruvate to BDO associated genes, it was identified 10 genes related to acetolactate synthase, three of them harboring a catalytic and a regulatory subunit, most probably related to branched-chain amino acids synthesis (table 2). Other three copies of catalytic acetolactate synthase were associated with other genes related to various functions. Only one copy of a catalytic acetolactate synthase related to the conversion of pyruvate on BDO was found, present on the *budABC* operon. For acetolactate decarboxylase and acetoin reductase, only the genes *budA*, and *budC* respectively were found. Also interestingly is the variety of genes for proteins of the COG1028 family (a total of 32 genes encountered), which *budC* belongs. Those genes could be overexpressed in *E. coli* for identification of other peptides of interest for acetoin conversion on BDO, or other reductases to production of short chain reduced chemicals of interest.

For future projects aiming an increase in BDO production from glycerol as sole carbon source, strategies involving the overexpression or heterologous expression of genes related to transport and conversion of glycerol into DHA or DHAP combined with the overexpression of the *budABC* operon could be useful for increasing the directing of carbon flow towards BDO production. Manipulating the expression of regulatory proteins can also lead to an increase in carbon utilization from glycerol and eventual direction towards the BDO pathway, deletion or overexpression of the the *deoR* and *fruR* regulatory proteins genes can provide insights on their possible role in glycerol as sole carbon source metabolism and the overexpression of *sigma-54tr* gene and the deletion of *dhaR* and *glpR* could also promote glycerol conversion into glycolytic precursors and increase its utilization.

Conclusions

The genes described in this work show a remarkable organization for the metabolism of glycerol and BDO. This work can serve as a source of genetic resources for other projects being that

the genes described could be studied individually or in novel clusters and operons aiming the metabolic engineering via synthetic biology of *Klebsiella aerogenes* or other microorganisms for increased BDO production from glycerol. The natural organization of the genes showed in this work can also provide hints for the design of new combinations of genes and fusion enzymes.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council of technological and scientific development of Brazil (CNPq) and the Institute of Biotechnology of the University of Caxias do Sul (Caxias do Sul, RS Brazil).

References

- [1] Parate, R.D., Rode, C.V., Dharne, M.S., 2018. 2,3-Butanediol Production from Biodiesel Derived Glycerol. *Current Environmental Engineering* 5, 4–12.
- [2] Kalia, V.C., Prakash, J., Koul, S., 2016. Biorefinery for Glycerol Rich Biodiesel Industry Waste. *Indian Journal of Microbiology* 56, 113–125.
- [3] Silva, G.P.D., Mack, M., Contiero, J., 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27, 30–39.
- [4] Cho, S., Kim, T., Woo, H.M., Kim, Y., Lee, J., Um, Y., 2015. High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. *Biotechnology for Biofuels* 8.
- [5] Leoneti, A.B., Aragão-Leoneti, V., Sonia Valle Walter Borges De Oliveira, 2012. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy* 45, 138–145.
- [6] Magee, R.J., Kosaric, N., 1987. The Microbial Production of 2,3-Butanediol. *Advances in Applied Microbiology Volume 32 Advances in Applied Microbiology* 89–161.

- [7] Sheldon, R.A., 2014. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chem.* 16, 950–963.
- [8] Bilal, M., Iqbal, H.M., Hu, H., Wang, W., Zhang, X., 2018. Metabolic engineering and enzyme-mediated processing: A biotechnological venture towards biofuel production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 82, 436–447.
- [9] Andrianantoandro, E., Basu, S., Karig, D.K., Weiss, R., 2006. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular Systems Biology* 2.
- [10] Shetty, R.P., Endy, D., Knight, T.F., 2008. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering* 2, 5.
- [11] Li, M.Z., Elledge, S.J., 2007. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nature Methods* 4, 251–256.
- [12] Shin, S.H., Kim, S., Kim, J.Y., Lee, S., Um, Y., Oh, M.-K., Kim, Y.-R., Lee, J., Yang, K.-S., 2012. Complete Genome Sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190. *Journal of Bacteriology* 194, 2373–2374.
- [13] Bächler, C., Schneider, P., Bähler, P., Lustig, A., Erni, B., 2004. *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. *The EMBO Journal* 24, 283–293.
- [14] Postma, P.W., 1986. The Bacterial Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells* 357–408.
- [15] Oberholzer, A.E., Schneider, P., Baumann, U., Erni, B., 2006. Crystal Structure of the Nucleotide-binding Subunit DhaL of the *Escherichia coli* Dihydroxyacetone Kinase. *Journal of Molecular Biology* 359, 539–545.

- [16] Garcia-Alles, L.F., Siebold, C., Nyffeler, T.L., Flükiger-Brühwiler, K., Schneider, P., Bürgi, H.-B., Baumann, U., Erni, B., 2004. Phosphoenolpyruvate- and ATP-Dependent Dihydroxyacetone Kinases: Covalent Substrate-Binding and Kinetic Mechanism†,‡. *Biochemistry* 43, 13037–13045.
- [17] Buck, M., Gallegos, M.-T., Studholme, D.J., Guo, Y., Gralla, J.D., 2000. The Bacterial Enhancer-Dependent sigma 54 (sigma N) Transcription Factor. *Journal of Bacteriology* 182, 4129–4136.
- [18] Ray, W.K., Zeng, G., Potters, M.B., Mansuri, A.M., Larson, T.J., 2000. Characterization of a 12-Kilodalton Rhodanese Encoded by glpE of *Escherichia coli* and Its Interaction with Thioredoxin. *Journal of Bacteriology* 182, 2277–2284.
- [19] Maegawa, S., Ito, K., Akiyama, Y., 2005. Proteolytic Action of GlpG, a Rhomboid Protease in the *Escherichia coli* Cytoplasmic Membrane†. *Biochemistry* 44, 13543–13552.
- [20] Fernandes, A.P., Holmgren, A., 2004. Glutaredoxins: Glutathione-Dependent Redox Enzymes with Functions Far Beyond a Simple Thioredoxin Backup System. *Antioxidants & Redox Signaling* 6, 63–74.
- [21] Cipollone, R., Ascenzi, P., Visca, P., 2007. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life* 59, 51–59.
- [22] Papenbrock, J., Guretzki, S., Henne, M., 2010. Latest news about the sulfurtransferase protein family of higher plants. *Amino Acids* 41, 43–57.
- [23] Aussignargues, C., Giuliani, M.-C., Infossi, P., Lojou, E., Guiral, M., Giudici-Orticoni, M.-T., Ilbert, M., 2012. Rhodanese Functions as Sulfur Supplier for Key Enzymes in Sulfur Energy Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 287, 19936–19948.
- [24] Remelli, W., Cereda, A., Papenbrock, J., Forlani, F., Pagani, S., 2010. The rhodanese RhdA helps *Azotobacter vinelandii* in maintaining cellular redox balance. *Biological Chemistry* 391.

- [25] Cipollone, R., Frangipani, E., Tiburzi, F., Imperi, F., Ascenzi, P., Visca, P., 2006. Involvement of *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanese in Protection from Cyanide Toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 390–398.
- [26] Kessler, D., 2006. Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 825–840.
- [27] Dahl, J.-U., Urban, A., Bolte, A., Sriyabhaya, P., Donahue, J.L., Nimtz, M., Larson, T.J., Leimkühler, S., 2011. The Identification of a Novel Protein Involved in Molybdenum Cofactor Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 35801–35812.
- [28] Matthies, A., Rajagopalan, K.V., Mendel, R.R., Leimkuhler, S., 2004. Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 5946–5951.
- [29] Palenchar, P.M., Buck, C.J., Cheng, H., Larson, T.J., Mueller, E.G., 2000. Evidence That ThiI, an Enzyme Shared between Thiamin and 4-Thiouridine Biosynthesis, May Be a Sulfurtransferase That Proceeds through a Persulfide Intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 275, 8283–8286.
- [30] Maddocks, S.E., Oyston, P.C.F., 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154, 3609–3623.
- [31] Li, X.-Z., 2016. Antimicrobial Resistance in Bacteria: An Overview of Mechanisms and Role of Drug Efflux Pumps. *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria* 131–163.
- [32] Vyazmensky, M., Sella, C., Barak, Z., Chipman, D.M., 1996. Isolation and Characterization of Subunits of Acetohydroxy Acid Synthase Isozyme III and Reconstitution of the Holoenzyme†. *Biochemistry* 35, 10339–10346.
- [33] Ramseier, T.M., Bledig, S., Michotey, V., Feghali, R., Saier, M.H., 1995. The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 16, 1157–1169.
- [34] Cole, S.T., Eiglmeier, K., Ahmed, S., Honore, N., Elmes, L., Anderson, W.F., Weiner, J.H., 1988. Nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships of the *glpABC* operon encoding the

anaerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 170, 2448–2456.

[35] Varga, M.E.R., Weiner, J.H., 1995. Physiological role of GlpB of anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochemistry and Cell Biology* 73, 147–153.

[36] NCBI (United States Of America). National Center For Biotechnology Information (Comp.). *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 chromosome, complete genome. 2017. available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_015663.1>. Access 01 mar. 2017.

3.2 Capítulo II: Development of a glycerol dehydrogenase – acetoin reductase fusion enzyme for increased glycerol conversion and BDO production in *Escherichia coli* DH5 α .

Mauricio Schiavo¹, Ronaldo K. M. Rocha¹, Mauricio M. da Silveira², Sabrina Carra², Sergio Echeverrigaray^{1*}

¹ Laboratory of Microbiology and applied biotechnology, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Laboratory of bioprocesses, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

Abstract

The biodiesel industry has the potential to sustain the entire future fuel market. The main waste from biodiesel production is glycerol, which exceeds its demand. Crude glycerol can be used as microbial feed for the production of fine chemicals as 2,3-butanediol (BDO). The development of metabolically engineered bacterium is being explored for increasing glycerol consumption and BDO production. *Escherichia coli* by its genetic versatility has been studied for this purpose. The objective of this work is to develop a novel fusion enzyme to convert simultaneously glycerol into dihydroxyacetone and acetoin in BDO under a close exchange and recycle of cofactor NADH and NAD. The engineered *E. coli* was capable to convert acetoin in BDO in 10mL growth batches and crude cell enzymatic assays and to achieve increased growth on media supplemented with 25 g/L glycerol and 5g/L acetoin. The fusion enzyme can be used to improve glycerol directing for BDO production.

Key words: fusion enzyme; 2,3-butanediol; glycerol

1.Introduction

The total demand for energy has increased dramatically in the past decades and will continue to grow as the population energy usage increases. In this context the consumption of fossil fuels and

their derivatives is increasing, causing harmful environmental changes and the reliance on and depletion of non-renewable energy sources such as petrol and natural gas (Almeida et al., 2012; Kalia et al., 2016; Meher et al., 2006; Rahman et al., 2018; Silva et al., 2009; Yang and Zhang, 2018). In the last decades, considerable efforts have been done for the substitution of fossil fuels by renewable alternative chemicals based on the transformation of biomass (Almeida et al., 2012; Cho et al., 2015; Meher et al., 2006; Silva et al., 2009). One of the most promising alternatives is biodiesel, that has the potential to sustain the entire future fuel market (Almeida et al., 2012; Cho et al., 2015; Kalia et al., 2016; Meher et al., 2006; Silva et al., 2009). Transesterified fatty-acids are used as biodiesel and the crude glycerol resulted as a residue comprising 10% (w/w) of the total final reaction obtained, in which 85% (w/w) is composed solely by glycerol (Almeida et al., 2012; Garg and Jain, 1995; Jhonson and Taconi, 2007; Kalia et al., 2016; Karinen and Krause, 2006; Meher et al., 2006; Pagliaro et al., 2009; Parate et al., 2018; Rahmat et al., 2010; Silva et al., 2009). Nevertheless, glycerol is also obtained from other industrial activities as the production of bioethanol and soaps. As an abundant waste, low cost chemical, high energy reduced molecule and suitable carbon source, glycerol can be used as feed for its microbial conversion on other highly reduced fine and bulk chemicals such as 1,3-propanediol, 1,2-propanediol, BDO, dihydroxyacetone, polyglycerols, succinic acid, and various polyesters (Almeida et al., 2012; Ashby et al., 2009; Cho et al., 2015; He et al., 2018; Jhonson and Taconi, 2007; Meher et al., 2006; Rahman et al., 2018). Glycerol is metabolized by microorganisms, entering the pyruvate production pathway, which consists of two possible enzymatic conversion steps, the first one comprising the direct transformation of glycerol into dihydroxyacetone by the glycerol dehydrogenase (GLDH) enzyme, the other by the prior phosphorylation of glycerol by glycerol kinase (GK) and subsequent conversion on dihydroxyacetone-3-phosphate by glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPSA), both dihydroxyacetone and dihydroxyacetone-3-phosphate are precursors entering the glycolytic pyruvate production pathway being that pyruvate can be subsequently converted in a myriad of other important

molecules including BDO (Garg and Jain, 1995; Petrov and Petrova 2009; Silva et al., 2009; Syu, 2001; Zhang et al., 2009).

BDO is an organic compound that has been explored by the industry for the production of 1,3-butadiene, antifreeze additives, polyurethane and foams, plastic polymers, methyl ethyl ketone (MEK), liquid fuels and other fine chemistry compounds (Ashby et al., 2009; Cho et al., 2015; Rahman et al., 2018; Cho et al., 2015). The biosynthesis of BDO from pyruvate, on BDO producing strains, occurs by the action of three enzymes, α -acetolactate synthase (α -ALS), α -acetolactate decarboxylase (α -ALDC), and acetoin dehydrogenase (BDH). Considering *E. aerogenes*, there was identified a one copy operon containing the three genes: budA (α -ALDC), budB (α -ALS) and budC (BDH), respectively (Garg and Jain, 1995; Rao et al., 2011; Shin et al., 2012; Xu, et al., 2015; Yang et al., 2014). *E. aerogenes* produces α -acetolactate from two pyruvate molecules by α -ALS and subsequently α -acetolactate to acetoin by α -ALDC, α -acetolactate can also be readily converted spontaneously into diacetyl. Diacetyl and acetoin can be both converted into BDO by the BDH enzyme that can act both as acetoin reductase and butanediol dehydrogenase (Garg and Jain, 1995; Rao et al., 2011; Shin et al., 2012; Xu, et al., 2015; Yang et al., 2014).

Many strategies have been explored for higher BDO production titers from crude glycerol, one of those strategies of interest is the metabolic engineering of known BDO producing bacterium strains as *E. aerogenes* and *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) or the cloning of synthetic pathways for BDO production in *E. coli* (Cho et al., 2015; Petrov and Petrova 2009; Rahman et al., 2018; Cho et al., 2015; Xu, et al., 2014; Yang et al., 2014; Yang and Zhang, 2018; Zhang et al., 2018). Two main bottlenecks for BDO production from glycerol concern the speed and higher conversion of glycerol into pyruvate and subsequently from pyruvate to acetoin and BDO, and the other is the maintenance of redox balance of NADH and NAD⁺ inside the microorganism, as there is a relationship of four NADH to one NAD⁺ cofactor being released from the glycerol to BDO enzymatic pathway (Almeida et al., 2012; Li et al., 2013; Liu et al., 2018). Therefore, the development of a simple strategy

directioned to overcome both bottlenecks simultaneously can be a powerful approach to improve BDO production from glycerol.

Escherichia coli is well established as a suitable chassis for expression of various genes of interest and its genome have been extensively studied (Liu et al., 2018; Yang and Zhang, 2018). The strategies explored for BDO production in *E. coli* involved the overexpression of the three-enzyme pathway α -ALS, α -ALDC and BDH from other species such as *Klebsiella pneumoniae* budA, budB, *Bacillus subtilis* ydjL (BDH) (Förster et al., 2017; Tong et al., 2015; Yang and Zhang, 2018). Strains of *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, and *Enterobacter cloacae* were also explored as suitable sources of heterologous genes for α -ALS, α -ALDC and BDH cloning on *E. coli* (Xu, et al., 2014; Yang and Zhang, 2018). Not only the heterologous genes were cloned but also different expression promoters were tested aiming cheap inducer molecules and better cytoplasmic levels of enzymes (Yang and Zhang, 2018).

Other strategies for the cytoplasmic redox control have been explored. The overexpression of NAD synthesis pathway to increase its concentration, the knockdown of other deviant cofactor-consuming pathways, replacement of enzymes with different cofactor needs, the NADH to NADPH conversion for enzymes with preferential cofactor needs, cofactor regeneration systems and the creation of fusion proteins for simultaneous cofactor regeneration and conversion of substrate molecules (Bao et al., 2014; Fang et al., 2015; Liu et al., 2018). Fang et al. (2015) have developed a fusion protein of a GLDH and an NADH oxidase (NOX) for the development of a bi-enzyme system aiming increased production of dihydroxyacetone and as a biotechnological tool in glycerol analysis (Fang et al., 2015; Lu and Feng, 2008). Rahman et al. (2018) also suggest on its conclusions that the cloning of both a very efficient GLDH enzyme gene and the genes for BDO production budB and budC could lead to higher levels of BDO production (Rahman et al., 2018).

The development of novel combinatorial enzymes increasing redox homeostasis and carbon directing for BDO production are essential for the future development of biorefineries using waste

substrates as glycerol. In this work, we developed a fusion protein of a glycerol dehydrogenase and an acetoin reductase enzymes for both increased conversion of acetoin into BDO, increased directing of glycerol into the pyruvate producing pathway via dihydroxyacetone and to maintain a close exchange and recycling of NAD and NADH.

The peptide expressed can be studied in the future for applications as a second step enzymatic system for both dihydroxyacetone and BDO production using acetoin and glycerol obtained from previous fermentation steps and from biodiesel refineries respectively. The plasmid constructed can also be cloned into species of the genus *Enterobacter* or *Klebsiella* to evaluate its capacity to improve BDO production and accelerate glycerol consumption.

2. Materials and methods

2.1 Enzymes and chemicals

Acetoin and Glycerol were purchased from Sigma Aldrich (USA). Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) and kanamycin were purchased from Thermofisher scientific, (USA), YNB (Yeast Nitrogen Base) was acquired from Difco™. All chemicals used in this work were commercially available and analytical-graded.

2.2 Bacterial strain, vectors, and insert construction

The control vector pET28a+ was purchased from Merck Millipore (USA) and the synthetic plasmid pGLDH-BDH was constructed by Integrated DNA Technologies (IDT) (USA) using a pIDTsmart kanamycin resistance backbone vector. The genome of *Klebsiella aerogenes* KCTC2190 annotated under the NCBI accession number NC_015663.1 was utilized for a search of glycerol and BDO metabolism genes of interest for the fusion enzyme construction. After the selection of the two

enzymes GLDH and BDH, the Integrated DNA Technologies online system for codon optimisation was utilised on the primary sequence of the enzymes for *Klebsiella* species codons, this way, the genes obtained were different from the original ones, which would prevent homologous recombination if the plasmid is utilized in other studies involving cloning in *Enterobacter* and *Klebsiella* species. The codon optimization index for the insert was calculated using the Biologics International Corp codon adaptation index calculator. *Escherichia coli* DH5 α was used for cloning and expression of both pET28a+ and pGLDH-BDH plasmids.

2.3 Media and growth conditions

Escherichia coli DH5 α was grown in a Luria–Bertani (LB) medium containing (g/L): peptone 10.0 g/L, yeast extract 5.0 g/L and sodium chloride 5.0 g/L at pH 7.0 (Rahman et al., 2018). The LB broth medium was supplemented with 100 μ g/mL kanamycin when necessary to maintain the plasmids (Rahman et al., 2018).

An initial experiment was performed to define the inhibitory effect of acetoin on *E. coli* growth. *E. coli* DH5 α was grown overnight on LB medium at 37°C with 150 rpm agitation. 0,5 mL of previously grown *E. coli* were added to 10 mL LB medium with different ratios of glycerol and acetoin as carbon source, respectively: 50g/L to 0g/L; 45g/L to 5g/L; 40g/l to 10g/L; 35g/L to 15g/L; 30g/L to 20g/L and 25g/L to 25g/L. Cell concentration was measured at OD 600 after 4 and 8 hours of cultivation.

For the bioconversion study with the transformed *E. coli* strains, the YNB (Yeast Nitrogen Base) at pH 7.0 media supplemented with 0.2g/L casein hydrolysate was utilized. YNB was chosen to alleviate the lack of micronutrients and amino acids on the minimal medium. Two batches, one with the addition of 5g/L acetoin and 25g/L glycerol and the other with 25g/L glycerol solely were performed.

The cells were grown for 48 hours at 37°C, 150 rpm with sample recovery at 0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 24; 48, hours respectively, the initial cell concentration was defined as approximately 0.05 OD 600.

The two growth experiments were carried out using *E. coli* pET28a+, *E. coli* pGLDH-BDH non induced and *E. coli* pGLDH-BDH induced with IPTG 0.1 mM after 4 hours of growth. The samples collected were analyzed by HPLC for total acetoin and BDO concentration.

For the enzyme expression and crude lysate assay, the transformed *E. coli* was cultivated on Luria–Bertani (LB) and induced by the addition of IPTG at mid-log phase. The initial pH of all cultivation media was adjusted to 7.0 by adding NaOH/HCl and the temperature was maintained at 37°C with 150 rpm shaking.

2.4 Enzymatic reaction conditions and cell extracts

Cell extracts were obtained from pGLDH-BDH and pET28a+ transformed *E. coli*. Both transformants were grown at 50mL LB at 37°C under 150 rpm agitation and both were induced with IPTG at mid-log phase and let grow for more three hours after induction.

The cells were harvested by centrifugation for 5 minutes at 5000 rcf on a 5804R Eppendorf centrifuge at 4°C, the pelleted cells were washed three times with a 0.9% NaCl solution by centrifugation with the same previous conditions. The washed cells were then resuspended on 1mL deionized water by 10 seconds vortexing. The washed cells were then lysed by four freeze-thaw cycles, 40 minutes at room temperature and 20 minutes at -80°C. The total protein concentration of both pGLDH-BDH and pET28a+ *E. coli* extracts was carried out using the Bradford (1976) protocol.

The enzymatic reactions were performed on a total volume of 900µL reaction media pH 7.0 at 37°C and a total of 90µg of measured protein from *E. coli* pET28a+ and *E. coli* pGLDH-BDH cell extracts were utilized, maintaining a total protein concentration of 10µg/mL of reaction.

The reaction was carried out using approximately 45g/L glycerol and 3.5g/L acetoin containing 35mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.1mM NADH. The reaction was performed in quadruplicates and samples of 100 μL were collected at 10 and 30 minutes. The samples collected were diluted in 400 μL miliQ H₂O and then utilized on HPLC to measure acetoin, glycerol, and BDO. This experiment gives an overview of the pGLDH-BDH cells extracts capacity to accelerate glycerol conversion and production of BDO.

2.5 Expression and SDS-PAGE analysis of GLDH-BDH

The transformed *E. coli DH5 α* cells containing the plasmids pGLDH-BDH and pET28a+ were grown at 37 °C, in LB medium supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin 24 h with shaking at 150 rpm (Rahman et al., 2018). Those overnight cultures were inoculated into fresh LB medium containing kanamycin to an OD₆₀₀ of 0.05–0.1 (1:50 dilution of the overnight culture) (Fang et al., 2015; Rahman et al., 2018). The cultures were grown until they reach mid-log phase (OD₆₀₀ = 0.4–0.5, 2–3 h) (Fang et al., 2015; Rahman et al., 2018) and then induced by adding IPTG to a final concentration of 0.1 mM and incubated for an additional 3 hours. The cells were then harvested by centrifugation, washed, and submitted to 4 freeze-thaw cycles to obtain cell extracts. The cells extracts were measured to its total protein concentration by the Bradford (1976) method and a total of 50 μg of protein was utilized for SDS-PAGE sample preparation. The samples were prepared by the addition of β -mercaptoethanol, SDS-laemmli buffer (Laemmli, 1970) and were boiled for 10 minutes at 100 °C. Samples of *E. coli* pGLDH-BDH and *E. coli* pET28a+ were applied to an SDS-PAGE 10% gel and identified by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck) (Fang et al., 2015; Rahman et al., 2018). The Precision Plus Protein All Blue Standards from Bio-Rad was used to estimate the molecular weight of proteins.

2.6 Analytical

The biomass concentration was measured from the absorbance at 600 nm (Rahman et al., 2018). The optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was obtained from a cuvette spectrophotometer Biochrom Libra S12. The Major metabolic products (acetoin, glycerol and BDO) were identified and quantified by HPLC (Agilent Technology, model 9100; Shimadzu, model LC-20AD), using a refractive index detector with an Aminex HPX-87H column (Aminex®, Bio-Rad HPLC columns) (300mm x 7.8mm, 9µm) consisting of an H⁺ ion exchange column established by the copolymer styrene-divinylbenzene sulfonate, suitable for the separation of sugars, glycerol, acetoin, BDO and other alcohols. For the growth batches, acetoin, butanediol and optical density at 600nm wave length were measured and for the enzymatic reaction, glycerol, acetoin, and butanediol were measured.

2.7 Statistical analysis

All the experiments were performed in triplicate and the results expressed in terms of mean ± SD (standard deviation). The statistical analysis of data was performed to test the significant difference by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's honest significant difference (HSD) test ($p < 0.05$) (Rahman et al., 2018). The software Microcal Origin was used for graph construction and statistical analysis.

3. Results and discussion

The genome of *K. aerogenes* under the accession number NC_015663.1 was utilized for a search of glycerol and BDO metabolism genes of interest for the fusion enzyme construction. There were identified 25 genes for transport, gene expression regulation and metabolism of glycerol into

dihydroxyacetone-phosphate and dihydroxyacetone and 13 genes related to pyruvate conversion on acetolactate, acetoin, BDO, and acetoin utilization. The genes for the proteins GLDH (*gldA* gene) (NCBI accession number: WP_004146274) and BDH (*budC* gene) (NCBI accession number WP_015366942) were selected for the construction of a fusion enzyme aiming the production of BDO and consumption of glycerol. The GLDH enzyme selected is the main participant on conversion of glycerol in dihydroxyacetone and is expressed monomerically and the BDH enzyme is the only enzyme annotated in the genome of *K. aerogenes* to have the specific function as acetoin reductase. Both GLDH and BDH were selected also because they are complementary on the NADH/NAD cofactor usage, so by bringing both proteins close together by fusion it is expected that less cofactor molecules may be needed for dihydroxyacetone and BDO production as a more constant and interconversion of cofactor is expected to occur. The expected result is an increased directing of glycerol to the pyruvate forming pathway and an increase in acetoin conversion into BDO.

3.1 Construction of the fusion enzyme and plasmid pGLDH-BDH

The proteins for GLDH (*gldA* gene) (WP_004146274) and BDH (*budC* gene) (WP_015366942) from *K. aerogenes* KCTC 2190 were selected for the fusion enzyme sequence construction, the GLDH sequence was inserted on the amino-terminal portion of the enzyme and the BDH sequence was inserted at the carboxy-terminal portion. A small spacer with 9 amino acids was included between both enzymes. With the primary sequence of the fusion enzyme, the IDT online system for codon optimization was utilized and the unwanted restriction enzyme sites for AvrII, SpeI, NheI and HindIII sites were changed. The codon optimization was also employed to allow better expression and codon usage for *K. aerogenes* strains for further studies involving cloning of the plasmid containing the fusion enzyme on species of *Klebsiella* and *Enterobacter*. The CAI (codon adaptation index) obtained for the codon-optimized GLGH-BDH was 0.61 in *E. coli* and 0.71 in

Klebsiella pneumoniae indicating that the codon usage was appropriate for protein expression in both species. The strong promoter *tac* with the *lac* operator and the pET28a+ ribosomal binding site (RBS) were used for the fusion enzyme expression.

Following the two stop codons (TAA and TAG) used for the fusion enzyme, a subsequent RBS was included, followed by an ATG start codon, the cleavage sites for AvrII and SpeI restriction enzymes and a TAA stop codon, allowing the further cloning of other genes in operon with the fusion enzyme constructed.

Subsequent to this small cloning site, a *lac* promoter and operator were inserted, with a third RBS, an ATG start codon, the NheI and HindIII restriction enzyme cleavage sites, and a TAA stop codon. The addition of this small ORF aimed to allow the expression of other genes under a separated promoter from the fusion enzyme. No terminator sequence was added between the GLDH-BDH operon construct and the second ORF.

Both the *in operon* cloning site and *lac* expressed cloning site were introduced to allow further cloning of genes of interest for metabolic engineering aiming glycerol consumption and BDO production.

Finally, the sequence synthesized encompass the *tac* promoter until the last stop codon of the *lac* regulated cloning site and have a total of 2116 bp in size (Figure 1).

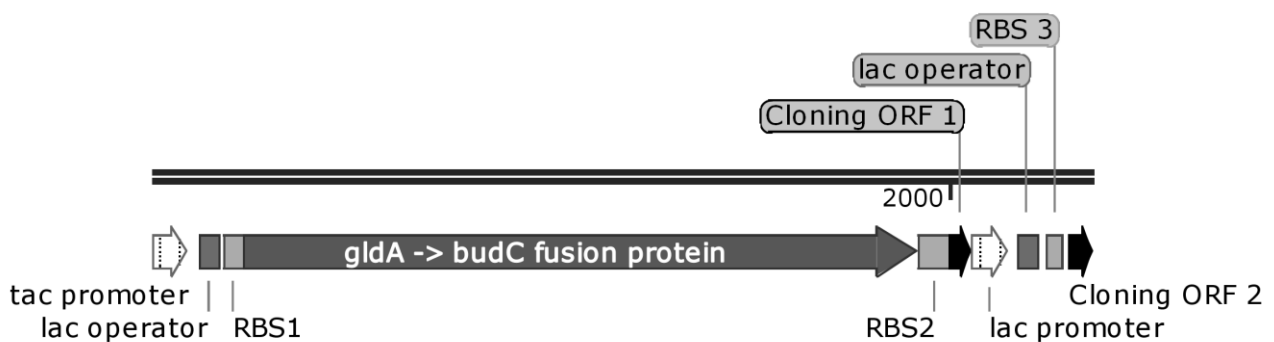


Fig. 1: Design of the fusion enzyme insert. 2116 bp DNA containing from 5' to 3': *tac* promoter; *lac* operator; first RBS; fusion enzyme CDS; second RBS; cloning ORF 1 (in-operon start codon followed by two restriction enzyme sites and one stop codon); *lac* promoter; *lac* operator; third RBS; cloning ORF 2 (start codon followed by two restriction enzyme sites and one stop codon). Figure created using the snapgene software.

The synthesized sequence was inserted on the pIDTSmart-kan vector with resistance to kanamycin, the sequence was inserted to allow the original *tonB* transcription terminator of the plasmid in frame with the two open reading frames (ORFs) of the synthesized sequence. The final pGLDH-BDH plasmid holds a total of 3838 bp of circular DNA and was cloned in *E. coli* DH5 α for expression of the fusion enzyme and further experiments.

3.2 Effect of acetoin on *E. coli* growth

Prior to the biotransformation experiments, a first analysis was carried out to define the acetoin inhibition effect or utilization over non transformed *E. coli* growth, by testing different ratios of glycerol and acetoin.

O.D 600 for the cultivation at 8 hours were measured and it was observed a decrease in cell concentration according to the different acetoin concentrations, which shows acetoin could have an inhibitory effect on *E. coli* and that *E. coli* is not able to consume acetoin as carbon source, lacking enzymes to its utilization or conversion (Figure 2).

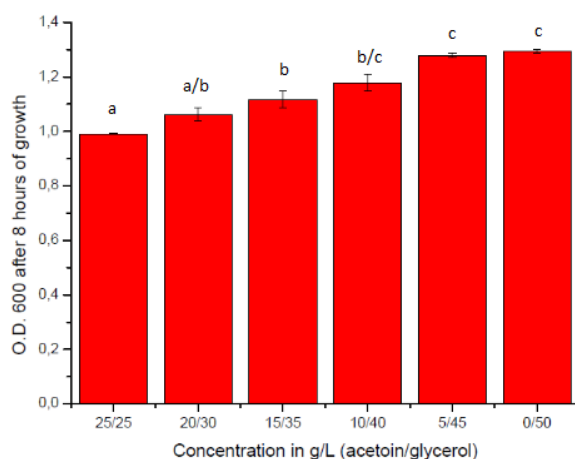


Fig 2. O.D. 600 of *E. coli* DH5 α growth after 8 hours on different acetoin/glycerol concentration. The statistical analysis showed 3 distinct groups (a,b,c) with significant difference ($p \leq 0,05$) and correlation with different glycerol/acetoin ratios.

Growth at 8 hours coincided with initial stationary phase for *E. coli* growth on the given conditions, and was used to evaluate cell density of the control *E. coli* as it could give a perspective of the effect of acetoin on growth speed and effects on the cell metabolism. Acetoin may have influence on the cell transport of nutrients and may compete with other molecules for access to membrane transporters. Acetoin can also compete with other molecules as carbohydrates and small alcohols for ligation with enzymes prostetic sites and cause a mild inhibitory effect on those enzymes activities. Nevertheless, acetoin in concentrations as 25 g/L pose a significant challenge for *E. coli* growth.

3.3 Fusion enzyme GLDH-BDH expression on *E. coli*.

The GLDH-BDH enzyme of (1148 a.a) with approximately 67 KDa was expressed and could be visualized on SDS-PAGE. 50 μ g of total proteins from both *E. coli* pGLDH-BDH and *E. coli*

pET28a+ extracts were used for SDS-PAGE analysis. The expected size of the fusion enzyme of 67KDa and its respective band was present only on *E. coli* pGLDH-BDH as shown in figure 3.

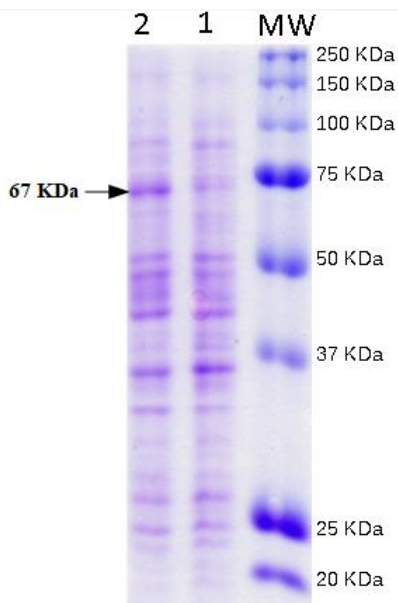


Fig. 3: SDS-PAGE analysis of the fusion enzyme present only on *E. coli* pGLDH-BDH. MW: Molecular weight marker. 1: *E. coli* pET28a+ extract. 2: *E. coli* pGLDH-BDH extracts.

3.4 *E. coli* pGLDH-BDH growth on YNB media

E. coli cells transformed with pET28a+ and the pGLDH-BDH plasmid were grown on YNB media without acetoin supplementation (figure 4A). In this case, both pGLDH induced and non-induced presented a slight diminished growth when compared to the pET28a+ transformed cells. However, when cultivated with a proportion of 25 g/L glycerol and 5g/L acetoin *E. coli* pGLDH-BDH showed an increase in growth (Figure 4B).

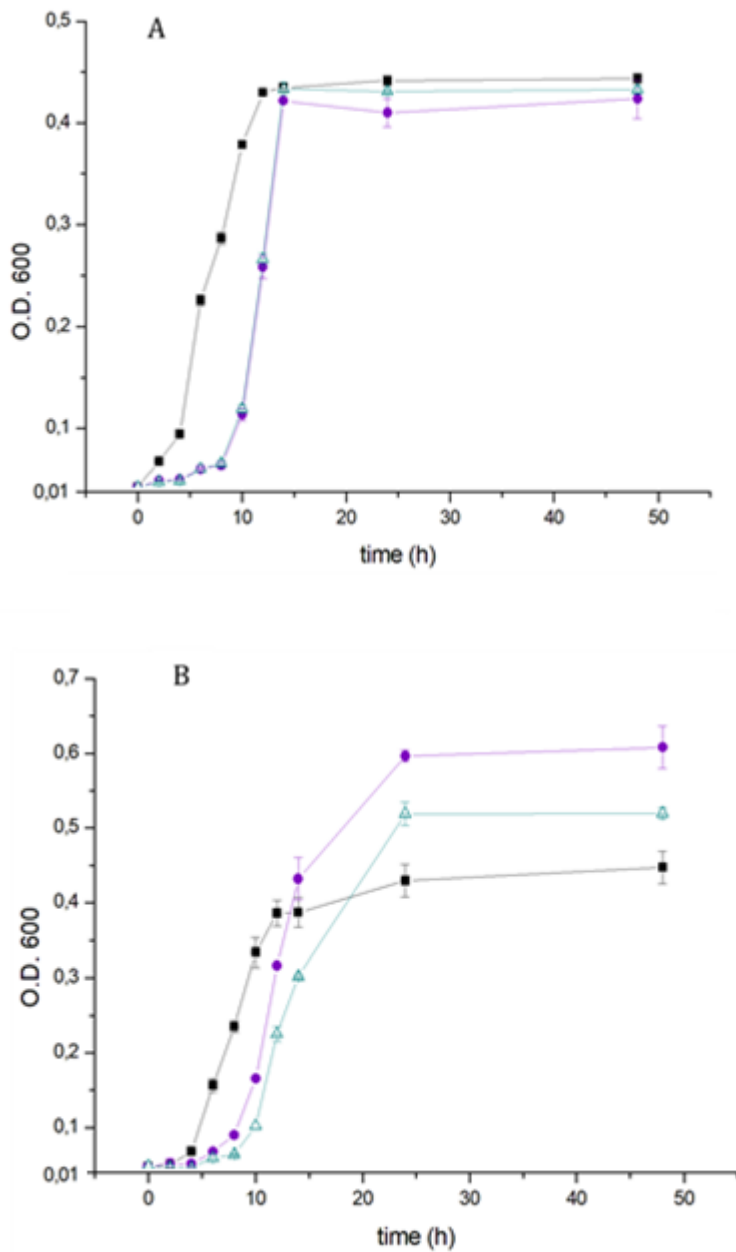


Fig. 4: Growth experiment with *E. coli* pET28a+ (—■—), *E. coli* pGLDH-BDH induced after 4h of growth (—●—) and pGLDH-BDH non-induced (—△—) on YNB media containing 25g/L glycerol and 0.2g/L casein hydrolysate pH 7.0 (A) or 25g/L glycerol, 5g/L acetoin and 0.2g/L casein hydrolysate pH 7.0 (B).

On other experiments when no acetoin was supplemented or when acetoin was supplemented in a concentration higher than 5g/L, the pGLDH-BDH transformed cells presented a diminished growth.

In all the cultivations, when *E. coli* pGLDH-BDH was grown only with glycerol, there was not detected the production of BDO, as *E. coli* lack the *budAB* genes.

Acetoin was converted into 2,3-butanediol by the pGLDH-BDH transformed *E. coli*. The measurement showed that pET28a+ transformed *E. coli* still absorbed acetoin, however, was unable to metabolize it. The major difference in acetoin concentration appeared at 24 hours growth when bacteria enter the stationary phase.

BDO was produced by pGLDH-BDH transformed *E. coli*. The production of BDO started at 10 hours cultivation and reached a final concentration of 0.343 (g/L) and 0.316 (g/L) BDO for the induced and uninduced pGLDH-BDH *E. coli* (samples diluted 1:5) (figure 5).

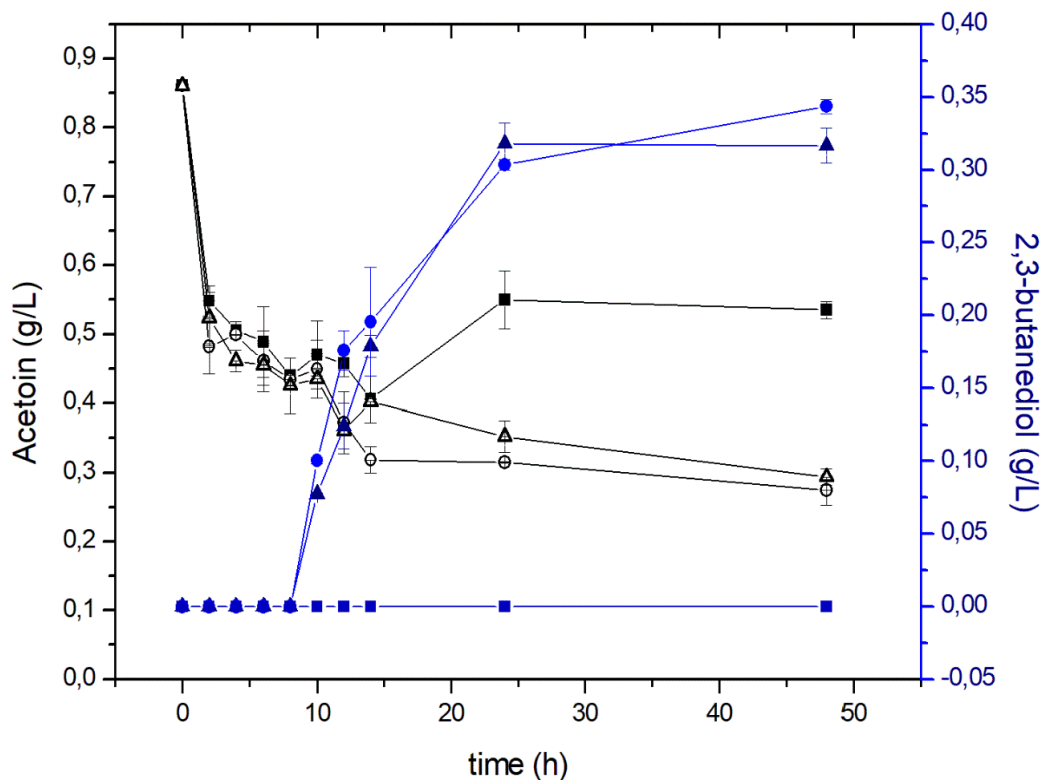


Fig. 5: Acetoin and BDO concentration profile for the growth experiment. Acetoin concentration: *E. coli* pET28a+ (—■—), *E. coli* pGLDH-BDH induced after 4h of growth (—○—)

) and pGLDH-BDH uninduced (—▲—). BDO concentration: *E. coli* pET28a+ (—■—), *E. coli* pGLDH-BDH induced after 4h of growth (—●—) and pGLDH-BDH uninduced (—▲—). YNB media containing an initial concentration of 25g/L glycerol and 5g/L acetoin.

BDO was produced by pGLDH-BDH transformed *E. coli*. The production of BDO started at 10 hours cultivation and reached a final concentration of 0.343 (g/L) and 0.316 (g/L) BDO for the induced and uninduced pGLDH-BDH *E. coli* (samples diluted 1:5).

Interestingly, the *log* phase coincided with the start of detectable production of BDO. Another interesting fact observed is that the supplemented acetoin concentration tended to diminish in all growth conditions until the *log* phase, which could be related to the number of cells multiplying and absorption of acetoin by the cells. After the *log* phase, only the pGLDH-BDH *E. coli* showed a steady decrease in extracellular acetoin concentration and the control *E. coli* showed a remarkable increase in extracellular acetoin concentration. This phenomenon observed may be related to the accumulation of acetoin inside the cell and subsequent release by cell lysis. Other possible explanation of this phenomenon observed is an initial accumulation of acetoin inside the cell by diffusion or facilitated diffusion by a membrane transporter and a subsequent stabilization of intracellular and extracellular concentrations of acetoin. This is especially interesting as the same mechanism for glycerol transport may play a role in acetoin transport, which could impact on the cell access to glycerol by competition for the membrane transporters. That could also be related to diminished growth of *E. coli* on 1 to 1 proportions of glycerol and acetoin. Despite that, the mechanisms of acetoin transport remain to be elucidated. Another interesting fact is that the pGLDH-BDH *E. coli* have an increased adaptation rate at initial cultivation than the control *E. coli*, which could be related to a number of possibilities, ranging from toxicity of the fusion enzyme to competition of resources for plasmidial replication, transcription and fusion enzyme expression.

3.5 *E. coli* pGLDH-BDH extracts enzymatic reaction5

On the enzymatic assay performed with both *E. coli* extracts, the final reaction samples obtained from *E. coli* pGLDH-BDH presented a considerably higher glycerol and acetoin conversion, an increase of approximately 12% and 29% after 30 minutes respectively when compared to the control *E. coli* pET28a+ (figure 6).

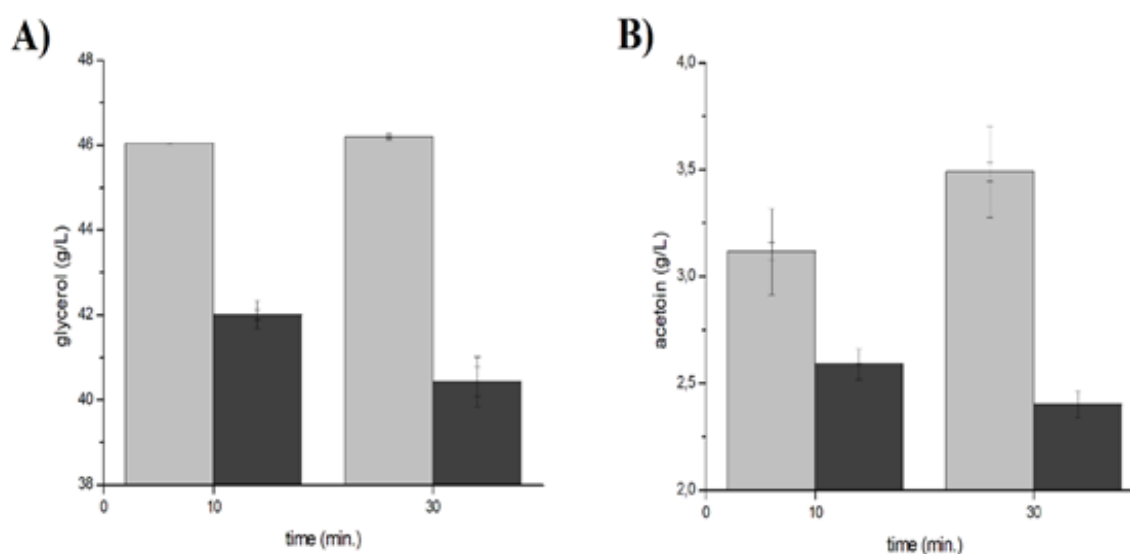


Fig 6. Enzymatic reaction using *E. coli* pet28a+ (■) and *E. coli* pGLDH-BDH (■) extracts after 10 and 30 minutes. A) Total glycerol conversion. Significant difference ($p \leq 0.05$) between pGLDH and pET28a+ extracts only after 30 minutes of reaction B) Total acetoin conversion. Significant difference ($p \leq 0.05$) between pGLDH and pET28a+ extracts at 10 and 30 minutes of reaction.

Only the *E. coli* pGLDH-BDH extracts were able to produce BDO, reaching the final concentration of 0.38 g/L of BDO after 10 minutes and 0.44 g/L BDO after 30 minutes of reaction.

3.6 Discussion

GLDH-BDH enzyme was developed with a CAI of 0.61 for *E. coli* and 0.71 for *Klebsiella pneumoniae* which guaranteed considerable expression levels being that codon utilization is in strong relation with expression and protein quality and folding (Angov et al., 2008; Fang et al., 2015; Marin, 2008). The designed plasmid was created to allow novel heterologous genes to be cloned, which could be used for metabolic engineering of both *Escherichia* and *Klebsiella* species.

The increased adaptation period of growth observed on *E. coli* pGLDH-BDH when grown with higher amounts of acetoin or in the absence of acetoin could be related to the fusion enzyme toxicity to the cells or interaction with other enzymes present in the cytoplasm, other explanation is the use of the strong promoters *tac* and *lac* and a strong origin of replication *ori* from pUC18 which could be responsible to an increase in transcription of the insert ORFs and multiplication of the plasmids, depleting the bacteria of ribonucleotides and nucleotides for its own homeostasis and division. A third hypothesis for the diminished growth observed is the difference on expression moment, being that species of *Klebsiella* and *Enterobacter* only start producing BDO at the end of growth phase and during stationary phase, which could lead to product inhibition on *E. coli*, by its early expression and production of BDO. Despite that, on a 25g/L glycerol 5g/L acetoin supplemented medium, *E. coli* pGLDH-BDH presented a higher growth after 48 hours incubation, which bestows the correct relation of substrate concentration to correct functioning of the fusion enzyme and correct recycling of the coenzymes, allowing a higher conversion of glycerol into biomass which could diminished the plasmid genetic cargo.

The same effect on growth inhibition at initial *log* phase and subsequent increased growth on final *log* phase was also observed on a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* overexpressing separately the *K. pneumoniae* heterologous GLDH and BDH enzymes genes (Yang et al., 2015). In the case of the modified *Bacillus amyloliquefaciens* (a known BDO producer), the final titer of BDO obtained was 103.4 g/L after the overexpression of the acetoin metabolism activator protein *alsR* gene and an

improve on fermentation conditions (Yang et al., 2015). Yang et al., 2015 also concluded that there was no difference between the intracellular ratio of NADH and NAD on both transformed and control strains, which showed the overexpression of the enzymes was able to maintain the regeneration of cofactors coping with a possible NAD/NADH imbalance.

It is important to notice that *E. coli* pGLDH-BDH was slower to adapt and to grow, which could be caused by excessive fusion protein mRNA, plasmidial DNA replication and peptide production as discussed previously. As a strategy for further studies involving cloning and expression of this enzyme, a T7 promoter could be used on BL21DE3 *E. coli* cells for a better control of expression proteins and possible toxicity effects on growth. However, in this project, it was desirable to have a common promoter for the fusion enzyme, which could allow the ORF to be expressed on other bacterial strains lacking the T7 transcriptase. Other possibilities are the usage of the constructed plasmid for overexpression of other genes of interest for glycerol and BDO metabolism on different *chassis*, as the plasmid contains two specific cloning sites, one for an operon expression of newly cloned proteins with the fusion enzyme, and the other with an independent *lac* promoter. The cloning of the *alsR* gene, an activator of BDO metabolism gene, overexpression of transport proteins for glycerol or other genes directed for dihydroxyacetone, dihydroxyacetone-phosphate formation and a triosephosphate-isomerase overexpression for directing dihydroxyacetone to glyceraldehyde-phosphate formation could lead to increased production of BDO and consumption of glycerol, or an acceleration of the fermentation process. The remaining *budAB* genes could also be overexpressed in a novel synthetic operon.

E. coli pGLDH-BDH extracts were able to increase glycerol conversion and to produce BDO. After 30 minutes of reaction, a total of 0.44g/L of BDO was produced from acetoin (initial concentration of approximately 3.5g/L) which showed the potential of the fusion enzyme for production of BDO and consumption of glycerol.

Considering the enzymatic assay, a greater initial concentration of glycerol (approximately 45g/L) compared to acetoin (approximately 3.5g/L) was utilised to influence in the directing of NADH recycling for the BDH enzyme and to approximate to the substrate concentrations on actual fermentations by known BDO producers. The experiment was also designed to evaluate a possible use of the cell extracts as an enzymatic adjuvant for BDO production and to validate the fusion enzyme as a suitable tool for metabolic engineering, to subsequent uses.

Other aspects of the fusion enzyme developed remain to be evaluated, as optimal pH and optimal substrate concentrations, nevertheless, the fusion enzyme was able to show the capacity to perform both glycerol dehydrogenase and acetoin reductase activities. One interesting aspect that could be investigated is the alteration of the GLDH-BDH activity only with acetoin and NADH as substrates compared to a non-fused overexpressed BDH enzyme as well as the GLDH-BDH activity only with glycerol and NAD as substrates compared to a non fused GLDH enzyme. That experiment could provide insights on possible effects of better solubility of enzyme or possible protein fusion effect on the activity of both GLDH and BDH.

4. Conclusions

The fusion enzyme developed in this work is able to both increase glycerol and acetoin consumption and lead to BDO production on *E. coli* DH5 α cells and in cell extracts containing the enzyme. Cells expressing the fusion enzyme were able to reach higher growth levels and biomass formation. The fusion enzyme can be further used for optimization of BDO production from glycerol on other known BDO producing bacterial species. Other studies should be performed to define the optimal activity conditions of this new fusion enzyme.

5. Acknowledgments

This work was supported by the National Council of technological and scientific development of Brazil (CNPq) and the Institute of Biotechnology of the University of Caxias do Sul (Caxias do Sul, RS Brazil).

6. Authors contribution

Conceived and designed the experiments: MS RCRM SE. Performed the experiments: MS RCRM. Analyzed the data: MS RCRM SE. Contributed reagents/materials/analysis tools: SC MMS. Wrote the paper: MS SE.

7. References

Almeida, J.R.M., Fávares, L.C.L., Quirino, B.F., 2012. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels* 5, 48.

Angov, E., Hillier, C.J., Kincaid, R.L., Lyon, J.A., 2008. Heterologous Protein Expression Is Enhanced by Harmonizing the Codon Usage Frequencies of the Target Gene with those of the Expression Host. *PLoS ONE* 3.

Ashby, R.D., Wyatt, V.T., Foglia, T.A., Solaiman, D.K.Y., 2009. Industrial Products from Biodiesel Glycerol. *Biocatalysis and Bioenergy* 131–154.

Bao, T., Zhang, X., Rao, Z., Zhao, X., Zhang, R., Yang, T., Xu, Z., Yang, S., 2014. Efficient Whole-Cell Biocatalyst for Acetoin Production with NAD Regeneration System through Homologous Co-

Expression of 2,3-Butanediol Dehydrogenase and NADH Oxidase in Engineered *Bacillus subtilis*. PLoS ONE 9.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.

Cho, S., Kim, T., Woo, H.M., Kim, Y., Lee, J., Um, Y., 2015. High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. *Biotechnology for Biofuels* 8.

Fang, B., Jiang, W., Zhou, Q., Wang, S., 2015. Codon-Optimized NADH Oxidase Gene Expression and Gene Fusion with Glycerol Dehydrogenase for Bienzyme System with Cofactor Regeneration. *Plos One* 10.

Förster, A.H., Beblawy, S., Golitsch, F., Gescher, J., 2017. Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnology for Biofuels* 10.

Garg, S. K., Jain, A., 1995. Fermentative Production of 2,3-Butanediol: A Review. *Fuel and Energy Abstracts* 36, 275.

He, Y., Chen, F., Sun, M., Gao, H., Guo, Z., Lin, H., Chen, J., Jin, W., Yang, Y., Zhang, L., Yuan, J., 2018. Efficient (3S)-Acetoin and (2S,3S)-2,3-Butanediol Production from meso-2,3-Butanediol Using Whole-Cell Biocatalysis. *Molecules* 23, 691.

Johnson, D.T., Taconi, K.A., 2007. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress* 26, 338–348.

Kalia, V.C., Prakash, J., Koul, S., 2016. Biorefinery for Glycerol Rich Biodiesel Industry Waste. *Indian Journal of Microbiology* 56, 113–125.

Karinen, R., Krause, A., 2006. New biocomponents from glycerol. *Applied Catalysis A: General* 306, 128–133.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Li, C., Lesnik, K., Liu, H., 2013. Microbial Conversion of Waste Glycerol from Biodiesel Production into Value-Added Products. *Energies* 6, 4739–4768.

Liu, J., Li, H., Zhao, G., Caiyin, Q., Qiao, J., 2018. Redox cofactor engineering in industrial microorganisms: strategies, recent applications and future directions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 45, 313–327.

Lu, P., Feng, M.-G., 2008. Bifunctional enhancement of a β -glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 579–587.

Marin, M., 2008. Folding at the rhythm of the rare codon beat. *Biotechnology Journal* 3, 1047–1057.

Meher, L., Vidyasagar, D., Naik, S., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification — a review. *Fuel and Energy Abstracts* 47, 353.

Pagliari, M., Ciriminna, R., Kimura, H., Rossi, M., Pina, C.D., 2009. Recent advances in the conversion of bioglycerol into value-added products. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 788–799.

Parate, R.D., Rode, C.V., Dharne, M.S., 2018. 2,3-Butanediol Production from Biodiesel Derived Glycerol. *Current Environmental Engineering* 5, 4–12.

Petrov, K., Petrova, P., 2009. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 659–665.

Rahman, M.S., Xu, C.C., Qin, W., 2018. Exotic glycerol dehydrogenase expressing *Escherichia coli* increases yield of 2,3-butanediol. *Bioresources and Bioprocessing* 5.

Rahmat, N., Abdullah, A.Z., Mohamed, A.R., 2010. Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 987–1000.

Rao, B., Zhang, L.Y., Sun, J.A., Su, G., Wei, D., Chu, J., Zhu, J., Shen, Y., 2011. Characterization and regulation of the 2,3-butanediol pathway in *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 2147–2159.

Shin, S.H., Kim, S., Kim, J.Y., Lee, S., Um, Y., Oh, M.-K., Kim, Y.-R., Lee, J., Yang, K.-S., 2012. Complete Genome Sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190. *Journal of Bacteriology* 194, 2373–2374.

Silva, G.P.D., Mack, M., Contiero, J., 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27, 30–39.

Syu, M.-J., 2001. Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 10–18.

Tong, Y.-J., Ji, X.-J., Shen, M.-Q., Liu, L.-G., Nie, Z.-K., Huang, H., 2015. Constructing a synthetic constitutive metabolic pathway in *Escherichia coli* for (R, R)-2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 637–647.

Xu, Y., Chu, H., Gao, C., Tao, F., Zhou, Z., Li, K., Li, L., Ma, C., Xu, P., 2014. Systematic metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield production of fuel bio-chemical 2,3-butanediol. *Metabolic Engineering* 23, 22–33.

Xu, G.-C., Bian, Y.-Q., Han, R.-Z., Dong, J.-J., Ni, Y., 2015. Cloning, Expression, and Characterization of *budC* Gene Encoding meso-2,3-Butanediol Dehydrogenase from *Bacillus licheniformis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 178, 604–617.

Yang, T.H., Rathnasingh, C., Lee, H.J., Seung, D., 2014. Identification of acetoin reductases involved in 2,3-butanediol pathway in *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Biotechnology* 172, 59–66.

Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Xu, M., Xu, Z., Yang, S.-T., 2015. Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial Cell Factories* 14.

Yang, Z., Zhang, Z., 2018. Recent advances on production of 2,3-butanediol using engineered microbes. *Biotechnology Advances*.

Zhang, Y., Huang, Z., Du, C., Li, Y., Cao, Z.A., 2009. Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metabolic Engineering* 11, 101–106.

Zhang, L., Singh, R., D, S., Guo, Z., Li, J., Chen, F., He, Y., Guan, X., Kang, Y.C., Lee, J.-K., 2018. An artificial synthetic pathway for acetoin, 2,3-butanediol, and 2-butanol production from ethanol using cell free multi-enzyme catalysis. *Green Chemistry* 20, 230–242.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- Neste trabalho, foi possível identificar os principais genes envolvidos no consumo e metabolismo de glicerol e na produção de BDO em *Klebsiella aerogenes* KCTC2190, montando assim um repertório de “ferramentas genéticas” ou *biobricks* que podem ser utilizados visando a engenharia metabólica de microrganismos de interesse.

- A partir deste repertório de “ferramentas genéticas” foi possível construir um gene para expressão de proteína quimérica entre uma enzima glicerol desidrogenase e uma enzima acetoína redutase, visando aumento no consumo de glicerol e produção de BDO e a manutenção de uma reciclagem mútua entre NADH e NAD próxima a enzima quimérica.

- O plasmídeo contendo o gene para a enzima quimérica foi clonado em *E. coli*. Sendo que foi possível a seleção de células transformantes em meio contendo marcador antibiótico do plasmídeo.

- A enzima quimérica foi expressa eficazmente em *E. coli* DH5 α tanto em indução com IPTG ou sem indução com IPTG e foi possível sua visualização em gel de poliacrilamida SDS.

- A enzima quimérica construída neste trabalho foi capaz de aumentar o crescimento celular e levar a produção de BDO a partir de acetoína em *E. coli* DH5 α , quando em crescimento em meio contendo 25g/L de glicerol e 5g/L de acetoína.

- A proteína quimérica em extrato celular também foi capaz de aumentar a conversão de glicerol e a produção de BDO em reação enzimática contendo 45g/L de glicerol e 5g/L de acetoína.

- A proteína quimérica desenvolvida apresentou potencial para sua utilização em estudos futuros, visando sua avaliação como um aditivo em processo fermentativo visando consumo de glicerol e produção de BDO, assim como sua clonagem e expressão em espécies produtoras de acetoína.

- Não foi possível a transformação de *Enterobacter aerogenes* ATCC13048 com o plasmídeo desenvolvido ou com plasmídeo controle pET28a+. Espécies do gênero *Enterobacter* já foram descritas como cepas de transformação difícil apesar de existirem protocolos descritos para transformação de algumas espécies próximas como *Klebsiella pneumoniae*. Para *Enterobacter aerogenes* ATCC13048, nenhum protocolo existente foi encontrado para sua transformação. Os possíveis motivos para a dificuldade encontrada em transformar *E. aerogenes* podem ser: a possível falta de fatores de transcrição para expressão da proteína de resistência a canamicina; a possível ausência de fator de replicação que se adeque a origem de replicação do plasmídeo; sistemas de proteção interna da bactéria contra DNA exógeno ou outras endonucleases nativas da bactéria.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso do plasmídeo construído neste trabalho se mostrou promissor como uma ferramenta para engenharia metabólica visando o aumento no consumo de glicerol e visando a produção de BDO. Em estudos futuros, o plasmídeo pGLDH-BDH pode ser utilizado para clonagem de novos genes envolvidos nas vias metabólicas de consumo de glicerol e produção de BDO, o plasmídeo foi construído para permitir a clonagem de genes de interesse em operon com a enzima quimérica, ou sob promotor lac independente, as enzimas de restrição selecionadas para clonagem foram escolhidas por não estarem presentes nativamente nos genes originais de *Klebsiella aerogenes* KCTC2190, assim sendo, genes como a proteína facilitadora de glicerol, os genes *budAB*, glicerol-3-fosfato desidrogenase, glicerol kinase entre outros podem ser amplificados por PCR e logo em seguida clonados no plasmídeo.

Apesar de não ter sido alcançada a inserção do plasmídeo pGLDH-BDH em *Enterobacter aerogenes* ATCC13048, outras espécies do gênero *Klebsiella* podem ser utilizadas na tentativa de clonagem do plasmídeo de interesse, atualmente, alguns protocolos para transformação de *Klebsiella pneumoniae* já foram descritos, utilizando eletroporação e cloreto de cálcio.

O plasmídeo construído ainda pode ser utilizado em *Escherichia coli* para superprodução da enzima quimérica, visando sua purificação ou utilização em extratos de células para acelerar ou melhorar os processos fermentativos de glicerol para produção de BDO, Para tanto, seria necessário a realização de análise de fermentação de glicerol na presença de cepas formadoras de BDO e do extrato contendo a enzima quimérica ou da enzima quimérica purificada.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMS, Bryn L.. The Next Generation of Synthetic Biology Chassis: Moving Synthetic Biology from the Laboratory to the Field. **Acs Synthetic Biology**, [s.l.], v. 5, n. 12, p.1328-1330, 26 set. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acssynbio.6b00256>.

ALMEIDA, João R M; FÁVARO, Léia C L; QUIRINO, Betania F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.5-48, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-5-48>.

ALVES, Madalena; ABREU, Angela. Produção de hidrogénio a partir de resíduos. **Valorização de Resíduos**, Braga, v. 1, n. 1, p.16-17, set. 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1822/5858>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

AMARAL, Priscilla F. Fonseca et al. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food And Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 87, n. 3, p.179-186, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2009.03.008>.

ANTONOVSKY, Niv et al. Sugar Synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*. *Cell*, [s.l.], v. 166, n. 1, p.115-125, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.064>.

ANVARI, Maesomah; MOTLAGH, Mohammad Reza Safari. Enhancement of 2,3-Butanediol Production by *Klebsiella oxytoca* PTCC 1402. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, [s.l.], v. 2011, p.1-7, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/636170>.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Rev Analytica**, n. 26, p. 56-62, 2007

ASHBY, Richard D. et al. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, [s.l.], v. 82, n. 9, p.625-630, set. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-005-1120-3>.

BALL, Philip. Synthetic biology—Engineering nature to make materials. **Mrs Bulletin**, [s.l.], v. 43,

n. 7, p.477-484, jul. 2018. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1557/mrs.2018.165>.

BAR-EVEN, A. et al. Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 107, n. 19, p.8889-8894, 21 abr. 2010. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907176107>.

BAR-EVEN, Arren et al. Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. **Nature Chemical Biology**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.509-517, jun. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.971>.

BAR-EVEN, Arren. Formate Assimilation: The Metabolic Architecture of Natural and Synthetic Pathways. **Biochemistry**, [s.l.], v. 55, n. 28, p.3851-3863, 5 jul. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00495>.

BARTOWSKY, Eveline J.; HENSCHKE, Paul A.. The ‘buttery’ attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 96, n. 3, p.235-252, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.013>.

ANP . **Glicerina gerada na produção de biodiesel (B100), segundo grandes regiões e unidades da Federação – 2007-2016**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

BOGORAD, Igor W.; LIN, Tzu-shyang; LIAO, James C.. Synthetic non-oxidative glycolysis enables complete carbon conservation. **Nature**, [s.l.], v. 502, n. 7473, p.693-697, 29 set. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12575>.

BRASIL, Farming. **B10 entra em vigor e mistura do biodiesel ao diesel avança de 8% para 10%**. 2018. Disponível em: <<https://sfagro.uol.com.br/b10-entra-em-vigor-e-industria-atendera-demanda-por-biodiesel-de-55-bilhoes-de-litros/>>. Acesso em: 14 ago. 2018.

CARBONELL, Pablo et al. Retropath: Automated Pipeline for Embedded Metabolic Circuits. **Acs Synthetic Biology**, [s.l.], v. 3, n. 8, p.565-577, 16 out. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/sb4001273>.

CARDOSO, Bárbara Françoise; SHIKIDA, Pery Francisco Assis; FINCO, Adele. Development of Brazilian Biodiesel Sector from the Perspective of Stakeholders. **Energies**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.399-413, 20 mar. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en10030399>.

CELIŃSKA, E.; GRAJEK, W.. Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.715-725, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.002>.

CERRO-ALARCÓN, Miriam et al. Biomass to fuels: A water-free process for biodiesel production with phosphazene catalysts. **Applied Catalysis A: General**, [s.l.], v. 346, n. 1-2, p.52-57, ago. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2008.05.002>.

CHAN, Leon y; KOSURI, Sriram; ENDY, Drew. Refactoring bacteriophage T7. **Molecular Systems Biology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-10, 13 set. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100025>.

CHENG, Ke-ke et al. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 26, n. 11, p.911-915, jun. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/b:bile.0000025902.44458.f4>.

CHHETRI, Arjun; WATTS, K.; ISLAM, M.. Waste Cooking Oil as an Alternate Feedstock for Biodiesel Production. **Energies**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.3-18, 10 abr. 2008. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en1010003>.

CHO, Sukhyeong et al. High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-12, 15 set. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-015-0336-6>.

DANNER, Herbert; BRAUN, Rudolf. Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.395-405, 1999. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/a806968i>.

DEMIRBAS, M.f.; BALAT, Mustafa. Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: A global perspective. **Energy Conversion And Management**, [s.l.], v. 47, n. 15-16, p.2371-2381, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2005.11.014>.

DHARMADI, Yandi; MURARKA, Abhishek; GONZALEZ, Ramon. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 94, n. 5, p.821-829, ago. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.21025>.

DILLS, Steven S. et al. Carbohydrate transport in bacteria. **Microbiological Reviews**, California, v. 3, n. 44, p.385-418, set. 1980.

DREIER, Birgit et al. Development of Zinc Finger Domains for Recognition of the 5'-ANN-3' Family of DNA Sequences and Their Use in the Construction of Artificial Transcription Factors. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 276, n. 31, p.29466-29478, 4 maio 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m102604200>.

DU, Wei et al. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 30, n. 3-4, p.125-129, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.04.004>.

DUEBER, J. E.. Reprogramming Control of an Allosteric Signaling Switch Through Modular Recombination. **Science**, [s.l.], v. 301, n. 5641, p.1904-1908, 26 set. 2003. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1085945>.

DWYER, M. A.. Computational Design of a Biologically Active Enzyme. **Science**, [s.l.], v. 304, n. 5679, p.1967-1971, 25 jun. 2004. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1098432>.

ELLEUCHE, Skander. Bringing functions together with fusion enzymes—from nature's inventions to biotechnological applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 99, n. 4, p.1545-1556, 24 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6315-1>.

ERB, Tobias J; JONES, Patrik R; BAR-EVEN, Arren. Synthetic metabolism: metabolic engineering meets enzyme design. **Current Opinion In Chemical Biology**, [s.l.], v. 37, p.56-62, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.023>.

FAGHIH-MIRZAEI, Ehsan et al. Biotransformation of acetoin to 2,3-butanediol: Assessment of

plant and microbial biocatalysts. **Research In Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.349-354, 2016. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/1735-5362.189330>.

FLICKINGER, M. C. Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come? **Biotechnology and Bioengineering**. 22: 27-48. 1980.

FU, Jing et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for chiral pure meso-2,3-butanediol production. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-14, 19 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-016-0502-5>.

GARG, S.k.; JAIN, A.. Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 51, n. 2-3, p.103-109, jan. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00136-o](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(94)00136-o).

GIRARDI, Viviane. **EMPREGO DO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE 2,3-BUTANODIOL POR *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048**. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2014.

GSL BIOTECH LLC. **Snappgene plasmid viewer software**. 2017. Disponível em: <www.snappgene.com>. Acesso em: 01 mar. 2017.

HANSEN, C. F. et al. A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. **Animal Production Science**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.154-161, 2009. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/ea08210>.

HATTI-KAUL, Rajni et al. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.119-124, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.01.001>.

HEINEMANN, M.; PANKE, S.. Synthetic biology--putting engineering into biology. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 22, n. 22, p.2790-2799, 5 set. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl469>.

HOHMANN, Stefan et al. Microbial MIP channels. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.33-38, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01645-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01645-5).

IDT (United States Of America). **Integrated Dna Technologies Ltda.** OligoAnalyzer Tool. 2017. Disponível em: <<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

ITO, Takeshi et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, [s.l.], v. 100, n. 3, p.260-265, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.260>.

JANTAMA, Kaemwich et al. 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 *Klebsiella oxytoca* in mineral salts medium. **Metabolic Engineering**, [s.l.], v. 30, p.16-26, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2015.04.004>.

JI, Xiao-jun; HUANG, He; OUYANG, Ping-kai. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.351-364, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.007>.

JOHNSON, Duane T.; TACONI, Katherine A.. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.338-348, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ep.10225>.

KALIA, Vipin Chandra; PRAKASH, Jyotsana; KOUL, Shikha. Biorefinery for Glycerol Rich Biodiesel Industry Waste. **Indian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 56, n. 2, p.113-125, 20 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-016-0583-7>.

KALLIO, Pauli et al. An engineered pathway for the biosynthesis of renewable propane. **Nature Communications**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-8, 2 set. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5731>.

KANEHISA LABORATORIES (Japan). **Kyoto Encyclopedia of genes and genomes**. 2017.

Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

KAUR, Guneet; SRIVASTAVA, A.k.; CHAND, Subhash. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 64, p.106-118, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.002>.

KHAYATI, G et al. Enhancement of 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* PTCC 1290: Application of Taguchi methodology for process optimization. **African Journal Of Biotechnology**. Tehran, p. 6304-6310. nov. 2009. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/66143/53853>>. Acesso em: 05 nov. 2018.

KONG, Pei San; AROUA, Mohamed Kheireddine; DAUD, Wan Mohd Ashri Wan. Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: A feasibility evaluation. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 63, p.533-555, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.05.054>.

LAGES, Fernanda; LUCAS, Cândida. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, [s.l.], v. 1322, n. 1, p.8-18, nov. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0005-2728\(97\)00062-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0005-2728(97)00062-5).

LARI, Giacomo M. et al. Environmental and economical perspectives of a glycerol biorefinery. **Energy & Environmental Science**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.1012-1029, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7ee03116e>.

LEE, Soojin et al. Synthesis of Pure meso-2,3-Butanediol from Crude Glycerol Using an Engineered Metabolic Pathway in *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 166, n. 7, p.1801-1813, 21 mar. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9593-z>.

LI, Qiang; DU, Wei; LIU, Dehua. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 80, n. 5, p.749-756, 9 ago. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1625-9>.

LI, Zheng-jun et al. Microbial production of meso-2,3-butanediol by metabolically engineered

Escherichia coli under low oxygen condition. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 87, n. 6, p.2001-2009, 25 maio 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2676-2>.

LIANG, Feiyan; LINDBLAD, Peter. Effects of overexpressing photosynthetic carbon flux control enzymes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. **Metabolic Engineering**, [s.l.], v. 38, p.56-64, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2016.06.005>.

LU, Xinyao et al. The role of budABC on 1,3-propanediol and 2,3-butanediol production from glycerol in *Klebsiella pneumoniae* CICIM B0057. **Bioengineered**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.439-444, 20 jul. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21655979.2016.1169355>.

MAO, Steve. Taking CRISPR technology further. **Science**, [s.l.], v. 360, n. 6387, p.393.4-393, 26 abr. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.360.6387.393-d>.

MARTIN, Vincent J J et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 7, p.796-802, 1 jun. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt833>.

MAZUMDAR, Suman; LEE, Jinwon; OH, Min-kyu. Microbial production of 2,3 butanediol from seaweed hydrolysate using metabolically engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 136, p.329-336, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.013>.

MEHER, L; VIDYASAGAR, D; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.248-268, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>.

MOTA, Claudio J. A.; SILVA, Carolina X. A. da; GONÇALVES, Valter L. C.. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.639-648, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000300008>.

MU, Ying et al. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude

glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 28, n. 21, p.1755-1759, 10 ago. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-006-9154-z>.

NAKASHIMA, Nobutaka; AKITA, Hironaga; HOSHINO, Tamotsu. Establishment of a novel gene expression method, BICES (biomass-inducible chromosome-based expression system), and its application to the production of 2,3-butanediol and acetoin. **Metabolic Engineering**, [s.l.], v. 25, p.204-214, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2014.07.011>.

NCBI (United States Of America). **National Center For Biotechnology Information (Comp.)**. *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 chromosome, complete genome. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_015663.1>. Acesso em: 01 mar. 2017.

NEVES, Luís Miguel Viegas das. **Produção de biohidrogénio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2009.

NIELSEN, David R. et al. Metabolic engineering of acetoin and meso-2, 3-butanediol biosynthesis in *E. coli*. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.274-284, mar. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.200900279>.

NISHIMURA, A. et al. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. **Nucleic Acids Research**, Japan, v. 18, n. 20, p.6169-6169, jul. 1990.

NOMANBHAY, Saifuddin; HUSSEIN, Refal; ONG, Mei Yin. Sustainability of biodiesel production in Malaysia by production of bio-oil from crude glycerol using microwave pyrolysis: a review. **Green Chemistry Letters And Reviews**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.135-157, 14 mar. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17518253.2018.1444795>.

NOVAGEN. **PET System Manual**. 2003. Disponível em: <https://lifeserv.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/protocols/Novagen_pET_system_manual.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2017.

NOVAGEN (United States Of America). **PET-28a-c(+) Vectors**. 2017. Disponível em: <<https://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pET28.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

OH, Baek-rock et al. Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 4, p.3918-3922, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.007>.

OLIVEIRA, Rafael R. de; NICHOLSON, Wayne L.. Synthetic operon for (R,R)-2,3-butanediol production in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 100, n. 2, p.719-728, 10 out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7030-2>.

OOI, T.I. et al. Glycerol Residue - A Rich Source of Glycerol and Medium Chain Fatty Acids. **Journal Of Oleo Science**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.29-33, 2004. Japan Oil Chemists' Society. <http://dx.doi.org/10.5650/jos.53.29>.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 82, n. 1, p.43-49, mar. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00149-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00149-3).

PARATE, Roopa D.; RODE, Chandrashekhar V.; DHARNE, Mahesh S.. 2,3-Butanediol Production from Biodiesel Derived Glycerol. **Current Environmental Engineering**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.4-12, 22 maio 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/2212717805666180112162517>.

PARK, Seo-young et al. Increased 2,3-butanediol production by changing codon usages in *Escherichia coli*. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, [s.l.], v. 61, n. 5, p.535-540, 27 mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bab.1216>.

PETROV, Kaloyan; STOYANOV, Anton. Accelerated production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using the method of forced pH fluctuations. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.317-321, 16 jul. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-011-0569-0>.

PETROV, Kaloyan; PETROVA, Penka. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 84, n. 4, p.659-665, 25 abr. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2004-x>.

PETROV, Kaloyan; PETROVA, Penka. Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 87, n. 3, p.943-949, 2 abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC.

PIRT, S. J.; CALLOW, D. S.. Production of 2,3-butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a single stage process. **Journal of Applied Bacteriology**. 21: 188-205. 1958

RAHMAN, Md. Shafiqur; MA, Zhongshun Yuan Kesen. Aerobic Conversion of Glycerol to 2,3-Butanediol by a Novel *Klebsiella variicola* SRP3 Strain. **Journal Of Microbial & Biochemical Technology**, [s.l.], v. 07, n. 05, p.299-304, 2015. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000229>.

RESEARCH AND MARKETS. **Global Biodiesel Market 2017-2021: DESCRIPTION**. 2017. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4395228/global-biodiesel-market-2017-2021?gclid=CjwKCAjw-8nbBRBnEiwAqWt1zWmudlIKgJwORryW1GfkFE9q2aHjbxzjxi6HPom1uz09CTwaY6Fw3BoCxUEQAvD_BwE>. Acesso em: 14 ago. 2018.

RIVALDI, Juan Daniel et al. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, v. 37, n. 37, p.44-51, 01 jan. 2008.

RODRIGO, Guillermo et al. DESHARKY: automatic design of metabolic pathways for optimal cell growth. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 24, n. 21, p.2554-2556, 5 set. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn471>.

ROMIO, Tiago. **PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724**. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2014.

ROSSI, Daniele Misturini et al. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 36, n. 8, p.4814-4819, abr. 2011. Elsevier

BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.005>.

ROSSI, Daniele Misturini et al. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.223-227, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.08.005>.

SAKAI, Shinsuke; YAGISHITA, Tatsuo. Microbial production of hydrogen and ethanol from glycerol-containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with thionine. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 98, n. 2, p.340-348, out. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.21427>.

SCHWANDER, Thomas et al. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide in vitro. *Science*, [s.l.], v. 354, n. 6314, p.900-904, 17 nov. 2016. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aah5237>.

SHIN, S. H. et al. Complete Genome Sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 194, n. 9, p.2373-2374, 9 abr. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00028-12>.

SILVA, Gervásio Paulo da; MACK, Matthias; CONTIERO, Jonas. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.30-39, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>.

SILVA, Paulo Regis Ferreira da; FREITAS, Thais Fernanda Stella de. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p.843-851, maio 2008.

SIQUEIRA, Ivo Augusto Assumpção; COLUSSE, Guilherme Augusto; ZAPPAROLI, Irene Domenes. Profile analysis of biodiesel producers in Brazil during 2005–2015. **Biofuels**, [s.l.], p.1-7, 24 mar. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17597269.2018.1448632>.

SPRINZAK, David; ELOWITZ, Michael B.. Reconstruction of genetic circuits. **Nature**, [s.l.], v. 438, n. 7067, p.443-448, nov. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04335>.

Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 22 nd Edittion, **APHA**, 2012.

SYU, M.-j.. Biological production of 2,3-butanediol. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.10-18, 1 jan. 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530000486>.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. (2012). *Microbiologia*, 10 ed. Porto Alegre: Artmed. pp. 132-134.

TIAN, Jingdong et al. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. **Nature**, [s.l.], v. 432, n. 7020, p.1050-1054, dez. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03151>.

TREFZ, Margareta et al. The GlpF residue Trp219 is part of an amino-acid cluster crucial for aquaglyceroporin oligomerization and function. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1860, n. 4, p.887-894, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.018>.

UI, Sadaharu et al. Molecular generation of an *Escherichia coli* strain producing only the meso-isomer of 2,3-butanediol. **Journal Of Fermentation And Bioengineering**, [s.l.], v. 84, n. 3, p.185-189, jan. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0922-338x\(97\)82052-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0922-338x(97)82052-1).

UI, S. et al. Production of l-2,3-butanediol by a new pathway constructed in *Escherichia coli*. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 39, n. 6, p.533-537, dez. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01622.x>.

VOEGELE, R T; SWEET, G D; BOOS, W. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 175, n. 4, p.1087-1094, fev. 1993. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.175.4.1087-1094.1993>.

XU, Youqiang et al. Systematic metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield production of fuel bio-chemical 2,3-butanediol. **Metabolic Engineering**, [s.l.], v. 23, p.22-33, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2014.02.004>.

YANG, Taowei et al. Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*.

Microbial Cell Factories, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-11, 22 ago. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-015-0317-2>.

YANG, Taowei et al. Metabolic engineering strategies for acetoin and 2,3-butanediol production: advances and prospects. **Critical Reviews In Biotechnology**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.990-1005, 20 abr. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07388551.2017.1299680>.

YANG, Fangxia; A HANNA, Milford; SUN, Runcang. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.13-23, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-5-13>.

WANG, Yu; TAO, Fei; XU, Ping. Glycerol Dehydrogenase Plays a Dual Role in Glycerol Metabolism and 2,3-Butanediol Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 289, n. 9, p.6080-6090, 15 jan. 2014. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m113.525535>.

WANG, Ailong et al. Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 87, n. 3, p.965-970, 8 abr. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2557-8>.

WANG, Zhengxiang et al. Glycerol production by microbial fermentation. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.201-223, jun. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750\(01\)00060-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750(01)00060-x).

WOOD, Andrew J. et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. **Science**, [s.l.], v. 333, n. 6040, p.307-307, 23 jun. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1207773>.

WOOLSTON, Benjamin M.; EDGAR, Steven; STEPHANOPOULOS, Gregory. Metabolic Engineering: Past and Future. **Annual Review Of Chemical And Biomolecular Engineering**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.259-288, 7 jun. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061312-103312>.

WU, Liming et al. Acetoin and 2,3-butanediol from *Bacillus amyloliquefaciens* induce stomatal

closure in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. **Journal Of Experimental Botany**, [s.l.], p.1-2, 8 out. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ery326>.

ZHANG, X.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O.. Fermentation of Glycerol to Succinate by Metabolically Engineered Strains of *Escherichia coli*. *Applied And Environmental Microbiology*, [s.l.], v. 76, n. 8, p.2397-2401, 12 fev. 2010. **American Society for Microbiology**. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02902-09>.

7. ANEXOS

7.1 Capítulo de livro submetido para publicação

Capítulo de livro adaptado para publicação no livro digital *As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade* da editora Atena (Qualis L3 CAPES; ISBN 978-85-7247-216-6 DOI 10.22533/at.ed.166192803).

A BIOLOGIA SINTÉTICA E ENGENHARIA METABÓLICA PARA DESENVOLVIMENTO DE SOLUÇÕES EM BIOTECNOLOGIA

Mauricio Schiavo

Fundação Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de biotecnologia e microbiologia aplicada, Caxias do Sul - Rio Grande do Sul

Gabriel Dall'Alba

Fundação Universidade de Caxias do Sul, Núcleo de Pesquisa em Bioinformática, Caxias do Sul - Rio Grande do Sul

Mauricio Moura da Silveira

Fundação Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de bioprocessos, Caxias do Sul - Rio Grande do Sul

Sergio Echeverrigaray

Fundação Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de biotecnologia e microbiologia aplicada, Caxias do Sul - Rio Grande do Sul

Resumo

Os avanços na biologia molecular, bioinformática, biologia de sistemas e no estudo de genômica, proteômica e metabolômica levaram ao desenvolvimento de duas áreas tecnológicas com potencial para revolucionar a biotecnologia como um todo. Ambas as áreas, a biologia sintética e a engenharia metabólica vem sendo desenvolvidas e aplicadas para solução de diversos problemas, alguns exemplos sendo: na redução dos custos de produção de compostos químicos de maior valor agregado em biorrefinarias, reduzindo o impacto ambiental e possibilitando a criação de sistemas renováveis para obtenção destes variados compostos; na indústria farmacêutica, com a possibilidade de modificar vias metabólicas pouco produtivas de compostos de interesse no desenvolvimento de fármacos e a utilização de diferentes organismos para expressão de novas vias metabólicas; na medicina, sendo a biologia sintética aplicada no desenvolvimento de terapias gênicas e no combate de agentes etiológicos biológicos como vírus e microrganismos patológicos; na indústria de alimentos, sendo que a biologia sintética e a engenharia metabólica são aplicadas em microrganismos para obtenção de flavorizantes, aromatizantes e diferentes micro e macro nutrientes; no desenvolvimento de novas soluções industriais e outras aplicações de organismos *chassis* que envolvam detecção e sinalização, purificação e extração e modificação enzimática de diferentes compostos químicos. Outras aplicações destas tecnologias poderão influenciar em várias questões diárias e trazer soluções em campos ainda não explorados. Neste trabalho visamos organizar os pontos relevantes recentes na biologia sintética e engenharia metabólica, com exemplos de aplicações destas tecnologias no mundo acadêmico e no setor produtivo, discutindo o presente, e a prospecção futura de estado da arte destas tecnologias e as mudanças de paradigma que podem trazer para a sociedade. Este trabalho também pode servir de inspiração no desenvolvimento de novas combinações de *biobricks* e de novos sistemas baseados em engenharia metabólica e biologia sintética.

Palavras chave: genética, Engenharia metabólica, *biobricks*

Abstract

Advances in molecular biology, bioinformatics, systems biology and the study of genomics, proteomics, and metabolomics have led to the development of two technological areas with the potential to revolutionize biotechnology as a whole. Both areas, synthetic biology, and metabolic engineering have been developed and applied to solve several problems, some examples being: reducing the production costs of higher value-added chemical compounds in biorefineries, diminishing environmental impact and enabling the creation of renewable systems to obtain these various compounds; in the pharmaceutical industry, with the possibility of modifying poorly productive metabolic pathways of compounds of interest in the development of drugs and the use of different organisms to express new metabolic pathways; in medicine, in the development of gene therapies and in the efforts to uphold against biological etiological agents such as viruses and microorganisms; in the food industry to modify microorganisms to obtain additives, flavorings and different micro and

macronutrients; in the development of new industrial solutions and other applications of chassis organisms involving detection and signaling, purification and extraction and enzymatic modification of chemicals and peptides of interest. Other applications of these technologies may influence many daily issues and bring solutions in fields not yet explored. In this work we aim to organize the relevant aspects of synthetic biology and metabolic engineering, with examples of applications of these technologies by the academic community and the productive sector, discussing the present, and future state-of-the-art exploration of these technologies and paradigm shifts that they may bring to society. This work can also be an inspiration for the development of new combinations of *biobricks* and new systems based on metabolic engineering and synthetic biology.

Key words: Synthetic biology, metabolic engineering, *biobricks*

Biologia sintética

A biologia sintética é um novo termo para uma ideia antiga. Em seu livro de 1912, *The Mechanistic Conception of Life*, o biólogo alemão-americano Jacques Loeb propôs que os organismos vivos fossem considerados a partir de uma perspectiva de engenharia - não apenas como entidades “projetadas” pela evolução, mas como dispositivos passíveis de intervenção humana, manipulação e alteração (BALL, 2018).

Essa foi uma visão nascida em parte por pura ingenuidade. De onde vinha a vitalidade da vida havia sido um profundo mistério para os cientistas, mas apenas nas décadas seguintes à proposta de Loeb é que os biólogos começaram a perceber que as origens surgiam da capacidade da matéria viva de se organizar em escalas microscópicas. E essa organização se mostrou incrivelmente complicada (BALL, 2018).

As esperanças de total compreensão dos mecanismos de herança e controle genéticos, para levar a compreensão das células e os organismos em termos de sua maquinaria molecular, deram lugar a uma apreciação da complexidade desconcertante dos sistemas vivos (BALL, 2018).

Entretanto, mesmo com os desafios ainda existentes, é possível intervir na genética de maneiras que às vezes são previsíveis. Entende-se muito sobre como os genes tendem a funcionar em redes, regulando a atividade uns dos outros para direcionar o destino da célula. Essa análise dos genomas em termos de redes funcionais envolvendo *feedback*, *switching* e amplificação é aquela que soa familiar aos engenheiros. (BALL, 2018).

Dessa forma, a biologia sintética se caracteriza como um campo tecnológico emergente que envolve a construção orientada por engenharia de entidades biológicas cada vez mais complexas para novas aplicações. Os principais aspectos de uma abordagem de engenharia são a orientação para propósitos específicos, a percepção profunda dos princípios científicos subjacentes, uma hierarquia de abstração incluindo interfaces adequadas entre e dentro dos níveis da hierarquia, padronização e separação entre projeto e fabricação. A biologia sintética investiga as possibilidades de implementar esses requisitos no processo de engenharia de sistemas biológicos (HEINEMANN; PANKE, 2006).

O advento da biologia de sistemas, o constante desenvolvimento de tecnologias fundamentais, como a síntese de novo de DNA (TIAN et al., 2004; HEINEMANN; PANKE, 2006), experimentos importantes, como o redesenho computacional de enzimas (DWYER,

2004; HEINEMANN; PANKE, 2006), a oportunidade de recombinar amplamente sistemas utilizando tecnologias como CRISPR-Cas9 (MAO, 2018), proteínas zinc-finger (DREIER et al., 2001; HEINEMANN; PANKE, 2006) e proteínas TALENs (WOOD et al., 2011) para reprogramar a especificidade do local de ligação ao DNA, e ainda a disponibilidade de sistemas regulatórios modelo bem definidos para o design de dispositivos moleculares inspirados em engenharia, fornecem uma base de conhecimento e tecnologia muito poderosa para a construção de novas entidades biológicas.

Aplicações encorajadoras vêm de áreas tão diversas quanto o desenho de redes de genes artificiais (SPRINZAK; ELOWITZ, 2005; HEINEMANN; PANKE, 2006), a refatoração de pequenos genomas (CHAN; KOSURI; ENDY, 2005; HEINEMANN; PANKE, 2006), a reprogramação de vias de sinalização (DUEBER, 2003; HEINEMANN; PANKE, 2006) ou engenharia metabólica (MARTIN et al., 2003; HEINEMANN; PANKE, 2006). Em conjunto, estas abordagens têm sido referidas como "biologia sintética".

Engenharia metabólica

A engenharia metabólica é um campo tecnológico em expansão que visa modificar o sistema metabólico endógeno de um organismo para aproveitá-lo em uma tarefa biotecnologicamente útil como, por exemplo, a produção de um composto de interesse (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Tem sido um dos objetivos finais da biologia chegar ao mesmo nível conceitual e sintético alcançado na química, desde o princípio das pesquisas em "engenharia metabólica" desenvolvidas no início dos anos 90. No entanto, as células ainda estão longe de serem pequenas fábricas para obtenção de produtos químicos (WOOLSTON; EDGAR; STEPHANOPOULOS, 2013), sendo que a engenharia metabólica continua sendo limitada na sua capacidade sintética, dependendo primariamente da transposição de vias metabólicas de um organismo para outro seguido por otimização desta via (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Nestes esforços, diferentes enzimas existentes, de diferentes organismos ou de diferentes vias metabólicas conhecidas e que podem ser responsáveis por um passo específico de uma nova via metabólica sintética são integradas para realizar uma determinada tarefa metabólica com maior eficiência ou nova funcionalidade (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Considerando as modificações genéticas baseadas em biologia sintética e engenharia metabólica, o aprofundamento do uso de técnicas e ferramentas de biologia molecular é necessário, tanto para modificação no genoma de um microorganismo ou alterações baseadas no uso de plasmídeos de expressão.

Ferramentas para biologia sintética e engenharia metabólica:

Alterações no genoma

A biologia molecular investiga técnicas de edição genética há décadas. Goldstein (2017) traz as primeiras definições de "engenharia genética" como o conjunto de técnicas de manipulação do DNA que surgem através da clonagem de um gene, colocando-o em um outro contexto a fim de ser propagado. Contudo, hoje o termo ganha novos horizontes, sendo utilizado para descrever toda e qualquer atividade que envolva a manipulação de DNA, introdução de alterações em células somáticas de animais e/ou plantas e alterações em células germinativas.

A engenharia genética ganhou volume no início da década de noventa. Foi quando, através da recombinação homóloga, células tronco embrionárias de ratos foram intencionalmente modificadas, sendo a primeira vez em que cientistas puderam selecionar e silenciar genes de interesse (THOMAS e CAPECCHI, 1987) (CAPECCHI, 1989). A partir disso, foi possível expandir o uso do ratos para gerar modelos de estudo de doenças humanas (expressando proteínas associadas à doenças através da substituição de genes normais por genes mutados). Embora o sucesso da metodologia, o desenvolvimento de abordagens alternativas, mais econômicas e práticas, tornou-se necessário para seguir promovendo avanços nesse campo de pesquisa.

Cronologicamente, o primeiro mecanismo a surgir em seguida e ser amplamente utilizado foram as nucleases *Zinc-Finger* (*Zinc Finger Proteins*), seguido pelas nucleases *TALEN* (*Transcription Activator-like Effector Nuclease*) e, mais recentemente, o complexo enzimático *CRISPR-Cas9* e suas variantes (dCas9, Cas13 e Cas12a) vem atraindo os olhares de pesquisadores mundo à fora (BATISTA e PACHECO, 2018).

As nucleases *Zinc-Finger* são abundantes domínios de ligação ao DNA em eucariotos e consistem de aproximadamente 30 aminoácidos, estabilizada por íons Zn^{2+} . Estas nucleases são capazes de reconhecer trípletos de DNA (trechos de no máximo três pares de base) e seu funcionamento depende da presença de um par de nucleases, um para a região *upstream* e um para a região *downstream* do sítio de clivagem, e de uma associação dos domínios à enzima de restrição *FokI*, que realiza a clivagem de fato (BATISTA e PACHECO, 2018) (LISTIK e CARMO, 2016).

A técnica tornou possível a edição gênica em mamíferos que não eram contemplados pelas técnicas previamente utilizadas. Como contrapontos da técnica estão descritos: (i) o alto custo; (ii) a complexidade da técnica e (iii) os altos índices de clivagem em regiões similares ao alvo (denominadas de *off-targets*) (FERNÁNDEZ et al., 2017).

Mesmo assim, ainda se há um espaço considerável para as *Zinc-Finger* até os dias de hoje, sendo muito utilizada para a detecção de DNA, conforme Batista e Pacheco (2018) discutem. Jen e Wang (2016) mencionam o uso das proteínas *Zinc-Finger* como potenciais marcadores de progressão de diferentes tipos de câncer em humanos.

Em 2011, pesquisadores identificaram em *Xanthomonas* um interessante mecanismo envolvendo domínios de ligação ao DNA (nesse caso, efetores pseudo-ativador de transcrição (*transcription activator-like effectors*)) associadas a uma *FokI* (CERMAK et al., 2011). Foi descoberto que as TALENs reconhecem sequências de DNA através de um mecanismo de pareamento de bases envolvendo resíduos de aminoácidos e pares de base específicos (e.g. asparagina-isoleucina reconhece Adenina) (LISTIK e CARMO, 2016).

As TALENs demonstraram-se vantajosas em relação às *Zinc-Finger* devido ao baixo índice de *off-targets*, característica dada pelas especificidades das cadeias de aminoácidos das TALENs, que conseguem se ligar a até 20 bases nitrogenadas. Além disso, enquanto as *Zinc-Fingers* possuem diversas restrições de montagem (JOUNG e SANDER, 2013), não se conhece complicações na capacidade de interação com sequências-alvo das TALENs nem com sua especificidade.

WareJoncas et al. (2018) afirmam que, até os dias atuais, as TALENs mantêm-se no topo das plataformas de DNA mais programáveis e com menos restrições ao seu funcionamento. Segundo os autores, o número de publicações que utilizam TALENs em suas metodologias ultrapassou substancialmente as publicações que utilizam *Zinc-Fingers* após a descoberta e aplicação dessa técnica, embora o alto custo monetário das TALENs impeça seu amplo uso em laboratórios de biologia molecular.

A descoberta de um complexo ribonucleoproteico – *CRISPR-Cas9* – tornou a edição gênica em uma tendência de pesquisa. *CRISPR* é a abreviação de Repetições

Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), um sistema natural encontrado nos mecanismos de imunidade em bactérias. As primeiras evidências do mecanismo vieram através do trabalho de Ishino et al. (1987), observando regiões espaçadoras e regiões de repetição no gene *lap* de *Escherichia coli*. Não muito tempo depois, a atividade da proteína Cas9 (integrada no complexo *CRISPR*) foi observada atuando na degradação de plasmídios ou de fagos invasivos, identificando que as regiões espaçadoras são, na verdade, cópias de DNA viral.

A formação do complexo *CRISPR* começa com a transcrição de DNA viral (espaçadores) e com a transcrição das repetições que agem como domínios de regulação gênica. Em seguida, o RNA resultante (crRNA), juntamente com um RNA transativador (tracrRNA), liga-se à uma endonuclease Cas9 (proteína associada a *CRISPR* 9), agindo como guia da enzima até a sequência alvo. Após o pareamento, a endonuclease induz uma quebra da dupla-fita de DNA para a clivagem da sequência alvo.

Os sistemas *CRISPR-Cas9* podem ser classificados em duas classes principais, de acordo com a performance das suas subunidades enzimáticas. A primeira classe consiste de complexos de múltiplas subunidades efectoras de RNA (tipos I, III e V), enquanto que a segunda classe consiste em efetores de RNA com uma única subunidade (tipos II e V) (KHADEMPAR et al., 2018; BARRANGOU et al., 2007).

A compreensão desse mecanismo trouxe vantagens na dinâmica da edição gênica por apresentar-se mais específica e dinâmica do que outros mecanismos prévios. A capacidade de realizar a fusão do crRNA e do tracrRNA em um único RNA guia (gRNA) simplificou o uso deste mecanismo, uma vez que, assim, a única necessidade para criar um complexo de interação com o DNA é criar um gRNA de interesse que seja capaz de atrelar-se à Cas9.

Com isso, o baixo custo da técnica aumentou a acessibilidade à tecnologia pelos laboratórios de biologia molecular ao redor do mundo. WareJoncas et al. (2018) evidencia que o *CRISPR-Cas9* possui limitações evidentes, como ainda apresentar clivagens em regiões *off-target* (similarmente às outras técnicas) e uma alta tolerância a interações não totalmente pareadas. Com isso, surgem tentativas de unificar diferentes técnicas, como *CRISPR-Cas9* + Sistemas *Zinc Finger*, juntando os monômeros FokI à proteínas Cas9 inativadas, tornando o complexo mais específico e, assim, evitando *off-targets*.

Mais recentemente, variações da *CRISPR*, como a *CRISPR-Cas12a* (ou Cpf1) e *CRISPR-Cas13a* (gerado com gRNAs), oferecem alternativas às limitações do sistema dependente de Cas9 através das particularidades exclusivas de cada variante. Por exemplo, o sistema *Cas12a* aparenta ser mais naturalmente específico do que o Cas9 (KIM et al., 2016), enquanto que a *Cas13a* apresenta motivos proteicos similares às *TALE*, ligando-se cada uma a uma única base nitrogenada de RNA específica (dando ainda mais especificidade ao complexo).

Com a eficácia e barateamento das técnicas de edição gênica, principalmente com o uso dos complexos *CRISPR*, crescem as pesquisas buscando mecanismos cada vez mais específicos de identificação e interação com uma sequência alvo.

As aplicações de diferentes técnicas de edição gênica (figura 1) podem ser vistas ao longo das décadas de seus usos, como: descobertas de mecanismos de desenvolvimento e funcionamento da vesícula biliar feitas com o uso de técnicas de entrega de genes aleatórios (*nontargeted gene delivery*) (Warejoncas et al., 2018); geração de modelos animais (como de camundongos (Marusugi et al., 2016), ratos (CHEN et al., 2013) e porcos (He et al., 2015) utilizando *zinc-finger*, *TALEN*, *CRISPR-Cas9* e inativação de genes/edição de genes-alvo (e.g. a recriação da mutação W no gene p.C147, associada a doença renal em ratos (JOHNSON et al., 2017).

Mais recentemente, um polêmico caso de pesquisa com embriões humanos virou o centro das atenções. He Jiankui, da Universidade do Sul de Ciência e Tecnologia da China, foi capaz de silenciar um gene envolvido na capacidade do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) de infectar células utilizando *CRISPR-Cas9*. O controverso trabalho levantou uma série de questões éticas, uma vez que há, ainda, a necessidade de aprimorar as técnicas de edição gênica, a fim de evitar efeitos indesejados de alterações no genoma que envolvem a clivagem parcial de sítios alvo, a clivagem *off-target* e os efeitos das deleções e modificações genéticas a nível transcricional, traducional, fisiológico e imunológico e a possibilidade da herdabilidade das alterações genéticas realizadas - algo que ainda é um desafio evidente para pesquisadores (REGALADO, 2018).

Os constantes avanços da pesquisa em edição gênica parecem, eventualmente, levar à edição de genes em humanos (com o objetivo de resolver problemas ligados à doenças atualmente sem cura ou tratamento), tornando evidente não apenas a necessidade de aprimorar as técnicas utilizadas, mas de discutir as questões éticas por trás dessa aplicação.

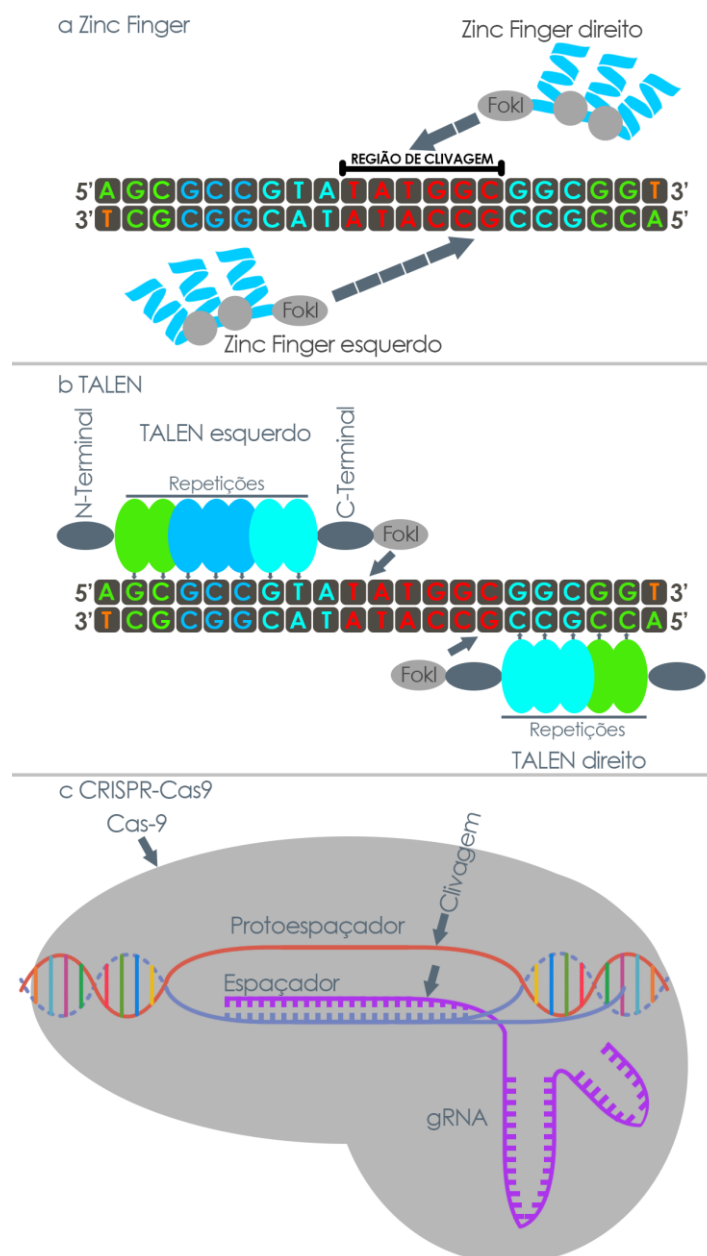


Figura 1: sistemas de modificação gênica utilizados para alterações a nível cromossomal ou outras aplicações de edição gênica *in vivo*. Adaptado de Warejoncas et al. (2018). Sistemas representados: (a) Zinc Finger; (b) TALENs e CRISPR-Cas9.

Alterações no nível de expressão de genes.

O silenciamento gênico, fenômeno em que ocorre o bloqueio do processo de transcrição, ou degradação de RNA transcrito, também conhecido como RNA de interferência (RNAi), é um mecanismo celular que pode ocorrer durante a transcrição do RNAm (RNA mensageiro). As funções vitais de qualquer organismo dependem da expressão de seus genes, isto é, a partir do DNA os genes são primeiro transcritos para o RNA, e depois traduzidos em proteínas (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004).

Quando ocorre o silenciamento gênico, o RNAi (fragmento de aproximadamente vinte e um nucleotídeos complementares a sequência do RNA mensageiro) atua em conjunto com complexos enzimáticos e leva a degradação do RNA alvo ou o impedimento

físico do processo de tradução. Desse modo considera-se que o gene para dado transcrito foi “desligado” (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004).

A ocorrência desse mecanismo foi identificada nos mais diversos organismos eucarióticos, como insetos, fungos, nematóides e plantas. A interferência por RNA ocorre naturalmente nesses organismos, funcionando como uma forma de regulação da produção de proteínas e como mecanismo de defesa contra vírus entre outras funções regulatórias (BRANTL, 2002).

Além da utilização de RNAi, outra alternativa que vem sendo estudada é o bloqueio físico de regiões promotoras utilizando CRISPR-dCAS (a enzima CAS possuindo uma mutação que inibe a sua atividade endonucleásica). Dessa forma, o processo de transcrição é interrompido antes da elongação e formação do RNAm. CRISPR-dCAS aparenta ser uma ferramenta mais versátil por poder ser aplicada tanto em eucariotos quanto em procariotos (XU; QI, 2019).

Sistemas de silenciamento gênico podem ser aplicados na terapia gênica, quando se busca evitar uma deleção completa de um gene específico ou apenas uma modulação na sua expressão. RNAi também pode ser utilizado no desenvolvimento de sistemas moleculares de combate a vírus de RNA e DNA em seres humanos, animais e plantas. A modulação específica na expressão de alguns genes também pode ser de interesse para preparar plantas de cultivo para situações de estresse biótico e abiótico (BRANTL, 2002; LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004; CULLEN, 2005; XU; QI, 2019).

Plasmídeos e sistemas para expressão extracromossomal

Além dos métodos desenvolvidos para alteração genômica de eucariotos e procariotos, sistemas de superexpressão e sistemas de *switch* genéticos (que envolvem sistemas de sinalização e regulação de expressão de genes repórter ou ativação de vias metabólicas) e outros sistemas de deleção de genes foram desenvolvidos utilizando fragmentos circulares de DNA, conhecidos como plasmídeos ou vetores (PURNICK; WEISS, 2009).

A utilização de plasmídeos e vetores de expressão gênica foram as primeiras estratégias exploradas no desenvolvimento de organismos geneticamente modificados e no desenvolvimento de engenharia metabólica visando a superexpressão de proteínas de interesse (BERG; MERTZ, 2010).

Estes plasmídeos podem ser encontrados em bancos de dados como Adgene, Snapgene, iGEM repository, e adquiridos em diferentes empresas, sendo que no Brasil, pode-se adquirir sequências sintéticas inteiras clonadas em diferentes vetores de escolha pelo valor de R\$ 3,00 a R\$ 2,00 por par de base dependendo das especificações e do fornecedor.

Geralmente vetores e plasmídeos possuem três regiões distintas, essenciais para seu funcionamento, sendo elas: um sítio de replicação, para promover a multiplicação do plasmídeo no interior da célula chassis; um marcador expresso que atribui uma característica específica a célula do organismo chassis, para posterior seleção de transformantes; e um sítio de múltipla clonagem (MCS) que permite a inserção de um fragmento de DNA específico. Como exemplo tem-se plasmídeos para clonagem e expressão de genes em procariotos que contém uma região *ori* de replicação de DNA plasmidial obtida de pBR322, uma região para expressão do gene para β -lactamase *ampR* que atribui resistência a antibióticos como ampicilina e penicilina para seleção de transformantes e um sítio de clonagem múltipla no interior de uma região codificadora, expressa sobre um promotor e operador *lac* Figura 2 (NOVAGEN, 2018).

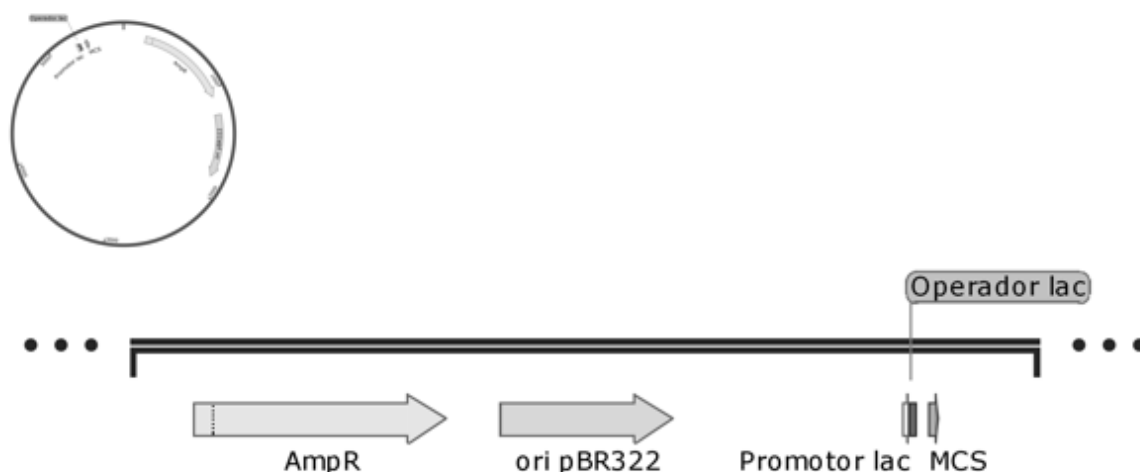


Figura 2: Exemplo de plasmídeo ou vetor para clonagem de sequências de DNA específico. Imagem adaptada de vetor plasmidial pET-11a e desenvolvida utilizando software Snapgene (GSL Biotech LLC. 2017).

No sítio de clonagem múltipla (MCS) pode-se inserir diferentes combinações de partes e *biobricks* para desenvolvimento de novas funções metabólicas ou novos peptídeos e moléculas de DNA e RNA com funções específicas (NOVAGEN, 2018).

Biobricks, são partes como promotores, reguladores, sequências de codificação entre outras que são descritas e utilizadas conforme o sistema de linguagem aberta em biologia sintética (SBOL) para design de novas combinações e sistemas de expressão. *Biobricks* funcionam como um repositório de partes de sequências de DNA que podem ser utilizadas em diferentes combinações para novas funções (Turing ATE my hamster LTD. 2018).

Peptídeos e suas aplicações

Plasmídeos e construções de *biobricks* são aplicados no design de novas proteínas e enzimas que vão atribuir uma nova função ou alteração para obtenção do próprio peptídeo purificado ou compostos gerados a partir de vias metabólicas obtidas por engenharia metabólica, ou sistemas de sinalização para interpretação de substâncias e proteínas em um meio específico (PURNICK; WEISS, 2009).

Considerando a expressão heteróloga de proteínas e sua reformulação, diferentes domínios de enzimas e peptídeos inteiros podem ser ligados para formação de proteínas de fusão. Aplicações de uma enzima de fusão em diferentes conceitos é explorada na figura 3 (ELLEUCHE, 2014).

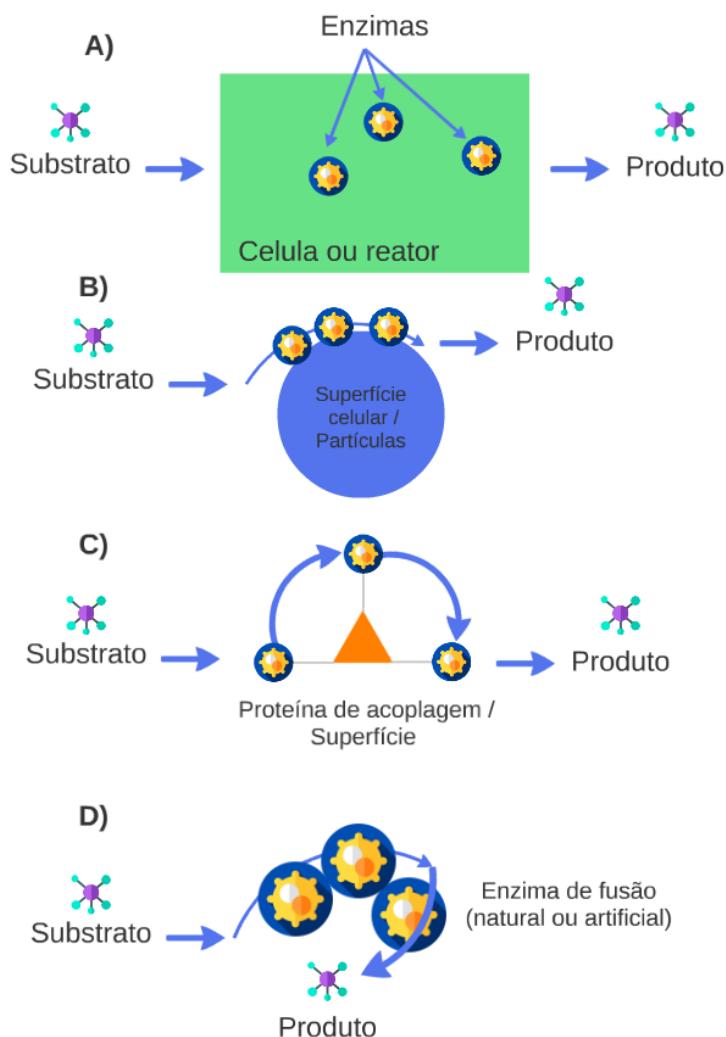


Figura. 3 Cascatas de reações acopladas em sistemas vivos como paradigmas para modelos artificiais. A) Ação combinada de três diferentes enzimas em um compartimento específico, como uma célula (natureza) ou em um reator de um único recipiente (sistema artificial) catalisa a conversão de um substrato para formação de um dado produto. B) As enzimas estão representadas na superfície celular, *cell-surface display*, (natureza) ou imobilizadas em partículas (sistema artificial). C) Enzimas são orientadas por uma proteína de suporte *scaffold*, como por exemplo em celulosomas (natureza) ou imobilizadas em uma superfície (sistema artificial). D) Uma enzima modular composta por três regiões ou domínios catalíticos (natureza) ou enzimas artificialmente fundidas (sistema artificial) catalisam três etapas de reação. Setas ilustram uma reação hipotética catalisada por três enzimas para converter um substrato em um produto. Adaptado de Elleuche (2014).

Além da fusão de enzimas e proteínas um processo de evolução e mutação direcionada de genes para proteínas já conhecidas pode levar a formação de vias metabólicas sintéticas mais rápidas e eficientes na utilização de substratos específicos, no desenvolvimento de novas proteínas repórter e cromoproteínas e aprimoramento de especificidade e capacidade de ligação de peptídeos, aptâmeros e fragmentos de anticorpo voltados a identificação de epítomos específicos (ARNOLD, 2017).

Um exemplo complexo para aplicações destas técnicas são o desenvolvimento de novas vias metabólicas para obtenção do composto 2,3-butanodiol a partir do substrato glicerol em células *chassis* de *Klebsiella aerogenes* e *Escherichia coli*. Dentre as modificações aplicadas estão a superexpressão de enzimas para acelerar o consumo de

glicerol e sua conversão em dihidroxiacetona para metabolismo em via metabólica de formação de piruvato, a superexpressão de genes para enzimas envolvidas na conversão de piruvato em 2,3-butanodiol, a deleção de genes para enzimas que levam ao desvio do piruvato para formação de outros subprodutos como acetato, etanol e lactato e a superexpressão de genes para auxiliar no reciclo de cofatores NAD e NADH envolvidos nos passos metabólicos de conversão de glicerol em 2,3-butanodiol e para manter o balanço redox interno das células *chassis* em homeostase. Também é explorado o uso de proteínas de fusão para realizar as funções descritas acima, um destes exemplos foi explorado pelo grupo de pesquisa do laboratório de biotecnologia e microbiologia aplicada da Universidade de Caxias do Sul, em que foi realizada a fusão das enzimas glicerol desidrogenase (para formação de dihidroxiacetona e NADH) e acetoína redutase (responsável pela formação de 2,3-butanodiol e NAD), esta estratégia visa trazer soluções para aumento no consumo de glicerol como substrato, aumento da produção de 2,3-butanodiol e um mutuo reciclo e reutilização de cofatores NAD e NADH, levando em consideração a aproximação física de ambas as enzimas (YANG; ZHANG, 2018).

Exemplos de aplicações de engenharia metabólica e biologia sintética:

Nos Estados Unidos, uma iniciativa chamada iGEM (genetically engineered machine) do MIT (Massachusetts Institute of Technology), realiza uma competição anual entre acadêmicos de nível de graduação para fomentar o desenvolvimento de novos *designs* e aplicações baseados em biologia sintética e a formação de empreendedores em biotecnologia (PURNICK; WEISS, 2009).

Entretanto, o uso de técnicas e aplicações em biologia sintética e engenharia metabólica não se restringem apenas a academia. Empresas e *startups* já vem desenvolvendo soluções e produtos baseados nestas técnicas, exemplos de empresas e *startups* que alcançaram investimento de 25 a 150 milhões de dólares em 2018 estão representadas na tabela 1 (SYNBIOBETA, 2018)

Tabela 1: Empresas e startups que utilizam o conceito de biologia sintética e que alcançaram investimento de 25.000.000,00 US\$ a 150.000.000,00 US\$ em 2018 (SYNBIOBETA, 2018).

Startup/Empresa	Ramo de atuação ou Indústria	O que faz	País de fundação
Autolus Therapeutics	Indústria farmacêutica/terapias para tratamento do câncer	Desenvolvimento de terapias com células T altamente direcionadas, controladas e altamente ativas. Engenharia de células T.	Reino Unido
Impossible foods	Indústria alimentícia	Desenvolve um hambúrguer de proteína vegetal contendo em seu ingrediente a levedura <i>Pichia pastoris</i> modificada expresando leg-hemoglobina de raízes de plantas de soja.	Estados Unidos
Precision Biosciences	Indústria farmacêutica/AgroIndústria/Biotecnologia	Método próprio e sistemas de modificação genética <i>in vivo</i> . Terapia gênica e alteração de genes envolvidos com patologias e características específicas em plantas e animais.	Estados Unidos
Beam Therapeutics	Indústria farmacêutica	Utiliza a tecnologia CRISPR para editar genes e alterar uma única base nitrogenada. Modificação de SNP's (single nucleotide polymorphisms) utilizando CRISPR.	Estados Unidos

Synthorxs	Indústria farmacêutica	DNA sintético para tradução invitro de peptídeos para uso como medicamentos e tratamentos.	Estados Unidos
Calyxt	AgroIndústria/ Indústria alimentícia	Edição genética utilizando TALEN para produção de plantas com traços que aumentem seu valor nutricional e quantidade de nutrientes. Foco na produção de alimentos para o consumidor final e não somente na produtividade.	Estados Unidos
Inovio Pharmaceutical	Indústria farmacêutica	Edição genética de células do sistema imune para combater células cancerosas e células infectadas com vírus. Produção de antígenos. <i>in vivo</i> Antigen-targeted immunotherapies.	Estados Unidos
Twist biosciences	Biotecnologia	Síntese de DNA. Produção de genes sintéticos.	Estados Unidos
Codexis	Biotecnologia	Evolução direcionada de proteínas e enzimas para aumento de especificidade e atividade catalítica entre outras atribuições. Protein engineering	Estados Unidos
Poseida Therapeutics	Indústria farmacêutica	Modificações genéticas em células CAR-T. Targeted immunotherapies.	Estados Unidos
Synlogics	Biotecnologia/Indústria farmacêutica	Desenvolvimento de microorganismos de microbioma, geneticamente modificados, utilizando engenharia metabólica para produção de compostos para tratamentos específicos a partir de um sistema gênico de circuitos para sinalizar ativação ou inativação destas vias metabólicas dependendo de sinais moleculares presentes no intestino.	Estados Unidos

Os Estados Unidos lideram a inovação e formação de empresas em biologia sintética, sendo que se destacam sua aplicação na indústria alimentícia, na agroindústria e na medicina e indústria farmacêutica (SYNBIOBETA, 2018).

Outras aplicações que também vem sendo exploradas são o desenvolvimento de microrganismos para produção de combustíveis e outros compostos com aplicação na indústria química e de polímeros (SYNBIOBETA, 2018).

Acesso a capital para empreendedorismo em biologia sintética e biotecnologia

No Brasil, a iniciativa privada também tem voltado sua atenção para o desenvolvimento de *startups* no setor de biotecnologia, sendo que aplicações em biologia sintética são de áreas de interesse de agências financiadoras como FINEP (Agência financiadora de inovação e pesquisa) e StartupBrasil do CNPq (Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico). Outros incentivos ao empreendedorismo em ciências da vida vêm de programas como BioStartupLab, que busca auxiliar pesquisadores e cientistas empreendedores ou levar soluções desenvolvidas na academia para o mercado. Outro espaço em expansão no incentivo a *startups* e empresas de biotecnologia são os pólos, parques e incubadoras tecnológicas nas universidades e instituições de pesquisa brasileiras.

Além dos incentivos nacionais, outros programas internacionais buscam *startups* de biologia sintética e biotecnologia para investimento em *seed capital* como os programas Rebelbio do Reino Unido e Indiebio dos Estados Unidos, ambos oferecem investimento inicial de 200.000,00 £ a 250.000,00 US\$ mais experiência, mentoria e aceleração de negócios em biotecnologia.

Conclusões

O desenvolvimento da biologia sintética e suas aplicações vem crescendo tanto no âmbito acadêmico quanto no setor produtivo trazendo soluções para diversos problemas. A aplicação dos conceitos de engenharia na biotecnologia e a construção de sistemas baseados em *switch* gênicos podem simplificar e padronizar a construção destes sistemas complexos, tornando sua aplicação e entendimento mais acessível para acadêmicos, engenheiros e empreendedores em biotecnologia. Considerando os exemplos abordados neste trabalho, fica claro a liderança dos Estados Unidos no fomento a biologia sintética e a sua liderança em captação de capital para empresas deste ramo. No Brasil, apesar dos esforços recentes, o ecossistema de desenvolvimento em biologia sintética e engenharia metabólica permanece embrionário, apesar das possibilidades e vantagens nacionais envolvendo a bioprospecção de organismos de interesse, sendo o Brasil o país mais biodiverso do mundo. Os exemplos apresentados neste trabalho também podem servir de inspiração para acadêmicos e pesquisadores para o desenvolvimento de startups para atender o mercado nacional de biotecnologia.

Referências

ARNOLD, Frances H.. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 16, p.4143-4148, 28 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201708408>.

BALL, Philip. Synthetic biology—Engineering nature to make materials. **Mrs Bulletin**, v. 43, n. 7, p.477-484, jul. 2018. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1557/mrs.2018.165>.

BARRANGOU, R. et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p.1709-1712, 23 mar. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1138140>.

BATISTA, Angelo C.; PACHECO, Luis G.c.. Detecting pathogens with Zinc-Finger, TALE and CRISPR- based programmable nucleic acid binding proteins. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 152, p.98-104, set. 2018.

BERG, P.; MERTZ, J. E.. Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology. **Genetics**, v. 184, n. 1, p.9-17, 1 jan. 2010. Genetics Society of America. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.109.112144>.

BRANTL, Sabine. Antisense-RNA regulation and RNA interference. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Gene Structure And Expression**, v. 1575, n. 1-3, p.15-25, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4781\(02\)00280-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00280-4).

CAPECCHI, M.. Altering the genome by homologous recombination. **Science**, v. 244, n. 4910, p.1288-1292, jun. 1989.

CERMAK, Tomas et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 12, p.82-93, 14 abr. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr218>.

CULLEN, Bryan R. RNAi the natural way. **Nature Genetics**, v. 37, n. 11, p.1163-1165, nov. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1105-1163>.

CHEN, Chun Cheng Andy et al. Heterozygous knockout of transforming growth factor- β 1 protects Dahl S rats against high salt-induced renal injury. **Physiological Genomics**, v. 45, n. 3, p.110-118, fev. 2013. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00119.2012>.

DREIER, Birgit et al. Development of Zinc Finger Domains for Recognition of the 5'-ANN-3' Family of DNA Sequences and Their Use in the Construction of Artificial Transcription Factors. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p.29466-29478, 4 maio 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m102604200>.

DUEBER, J. E.. Reprogramming Control of an Allosteric Signaling Switch Through Modular Recombination. **Science**, v. 301, n. 5641, p.1904-1908, 26 set. 2003. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1085945>.

DWYER, M. A.. Computational Design of a Biologically Active Enzyme. **Science**, v. 304, n. 5679, p.1967-1971, 25 jun. 2004. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1098432>.

ELLEUCHE, Skander. Bringing functions together with fusion enzymes—from nature's inventions to biotechnological applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 99, n. 4, p.1545-1556, 24 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6315-1>.

REGALADO, A. **EXCLUSIVE: CHINESE SCIENTISTS ARE CREATING CRISPR BABIES.** Massachusetts: MIT, 25 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.technologyreview.com/s/612458/exclusive-chinese-scientists-are-creating-crispr-babies/>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

ERB, Tobias J; JONES, Patrik R; BAR-EVEN, Arren. Synthetic metabolism: metabolic engineering meets enzyme design. **Current Opinion In Chemical Biology**, v. 37, p.56-62, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.023>.

FERNÁNDEZ, Almudena; JOSA, Santiago; MONTOLIU, Lluís. A history of genome editing in mammals. **Mammalian Genome**, v. 28, n. 7-8, p.237-246, 6 jun. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-017-9699-2>.

GSL BIOTECH LLC. **Snapgene plasmid viewer software.** 2017. Disponível em: <www.snapgene.com>. Acesso em: 01 mar. 2017.

GOLDSTEIN, Elliott S.; KILPATRICK, Stephen T.; KREBS, Jocelyn E.. **Lewin's Genes XII.** 12. ed. Massachusetts: Jones & Bartlett Pub., 2017. 838 p.

HE, Jin et al. PKD1 Mono-Allelic Knockout Is Sufficient to Trigger Renal Cystogenesis in a Mini-Pig Model. **International Journal Of Biological Sciences**, v. 11, n. 4, p.361-369, 2015. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.10858>.

HEINEMANN, M.; PANKE, S.. Synthetic biology--putting engineering into biology. **Bioinformatics**, v. 22, n. 22, p.2790-2799, 5 set. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl469>.

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for the alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p.5429-5433, 1987.

JEN, Jayu; WANG, Yi-ching. Zinc finger proteins in cancer progression. **Journal Of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p.1-9, 13 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-016-0269-9>.

JOHNSON, Bryce G. et al. Uromodulin p.Cys147Trp mutation drives kidney disease by activating ER stress and apoptosis. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 127, n. 11, p.3954-3969, 9 out. 2017. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci93817>.

JOUNG, J. Keith; SANDER, Jeffrey D.. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 1, p.49-55, 21 nov. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3486>.

KHADEMPAR, Saedeh et al. CRISPR-Cas9 in genome editing: Its function and medical applications. **Journal Of Cellular Physiology**, p.1-11, 26 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27476>.

KIM, Daesik et al. Erratum: Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p.888-888, ago. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0816-888a>.

LISTIK, E.; CARMO, A. C. V. As características dos mecanismos e sistemas de edição genômica. **Revista acadêmica Oswaldo Cruz**, v. 10, p.1-14, 2016.

LIPPMAN, Zachary; MARTIENSSEN, Rob. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, v. 431, n. 7006, p.364-370, set. 2004. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02875>.

MAO, Steve. Taking CRISPR technology further. **Science**, v. 360, n. 6387, p.393.4-393, 26 abr. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.360.6387.393-d>.

MARTIN, Vincent J J et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 7, p.796-802, 1 jun. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt833>.

MARUSUGI, Kiyoma et al. Functional validation of tensin2 SH2-PTB domain by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. **Journal Of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 9, p.1413-1420, 2016. Japanese Society of Veterinary Science. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.16-0205>.

NOVAGEN. **PET-11a-d Vectors**. Disponível em:

<<https://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET11a.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

PURNICK, Priscilla E. M.; WEISS, Ron. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 6, p.410-422, jun. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2698>.

SPRINZAK, David; ELOWITZ, Michael B.. Reconstruction of genetic circuits. **Nature**, v. 438, n. 7067, p.443-448, nov. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04335>.

SYNBIOBETA. **Funding for synthetic biology companies**. Disponível em: <<https://synbiobeta.com/these-33-synthetic-biology-companies-just-raised-925-million/>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

THOMAS, Kirk R.; CAPECCHI, Mario R.. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. **Cell**, v. 51, n. 3, p.503-512, nov. 1987.

TIAN, Jingdong et al. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. **Nature**, v. 432, n. 7020, p.1050-1054, dez. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03151>.

Turing Ate My Hamster LTD. (SBOL) The Synthetic Biology Open Language. Disponível em: <<https://biobricks.org/>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

XU, Xiaoshu; QI, Lei S.. A CRISPR–dCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology. **Journal Of Molecular Biology**, v. 431, n. 1, p.34-47, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.037>.

YANG, Zhiliang; ZHANG, Zisheng. Recent advances on production of 2, 3-butanediol using engineered microbes. **Biotechnology Advances**, v. 1, n. 1, p.1-39, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.019>.

WAREJONCAS, Zachary et al. Precision gene editing technology and applications in nephrology. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 11, p.663-677, 8 ago. 2018. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-018-0047-x>.

WOOD, Andrew J. et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. **Science**, v. 333, n. 6040, p.307-307, 23 jun. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1207773>.

WOOLSTON, Benjamin M.; EDGAR, Steven; STEPHANOPOULOS, Gregory. Metabolic Engineering: Past and Future. **Annual Review Of Chemical And Biomolecular Engineering**, v. 4, n. 1, p.259-288, 7 jun. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061312-103312>.

7.2 Referência imagens adaptadas

Figura 3 e Figura 3 capítulo de livro:

Ícone representando butadieno (Borracha vulcanizada para automotivos) e ícone representando Metil etil cetona (combustível): (Icons made by Freepik from www.flaticon.com)

Ícones representando produtos cosméticos (cetona 2,3-butanodiol cetal):

lipstick icon: (Icon made by smalllikeart from www.flaticon.com)

cosmetics Icon: (Icon made by Freepik from www.flaticon.com)

Ícones representando flavorizantes (diacetil e acetoína):

Butter icon: (Icon made by Creaticca Creative Agency from www.flaticon.com)

Gelatin icons: (Icons made by Freepik from www.flaticon.com)

Ícones representando ésteres de 2,3-butanodiol (utilizados na indústria farmacêutica):

Red and white pill icon: (Icon made by Nikita Golubev from www.flaticon.com)

Pill container icon: (Icon made by Nikita Golubev from www.flaticon.com)

Multicolor pills icon: (Icon made by Smashicons from www.flaticon.com)

Figura 6:

Ícone representando enzima e ícone representando produto e substrato: (Icons made by Freepik from www.flaticon.com)