



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**MODIFICAÇÕES GENÉTICAS EM *Clostridium acetobutylicum* VISANDO
O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS**

Myrna Barbosa Gomes

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Brasília, Agosto de 2018

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**MODIFICAÇÕES GENÉTICAS EM *Clostridium acetobutylicum* VISANDO
O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS**

Myrna Barbosa Gomes

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Brasília, Agosto de 2018

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação do professor Fernando Araripe Gonçalves Torres e com apoio financeiro do CNPq.

Banca Examinadora

Professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Universidade de Brasília
Presidente da Banca

Professor Dr. Luiz André Felizardo Silva Schlittler
BETA 1-4 BIOTECNOLOGIA
Membro Externo

Professora Dra. Cynthia Maria Kyaw
Universidade de Brasília
Membro Efetivo

Professora Dra. Eliane Ferreira Noronha
Universidade de Brasília
Membro Efetivo

Professora Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes
Universidade de Brasília
Membro Suplente

*Porque dEle, e por Ele, e para Ele são todas
as coisas; glória, pois a Ele eternamente.*

Amém!”

Romanos 11:36

*“We keep moving forward, opening new
doors, and doing new things, because we're
curious and curiosity keeps leading us down
new paths.”*

Walt Disney

*À Deus pelas bênçãos de todos os dias.
Aos meus pais pelo apoio incondicional
Aos meus amigos pela companhia*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma oportunidade de crescimento e pelos milagres diários que me fizeram chegar até aqui.

Aos meus pais por ajudarem e apoiarem as decisões tomadas por mim, por todos os ensinamentos e a educação, sem os quais eu não teria sucesso. Aos meus irmãos pelos momentos de descontração e alegria, pelas conversas e por todo o apoio.

Ao professor Fernando Araripe pela orientação, o apoio, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo incentivo e suporte para a realização deste trabalho, mas principalmente por cuidar de mim durante estes anos.

Ao Professor e amigo Luiz André pela ajuda e apoio durante a realização deste trabalho.

Às Professoras Janice de Marco e Lídia Pepe por ajudarem sempre que precisei, por me orientar, por toda a paciência e compreensão.

A Nadine, minha irmã do coração, que não só me ajudou psicologicamente, mas esteve ao meu lado em todos os momentos, ouvindo meus desabafos, me ajudando a superar os problemas. Agradeço a Deus todos os dias por ter uma pessoa tão maravilhosa como você em minha vida.

Aos amigos Viviane, Marciano e Túlio, vocês me ajudaram a contornar as pedras que encontrei pelo caminho, sem suas ideias muita coisa não teria sido feita.

A Luíza, Mari e Ana, vocês foram minha força dentro do laboratório, companheiras para todos os momentos de café e para todos os momentos da vida.

Agradeço por vocês estarem sempre presentes.

As pessoas mais que especiais do Lab 2 (Rainha): Tiago, Vanessa, Francisco, Daniel, Carol, Roberta, Dani, Ieda, Igor, Diego, Yasmin, Julia e Pedro obrigada pelas conversas, auxílios, meios de cultura e soluções emprestadas, mas principalmente por me aguentarem nos momentos de estresse.

À professora Claudia Lareo da UDELAR/UY, pela doação das cepas de referência e o acolhimento em seu laboratório. Aos amigos do Uruguai, Eloísa, Laura, Maru, Valeria, Mairan, Flo Rizzo, Florencia, Max e Veronica, que me auxiliaram e me ensinaram muito, Gracias!

Aos amigos de outros laboratórios que estiveram presentes nesta jornada, em especial a Fernanda, Fabiana e Caliandra.

Aos professores que colaboraram com este trabalho auxiliando nos experimentos, em especial a Prof. Sônia, Prof. Élide, Prof. Ildinete, Prof. Eliana e o Prof. Osmindo.

Ao CNPq e a Univesidade de Brasília pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram durante todo tempo para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIACÕES	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Combustíveis fósseis.....	4
2.2. Combustíveis de fontes renováveis	6
2.2.1 Bioetanol	8
2.2.2 Bioisopropanol	11
2.2.3 Biobutanol	12
2.3. O gênero <i>Clostridium</i>	13
2.3.1 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	16
2.3.2 Limitações da Fermentação ABE.....	23
2.4. Manipulações genéticas aplicadas em <i>Clostridium</i> spp.	26
2.4.1. Superexpressão de genes por plasmídeos.....	28
2.4.2. Troca alélica acoplada (<i>Allelic-Coupled Exchange</i> - ACE)	28
2.4.3. Sistema CRISPR-Cas9	32
2.5 Recuperação de solventes.....	33
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivos específicos.....	37
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	38
5. MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1. - Material.....	39
5.1.1 Células bacterianas	39
5.1.2 Meios de cultura	39

5.1.3	Soluções.....	41
5.1.4	Kits	43
5.1.5	Marcadores de massa molecular para DNA	44
5.1.6	Enzimas de restrição.....	44
5.2	Métodos.....	45
5.2.1	Cultivo de micro-organismos	45
5.2.2	Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico	45
5.2.3	Transformação bacteriana – choque térmico.....	45
5.2.4	Preparação de DNA plasmidial em pequena escala	46
5.2.5	Preparação de DNA plasmidial em grande escala.....	47
5.2.6	Reação em cadeia da polimerase (PCR):.....	47
5.2.7	Digestão de DNA com enzimas de restrição	47
5.2.8	Análise de DNA por eletroforese	47
5.2.9	Precipitação de DNA:.....	48
5.2.10	Preparo das células para eletroporação:.....	48
5.2.11	Eletroporação.....	48
5.2.12	Contrasseleção.....	49
5.2.13	Extração de DNA total de bactéria.....	50
5.2.14	Iniciadores	50
5.2.15	Cromatografia (HPLC).....	50
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.1.	Construção de vetores para metilação de DNA.....	52
6.1.1.	Síntese química do gene da metiltransferase do fago $\phi 3TI$ de <i>B. subtilis</i>	52
6.1.2.	Síntese do gene otimizado da metiltransferase do fago $\phi 3T$ de <i>B. subtilis</i>	55
6.2.	Construção dos vetores de integração para <i>Clostridium acetobutylicum</i>	59
6.2.1.	Construção do vetor para deleção do gene da Fosfotransacetilase (<i>pta</i>).....	60
6.2.2.	Construção do vetor para deleção do gene da butirato quinase (<i>buk</i>)	61
6.3.	Deleção do gene da Fosfotransacetilase (<i>pta</i>)	65

6.4.	Deleção do gene da Butirato quinase (<i>buk</i>).....	69
6.5.	Expressão do gene da álcool desidrogenase secundária em <i>C. acetobutylicum</i> ..	73
6.5.1.	Construção do vetor da álcool desidrogenase secundária (<i>sadH</i>);	73
6.5.2.	Produção de Isopropanol em <i>C. acetobutylicum</i>	75
7.	CONCLUSÃO	78
8.	PERSPECTIVAS	79
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
10.	PATENTE	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Consumo de energia mundial	4
Figura 2 - Produtos derivados do petróleo.	5
Figura 3 - Consumo de diferentes combustíveis fósseis nos últimos 44 anos no Brasil.	6
Figura 4 - Esporulação em Clostrídios.	15
Figura 5 - Representação esquemática do metabolismo de <i>C. acetobutylicum</i>	17
Figura 6 - Via metabólica de <i>C. acetobutylicum</i>	19
Figura 7 - Representação circular do genoma e do megaplasmídeo de <i>C. acetobutylicum</i>	21
Figura 8 - Mapa esquemático das regiões do DNA de <i>C. acetobutylicum</i>	22
Figura 9 - Modificação genética mediada por troca alélica acoplada.	30
Figura 10 - Modo de ação da enzima MazF mRNA interferase.	31
Figura 11 - Esquema da metodologia de remoção por gas-stripping.	34
Figura 12 - Sequência da região do fago ϕ 3TI de <i>B. subtilis</i> contendo o gene da metilase.	53
Figura 13 - Mapa físico do plasmídeo pACYC- ϕ 3T.	54
Figura 14 – Perfil de digestão dos vetores pACYC184 e pACYC- ϕ 3TI pela Fnu4HI.	55
Figura 15 - Mapa físico do plasmídeo pACYC- ϕ 3TIm.	56
Figura 16 – Confirmação da ausência de digestão do vetor pACYC- ϕ 3TIm pela Fnu4HI.....	56
Figura 17 – Desenho esquemático do fragmento dos genes <i>pta-ackA</i>	60
Figura 18 – Mapa físico do vetor de integração em <i>C. acetobutylicum</i> - pMTL-mazF-pta.	61
Figura 19 - Desenho esquemático do fragmento dos genes <i>buk-ptb-cac3077</i>	62
Figura 20 - Construção do vetor pMTL-mazF-buk.	63
Figura 21 – Perfil de digestão dos vetores para clostrídio pela Fnu4HI.	64
Figura 22 - Seleção da eletrotransformação de <i>C. acetobutylicum</i> com o vetor pMTL-mazF-pta.	66
Figura 23 – Seleção dos clones em meio contendo Fluoracetato de sódio.	66
Figura 24 – Confirmação do nocaute do gene <i>pta</i>	67
Figura 25 - Perfil cromatográfico em HPLC da produção de ácidos do clone A2 (48 h).....	68
Figura 26 - Perfil cromatográfico em HPLC da produção de butanol do clone A2 (96 h).	68
Figura 27 - Seleção em meio contendo Tianfenicol.....	70
Figura 28 - Confirmação do nocaute do gene <i>buk</i>	71
Figura 29 - Perfil cromatográfico em HPLC da produção de ácidos do clone AB1 (48 h).....	72
Figura 30 - Perfil cromatográfico em HPLC da produção de butanol do clone AB1 (96 h).	72
Figura 31 – Mapa físico do vetor de expressão do gene <i>sadH</i> - pHASadH-EmR.....	74
Figura 32 - Perfil cromatográfico em HPLC para análise da produção de Isopropanol AB1 (48 h).....	75
Figura 33 - Perfil cromatográfico em HPLC para comparação da produção de Isopropanol AB1 (48 h). ..	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enzimas de restrição usadas	44
Tabela 2. Condições de eletroporação testadas em <i>C. acetobutylicum</i> .	49
Tabela 3. Iniciadores utilizados neste trabalho.	50
Tabela 4 - Padrões utilizados no HPLC	51

LISTA DE ABREVIÇÕES

A	adenina
C	citossina
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
G	guanina
g	grama
<i>g</i>	força gravitacional
h	hora
kb	quilobase
L	litro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
DO ₆₀₀	densidade celular óptica medida a 600 nm
pb	par de base

PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
p/v	peso por volume
RNase A	ribonuclease A
rpm	rotações por minuto
s	segundo
T	timina
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
U	unidade
v	volume
V	volts
v/v	volume por volume
°C	graus Celsius
μF	microfaraday
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
Ω	ohm

RESUMO

Fontes limitadas de combustíveis fósseis, instabilidade no preço do petróleo e a necessidade de reduzir as emissões de dióxido de carbono na atmosfera estimulam a necessidade de se explorar novas tecnologias na produção de combustíveis líquidos usando matéria-prima renovável. Entre os biocombustíveis produzidos atualmente o butanol (1-butanol, n-butanol), desperta particular interesse, devido a características energéticas que o tornam um combustível promissor para motores de combustão. A biossíntese desse álcool está presente no gênero *Clostridium*, cujo metabolismo fermentativo é capaz de produzir acetona, butanol e etanol. Entretanto, a engenharia metabólica desses micro-organismos para produção de bioálcool é particularmente difícil de ser realizada, uma vez que as vias fermentativas são bastante ramificadas e possuem sistema de restrição diferenciado. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um bioprocessamento envolvendo modificações genéticas em cepas de *C. acetobutylicum* para o aumento da produção de álcoois. Para suplantar o sistema de restrição, linhagens de *E. coli* contendo o plasmídeo com o gene da metiltransferase otimizado ($\phi 3TIm$) foram utilizadas para metilação no DNA. A otimização da produção de álcoois foi realizada através do nocaute dos genes associados à formação de ácidos acético e butírico (*pta* e *buk*), assim como a expressão da álcool desidrogenase secundária de *C. beijerinckii* na linhagem resultante. Os resultados mostram que o DNA metilado em *E. coli* é resistente a ação da enzima de restrição *Cac284I* do *C. acetobutylicum*. Os genes *pta* e *buk* foram deletados e a produção de ácidos foi consideravelmente diminuída. O aumento da produção de butanol e etanol foi vista na cepa A1(Δpta), porém a cepa AB1 ($\Delta pta\Delta buk$) manteve os níveis produção butanol e de etanol semelhantes aos da cepa selvagem. Não houve produção de isopropanol em nenhum dos mutantes após a transformação com vetor episomal. Esta proposta é uma das primeiras iniciativas do país voltadas para a manipulação genética de clostrídios para a produção de biocombustíveis, os ganhos em termos de conhecimento serão bastante amplos e poderá servir como base para inúmeros desenvolvimentos futuros.

Palavras-chave: *Clostridium*, engenharia metabólica, fermentação ABE, butanol, isopropanol.

ABSTRACT

Limited sources of fossil fuels, instability in the price of oil and the need to reduce carbon dioxide emissions in the atmosphere stimulate the need to explore new technologies in the production of liquid fuels using renewable raw material. Among the currently produced biofuels, butanol (1-butanol, n-butanol) is particularly interesting because of the energetic characteristics that make it a promising fuel for combustion engines. The biosynthesis of this alcohol is present in the genus *Clostridium*, whose fermentative metabolism is capable of producing acetone, butanol and ethanol. However, the metabolic engineering of these microorganisms for bioalcohol production is particularly difficult to perform, since the fermentative pathways are quite branched and have a distinct restriction system. The aim of this work was to develop a bioprocess involving genetic modifications in *C. acetobutylicum* strains to increase the production of alcohols. To overcome the restriction system, *E. coli* strains containing the plasmid with the optimized methyltransferase gene ($\phi 3TIm$) were used for DNA methylation. The optimization of alcohol production was accomplished through the knockout of genes associated with the formation of acetic and butyric acids (*pta* and *buk*), as well as the expression of the secondary alcohol dehydrogenase (*sadh*) from *C. beijerinckii* in the resulting lineage. The results show that the methylated DNA in *E. coli* is resistant to the action of the Cac284I restriction enzyme of *C. acetobutylicum*. The *pta* and *buk* genes were deleted and acid production was considerably decreased. Increased production of butanol and ethanol was observed in strain A1 (Δpta), but strain AB1 ($\Delta pta\Delta buk$) maintained production of butanol and ethanol levels similar to wild type. There was no production of isopropanol in any of the mutants after episomal vector transformation. This work represents one of the first initiatives in Brazil aimed at the genetic manipulation of clostridia to produce biofuels and will pave the way for numerous future developments.

Key words: *Clostridium*, metabolic engineering, ABE fermentation, butanol, isopropanol.

1. INTRODUÇÃO

A produção de energia usando recursos naturais renováveis é uma das mais urgentes tarefas de nosso tempo. Fontes limitadas de combustíveis fósseis, instabilidade no preço do petróleo e a necessidade de reduzir as emissões de dióxido de carbono na atmosfera estimulam a necessidade de se explorar novas tecnologias na produção de combustíveis líquidos usando matéria-prima renovável.

Observa-se então, uma busca ávida por inovação no que tange a substituição das fontes de energia oriundas de matérias-primas não renováveis. As chamadas fontes alternativas, como a biomassa vegetal, que despertou interesse particular de instituições acadêmicas e do setor produtivo em todo mundo. A utilização desta fonte depende da biotecnologia para ser desenvolvida. Em geral, as rotas biotecnológicas são realizadas através de micro-organismos e seus metabólitos, entretanto, estes apresentam uma série de características que podem dificultar sua utilização para fins comerciais.

Os micro-organismos são capazes de produzir bioálcoois pela fermentação de biomassas, mas possuem obstáculos metabólicos que impedem a produção sob condições de interesse à realidade industrial, haja vista sua baixa tolerância às elevadas concentrações, tanto de matéria prima (substrato) quanto de produto. De fato, os solventes orgânicos, em geral, possuem características agressivas à natureza da célula microbiana que, em sua presença, esporulam. Logo, as ferramentas da genética se apresentam como fundamentais para adequar processos que ocorrem na natureza às demandas da indústria, através da construção de micro-organismos adaptados e melhorados metabolicamente.

O desenvolvimento e a difusão de novas tecnologias são essenciais para elevar a produtividade das tecnologias e promover o crescimento industrial. O mercado globalizado exige que as empresas se engajem em processos de racionalização, inserção internacional e inovação. Estes são os recursos que possibilitaram a transformação da indústria brasileira ao longo dos últimos 50 anos em uma das maiores e mais diversificadas entre os países em desenvolvimento, apesar de seu processo de inovação ainda ser deficiente (SCHLITTLER, 2017).

No Brasil, alguns setores se destacam pelo uso das biomassas como o de celulose e papel, alimentos e, especialmente, o sucroalcooleiro. Este último setor se sobressai aos demais por ser o responsável pela geração de centenas de milhões de toneladas de biomassa anualmente, sendo que a maior parte são resíduos. Cabe ressaltar que grande

parte das inovações tecnológicas introduzidas na indústria sucroalcooleira esteve focada, durante muitos anos, na base agrícola como a mecanização de colheitas, defensivos agrícolas, fertilizantes químicos, e outros produtos. Desta forma, a base agroindustrial, que compreende as etapas de processamento da cana, sua transformação e as operações adjacentes, ficou carente de incentivos e de esforços em pesquisa, desenvolvimento e inovação, aliados à restrita capacidade empreendedora dos meios acadêmicos.

Neste contexto, o etanol ganhou status de prioridade e, especialmente no Brasil, este biocombustível tem uma participação expressiva na matriz energética. No entanto, a indústria brasileira do etanol está fortemente atrelada à do petróleo, pois a produção de gasolina requer grande concentração de álcool em sua composição. Logo, o setor sucroalcooleiro se tornou bastante dependente das políticas de produção e de precificação da gasolina, o que geralmente não atende às suas necessidades. É importante enfatizar que hoje o setor passa por uma crise que poderá definir os rumos de suas atividades no Brasil.

O butanol, especificamente o 1-butanol, é um álcool com quatro átomos de carbono em sua estrutura molecular que, em temperatura ambiente, se encontra na forma líquida. É inflamável, incolor, pouco solúvel em água e totalmente miscível com solventes orgânicos polares, tais como ésteres e outros álcoois. É uma substância largamente utilizada como solvente, bloco de construção na indústria química e tem potencial para ser utilizado como biocombustível, haja vista sua semelhança energética com a gasolina (GRANA *et al.*, 2010).

A habilidade de micro-organismos sintetizarem butanol foi descrita por Pasteur em 1861 (PASTEUR, 1861). A principal espécie capaz de produzir esse composto é o *Clostridium acetobutylicum* que, devido ao seu metabolismo fermentativo natural, é capaz de produzir butanol, etanol e acetona (fermentação ABE). Este gênero de micro-organismos também é capaz de utilizar substratos variados, desde simples monossacarídeos até os polissacarídeos complexos. No entanto, embora a fermentação ABE seja um processo bastante conhecido, a produção destes solventes em larga escala permanece ainda em níveis sub-ótimos, já que os micro-organismos fermentadores apresentam uma série de limitações metabólicas para executarem o processo sob produtividades elevadas (JONES; WOOD, 1986; LEE *et al.*, 2008).

A engenharia metabólica em *Clostridium acetobutylicum* é particularmente difícil de ser realizada uma vez que não há ferramentas genéticas altamente eficazes, além da existência de um sistema de defesa complexo que restringe a inserção de novos genes. É importante destacar que durante a última década a aplicação combinada de técnicas moleculares e o aprimoramento de métodos de fermentação têm resultado no desenvolvimento de linhagens superprodutoras de solventes ABE (CHARBIN *et al.*, 2018).

Assim, mostra-se premente o desenvolvimento de processos para produção melhorada de álcoois via fermentação através de micro-organismos, especialmente do gênero *Clostridium*. Portanto, a criação e a difusão de novas tecnologias para a produção de bioálcoois, em micro-organismos geneticamente modificados de forma a aumentar a produtividade do referido processo, serão essenciais para a inserção do Brasil entre os principais produtores de bioálcoois a partir de biotecnologia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Combustíveis fósseis

Combustíveis fósseis são vitais para as necessidades energéticas globais, sendo parte de mais de 80% da energia primária consumida no mundo. A demanda por petróleo continua a aumentar, muito embora seu ritmo de crescimento tenha diminuído devido a maior eficiência dos veículos e aumento da tecnologia. Ganhos maiores em eficiência energética combinada com as mudanças graduais na mistura de combustível significa que o crescimento das emissões de carbono provenientes da energia deverá desacelerar significativamente em relação aos últimos 20 anos.

Mesmo assim, o caminho mais provável é que as emissões de carbono continuem a aumentar, indicando a necessidade de mais ações políticas. O momento e a forma dessa ação terão uma influência importante na natureza da transição energética. Dados recentes divulgados pela “International Energy Agency” (IEA), “British Petroleum” (BP) e Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) mostram a continuidade de crescimento de demanda por combustíveis fósseis no futuro (DUDLEY, 2017).

A transição gradual na matriz de combustíveis considerando as energias renováveis, juntamente com as energias nuclear e hidrelétrica, deverá representar metade do crescimento do estoque de energia nos próximos 20 anos (Figura 1). Mesmo assim, o petróleo, o gás e o carvão continuam a ser as fontes dominantes de energia que impulsionam a economia mundial, representando mais de três quartos do total de suprimentos de energia em 2035 (abaixo de 85% em 2015).

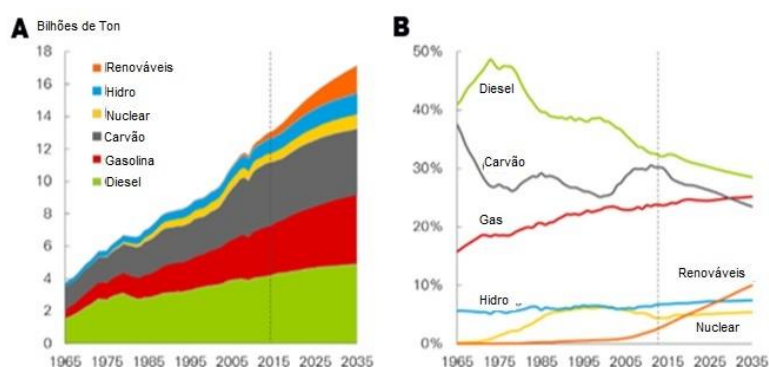


Figura 1– Consumo de energia mundial. (A) Aumento do consumo mundial de energia por décadas. (B) Percentual de consumo das diferentes fontes de energia no mundo (Dudley, 2017).

Dentre os derivados do petróleo mais consumidos no setor de energia estão: gasolina, diesel, óleo e combustível de aviação. Eles também são considerados ingredientes chave em milhões de produtos de uso diário como tinta, plástico, detergentes, giz de cera, lentes de óculos, desodorantes, pneus e até em válvulas cardíacas (Figura 2). Cada barril de petróleo (42 L) é capaz de gerar (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2015; DUDLEY, 2017):

- 45.3% gasolina para uso em automóveis
- 29.8% óleo de aquecimento e diesel
- 19.4% outros produtos incluindo os derivados para a manufatura de químicos, sintéticos e plásticos.
- 9.7% combustível de aviação
- 2.1% asfalto

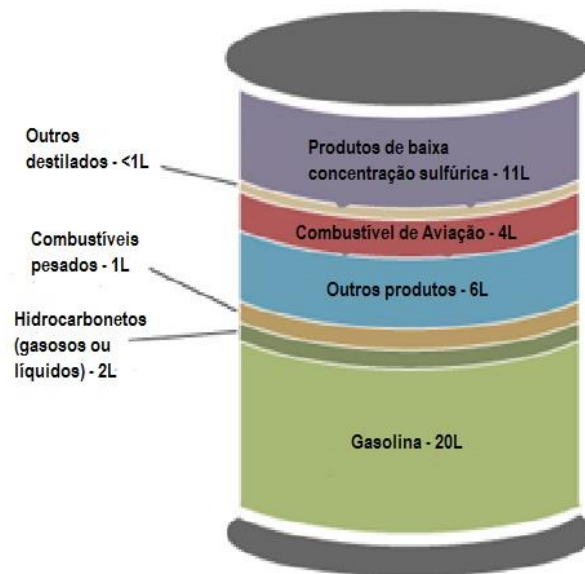


Figura 2 - Produtos derivados do petróleo. Volume de cada produto por barril de petróleo: 11L de produtos destilados de baixa concentração sulfúrica; 1L de outros destilados; 4L de combustível de aviação; 6L de outros produtos; 1L de combustível pesado; 2L de hidrocarbonetos (gasosos ou líquidos) e 20L de Gasolina (BP, 2017).

O aumento da produção doméstica de petróleo tem sido um objetivo a longo prazo do governo brasileiro, e as descobertas de grandes depósitos de petróleo em alto mar e do pré-sal aumentaram sua importância como produtor de combustíveis líquidos. O consumo de derivados do petróleo no Brasil aumentou consideravelmente nos últimos anos (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2015; DUDLEY, 2017). Dados de 2016 mostram o Brasil como o oitavo maior consumidor de energia do mundo e o terceiro maior das Américas, atrás dos Estados Unidos e do Canadá. O consumo total de energia primária no Brasil quase duplicou na última década por causa do crescimento econômico. Petróleo e outros líquidos representaram cerca de 47% do consumo de energia no Brasil (Figura 3). A energia renovável, a energia hidrelétrica e a energia nuclear representaram 37% do consumo de energia no Brasil em 2016 (DUDLEY, 2017).

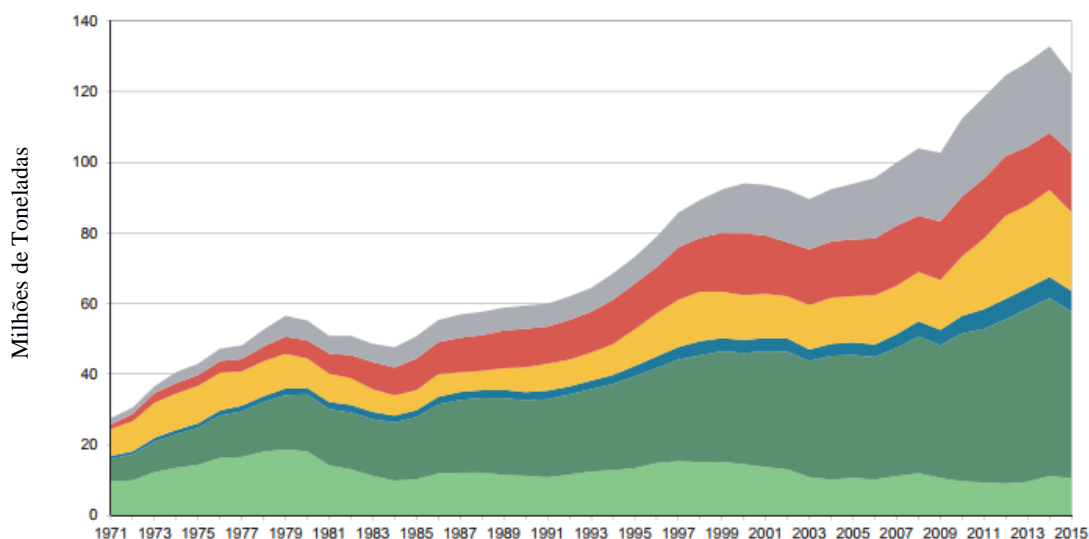


Figura 3 - Consumo de diferentes combustíveis fósseis nos últimos 44 anos no Brasil. Em verde claro, óleo combustível; verde escuro, destilados intermediários; azul, combustível de aviação; amarelo, gasolina; vermelho, LPG (etano e nafta); cinza, outros (óleo cru e hidrocarbonetos) (Dudley, 2017).

2.2. Combustíveis de fontes renováveis

As duas últimas décadas foram marcadas pela intensificação das discussões sobre temas ambientais, principalmente devido às mudanças climáticas e ao aquecimento global. As emissões de gases do efeito estufa têm sido vistas como as principais responsáveis por esse cenário negativo, por isso os governos do mundo inteiro têm fomentado a intensificação da produção e do consumo de fontes renováveis de energia.

A biomassa vegetal é a principal fonte utilizada para produção dos biocombustíveis líquidos e gasosos. Atualmente, os biocombustíveis são apontados como alternativa realista e comprovada para cumprir com sucesso as reduções de emissões de gás carbônico em larga escala, impulsionar o crescimento econômico e melhorar a segurança energética.

Existem quatro gerações de biocombustíveis, sendo elas classificadas de acordo com a matéria prima utilizada. Embora não haja consenso nas definições, em geral, são consideradas as seguintes: a primeira geração obtida a partir de açúcar (cana-de-açúcar, beterraba), amido (milho) ou óleos (girassol). Entretanto, estes biocombustíveis têm várias desvantagens, pois representam uma ameaça aos preços dos alimentos, uma vez que a biomassa utilizada é de culturas alimentares. Eles também têm um impacto negativo sobre a biodiversidade e a competição pela água em algumas regiões (EASAC, 2012).

A segunda geração é proveniente de biomassa lignocelulósica de matérias primas não alimentares (gramíneas, plantações de árvores ou resíduos lenhosos de florestas, por exemplo) ou resíduos orgânicos e resíduos alimentares. Entretanto, para estes materiais é necessária uma etapa de pré-tratamento, que envolve reações termoquímicas ou bioquímicas que liberam os açúcares incorporados nas fibras da planta. Após essa etapa, o processo de geração de etanol das usinas se assemelha ao da produção de etanol de primeira geração (EASAC, 2012; ARO, 2016).

Os biocombustíveis de terceira geração são cultivados como fontes de grande energia, de baixo custo e completamente renováveis. O principal exemplo corresponde a produção industrializada de biodiesel por algas. Elas podem ser cultivadas usando esgoto, águas residuais e água salgada, como oceanos ou lagos salgados. Não haveria então, a necessidade de usar a água que seria usada para consumo humano. Entretanto, mais pesquisas precisam ser realizadas para melhoria do processo de extração dos biocombustíveis, a fim de torná-lo financeiramente competitivo (KOÇAR & CIVAŞ, 2013; ARO, 2016).

A quarta geração de biocombustíveis está em desenvolvimento e envolve o conceito de processos bioquímicos e termoquímicos que produzem os biocombustíveis. Alguns caminhos da tecnologia de quarta geração incluem: pirólise, gaseificação, energia solar e manipulação genética de organismos para secretar hidrocarbonetos. Para o sucesso dessa geração, é preciso descobrir novas soluções para a construção de fábricas vivas e

para a engenharia genética e metabólica dos micro-organismos (ELLABBAN, ABURUB & BLAABJERG, 2014; ARO, 2016).

Embora os combustíveis alternativos tenham uma série de vantagens sobre os combustíveis convencionais, especialmente vantagens relacionadas ao meio ambiente, eles ainda têm um longo caminho a percorrer antes de poderem ser considerados alternativas economicamente viáveis aos combustíveis convencionais utilizados. Muitas pesquisas estão sendo direcionadas para analisar e melhorar a viabilidade econômica desses combustíveis (SANGEETA *et al.*, 2014).

2.2.1 Bioetanol

Dentre os principais biocombustíveis conhecidos, destaca-se o bioetanol, cuja vantagem mais significativa é poder ser produzido usando biomassa, o que lhe confere o status verde, ajudando a manter balanceada a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa. Outra vantagem associada ao etanol é sua propriedade antidetonante melhor que a da gasolina e a baixa emissão de monóxido de carbono, ele é mais seguro para ser transportado devido a sua alta temperatura de ignição e sua molécula contém apenas um átomo de oxigênio que o torna um hidrocarboneto parcialmente oxidável (DEMIRBAS, 2008; SANGEETA *et al.*, 2014)□□.

A tecnologia utilizada para produzir etanol (álcool) é a fermentação de açúcares simples (isto é, glicose, frutose e outros monossacarídeos) derivados de biomassa vegetal. De fato, o etanol foi testado como um combustível para motores antes da produção comercial de gasolina, em 1859 por Edwin Drake. No início de 1826, o inventor americano Samuel Morey desenhou um motor de combustão interna que foi alimentado por etanol e terebentina movimentando um barco a 7/8 mph (milhas por hora). Em 1860, o engenheiro alemão Nicolaus August Otto desenvolveu outro motor de combustão interna que funcionou também com uma mistura desses combustíveis (KOVARIK, 1998; GUO, SONG & BUHAIN, 2015).

O etanol foi usado como combustível para carros até a década de 30, porém, após a segunda guerra mundial havia pouco interesse em usar os cultivos agrícolas para a produção de combustível considerando o abundante suprimento de petróleo e gás natural

além do baixo custo de ambos. O interesse no etanol foi renovado na década de 70 com a interrupção do fornecimento de petróleo oriundo do Oriente Médio e a eliminação do chumbo como um reforço de octanagem para a gasolina (HUNT, 1981; BOTHAST & SCHLICHER, 2005).

Com a limitação no fornecimento de petróleo e a dependência cada vez maior dos países, a necessidade de fontes alternativas de energia recebeu um foco renovado, sendo o bioálcool uma opção bem atrativa. Considerando, o benefício aos agricultores, criando um novo mercado substancial para o fornecimento de biomassa e gerando novos empregos em áreas rurais economicamente pobres e pequenas comunidades (LUCON & GOLDEMBERG, 2007).

O álcool etílico produzido por processos de fermentação da biomassa é chamado de bioetanol. Os polímeros presentes em materiais vegetais (hemicelulose e celulose) podem ser convertidos em açúcares por processo de hidrólise para serem utilizados na produção do bioetanol. A partir do material hidrolisado, segue-se a fermentação, que é um processo biológico anaeróbico em que os açúcares são convertidos em álcool pela ação de micro-organismos, geralmente leveduras. O valor de qualquer tipo particular de biomassa como matéria-prima para fermentação depende da facilidade com que pode ser convertida em açúcares (BOTHAST & SCHLICHER, 2005; DEMIRBAS, 2008).

O bioetanol pode ser produzido a partir de uma grande variedade de carboidratos com uma fórmula geral de $(CH_2O)_n$. A fermentação da sacarose é realizada utilizando micro-organismos como *Saccharomyces cerevisiae*. A reação química é composta por hidrólise enzimática de sacarose seguida de fermentação de açúcares simples (BALTZ *et al.*, 1982; SOKHANSANJ *et al.*, 2002; DEMIRBAS, 2008).

O procedimento típico para a fabricação de bioetanol a partir de culturas alimentares envolve uma série de etapas, como moagem, liquefação, sacarificação, fermentação, destilação, secagem e desnaturação. Produzido a partir dessas culturas ele é visto como biocombustível de primeira geração. No entanto, há preocupações sobre os impactos ambientais e os equilíbrios de carbono, que estabelecem limites na crescente produção de biocombustíveis de primeira geração. A principal desvantagem dos biocombustíveis de primeira geração é o debate entre produção de alimentos x combustíveis, uma das razões do aumento dos preços dos alimentos deve-se ao aumento da produção desses combustíveis. Para minimizar os impactos adversos dessa produção,

foi explorado o bioetanol, de segunda geração, produzido a partir de materiais vegetais lignocelulósicos não alimentares (NAIK *et al.*, 2010; GUO, SONG & BUHAIN, 2015).

Os materiais lignocelulósicos são matérias-primas para biocombustíveis e podem ser obtidos através de hidrólise e fermentação ou através de gaseificação. Os recursos típicos para sua produção são as culturas florestais de rotação curta (álamo, salgueiro e eucalipto), gramíneas perenes (miscanthus, piração e grama canela) e resíduos da indústria da madeira, silvicultura e agricultura. Estes compostos, também referidos como biocombustíveis de 2ª geração, são combustíveis à base de carbono que são produzidos por processos inovadores, para os quais sua utilização comercial ainda está em desenvolvimento (ADITIYA *et al.*, 2016).

Existem duas rotas principais disponíveis para produzir combustíveis líquidos a partir da biomassa; um envolve o processamento termoquímico e o outro processo bioquímico. O processamento termoquímico define a conversão de biomassa em uma gama de produtos, por degradação térmica e reformação química, e envolve essencialmente aquecimento de biomassa na presença de diferentes concentrações de oxigênio. A clara vantagem do processamento termoquímico é que ele pode, essencialmente, converter todos os componentes orgânicos da biomassa que em comparação com o processamento bioquímico concentra-se principalmente nos polissacarídeos (GOMEZ, STEELE-KING & MCQUEEN-MASON, 2008; NAIK *et al.*, 2010).

No entanto, a tecnologia de etanol de segunda geração não é tão robusta quanto o etanol da primeira e deve ser melhorada em duas etapas específicas e cruciais: pré-tratamento e hidrólise do material lignocelulósico (FERRAZ JÚNIOR *et al.*, 2017). Os custos iniciais de pré-tratamento da biomassa e as caras enzimas celulósicas necessárias para a fermentação, especialmente para melhorar o rendimento, elevam os custos de produção do bioetanol pela fermentação em relação aos custos locais da gasolina. Esforços contínuos em direção a melhorias nas técnicas de pré-tratamento e bioengenharia de microorganismos e enzimas, usados na fermentação, provavelmente reduzirão essa lacuna de forma significativa (SANGEETA *et al.*, 2014).

Os álcoois de cadeia superior ou longa, como o butanol (C₄H₉OH) e o pentanol (C₅H₁₁OH), chamaram a atenção da comunidade científica nos últimos anos, pois são biocombustíveis alternativos, viáveis para uso em motores de combustão interna, com

maior índice cetano (medida de qualidade de combustão) e densidade de energia. São também renováveis, que podem ser produzidos por fermentação alcoólica de biomassa semelhantes à produção de etanol (KARABEKTAS & HOSOZ, 2009; DOĞAN, 2011).

2.2.2 Bioisopropanol

O isopropanol é o álcool produzido pela hidratação do propeno ou hidrogenação da acetona (KLABUNDE, BISCHOFF & PAPAS, 2018). Como seus ganhos de energia em relação ao etanol são mínimos e o custo de obtenção é alto, a produção em larga escala e o uso desse combustível não são justificáveis. Entretanto, este álcool pode ser produzido por micro-organismos e pode ser usado como biocombustível para substituir parcialmente a gasolina pois possui uma densidade de energia de 23,9 MJ/L, um pouco menor que a da gasolina (32 MJ/L), além de um alto índice de octano e baixa solubilidade em água quando comparado ao etanol (OSBURN, BROWN & WERKMAN, 1937; YAN & LIAO, 2009; PERALTA-YAHYA & KEASLING, 2010).

Na natureza, várias espécies do gênero *Clostridium* produzem isopropanol a partir de acetil-CoA, a via de formação do isopropanol em *C. beijerinckii* requer 1 mol de glicose para produzir 1 mol de isopropanol (CHEN & HIU, 1986). A redução da acetona em isopropanol é catalisada por uma álcool desidrogenase secundária dependente de NADPH (*Sadh*), que foi extensivamente caracterizada (ISMAIEL *et al.* 1993; KORKHIN *et al.*, 1998; GOIHERG *et al.*, 2010). A enzima se mostrou ativa para produção de álcoois primários e secundários e estudos cinéticos confirmaram que o substrato fisiológico era acetona (ISMAIEL *et al.*, 1993; CHEN, 1995).

Com as ferramentas genéticas que estão disponíveis para a espécie *C. acetobutylicum* foram realizados estudos transformando este produtor nativo de ABE, reconhecido por seu uso industrial e alto rendimento na produção de solventes entre as espécies do gênero, em um produtor eficiente de isopropanol. Essa abordagem foi alcançada expressando o gene codificador da álcool desidrogenase secundária (*sadh*) de *C. beijerinckii* para reduzir a acetona em isopropanol nos *C. acetobutylicum* (LEE *et al.*, 2012; DUSSÉAUX *et al.*, 2013).

2.2.3 Biobutanol

O butanol (nomenclatura IUPAC: 1-butanol) é um líquido incolor e inflamável, miscível com todos os solventes comuns, mas pouco solúvel em água. É um produto químico importante com uma ampla variedade de usos industriais. Quase a metade da produção mundial é convertida em ésteres de acrilato e metacrilato além de outros derivados importantes, como os éteres de glicol, acetato de butila, butilamina e amino resinas (EZEJI, QURESHI & BLASCHEK, 2007; DÜRRE, 2008).

As aplicações do butanol e dos compostos derivados dele incluem diluentes de tinta, fluidos hidráulicos e de freio, fabricação de perfumes, vidro blindados, detergentes, auxiliares de flotação (por exemplo, xantato de butila), fluídos de descongelamento, cosméticos (maquiagem dos olhos, batons, produtos de cuidados das unhas, produtos de barbear e higiene pessoal), a produção de medicamentos como alcaloides, antibióticos, cânforas, hormônios e vitaminas, bem como fases móveis em cromatografia (DÜRRE, 2008; GREEN, 2011)□.

A maior parte do 1-butanol produzido atualmente é sintético e derivado da rota petroquímica na síntese de oxo-propileno. Os custos de produção de butanol sintético estão ligados ao mercado de propileno e são extremamente sensíveis ao preço do petróleo bruto (GREEN, 2011). Entretanto, a capacidade de ser produzido por recursos petrolíferos e não petrolíferos usando as mesmas matérias primas do que o etanol e a partir de processos biológicos (fermentação) chamou a atenção dos pesquisadores como biocombustível alternativo ao bioetanol (DÜRRE, 2008; NDABA, CHIYANZU & MARX, 2015).

Em comparação com o etanol, o n-butanol exibe maior conteúdo energético, o que o torna um produto mais favorável como um combustível de mistura à gasolina. Em verdade, a eficiência do butanol é semelhante à da gasolina. Em comparação com a gasolina convencional, o índice antidetonante (“anti-knock”) do n-butanol está na mesma faixa e, portanto, não causará um impacto negativo na batida do motor. Além disso, o alto calor de evaporação do n-butanol fornece arrefecimento de carga adicional para evitar o golpe do motor quando usado em motores de injeção direta de gasolina. Isto permite uma melhor sincronização da faísca do motor em altas cargas e, assim, melhora a eficiência

térmica do motor (LAPUERTA *et al.*, 2010; TAO *et al.*, 2014; RAKOPOULOS, 2015; RAKOPOULOS *et al.*, 2017).

O butanol pode ser naturalmente produzido por micro-organismos por meio da fermentação de substratos renováveis, como a glicose. A utilização do processo de fermentação Acetona-Butanol-Etanol (ABE) foi relatada pela primeira vez no Reino Unido, em 1912, e a produção comercial se espalhou rapidamente pelo mundo durante a primeira e segunda guerras mundiais; primeiro, para produzir acetona para munições e, depois, para produzir butanol para verniz e tinta. O processo de fermentação caiu em desuso nos EUA e na Europa na década de 1950 quando os solventes renováveis já não podiam competir com seus equivalentes sintéticos em preço (JONES & KEIS, 1995; CHIAO & SUN, 2007). No entanto, a chamada "crise do petróleo", em 1973, estimulou a pesquisa científica neste campo, e o aumento dramático subsequente nos preços do petróleo bruto levou a uma reintrodução dos processos fermentativos para a produção industrial de butanol (MCCOY *et al.*, 1926; DÜRRE, 2008).

As primeiras tentativas de isolar e desenvolver estirpes bacterianas capazes de produzir solventes para aplicação comercial foram iniciadas pela empresa britânica Strange e Graham Ltd. que, em 1910, investigou a viabilidade da fabricação de borracha sintética a partir de álcoois superiores. Vários micro-organismos foram isolados de diversas fontes naturais; no entanto, embora muitos tenham sido testados, apenas um deles apresentou rendimento ideal para este propósito. A cepa industrial tornou-se conhecida como *Clostridium acetobutylicum* (MCCOY *et al.*, 1926; MCNEIL & KRISTIANSEN, 1986).

2.3. O gênero *Clostridium*

Em 1861, Pasteur, publicou a existência de micro-organismos capazes de sobreviver em condições anaeróbicas. Desde então, diversos trabalhos foram realizados para compreender a ocorrência de tal característica. Essas bactérias foram classificadas como pertencentes ao filo Firmicute, da classe Clostridia, ordem Clostridiales, pertencentes à família Clostridiaceae e ao gênero *Clostridium* (DÜRRE, 2005; LUDWIG, SCHLEIFER & WHITMAN, 2015).

O gênero *Clostridium* é um vasto e heterogeneo grupo bacteriano que representa um dos maiores do domínio Bacteria. As classificações taxonomicas mais antigas, que se baseavam apenas nas características fenotípicas, atribuíam mais de 200 espécies ao gênero *Clostridium*. Através de análises filogenéticas verificou-se que muitas espécies catalogadas inicialmente neste gênero se encontram filogeneticamente relacionadas com outros gêneros. Deste modo, uma nova reestruturação taxonomica baseada nesses dados reclassificou várias espécies em novos gêneros ou as sua atribuiu a gêneros já existentes (COLLINS *et al.*, 1994; JONES & KEYS, 2005).

Morfologicamente, as características deste gênero podem variar com o tempo de cultivo e o meio utilizado. São caracterizadas como um grupo de bactérias Gram positiva, embora em muitas espécies, as células Gram positiva só possam ser observadas em culturas muito jovens (por exemplo, *C. aminovalericum*, *C. durum*, *C. formicaceticum*, *C. kluyveri*, *C. pasteurianum*). A maioria delas encontra-se sob a forma de bastonete com variações em forma tamanho e espessura. Podem, em algumas espécies, apresentar mobilidade através de flagelos peritríquios, sendo a presença de cápsula uma característica presente apenas em espécies como em *C. perfringes* e em *C. butyricum* (CATO; STACKEBRANDT, 1989; JONES; KEYS, 2005).

A capacidade de produzir endosporos embora pareça ser monofilética, não é recorrente em todas as espécies. Os esporos da maioria das espécies são mais largos que as células vegetativas, conferindo uma aparência distinta dependendo da posição em que são formados. Nas fases mais avançadas da esporulação, verifica-se uma deformação da parede celular devido à presença de endoesporos ovais ou esféricos que podem ocupar a posição central, subterminal ou terminal do citoplasma (Figura 4) (CATO; STACKEBRANDT, 1989; DÜRRE, 2014).

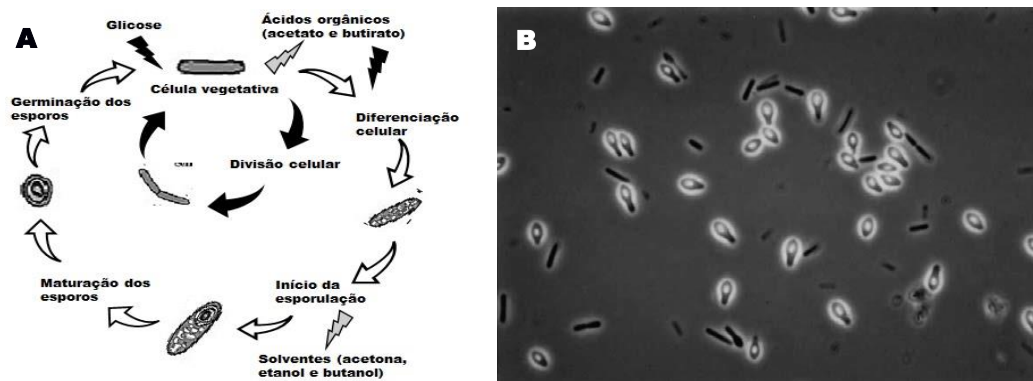


Figura 4 - Esporulação em Clostrídios. (A) Ciclo da esporulação em clostrídios (adaptado Al-Hinai, Jones & Papoutsakis, 2015) e (B) microscopia de contraste de fase (750x) de uma cultura de *C. botulinum* tipo A (Johnson, 2009).

São classificados como micro-organismos anaeróbios, no entanto, é sabido que algumas espécies podem sobreviver à exposição limitada de ar e, muitas vezes, eliminam oxigênio ou derivados reativos através da redução NAD(P)H dependente. Espécies como *C. acetobutylicum*, *C. haemolyticum* e *C. novyi* exigem condições estritamente anaeróbicas e não crescem se houver vestígios de oxigênio, espécies como *C. aerotolerans*, *C. beijerinckii*, *C. histolyticum*, *C. camis* e *C. durum*, entretanto, crescerão. Esta característica os diferencia de outros micro-organismos com a mesma capacidade de esporulação, incluindo *Bacillus anthracis* e *Bacillus subtilis* (ROOD *et al.*, 1997; JOHNSON, 2009).

Para a maioria das espécies do gênero faltam defesas contra espécies reativas de oxigênio tais como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e átomos de oxigênio. Estes organismos não possuem pigmentos heme e são catalase negativos. Para outros, o oxigênio é tóxico por interferir diretamente com sistemas de enzimas vitais e, talvez pela reação direta com ácidos nucleicos (LOWE, JAIN & ZEIKUS, 1993; JOHNSON, 2009).

Clostrídios podem crescer sobre uma variedade de valores de pH e temperaturas. A maioria das espécies preferem crescimento dentro da faixa de pH 6-7, mas algumas crescem em pH abaixo de 4 ou acima de 8. Grande parte das espécies de clostrídios cresce entre 25-47°C, mas algumas espécies são psicrófilas, importantes na deterioração dos alimentos e outras são termofílicas, valiosas como fontes de enzimas para os processos industriais (GOTTWALD & GOTTSCHALK, 1985; PYNE *et al.*, 2014).

Encontra-se amplamente distribuídas pela natureza, resultado da resistência e da longevidade dos seus esporos, embora o solo e o intestino de humanos e animais

constituam os principais habitats destes micro-organismos. Isto também se deve à capacidade de metabolizar uma grande variedade de fontes de carbono, incluindo carboidratos complexos, além de serem capazes de utilizar proteínas, aminoácidos e outras moléculas orgânicas (LOWE, JAIN & ZEIKUS, 1993; ROCHA, DANCHIN & VIARI, 1999; MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2010; TRACY *et al.*, 2012).

As espécies do gênero *Clostridium* spp. se diferem também pelos substratos que fermentam (celulose, amido, hemicelulose e pectinas em virtude da produção de enzimas extracelulares), convertendo anaerobicamente açúcares em: etanol, ácidos orgânicos e outros produtos, incluindo vários gases. Algumas espécies produzem proteínas putrefativas com a formação de produtos nitrogenados, outras podem utilizar ácidos nucleicos, purinas e pirimidinas, e algumas espécies, como *Clostridium pasteurianum*, utilizam nitrogênio molecular como única fonte de nitrogênio e o convertem em nitrogênio orgânico (JOHNSON, 2009; TRACY *et al.*, 2012).

Este gênero inclui patógenos (*Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium difficile*), produtores de solventes (*Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii*), cepas celulolíticas (*Clostridium phytofermentans* e *Clostridium thermocellum*) além de cepas de importância para a fisiologia humana e a biorremediação (JOHNSON, 2009). A capacidade de produzir metabólitos valiosos (enzimas e solventes) despertou o interesse da indústria, e entre as principais espécies estudadas com essas características, destaca-se o *Clostridium acetobutylicum*, pois este, é capaz de produzir a partir de seu metabolismo natural acetona, butanol e etanol.

2.3.1 *Clostridium acetobutylicum*

Esta espécie foi identificada pela primeira vez entre 1912 e 1914, desde então, tem sido utilizada para desenvolver um processo industrial de fermentação de acetona, butanol e etanol à base de amido. É a espécie sacarolítica mais conhecida e utilizada como produtora de solventes, foi submetida a análises bioquímicas, fisiológicas e genéticas detalhadas, tornando-se o modelo para diversos trabalhos (MCCOY *et al.*, 1926; GRUPE & GOTTSCHALK, 1992; DÜRRE *et al.*, 1995; DÜRRE, 2014).

Ao longo dos últimos quinze anos, o trabalho com este organismo levou ao desenvolvimento de diversas tecnologias como: sistema hospedeiro-vetor, protocolos de eletrotransformação, sistema de gene repórter e nocaute de genes cromossômicos e, mais recentemente, procedimentos de integração de genes cromossômicos (TUMMALA, WELKER & PAPOUTSAKIS, 2003; PAPOUTSAKIS, 2008; AL-HINAI, FAST & PAPOUTSAKIS, 2012; XUE *et al.*, 2017). Portanto, sua escolha como micro-organismo para desenvolvimento de trabalhos relativos a melhoria nos processos de produção de álcoois é justificada.

2.3.1.1 Metabolismo

A espécie *C. acetobutylicum* pode utilizar amido, hexoses ou pentoses como fonte de carbono. A glicose é fermentada pela via Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) para piruvato. O piruvato produzido é então metabolizado na presença de coenzima (CoA) para produzir dióxido de carbono, acetil-CoA e ferredoxina reduzida. O Acetil-CoA é subsequentemente condensado, reduzido ou desidratado para produzir outros derivados, tais como acetoacetil-CoA e butiril-CoA. Estes compostos são os intermediários centrais que levam à produção de ácido e solventes (Figura 5) (JONES; WOODS, 1986).

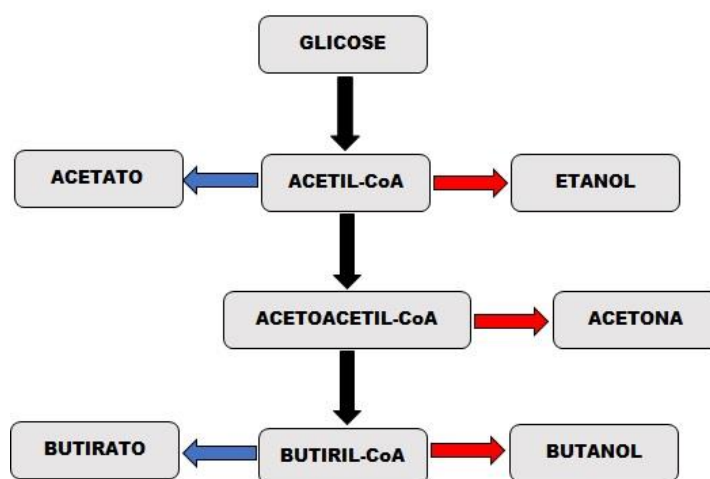


Figura 5 - Representação esquemática do metabolismo de *C. acetobutylicum*. Seta em azul indica a formação de ácidos (ácético e butírico) e a seta em vermelho indica a formação de solventes (acetona, butanol e etanol).

A fermentação Acetona-Butanol-Etanol (ABE) de *C. acetobutylicum* ocorre em dois estágios: o primeiro (acidogênese), no qual os ácidos acético e butírico são formados além de hidrogênio e dióxido de carbono, e o segundo (solventogênese), caracterizado pela reabsorção dos ácidos que são convertidos nos solventes ABE. Etanol e acetoina são formados em menores quantidades e o lactato pode ser produzido sob condições específicas do meio de cultura (JONES & WOODS, 1986; AWANG *et al.*, 1988).

Durante a acidogênese, o acetato é produzido a partir de acetil-CoA, neste processo duas enzimas são essenciais, a acetato quinase (AK) e fosfotransacetilase (PTA) responsáveis por essa conversão, com produção de ATP. Durante a solventogênese, os níveis de atividade de AK e PTA diminuem, sugerindo que a absorção de acetato produzido não ocorre através de uma reversão dessas enzimas (HARTMANIS & GATENBECK, 1984; BOYNTON, BENNETT & RUDOLPH, 1996). A enzima PTA (EC 2.3.1.8) possui 333 resíduos com uma massa molecular calculada de 36,2 kDa. É também precedida por uma sequência putativa de Shine-Dalgarno (GAAGGGAG) localizada 9 pb a montante do códon de iniciação da metionina. Um estudo sobre hidrofobicidade indicou que tanto o PTA como o AK possuem quantidades aproximadamente iguais de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos, sem potenciais domínios transmembranares (BOYNTON, BENNETT & RUDOLPH, 1996).

A via de formação de butirato também é composta por duas enzimas principais, a fosfotransbutirilase (PTB) e pela butirato quinase (BK). Sob condições típicas de fermentação, o PTB e o BK operam somente na direção da formação de butirato (HARTMANIS & GATENBECK, 1984; WALTER *et al.*, 1993). Extratos brutos da butirato-quinase apresentaram alta atividade específica (5,2 mmol/min/mg de proteína) com butirato e o valerato. A enzima purificada é um dímero com duas subunidades aparentemente idênticas com pesos moleculares de 39 kDa. A composição de aminoácidos mostrou que ela não contém triptofano e é pobre em aminoácidos contendo enxofre. A butirato-quinase é rapidamente inativada a 50°C na ausência de um substrato de ácido graxo (HARTMANIS, 1987).

O início da produção de solvente envolve uma mudança no fluxo de carbono das vias, da produção de ácido para a produção de solventes. Durante a produção de solventes, o acetil-CoA e a butiril-CoA funcionam como intermediários para a produção de etanol e butanol. Essas vias produzem acetaldeído e butiraldeído, respectivamente. O etanol e o butanol são produzidos em dois passos catalisados por redutores aldeído desidrogenase

(ADD) e álcool desidrogenase (ADH). E a acetona é produzida a partir da acetoacetil coenzima-A num processo que envolve uma CoA transferase (Figura 6) (HUANG, GIBBINS & FORSBERG, 1985; FISCHER, HELMS & DÜRRE, 1993; DÜRRE *et al.*, 1995; NAIR *et al.*, 1999).

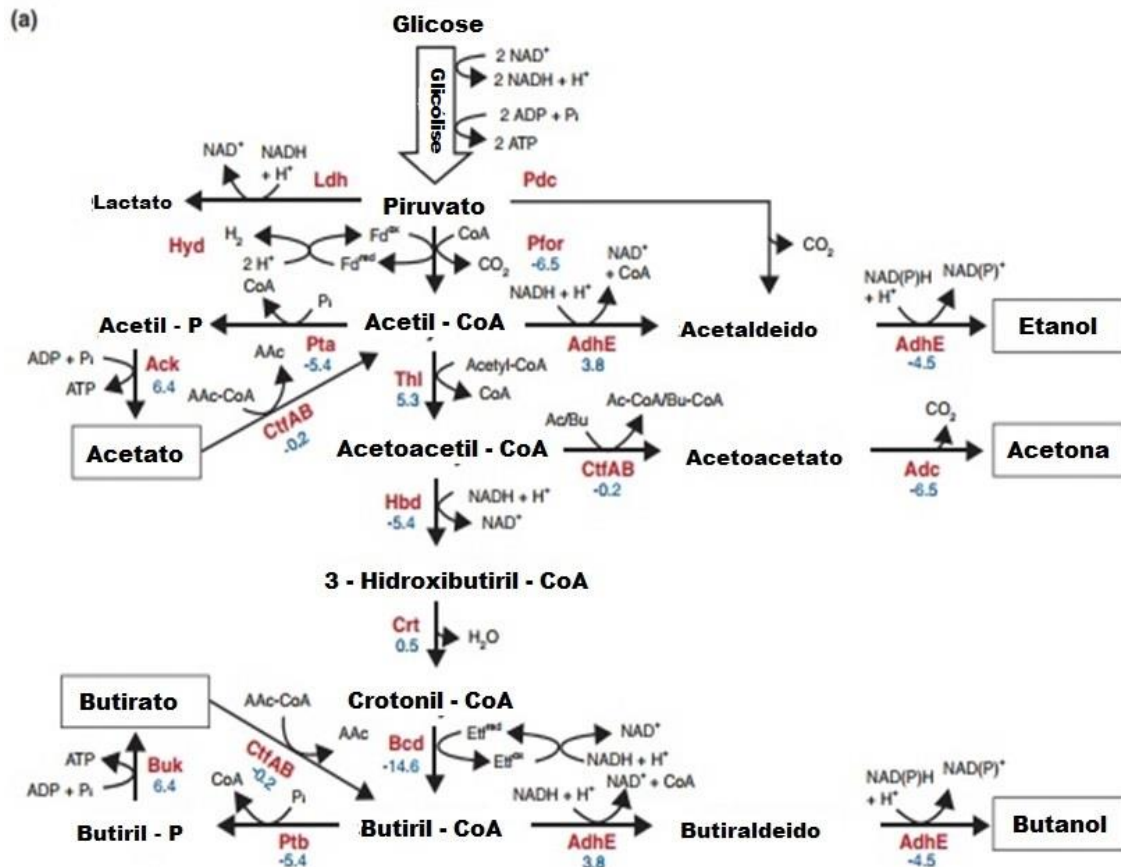


Figura 6 - Via metabólica de *C. acetobutylicum*. Adaptado de Lütke-Eversloh & Bahl (2011). Ldh, lactato desidrogenase; Pdc, piruvato descarboxilase; Hyd, hidrogenase; Pfor, piruvato:ferredoxina oxidoreductase; Fd, ferredoxina; Pta, fosfoacetil-CoA:acetil-CoA transferase; Ack, acetato quinase; AdhE, aldeído/álcool desidrogenase; CtfAB, acetoacetil-CoA:acil-CoA transferase; Adc, acetoacetato descarboxilase; Thl, tiolase; Hbd, 3-hidroxi-butil-CoA desidrogenase; Crt, crotonase; Bcd, butiril-CoA desidrogenase; Etf, elétron transfer flavoproteína; Ptb, fosfoacetil-CoA:butiril-CoA transferase; Buk, butirato quinase. AAc, acetoacetate; AAc-CoA, acetoacetil-CoA; Ac/Bu, acetato/butirato; Ac-CoA/Bu-CoA, acetil-CoA/butiril-CoA.

Os clostrídios produtores ABE geram excesso de redutores na glicólise ou na reação da oxidoreductase piruvato-ferredoxina. Embora parte da NADH produzida pela via EMP esteja na forma de NADH-ferredoxina redutase, a reação pode ser alterada da formação de piruvato para formar ácido láctico, facilitando a rápida regeneração NADH e NAD⁺. A ferredoxina reduzida é a doadora de elétrons da hidrogenase em *C. acetobutylicum* (DEMUEZ *et al.*, 2007; GUERRINI *et al.*, 2008).

Durante a acidogênese, o hidrogênio funciona como um receptor do excesso de prótons e elétrons (PETITDEMANGE *et al.*, 1976; DESAI *et al.*, 1999). Nesta fase, a atividade da hidrogenase é alta e é produzido mais hidrogênio do que é teoricamente possível a partir da clivagem do piruvato. Isso indica que uma parte do NADH produzido durante a glicólise é reoxidada através da via que leva à produção de hidrogênio. Assim, uma grande proporção do fluxo de elétrons é direcionada para a produção de hidrogênio enquanto o fluxo de carbono é direcionado principalmente para a produção de ácido, resultando na geração máxima de energia. Durante a solventogênese ocorre a redução da produção de hidrogênio e seus equivalentes como NADH ou NADPH, são oxidados para produzir butanol ou etanol. (ZEIKUS, 1985; GIRBAL *et al.*, 1995; DÜRRE, 2008).

O início da solventogênese está ligado à formação de endósporos, embora um não seja essencial para o outro, o início dos processos pode ocorrer simultaneamente quando a célula é exposta a um estresse ácido severo (LONG, JONES & WOODS, 1984; DÜRRE, 2014). Esta é uma vantagem distinta para sobrevivência comparada outras bactérias que são incapazes de lidar com o estresse ácido. Entretanto, os solventes produzidos também danificam as células pela inativação das proteínas de membrana, entre outros efeitos. Consequentemente, com o início da solventogênese, a formação de endósporos é ativado para a sobrevivência do clostrídio (DÜRRE *et al.*, 1987; DÜRRE, 2008).

2.3.1.2 Genética de *C. acetobutylicum*

O genoma de *C. acetobutylicum*, primeiro a ser sequenciado, consiste em 3.940.880 pb. Os genes são distribuídos de forma bastante uniforme, com aproximadamente 51,5% sendo transcritos a partir de uma fita do DNA e 49,5% da fita complementar. Um total de 3.740 ORFs codificadoras de polipeptídeos foram identificados, representando 88% do DNA genômico, com regiões intergênicas com média de 121 pb (Figura 7). Uma origem de replicação putativa foi identificada, bem como genes *gyrA*, *gyrB* e *dnaA* que são adjacentes a origem da replicação em muitas outras bactérias. A região do genoma que mostra o maior nível de conservação, quando comparado com *B. subtilis*, apresenta aproximadamente 200 genes e neles estão incluídos

os principais operons que codificam funções celulares centrais, como a tradução e transcrição (NÖLLING *et al.*, 2001).

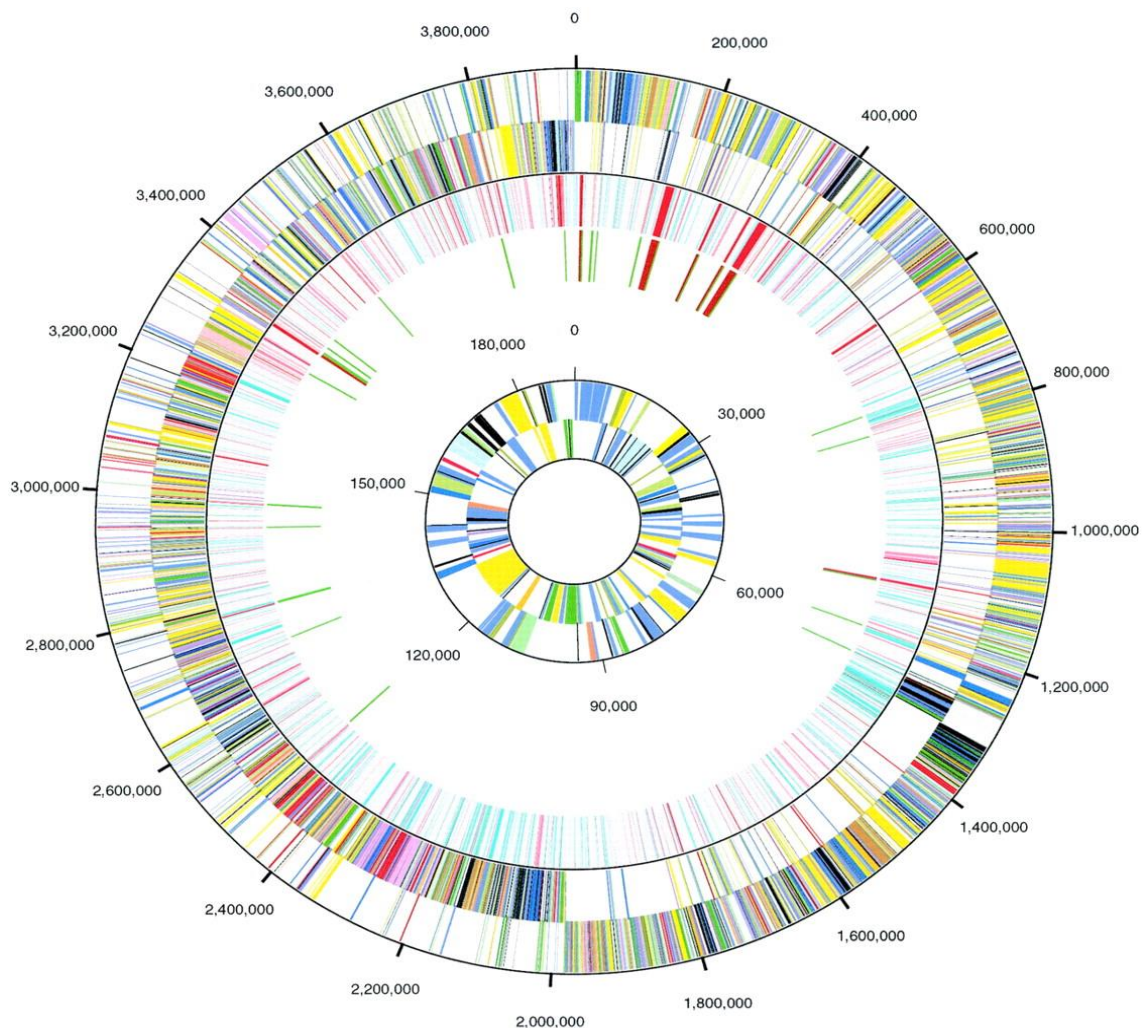


Figura 7 - Representação circular do genoma e do megaplasmídeo de *C. acetobutylicum*. Os dois anéis externos indicam a posição dos genes nas duas fitas do genoma, nos sentidos senso e antissenso, respectivamente, colorida de acordo com a função. O terceiro anel (interno) indica a % de GC contida em cada gene putativo. O quarto anel indica a posição dos genes de tRNA (verdes) e de rRNA (vermelho). Os anéis internos (menores) mostram a posição dos genes nas fitas do pSOL1, senso e antissenso do pSOL1, respectivamente, colorida de acordo com a função (Nolling *et al.*, 2001).

Existem 11 operons ribossomais agrupados em proximidade com a origem da replicação e todos são orientados na mesma direção que a forquilha de replicação principal. Ele também possui um megaplasmídeo, pSOL1, que consiste em 192 Kb e parece codificar 178 polipeptídios. Em contraste com o genoma, não existe uma polarização de cadeia de codificação óbvia no plasmídeo. Dois profagos também foram encontrados, o primeiro tem aproximadamente 90 kb e inclui cerca de 85 genes

(CAC1113 a CAC1197), sendo 11 relacionados a fagos, 3 recombinases, e uma série de enzimas de processamento de DNA. O segundo profago parece abranger cerca de 60 kb e exibe codificação de aproximadamente 79 genes (CAC1878 a CAC1957) (FISCHER; HELMS; DÜRRE, 1993; NÖLLING *et al.*, 2001).

O plasmídeo pSOL1 é composto por genes importantes para o processo de formação da acetona e do butanol. Nele se encontra o operon *sol*, cujos genes codificam butiraldeído desidrogenase (*badh*), butanol desidrogenase (*bdhA*), butirato-CoA transferase (*ctfB*), acetato-CoA transferase (*ctfA*) (FISCHER; HELMS; DÜRRE, 1993; NAIR *et al.*, 1999). A indução da transcrição deste operon marca o início da formação do butanol. Durante a fase de produção do solvente, o operon *sol* é desligado e o gene cromossomal *bdhB* (butanol desidrogenase) é induzido (Figura 8) (PETERSEN *et al.*, 1993; SAUER & DÜRRE, 1995; CORNILLOT *et al.*, 1997).

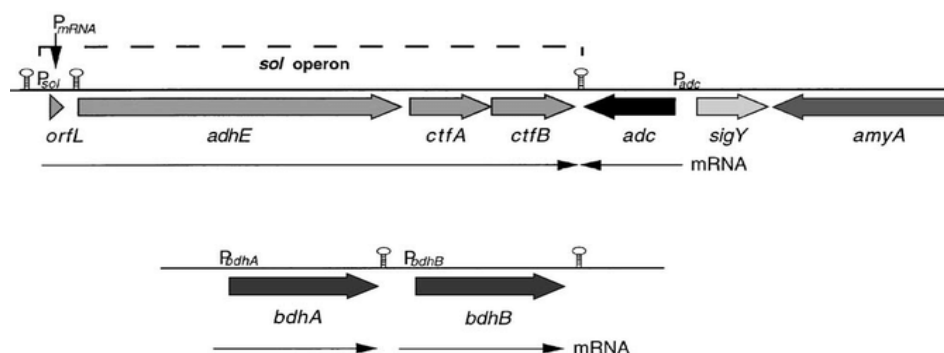


Figura 8 - Mapa esquemático das regiões do DNA de *C. acetobutylicum*, que codificam enzimas essenciais para a solventogênese. Setas representam localizações e orientação dos genes; setas finas indicam transcrições primárias de mRNA. Posições de promotores dos operons diretamente envolvidos na solventogênese são representados por *P_{sol}*, *P_{adc}*, *P_{bdhA}*, *P_{bdhB}*. *P_{mRNA}* indica um local putativo de processamento de mRNA. Genes indicados: *adhE*, aldeído/álcool desidrogenase; *ctfA/B*, acetato/butirato-coenzima A transferase; *adc*, acetatoacetato descarboxilase; *sigY*, fator sigma alternativo; *amyA*, a-amilase; *bdhA*, butanol desidrogenase A; *bdhB*, butanol desidrogenase B (Extraído de DÜRRE *et al.*, 2002).

Os genes envolvidos na regulação da fase acidogênica foram descritos como dois operons bicistronicos, o primeiro relacionado a formação ácido acético composto pelos genes *pta* e *ack*, e o segundo, responsável pela formação de ácido butírico formado pelos genes *ptb* e *buk*. Ambos os genes estão em conjunto no genoma na seguinte sequencia: o *ptb* precede o *buk* e o *pta* precede *ack* (WALTER *et al.*, 1993; BOYNTON, BENETT & RUDOLPH, 1996). O nocaute desses genes mostrou um aumento na formação de solventes, pela alteração do fluxo de carbono na via metabólica (BOYNTON, BENETT & RUDOLPH, 1996; GREEN *et al.*, 1996).

A solventogênese está intimamente ligada à esporulação, o fator de transcrição responsável pela iniciação da esporulação (Spo0A) também inicia a produção de solventes pela ativação transcricional dos genes da acetoacetato descarboxilase (*adc*), álcool desidrogenase (*adhE*) e a CoA transferase (*ctfAB*). Mutantes com deleção do gene *spo0A* são severamente deficientes na produção de solventes, enquanto as cepas com *spo0A* amplificado superexpressam os genes da formação de solventes, mas apresentam redução na produção de butanol devido à esporulação (HARRIS, WELKER & PAPOUTSAKIS, 2002; SULLIVAN & BENNETT, 2006).

Os clostrídios solventogênicos perdem sua produtividade ao longo do tempo, se as células são mantidas no estado vegetativo durante um período prolongado. A degeneração da cepa é um resultado de mudanças genéticas e não é o mesmo que a perda de habilidade para produzir solventes em condições de cultivo desfavoráveis. A perda da capacidade de produção de solvente associada à cura do megaplasmídeo, um fenômeno comum em *C. acetobutylicum* (STEPHENS *et al.*, 1985; FISCHER, HELMS & DÜRRE, 1993; CORNILLOT *et al.*, 1997).

2.3.2 Limitações da Fermentação ABE

Todos os clostrídios produtores de solventes conhecidos compartilham um metabolismo semelhante. Durante a fermentação, são produzidos solventes (acetona, etanol e butanol) e gases (H₂ e CO₂), podendo ser usados para isso, fontes renováveis de carbono, como resíduos agroindustriais e biomassa lignocelulósica. A produção de solventes pelas rotas fermentativas ainda não é economicamente competitiva em comparação com as abordagens petroquímicas, porque o butanol é tóxico para as próprias bactérias produtoras e, assim, a capacidade de produção é limitada pela tolerância ao butanol produzido. A fim de minimizar a toxicidade do butanol para as células e melhorar a produção de solventes, muitas estratégias de recuperação estão sendo testadas (DÜRRE, 2008; JIMÉNEZ-BONILLA & WANG, 2018).

Pesquisadores no campo da engenharia metabólica realizaram numerosos estudos para estabelecer um método eficiente de produção de álcoois. A produção melhorada foi conseguida alternando a adição de substâncias para impulsionar o fluxo de carbono ou elétrons em direção à produção de solventes em bateladas alimentadas ou contínuas.

Ácidos orgânicos, como acetato, butirato, lactato e propionato, são usados para conduzir o fluxo de carbono. O aumento da produção de ABE também foi observado na batelada alimentada com glicose e cultura contínua de *C. acetobutylicum* com adição de ácido butírico ou ácido acético (BAHL, ANDERSCH & GOTTSCHALK, 1982; MATTA-EL-AMMOURI *et al.*, 1987; GRUPE & GOTTSCHALK, 1992; ZHANG *et al.*, 2009).

Esses estudos deixam claro o significado dos fluxos de carbono e elétrons na otimização da produção de butanol da fermentação ABE em clostrídios, para o estabelecimento de um sistema de produção de butanol altamente eficiente. A produtividade do solvente volumétrico (g de solvente/L/h) tem um grande impacto no custo do processo. O processo de fermentação semi-contínua oferece uma produtividade de solvente 40% maior do que um processo em batelada convencional, pois a cultura contínua durante um período prolongado com cepas como *C. acetobutylicum* tende a degenerar ao longo do tempo (CORNILLOT *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2009).

A produção de butanol tem um forte efeito inibitório no crescimento do micro-organismo, pela toxicidade à célula, o que leva baixa produção deste álcool (concentração final, produtividade e rendimento) (JONES; WOODS, 1986). Para eliminar a inibição do butanol, várias técnicas de recuperação de butanol foram aplicadas a fermentação por batelada, batelada alimentada, assim como em culturas contínuas. Os métodos desenvolvidos por pesquisadores nos campos combinados de tecnologia microbiana e engenharia de separação utilizam extração líquido-líquido (QURESHI; MADDOX, 1995; CRABBE *et al.*, 2001), remoção de nitrogênio (*gas-stripping*) (GROOT, VAN DER LANS & LUYBEN, 1989; EZEJI, QURESHI & BLASCHEK, 2004), pervaporação da membrana (QURESHI *et al.*, 2001; IZÁK *et al.*, 2008;), adsorção (YANG & TSAO, 1995; NIELSEN & PRATHER, 2009) e per-extração usando polipropileno e biodiesel (GROBBEN *et al.*, 1993). Técnicas de cultura com recuperação integrada de butanol *in situ* são muito vantajosas porque a concentração de butanol em toda a cultura pode ser mantida abaixo do nível de inibição de butanol.

Acetona, etanol e butanol são os produtos dominantes do processo ABE, dos quais o butanol constitui 60-70% (p/p) do total de solventes, acetona 20-30% e etanol cerca de 10% (CHIAO & SUN, 2007). Uma maneira possível de melhorar a eficácia da produção de bioálcoois é aumentar o butanol eliminando a produção de outros subprodutos da fermentação, tais como os ácidos ou a acetona.

Nas últimas décadas, várias estratégias foram desenvolvidas para diminuir a produção de acetona e aumentar a produção de butanol (NAIR & PAPOUTSAKIS 1994; SILLERS *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2009; SILLERS, AL-HINAI & PAPOUTSAKIS, 2009; HAN, GOPALAN & EZEJI, 2011). A geração de acetona é indesejável na produção de biocombustível, pois, além de ser corrosiva, reduz o rendimento de butanol por unidade de massa de substrato utilizado. Entretanto, estudos mostraram que a produção de acetona é importante para a detoxificação no citoplasma dos ácidos carboxílicos e prótons gerados durante a fase solventogênica (BAHL, ANDERSCH & GOTTSCHALK, 1982; JIANG *et al.*, 2009; COLLAS *et al.*, 2012).

A conversão intracelular de acetona em isopropanol foi uma alternativa atraente para evitar a excreção de acetona e produzir um álcool valioso. Lee e colaboradores (2012) expressaram o gene *sadh* (álcool desidrogenase secundária) de *C. beijerinckii* em *C. acetobutylicum* para realizar a simples conversão de acetona em isopropanol. O resultado desse estudo levou ao desenvolvimento da primeira linhagem de *C. acetobutylicum* capaz de realizar a fermentação IBE. No seu conjunto, esses estudos têm despertado grande interesse industrial já que *C. acetobutylicum* pode ser considerado como plataforma de fermentação eficiente para a produção de biocombustíveis.

Na maioria dos casos, as estirpes usadas na fermentação foram isoladas da natureza. No entanto, recentemente foram feitas várias tentativas para criar linhagens para a síntese de butanol através de mutagênese ou engenharia genética. A escolha de uma cepa para a fermentação depende de vários fatores: matéria-prima, método de fermentação (periódico, contínuo ou batelada), tecnologia de separação de solventes, composição necessária e proporção dos produtos metabólicos finais, exigência de minerais e vitaminas adicionais, resistência a bacteriófagos e contaminação com bactérias ácido-láticas (DÜRRE, 2008; LEE *et al.*, 2008).

Um grande conjunto de ferramentas para modificação genética de clostrídios foi desenvolvido para criar cepas com níveis mais elevados de síntese de solventes e maior resistência ao butanol. Os métodos de clonagem, expressão e inativação de genes são amplamente utilizados para mudar as vias metabólicas da solventogênese. Assim, desenvolvimento de cepas produtoras de butanol recombinante seja na plataforma Clostrídio ou em outros micro-organismos abrem o caminho para uma produção eficiente dos biocombustíveis de nova geração (LEE *et al.*, 2008; BEREZINA *et al.*, 2012).

2.4. Manipulações genéticas aplicadas em *Clostridium* spp.

Para a manipulação genética de cepas bacterianas, muitas vezes o passo mais difícil envolve o estabelecimento de um meio eficiente de introdução de DNA exógeno em células hospedeiras, o que abre caminho a uma série de aplicações genéticas valiosas. Assim, estabelecer uma metodologia para transferência eficiente de DNA é primordial para o desenvolvimento de linhagens melhoradas de *Clostridium* spp. A técnica de transferência de DNA dominante para este gênero é a transformação.

As bactérias Gram-positivas, especialmente os membros do gênero *Clostridium*, estão entre os micro-organismos mais difíceis de serem modificados. Entretanto, a eletrotransformação é a técnica mais empregada devido à sua simplicidade, maior confiabilidade, independência de espécies doadoras e alta eficiência da transferência de plasmídeos. Muitos métodos de transformação foram testados para transferência de plasmídeos para bactérias deste gênero (PYNE *et al.*, 2014). Raramente podem ser observados pontos comuns em protocolos entre diferentes espécies sem otimização rigorosa.

A resistência à transformação apresentada pelas espécies de *Clostridium*, como em *C. acetobutylicum*, é frequentemente, o resultado do sistema restrição da bactéria ou de uma incapacidade do DNA para penetrar na parede celular espessa da bactéria Gram-positiva. A restrição pode ser superada por metilação apropriada para proteção de DNA de plasmídeo transformante, enquanto que a parede celular Gram-positiva pode ser alterada através da modificação do estado fisiológico das células receptoras ou pela modulação dos parâmetros elétricos do pulso de eletroporação (SILLERS *et al.*, 2008; AUNE & AACHMANN, 2010).

A complexidade para a manipulação genética de *C. acetobutylicum* deve-se ao seu sistema endógeno de restrição que cliva sequências de DNA não metiladas pela ação da endonuclease Cac824I. O sistema de restrição tipo II identificado nesta espécie possui sequências de reconhecimento exclusivas, sequências estas ricas em bases GC, por exemplo, 5'-GCNGC-3' reconhecida pela endonuclease (MERMELSTEIN *et al.*, 1992). Para contornar esse problema, o DNA a ser usado para transformar o clostrídio pode ser metilado *in vivo* em *E. coli* contendo plasmídeo com o gene que codifica uma

metiltransferase capaz de metilar essas sequências (MERMELSTEIN; PAPOUTSAKIS, 1993). Ou utiliza-se uma cepa de *C. acetobutylicum*, cujo gene que codifica a endonuclease Cac824I tenha sido deletado, o que torna essa bactéria competente para receber qualquer tipo de DNA (DONG *et al.*, 2010).

A criação de vetores para serem utilizados nas técnicas para manipulação genética em clostrídios depende de uma ampla disponibilidade de marcas de seleção e origens de replicação funcional. As cepas recombinantes da maioria das espécies são selecionadas usando eritromicina/claritromicina (*ermB*) ou tianfenicol/cloranfenicol (*catP*) (HEAP *et al.*, 2007). O número de origens de replicação para esses micro-organismos é limitado, pois a estabilidade segregacional varia entre 69,0 e 99,9% por geração para os hospedeiros *C. acetobutylicum*, *C. botulinum*, *C. difficile* e *C. tyrobutyricum* (HEAP *et al.*, 2009; 2010; YU *et al.*, 2011).

Técnicas de modificação genética como a superexpressão de genes baseadas em plasmídeos, a interrupção de genes mediados por RNA antisense, a deleção de genes cromossômicos e as tecnologias avançadas de edição de genoma exigem acesso a um repertório de sistemas de promotores constitutivos e induzíveis. Para avaliar a função e força do promotor, numerosos sistemas repórteres de genes foram adaptados ou desenvolvidos para *Clostridium*. Os promotores de genes envolvidos no metabolismo central do carbono dos clostrídios como a acetoacetato decarboxilase (*adc*), fosfobutiriltransferase (*ptb*), ferridoxina (*fdx*) e tiolase (*thl*) foram amplamente aplicados para expressão de genes heterólogos (TUMMALA, WELKER & PAPOUTSAKIS, 1999; YU *et al.*, 2011; CUI *et al.*, 2012).

Certas aplicações genéticas requerem o uso de sistemas de promotores induzíveis, resultantes da toxicidade ou de expressão transitória de uma proteína codificada. Estes sistemas foram recentemente adaptados para uso em clostrídios, com indução decorrente de produtos bióticos ou abióticos. Como exemplo de promotores induzíveis temos: promotor induzido por xilose (GIRBAL *et al.*, 2003), promotor artificial *fac* (criado através da inserção do *lacI* de *E. coli* imediatamente a jusante do promotor do gene da ferredoxina) induzido por β -D-1-tiogalactopiranosídeo de isopropila (IPTG) (HEAP *et al.*, 2007), promotor *recA* induzido por UV (NUYTS *et al.*, 2001), de tetO1 contendo promotor induzido por anidrotetraciclina (DONG *et al.*, 2012). Para futuras aplicações genéticas que requerem expressão transitória de genes ou controle estrito de níveis de

proteína intracelular, particularmente para processos envolvendo produtos de genes tóxicos ou letais estes promotores serão essenciais.

2.4.1. Superexpressão de genes por plasmídeos

As aplicações da superexpressão de genes abrangem estratégias de expressão homóloga e heteróloga. Embora a superexpressão homóloga tenha como objetivo aumentar a atividade de um gene cromossômico através do aumento do número de cópias, as estratégias heterólogas são comumente utilizadas para produzir uma atividade não nativa à célula. Muitas estratégias de superexpressão de genes baseados em plasmídeos para clostrídios foram relatadas, a maioria das quais envolvendo *C. acetobutylicum*. Vários genes envolvidos no metabolismo fermentativo central desta bactéria foram superexpressados individualmente e em combinação, incluindo o da aldeído desidrogenase (*aad*), álcool desidrogenases (*adhE1*) (NAIR & PAPOUTSAKIS, 1994; SILLERS, AL-HINAI & PAPOUTSAKIS, 2009) e *adhE2* (SILLERS *et al.*, 2008), thiolase (*thl*) (SILLERS, AL-HINAI & PAPOUTSAKIS, 2009), operon acetato descarboxilase/fosfotransbutilase *adc-ptb* (MERMELSTEIN *et al.*, 1992).

Em contraste com as estratégias homólogas de superexpressão, a expressão heteróloga ou não-nativa em *Clostridium* é uma linha de pesquisa relativamente nova. Trabalhos relacionados à engenharia de *C. acetobutylicum* para a expressão dessas proteínas têm enfoque em componentes como: um complexo enzimático que degrada celulose (minicelulossoma) de *C. cellulolyticum* e *C. thermocellum* (CHANAL *et al.*, 2011; MINGARDON *et al.*, 2011; KOVÁCS *et al.*, 2013), a álcool desidrogenase primária/secundária (*adh/sadh*) de *C. beijerinckii* (LEE *et al.*, 2012)□, acetoína redutase para conversão de acetona em 2,3-butanodiol (SIEMERINK *et al.*, 2011)□. Uma série de hidrogenases procarióticas e eucarióticas também foram expressas de forma heteróloga em *C. acetobutylicum*, incluindo algumas originárias de algas (GIRBAL *et al.*, 2005).

2.4.2. Troca alélica acoplada (*Allelic-Coupled Exchange - ACE*)

A recombinação homóloga é uma ferramenta de edição genética comumente utilizada para micro-organismos. Em 2012, Heap e colaboradores, desenvolveram a técnica de troca alélica acoplada (*Allelic-Coupled Exchange* - ACE) para deleção de genes usando dupla recombinação e sem o uso de contrasseleção codificada por plasmídeo. Aqui, o evento desejado de recombinação ocorre pela presença de duas sequências homólogas, sendo uma, a região adjacente ao gene alvo do nocaute e a segunda sendo parte do próprio gene (Figura 9).

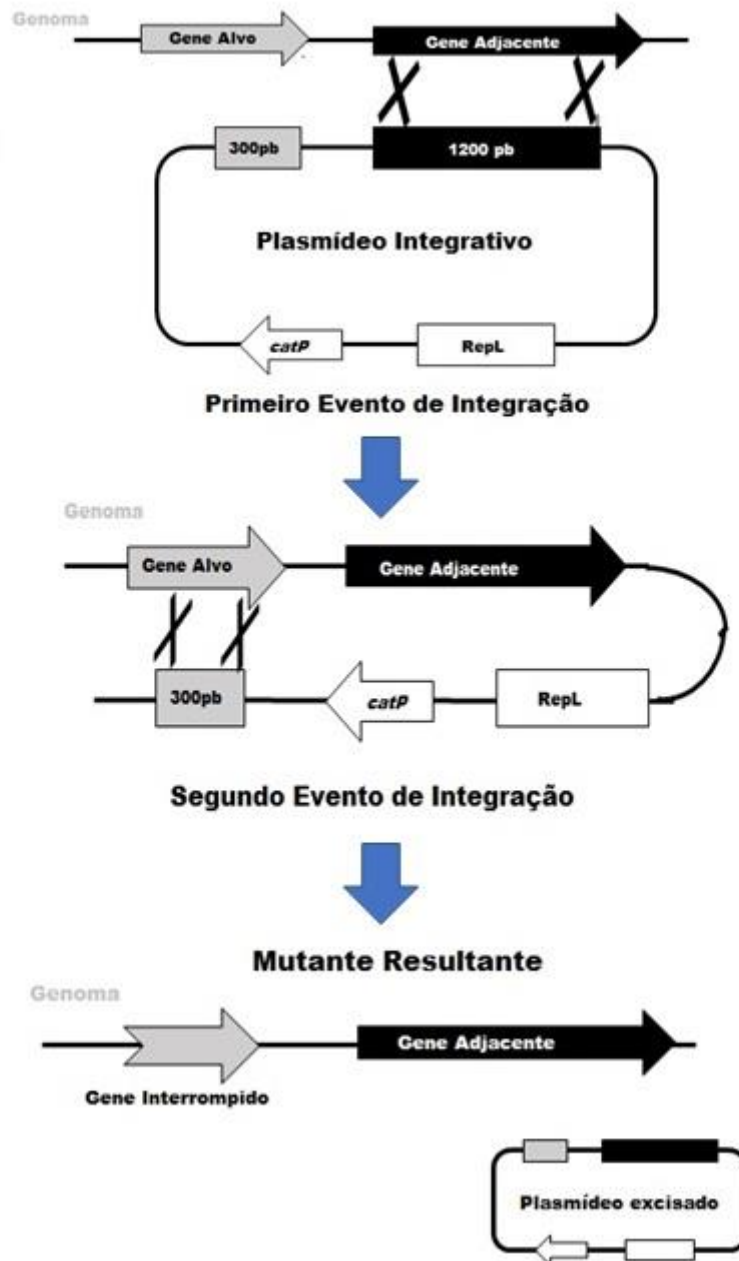


Figura 9 - Modificação genética mediada por troca alélica acoplada. Adaptado de Heap e colaboradores (2012). O primeiro evento de recombinação (integração do plasmídeo) é mediado pela região longa de homologia (1200pb) do Plasmídeo de Integração e o gene adjacente. Os clones obtidos no primeiro evento de integração são obtidos por seleção em meio contendo tianfenicol (*catP*). O segundo evento de recombinação (excisão do plasmídeo) é mediado pela região curta de homologia (300 pb) e o gene alvo. Clones recombinados são selecionados usando auxotrofia.

A sequência de eventos de integração pode ser controlada usando o comprimento das regiões de homologia, a primeira integração ocorre pela presença de uma grande sequência homóloga. Essa integração é selecionada pela presença de antibiótico no meio de cultura. Já a segunda ocorre com o fragmento menor, que resulta em nocaute do gene e excisão do plasmídeo, sendo a seleção feita por meio de uma característica fenotípica.

Para o funcionamento adequado dessa técnica, é necessário escolher para o nocaute, um gene cuja ausência de expressão, possa ser selecionada fenotipicamente e, portanto, acaba limitando a utilização desta técnica. A alternativa para esta limitação foi o desenvolvimento de um método baseado em contrasseleção, a fim de permitir a substituição da utilização de fenótipos relacionados ao nocaute dos genes. Foram necessários dois componentes para o método: um promotor induzível e um gene tóxico baseado em um mecanismo geral que seria aplicável aos clostrídios. Este promotor junto ao seu regulador pode ser induzido por lactose (*bgaR*; CPE0770) e foi identificado em *C. perfringens*. Para um gene tóxico, foi escolhido o gene *mazF* de *E. coli*, uma mRNA interferase, que exibe um mecanismo geral de toxicidade. O complexo MazE-MazF faz parte do sistema toxina-antitoxina em *E. coli* (Figura 10).

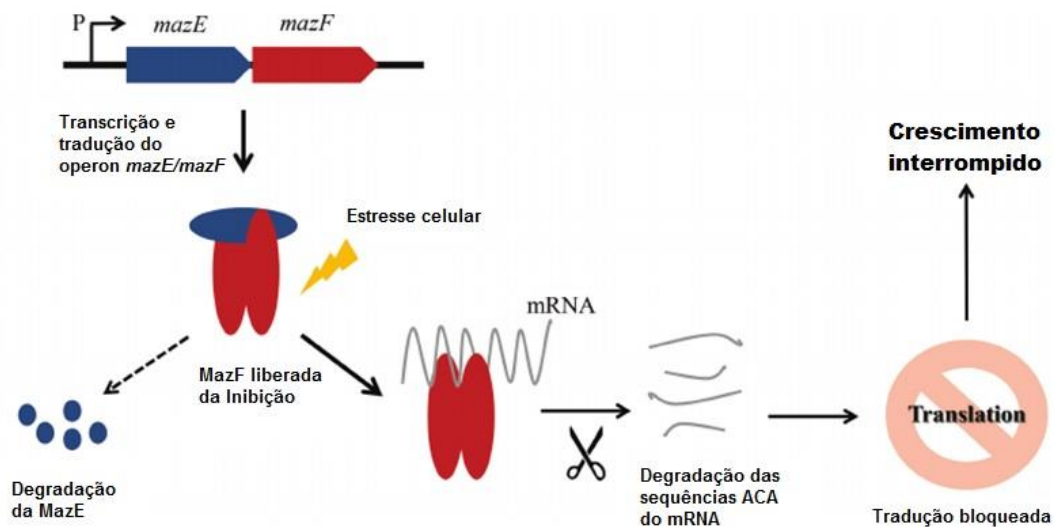


Figura 10 - Modo de ação da enzima MazF mRNA interferase. A MazF faz parte do sistema toxina-antitoxina de *E. coli* codificado pelo operon *mazEF*. Em condições normais, a antitoxina MazE liga-se e inibe a proteína MazF. Uma vez que as células são submetidas ao estresse, a proteína MazE é degradada por proteases celulares, e a proteína MazF deixa de ser reprimida. A MazF então, cliva mRNA em seqüências ACA, conduzindo assim à parada do crescimento, seguido pela morte celular. P, promotor (Adaptado de Al-Hinai, Fast & Papoutsakis, 2012).

A combinação da técnica da troca alélica acoplada, com o sistema de indução do gene *mazF* sob a ação do promotor induzido por lactose, foi descrita por Al-Hinai e colaboradores (2012) foi testada em *C. acetobutlicum* com sucesso. Este método não recorre à geração de cepas auxotróficas e não se limita a certos *locus* genômicos, ampliando consideravelmente o numero de genes a serem nocauteados.

2.4.3. Sistema CRISPR-Cas9

O sistema CRISPR (“Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat”) proporciona “imunidade” adaptativa a arqueas e bactérias, e funciona inserindo fragmentos de genomas exógenos em matrizes CRISPR e usando os transcritos resultantes como RNAs-guia para detectar e inativar os elementos genéticos. Sequências de DNA curtas localizadas entre as repetições CRISPR compõem um conjunto de alvos do CRISPR. Esta matriz é transcrita e processada dentro das sequências de repetição, produzindo fragmentos de RNA chamados CRISPR-RNA (crRNA). O crRNA então direciona a nuclease Cas para o local alvo, a presença de uma sequência específica protoespaçadora adjacente (*protospacer-adjacent motif* – PAM) leva a clivagem desta sequência. Nos sistemas do tipo II CRISPR/Cas, a Cas9 se liga ao crRNA e forma um complexo trans-ativado (tracrRNA) que é necessário para que a nuclease Cas9 seja funcional (CHYLINSKI, LE RHUN & CHARPENTIER, 2013; SOREK; LAWRENCE; WIEDENHEFT, 2013; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Após a clivagem pela Cas9, o *locus* alvo será reparado por uma das duas vias principais para edição de dano do DNA: a junção não-homóloga (*nonhomologous end joining* – NHEJ) ou a via homóloga de reparo direto (*homology-directed repair* – HDR), ambas as quais podem ser usadas para alcançar um desfecho de edição desejado. Na ausência de um modelo de reparo, as quebras na fita dupla são religadas através do processo NHEJ, o que deixa cicatrizes sob a forma de mutações. O NHEJ pode ser aproveitado como forma de mediar nocaute de genes (CONG *et al.*, 2013; RAN *et al.*, 2013).

O sistema homólogo de reparo direto (HDR) é o principal caminho para manipulações genéticas, pois pode ser usado para gerar modificações precisas e definidas em um *locus* alvo na presença de uma sequência homóloga para o reparo. Este reparo pode ser realizado utilizando construções convencionais de DNA de cadeia dupla com braços de homologia flanqueando a sequência de inserção ou oligonucleotídeos de DNA fita simples. Ao contrário do NHEJ, o HDR geralmente está ativo na divisão celular, e sua eficiência pode variar dependendo do tipo e fase da célula, bem como do *locus* genômico escolhido (SALEH-GOHARI & HELLEDAY, 2004; RAN *et al.*, 2013; SHMAKOV *et al.*, 2017).

O sistema CRISPR-Cas9 foi usado com sucesso como uma ferramenta de edição do genoma em procariotos e eucariotos (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Trabalhos recentes provaram que eles podem também ser usados em clostrídios, incluindo *C. beijerinckii* e *C. acetobutylicum* (WANG *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016). Para a realização dos trabalhos com CRISPR para *C. acetobutylicum*, uma versão mutante da proteína Cas9 foi desenvolvida. A Cas9-nickase (mutada no aminoácido D10A), foi guiada por um complexo de crRNA e tracrRNA condensados (chamado sgRNA) e sua mutação permitiu a clivagem de apenas uma das fitas de DNA (LI *et al.*, 2016). Em contraste, a clivagem da dupla fita (DSB) realizada pela Cas9 nativa, o corte de uma única fita realizado pela enzima mutada é mais fácil de ser reparado e, assim, melhora a eficiência desta técnica na manipulação do genoma deste clostrídio (DAVIS & MAIZELS, 2011; METZGER *et al.*, 2011).

2.5 Recuperação de solventes

A recuperação de solventes é essencial para minimizar o custo da produção dos bioálcoois. A destilação convencional é robusta e comprovada, mas necessita de um alto gasto de energia. Para cada tonelada de solvente, são necessárias aproximadamente 12 toneladas de vapor. A integração da recuperação de solventes com fermentação é uma opção de processo atraente. A remoção por gás (*gas-stripping*) foi usada para diminuir a inibição da produção e melhorar tanto o título do solvente obtido, como a produtividade. Outros métodos para a recuperação do solvente incluem extração líquido-líquido, adsorção, pervaporação, osmose reversa e separação aquosa em duas fases. Estes métodos foram amplamente revistos, mas poucos foram comprovados em escala ou comercializados (VANE, 2008; NI & SUN, 2009; EZEJI *et al.*, 2010; MARIANO *et al.*, 2011).

A remoção de gás, mostrada esquematicamente na figura 11, foi proposta como um método para recuperar álcoois a partir de meios de fermentação. A remoção de álcool da fermentação é feita transferindo o álcool para uma corrente de gás, a opção de usar o dióxido de carbono produzido durante a fermentação ou outro gás inerte como agente de remoção e a capacidade de operar nas temperaturas do fermentador torna esta técnica a mais eficiente para remoção. O princípio de funcionamento é geralmente o de um contato de gás-líquido em contracorrente. A proporção de álcool para água na fase gasosa, em equilíbrio, é ditada por comportamento de divisão gás-líquido semelhante ao da destilação (GAPES, NIMCEVIC & FRIEDL, 1996; DÜRRE, 1998; MARIANO *et al.*, 2011).

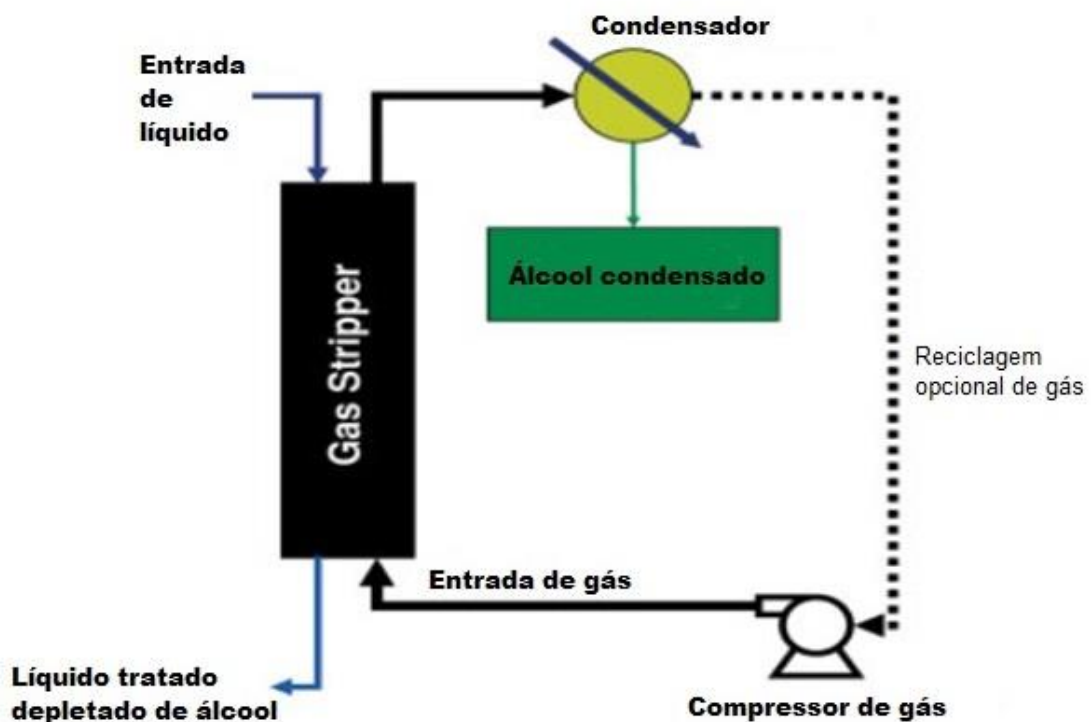


Figura 11 - Esquema da metodologia de remoção por gas-stripping. Extraído de Mariano *et al.*, 2011.

Na extração líquido-líquido, o meio de fermentação é colocado em contato por transferência de massa com um líquido de extração e os compostos são transferidos do meio para o extrator. Esse contato pode ser direto, por meio de um dispositivo de mistura ou contato com coluna embalada ou por meio indireto, usando uma membrana porosa e não molhada para separar os dois líquidos. O último é às vezes referido como "perstração". Para reutilizar o extrator, os compostos absorvidos devem ser removidos em

uma unidade de regeneração. A extração de líquido-líquido foi estudada tanto para o etanol como para fermentações com butanol. Os extratores mais comumente estudados incluem álcoois, alcanos ou ésteres de cadeia longa linear e ramificada; ácidos graxos; dióxido de carbono supercrítico; óleo de silicone; óleo mineral; e óleos vegetais, embora também tenham sido propostos materiais mais exóticos como líquidos iônicos e solventes fluorocarbonados (ENNIS *et al.*, 1986; GROOT; VAN DER LANS; LUYBEN, 1989; LEE *et al.*, 2012; TAYLOR *et al.*, 1997).

Na adsorção, o álcool é transferido preferencialmente do líquido de alimentação para um material adsorvente sólido. Embora as tecnologias de *gas-stripping* e extração líquido-líquido envolvam fases de vapor e extração líquida, respectivamente, muitos dos mesmos princípios se aplicam à adsorção. Em todos os três casos, o álcool deve ser recuperado do material de extração carregado. No entanto, o extrator é geralmente contido em uma coluna de contato embalada que serve como adsorvedor e dessorvedor (QURESHI *et al.*, 2005).

Ao contrário dos sistemas que envolvem extratores de gás/vapor e de fase líquida, o extrator sólido não é movido através do sistema. Assim, a adsorção geralmente envolve um processo cíclico de carga e descarga do adsorvente. Semelhante aos extratores líquidos, o adsorvente sólido exibe uma certa seletividade de adsorção em relação ao álcool e à água, bem como os coeficientes de distribuição de equilíbrio de sorção para ambos. É desejável um alto fator de separação e alto coeficiente de distribuição. Uma vez que o adsorvente é um sólido estável, tem pouca ou nenhuma solubilidade na água ou no álcool (CARTÓN *et al.*, 1998; QURESHI *et al.*, 2005).

A produção mundial de solventes é majoritariamente feita pela rota petroquímica utilizando como matéria-prima hidrocarbonetos. Apesar da rentabilidade do processo petroquímico, este é altamente impactante em termos ambientais e com baixas perspectivas para o futuro, em face às tendências de uso de matérias-primas que causem impactos reduzidos. Logo, as rotas de produção por processos petroquímicos tendem a ser substituídas no futuro (GARCÍA *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de ferramentas tecnológicas aprimoradas que permita a produção destes compostos por rota biotecnológica terá impactos ambientais e econômicos significativos para o Brasil. O conjunto de solventes ABE, ou seja, acetona-butanol-etanol tem um caráter estratégico para a estrutura agroindustrial brasileira, pois suas cadeias produtiva e logística são compatíveis com as do setor sucroalcooleiro e, com

necessidade de poucas adaptações, esse conjunto de solventes pode fazer parte do portfólio de produtos manufaturados pelo setor.

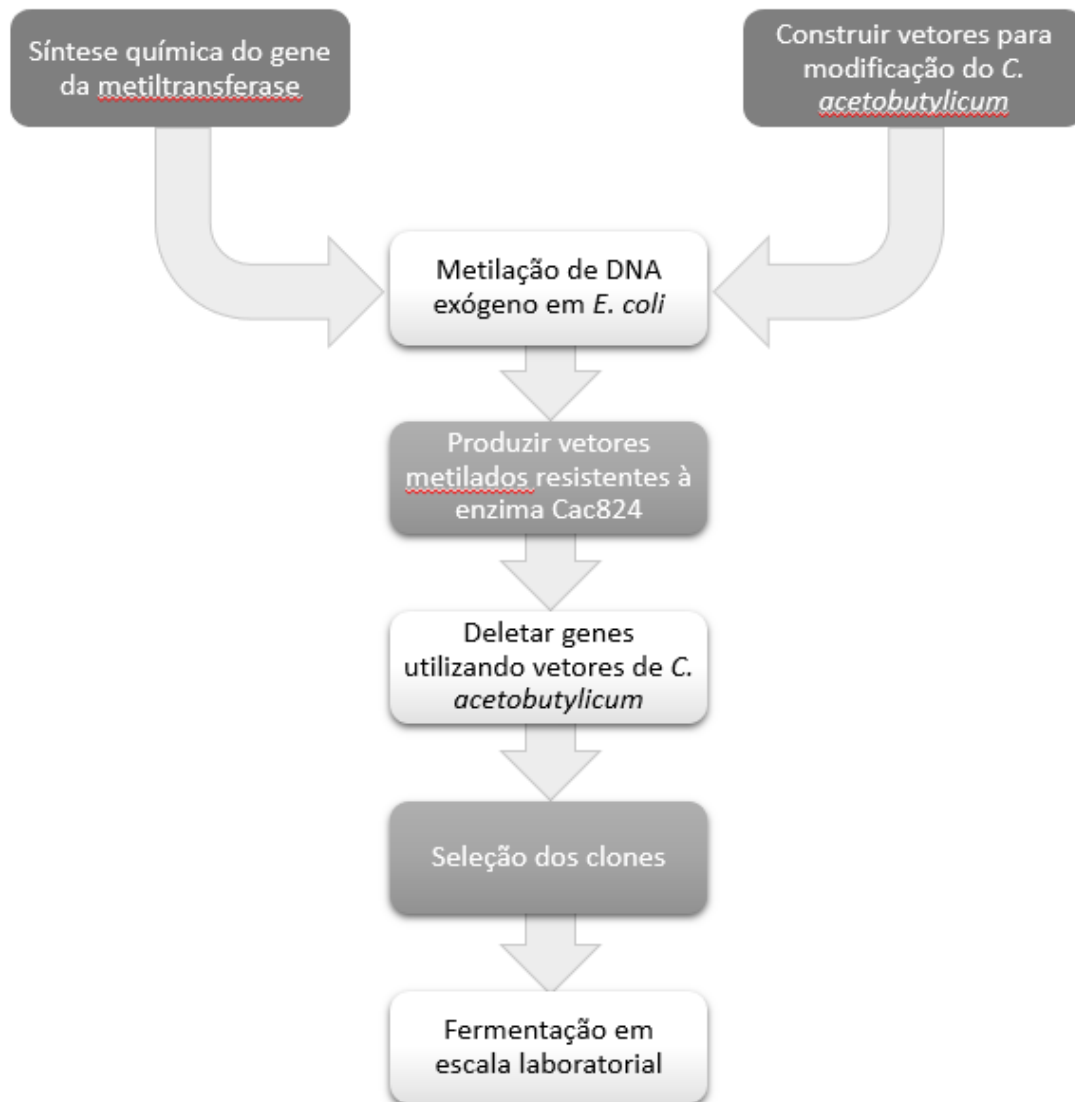
3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi realizar modificações genéticas em *Clostridium acetobutylicum* visando obter aumento da produção de bioálcoois.

3.1. Objetivos específicos

- ✓ Produzir metilação em plasmídeos, utilizando o gene da metiltransferase ($\phi 3T$) do fago $\phi 3TI$ de *B. subtilis*;
- ✓ Deletar o gene da via de formação do ácido acético (*pta*) de *C. acetobutylicum*;
- ✓ Deletar o gene da via de formação do ácido butírico (*buk*) de *C. acetobutylicum*;
- ✓ Expressar o gene da álcool-desidrogenase secundária (*sadh*) em *C. acetobutylicum*;
- ✓ Avaliar a produção de álcoois (butanol, isopropanol e etanol) na linhagem obtida.

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. - Material

5.1.1 Células bacterianas

- *Escherichia coli* XL10-gold (Agilent Technologies, EUA): *Tet^r Δ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR- mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*
- *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen, EUA): *F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ⁻*
- *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen, EUA): *F⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1*
- *Clostridium acetobutylicum* DSM792 (DSMZ, Alemanha), doada pela Professora Dr. Cláudia Lareo da Universidad de la República Uruguay.

5.1.2 Meios de cultura

Meio Luria-Bertani – LB

<i>Extrato de levedura</i>	0,5% (p/v)
<i>Peptona</i>	1% (p/v)
<i>NaCl</i>	1% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2. Para o meio sólido foi adicionado ágar 2% (p/v)

Meio YTG

<i>Triptona</i>	3,2% (p/v)
<i>Extrato de levedura</i>	2% (p/v)
<i>NaCl</i>	0.8% (p/v)

Glicose 1% (p/v)

Para o meio sólido foi adicionado ágar 2% (p/v)

MM (Meio Mínimo)

Solução de sais M9 10x 1% (p/v)

Adenina-HCl 5 mM

Solução de aminoácidos 3% (p/v)

MgSO₄, 10 mM

Tiamina 10% (p/v)

ZnSO₄ 10 mM

CaCl₂, 100 mM

Uracila, 20 mM

Histidina 0.1% (p/v)

Para o meio sólido foi adicionado ágar 2% (p/v)

Meio CGM (*Clostridium* Groth Medium)

KH₂PO₄ 5,5 mM

K₂HPO₄ 4 mM

MgSO₄·H₂O 3 mM

MnSO₄·H₂O 0,6 M

FeSO₄·7H₂O 0,6 M

NaCl 0,2 M

Asparagina 0,15 M

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

$(NH_4)_2SO_4$ 0,15 M

Glicose 0,5% (p/v)

Para o meio sólido foi adicionado ágar 2% (p/v)

Para os meios mínimos e os meios complexos tamponados foram feitas soluções estoque de todos os reagentes e misturadas assepticamente ao momento de preparar as placas. As soluções de glicose 10X, a solução de glicerol 10X, a solução de fosfato de potássio 1 M pH 6,0 e a solução de ágar 2% (p/v) foram autoclavadas separadamente.

5.1.3 Soluções

Antibióticos

- Solução de ampicilina (1000X)

Ampicilina 100 mg/mL

Dissolvida em água milliQ e esterilizada por filtração

- Solução de tetraciclina (1000X)

Tetraciclina 5 mg/mL

Dissolvida em água milliQ e esterilizada por filtração

- Solução de Tianfenicol (1000X)

Tianfenicol 15 mg/mL

Dissolvida em água milli Q e esterilizada por filtração

- Solução de Fase móvel (HPLC)

H_2SO_4 0.005N

Dissolvida em água milli Q

Soluções para células bacterianas competentes

- Tampão de transformação I

RbCl 12 g/L

MnCl₂·4H₂O 9,9 g/L

Acetato de potássio 0,03 M

CaCl₂·2H₂O 1,5 g/L

Glicerol 150 g/L

Uma solução estoque de acetato de potássio 1 M foi preparada e seu pH ajustado para 7,5 com ácido acético glacial. A solução foi esterilizada por filtração. O pH do tampão de transformação foi ajustado para 5,8 com ácido acético 0,2 M e a solução foi esterilizada por filtração.

- Tampão de transformação II

MOPS 0,02 M

RbCl 1,2 g/L

CaCl₂ 11 g/L

Glicerol 150 g/L

Uma solução estoque de MOPS 1 M foi preparada e seu pH ajustado para 6,8 com NaOH. A solução foi esterilizada por filtração. O pH do tampão de transformação foi ajustado para 6,8 com NaOH e a solução foi esterilizada por filtração.

Soluções para preparação de DNA plasmidial (miniprep)

- Solução I

Tris-HCl pH 8,0 25 mM

EDTA pH 8,0 *10 mM*

- Solução II

NaOH *0,2 M*

SDS *1% (p/v)*

Solução preparada no momento de uso.

- Solução III

Acetato de sódio *3 M*

Ácido acético *2 M*

O pH foi ajustado para 5,0.

Soluções para eletroforese em gel de agarose

- Brometo de Etídeo

EtBr *10 mg/mL*

- Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X

Tris *2 M*

Ácido acético *1 M*

EDTA pH 8,0 *0,05 M*

- Tampão de amostra

TAE 20X *50% (p/v)*

Glicerol *30% (v/v)*

Azul de bromofenol *0,25 (p/v)*

5.1.4 Kits

- Qiagen Plasmid Maxi kit (Qiagen): purificação de plasmídeos em grande escala.

- In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech): clonagem de fragmentos por recombinação homóloga.
- Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega): purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose e purificação de produtos de PCR.

5.1.5 Marcadores de massa molecular para DNA

- 1 kb DNA Ladder, 500-10.000 pb (New England Biolabs).
- O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder 75-20.000 pb (Thermo Scientific).

5.1.6 Enzimas de restrição

A tabela 1 apresenta as enzimas de restrição usadas neste trabalho indicando o sítio de clivagem, assim como a temperatura de incubação e o tampão recomendado para cada enzima.

Tabela 1. Enzimas de restrição usadas

<i>Enzima</i>	<i>Sítio de clivagem</i>	<i>Tampão</i>	<i>Temperatura de incubação</i>
BamHI	G ⁺ GATCC	NEBuffer 3.1	37 °C
NotI	GC ⁺ GGCCGC	NEBuffer 3.1	37 °C
XhoI	C ⁺ TCGAG	NEBuffer 3.1	37 °C
EcoRI	G ⁺ AATTC	NEBuffer 2.1	37 °C
EcoRV	GAT ⁺ ATC	NEBuffer 3.1	37 °C
Fnu4HI	GC ⁺ NGC	CutSmart®Buffer	37 °C

5.2 Métodos

5.2.1 Cultivo de micro-organismos

A cepa do *Clostridium acetobutylicum* DSM792 foi doada pela Prof. Claudia Lareo da Universidad de la República Uruguay e foi mantido em meio líquido em frasco de cultivo de 50mL foi adicionado nitrogênio gasoso (N₂) para manutenção da condição anaeróbia, fechado com tampa butírica, selados com lacre de alumínio e a incubação do meio sólido foi feito em câmara de anaerobiose (Forma 1025/1029 Anaerobic Chamber – Thermo Scientific) com a seguinte atmosfera 85% de nitrogênio, 5% de hidrogênio e 10% de dióxido de carbono. Os inóculos foram realizados a partir da injeção de 1% do estoque mantido a 4 °C em meio líquido apropriado e incubados em *shaker* a 37 °C por 48 h.

5.2.2 Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico

A *E. coli* DH5 α , DH10B e XL10-Gold foram semeadas em placa de Petri contendo meio LB ágar a partir de estoque armazenado a -80 °C e incubada a 37 °C por 16 h. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SOB em frasco Erlenmeyer de 125 mL e incubada a 37 °C por 16 h, com agitação de 200 rpm. Um mililitro desse pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio SOB fresco, incubando a 37 °C até atingir uma DO₆₀₀ de 0,3.

Após atingir a DO₆₀₀ desejada, a cultura foi então resfriada por 15 min em banho de gelo e as células foram centrifugadas a 3000 x g por 5 min a 4 °C. O sedimento de células foi ressuspenso em 32 mL de tampão de transformação I e incubado no gelo por mais 15 min. Foi feita uma nova centrifugação, nas mesmas condições, e as células foram ressuspenso em 4 mL de tampão de transformação II. O conteúdo foi dividido em alíquotas de 100 μ L e armazenado a -80 °C.

5.2.3 Transformação bacteriana – choque térmico

Uma alíquota de células competentes foi retirada do armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelada em gelo. Foram adicionados $10\text{ }\mu\text{L}$ do sistema de ligação às células e foi feita a incubação em gelo por 30 min. O choque térmico foi feito a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 s, seguido de 2 min em gelo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB e o sistema foi incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h. As células transformadas foram semeadas em meio LB ágar contendo antibiótico ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ampicilina ou $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ tetraciclina).

5.2.4 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala

A extração de DNA plasmidial de *E. coli* foi feita de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001), com adaptações. Uma colônia isolada da placa de transformantes foi inoculada em 5 mL de meio LB com o antibiótico adequado e este foi inculado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 h sob agitação. As células de 3 mL de cultura foram coletadas por centrifugação a $10000\text{ } \times g$ por 2 min e o precipitado foi ressuspendido em 200 μL de solução I. Foram adicionados 360 μL de solução II (recém-preparada) para provocar a lise das células, e a amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 min.

Posteriormente foram adicionados 300 μL de solução III gelada e a mistura foi incubada por 5 min em gelo. A amostra foi centrifugada a $10000\text{ } \times g$ por 5 min e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, centrifugando novamente caso o sobrenadante não estivesse límpido. O sobrenadante foi adicionado a 750 μL de isopropanol, homogeneizado por inversão e centrifugado a $10000\text{ } \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200 μL de solução I.

Foram adicionados 110 μL de acetato de amônio 7,5 M e a amostra foi homogeneizada em agitador do tipo vórtice. Em seguida, a amostra foi centrifugada a $10000\text{ } \times g$ por 10 min o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e precipitado através da adição de 750 μL de etanol 100% gelado. Seguiu-se uma centrifugação a $10000\text{ } \times g$ por 5 min, o descarte do sobrenadante e uma lavagem com 500 μL de etanol 70% gelado. Foi feita uma última centrifugação a $10000\text{ } \times g$ por 2 min, o sobrenadante descartado e o precipitado foi então seco em um concentrador a vácuo. O precipitado foi então ressuspendido em 50 μL de água milliQ contendo RNase A ($20\text{ }\mu\text{g/mL}$) e incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. O DNA foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.5 Preparação de DNA plasmidial em grande escala

Para a extração de plasmídeos bacterianos em grande escala foi utilizado o kit Qiagen Plasmid Midi and Maxi (Qiagen) e as orientações do fabricante foram seguidas.

5.2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR):

Para as reações de PCR foram utilizadas as polimerases Phusion e Taq DNA polimerase (Thermo Scientific), sendo empregadas as recomendações do fabricante. Para o anelamento dos primers, foi utilizada a T_m fornecida pelo fabricante destes. Em todas as reações, a quantidade de DNA molde utilizada foi inferior a 10 ng.

5.2.7 Digestão de DNA com enzimas de restrição

Todas as digestões de DNA foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante das enzimas. De acordo com a quantidade de DNA a ser digerido, a quantidade de enzima foi calculada, não ultrapassando um volume maior que 10% do volume total da reação. Todas as reações foram incubadas por 2 h na temperatura adequada para cada enzima.

5.2.8 Análise de DNA por eletroforese

A análise de DNA por eletroforese foi feita de acordo com Sambrook e Russel (2001), com adaptações. O gel foi feito utilizando tampão TAE 1X com uma concentração de 1% de agarose e 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a uma diferença de potencial para provocar a migração e separação dos fragmentos de DNA. Como o brometo de etídeo foi utilizado como corante, a visualização foi feita com a exposição do gel à luz ultravioleta.

5.2.9 Precipitação de DNA:

Após a digestão do DNA com enzimas de restrição, para retirar sais e enzimas as amostras foram precipitadas adicionando acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol 100% gelado. Foi realizada uma incubação a -20 °C por 16 h, e então as amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado novamente a 10000 x g por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em um concentrador a vácuo e ressuscitado em volume adequado de água milliQ.

5.2.10 Preparo das células para eletroporação:

Foi adicionado ao meio CGM, 2 mL de uma cultura estoque mantida a 4°C, e posteriormente incubada a 37 °C até atingir a DO₆₀₀ 0,6. A preparação do inóculo foi feita com a adição de 10% do pré-inóculo a 50 mL de meio CGM e incubada a 37 °C até atingir a DO₆₀₀ 1,2. O cultivo foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 6000 g por 15 min, as células coletadas foram lavadas duas vezes e ressuscitadas em 1,8 mL de uma solução de NaH₂PO₄ 5 mM e glicose 270 mM. A mistura foi dividida em duas cubetas de 2 mm e incubadas no gelo por 5 min, após os 2 primeiros minutos o plasmídeo (500 ng) foi adicionado.

Foram também utilizados meios mínimos e YTG para o cultivo das células em inóculos, para testar a alteração no tempo de crescimento dos clostrídios. Considerando os mesmos parâmetros para incubação e ressuspensão de células.

5.2.11 Eletroporação

Para *C. acetobutylicum* as condições de eletroporação foram 2000 V, 25 µF, 600 Ω em 6 ms. A cubeta utilizada foi de 2 mm e após o choque as amostras eletroporadas foram injetadas em meio CGM incubado por 24 h a 37 °C. As células foram semeadas em placas de meio CGM contendo tianfenicol (15 µg/mL) e incubadas a 37 °C em câmara anaeróbica (MERMELSTEIN; PAPOUTSAKIS, 1993).

Também foram testadas as seguintes condições para eletroporação, considerando protocolos descritos para diferentes espécies de *Clostridium* (tabela 2):

Tabela 2. Condições de eletroporação testadas em C. acetobutylicum.

Espécie	Voltagem	Capacitância	Resistência	Referência
<i>C. acetobutylicum</i>	2.0 kV	25 μ F	∞	(HEAP <i>et al.</i> , 2007)
<i>C. pasteurianum</i>	1.8 kV	25 μ F	∞	(PYNE <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. thermocellum</i>	1.9 kV	32 μ F	∞	(OLSON <i>et al.</i> , 2010)

Estes testes foram realizados para conseguir adaptar o sistema de eletroporação para anaeróbicos fora câmara anaeróbica. Sendo os parâmetros descritos por Pyne e colaboradores (2013), a que obteve maior eficiência.

5.2.12 Contrasseleção

As colônias crescidas em meio contendo tianfenicol foram repicadas para o meio mínimo contendo fluoracetato de sódio, cuja metabolização é tóxica para as bactérias que não tiverem o gene *pta* interrompido. Após a incubação a 37 °C por 72 h os clones obtidos foram selecionados para extração do DNA genômico e posterior confirmação do nocaute por PCR.

Para a interrupção do gene *buk*, a primeira seleção também ocorre em meio contendo tianfenicol, porém a contrasseleção foi realizada em meio contendo lactose. As colônias capazes de sobreviver em meio com lactose após a incubação a 37 °C por 72 h foram selecionados para extração do DNA genômico e posterior confirmação do nocaute por PCR.

5.2.13 Extração de DNA total de bactéria

A extração de DNA total de *E. coli* foi realizada com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), para as colônias crescidas nos meios citados, de acordo com as orientações do fabricante.

5.2.14 Iniciadores

Os iniciadores utilizados nesse trabalho estão listados na tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores utilizados neste trabalho.

Iniciadores	Sequencia (5'-3')	Utilização em:
ptaF	AGCAGAGCTTGTTCTTGTAGGT	<i>C. acetobutylicum</i>
ptaR	AGCTTGTACCCAATGTTTCCTGT	<i>C. acetobutylicum</i>
ackR	ACGCATATCGCTGCTTATTCCA	<i>C. acetobutylicum</i>
bukF	TCCTGGCTCGACCTCAACTA	<i>C. acetobutylicum</i>
bukR	GTTGTACGCAATTCCGCCTG	<i>C. acetobutylicum</i>
bukGF	GTAAGGGATCCAGGTCAGCATGC	<i>C. acetobutylicum</i>

5.2.15 Cromatografia (HPLC)

A concentração de ácidos orgânicos e solventes foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) equipada com detector de índice de

refração e detector de luz ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda, 210nm e 280nm (Shimadzu Co. Kioto, Japan série LC 20A). As amostras foram cultivadas em frascos de vidro contendo 30mL de meio YTG por 96h e foi retirado 1mL de cada nos seguintes tempos: 24h, 48h, 72h e 96h. As alíquotas obtidas foram primeiro centrifugadas a 4.000 x g durante 2 minutos e os sobrenadantes foram filtrados (Millex-HV, membrana PVDF, 0,2 µm de tamanho de poro, 13 mm de diâmetro - Millipore) para posterior análise.

A coluna analítica utilizada foi a ROA – Ácidos Orgânicos (Rezex Phenomenex - 300Å, 300 x 7.8 mm). A fase móvel foi H₂SO₄ 0.005N em água ultrapura e as condições para corrida foram: fluxo da fase móvel de 0,5 ml/min, temperatura da coluna 30°C, volume de injeção de amostra de 20 µL (TSUEY *et al.*, 2006). Os padrões de comparação para o tempo de retenção estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Padrões utilizados no HPLC

Padrão	Tempo de Retenção (min)	Concentração
Ácido Acético	19.886	5g/L
Ácido Butírico	28.552	5g/L
Acetona	28.552	5g/L
Etanol	25.574	5g/L
Butanol	44.877	5g/L
Isopropanol	27.477	5g/L
Glicose	12.278	1g/L

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Construção de vetores para metilação de DNA

A fim de produzir vetores para a modificação genética de *C. acetobutylicum*, capazes de superar seu sistema de restrição específico, foi desenvolvida uma metodologia cuja função é realizar a metilação do DNA, antes da transformação destes nos microorganismos alvo. Foi usado um vetor episomal comercial para a construção desse plasmídeo, o pACYC184 contendo cassete de resistência a tetraciclina e origem de replicação p15A. A síntese dos genes da metilação foi realizada pelas empresas Epoch Biosciences (EUA) e IDT DNA (EUA).

6.1.1. Síntese química do gene da metiltransferase do fago $\phi 3TI$ de *B. subtilis*

Foi selecionada a para este propósito a metilase codificada pelo fago $\phi 3TI$ de *B. subtilis* ($\phi 3TI$ -MTP). A região do fago $\phi 3TI$ contendo o gene $\phi 3TI$ responsável pela produção da metiltransferase foi sintetizado na forma de um fragmento de 2.366 pb com sequência idêntica àquela descrita na literatura. O códon de iniciação atípico, TTG, foi mantido nessa construção e sítios de restrição para EcoRI foram adicionados às extremidades para confirmação dos tamanhos (Figura 12).

GAATTC TCGTAT T TGAAAA CGTAAAAGGGTTGATAACGAAGCGTCACCGTCTACATT CGACGC
 ACTTATCGAGAA GTTAAATGAAATAGGT TACGAGATTA GTTGGGAAGTAGTAAACCGGTGGGAT
 TACGGAGTAGCGCAGAAA CGTGAGC GAGTGT TATAGT TGGTGTGCGGAATGACCTCGGTTTTA
 AGTTCGATTTTC CGAATCCGTTAGAAAGCGAT TATCAGACGC GAGTAT TCGGGGATGTGATCGG
 AGATC TGCCAGAGGT CGGAGAA TACTTC TACGTTAATCGGGGGGTTGGGGTAAAGTGT TGGTG
 AAAAGTGT TTCGGA CTGGAAGATGTATCGCCGACTATAAAAAGT CAAAACGCAAATCTTCCTC
 CTGGTTATCCCGGACACCC TAAAGACGC CGATCAAATCTGCAACCGACCGATTAGCCAACAAAA
 GCGCCCGCCGT TTCACCGTTCGCGAATGTCTCGAATCCAATCTGCGCCAGACACTTACGTCC
 TGCCAGACGATA TTTCTT AACGGCGCAGTATCGGATTAGTCCGGTAACGGAATTGCTTCGCGTG
 TTGCGTGGTATA TCGGGCGGGCGTTGCGGATCAACTTT CATCTAACTGTAAGTAAATATGATAG
 ATAAGATGGTTGAAA TATTACATAAAAAGATCAATTTTATTTAGAGTAAAAA TAAATATATGGA
 GGTTGTTG TTGAGTAACTACGTGTAATGAGCCTTTTAGT GGAATTGGTGCATTTGAAGCTG
CATTAAGAAACA TAGCGTTGATTA TGAAGT GATTGGCTTTAGTGAAA TAGATAAATATGCAAT
CAAATCTTATTTGCAATT CATAAT GTAAGT GAAACAT TGAATGT TGGAGACATAAGTAAAGCT
AAGAAAGATAATATTCCATATT TGGATT TGTAAACAAGTGGATTT CCTTGT CCCACTTTT CAG
TAGCCGGCGGCC GTGATGGTAT GGAATA TAAGTGTAGCAATT GTTCGCACGAGCATTTAAT TAC
TTATGAGGATTA TAAGAAGGAGTCAAATGCC CGAAGTGTGAAGCTGTTTCTAAGGCTAAAGAT
GAACGGGGAACGCTCTTTT TGAACAGCTTT GTTAGCAGAA GAGAAGAAGCCGAAATTTGTGA
TATTAGAAAATG TAAAAGGGCTAAT TAA TAGTGGCAATGGACAAGTGT TAAGAATAAT TAGTGA
GACTATGAACAA TATAGGCTATAGGATT GACCTAGAGCTACTTAATTC AAAGTTTTTCAATGTT
CCACAGAATCGTGAACGGGTATACATAA TTGGCATTAGAGAA GATTTGGTTGAAAATGAACAAT
GGGTTGTAGTCAAGAAGCGAAA CGATGTTCTGAGTAAAGGTAAAAAGAGATTGCAAGAAATAAA
TATAAAGAGTTT TAA TTTTAAAATGGCCTTTACAAGACACTGT CACAAAAGAGGTTGAGAGAAAT
CTTGAGGATTTT GTTGATGAGAAGTATTACTTAAA TGAAGAAAAGACGAAGAAACTTGTGAGC
AACTAGGAACCGCAC CGCTACAAAAACAAGAAGTAAGGGAGCCGT TAA TGGTGGGACA CGTGGA
TTTAAAAGGTCACGATGCCATCAAAGAGTTTACTCGCCTGAAGGACTTTCACCGACATTA ACT
ACAAATGGGCGGCCGT CACAGAGAACCTAAAATCGCAGAAAAGCAGAAA GAAAGTAAAGGGCAGTGT
TAACGCCAGAAA GAGAAGAGAAAAGACAGAATGGAAGACGTTT TAAAGAAAACGGGAGAACCGGC
TTTCA CGGTAA TACAATTGATCGACATGGTGTAGCAATCGGAGAATA CCCAAAA TATAAAAT
AGAAAGCTCTCTCCATTAGAATGTTGGAGACTCCAAGCATTGATGACGAA GATTTGAAAAAG
CTTTTGCAGCAGGAA TAAGTAACTACAATTATACAAGCAAGCCGGTAATTCAATTACAGT TAG
TGTGCTTGAGTCTATATTT CAAGAA TTAATACATACATATGT TAA TAAAGAATCTGAATAAAT
TTGTC TTTTAAA CAAATGCAAAATAAGAGGATTGAGAGGTGAGGAAGATGGATAGTTACC CAG
AGTCTTTAAAAAGAGAGACAGAGGAGAT TAAAGAGCGTGT TAGGAATGAAATATCAAAGAAGA
CAGGAT TAAAGAAAT TGCAGAAACGACAGTTGAGTTTTT TGAATCAGAGGAGAAAAGACATAAA
TACTTTTCTGAAAGTTGCTGCAGCTATGGCGTATAACTTAAAGT GAGTTTTTCAAATCTTATTTAA
AAGGAGAGTGAA TATGCTAACTGATCAGAAAAAAT TGACTTGGTAAACGCTCTTAGGAATTC

Figura 12 - Sequência da região do fago $\phi 3TI$ de *B. subtilis* contendo o gene da metilase. Em vermelho, a região codante do gene $\phi 3TI$ -MTP. O códon de iniciação, TTG, está sublinhado e os sítios de EcoRI em azul.

A confirmação do tamanho da sequência foi feita digerindo-se os plasmídeos extraídos dos transformantes com EcoRI, onde pode-se observar a liberação de um fragmento de 2,3 kb correspondente ao gene $\phi 3TI$. O vetor resultante foi denominado pACYC- $\phi 3TI$ (Figura 13).

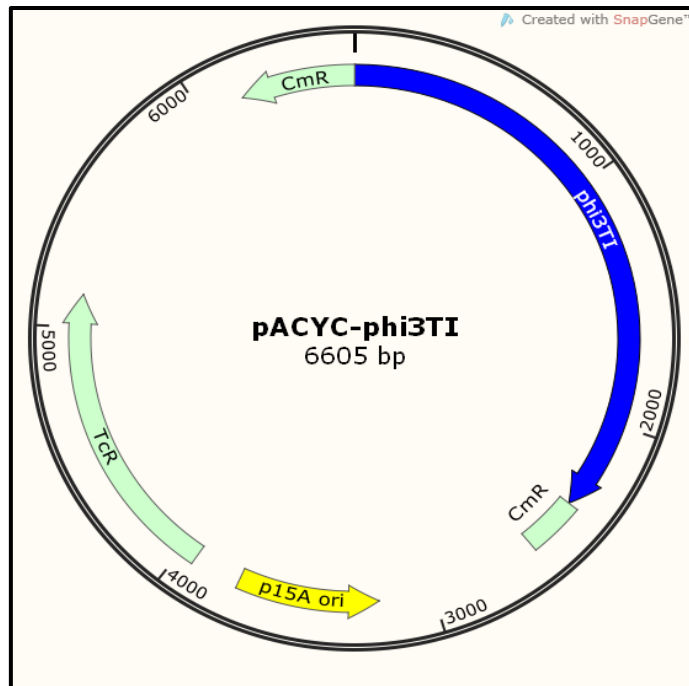


Figura 13 - Mapa físico do plasmídeo pACYC- ϕ 3TI. Este vetor é derivado do vetor pACYC184 contendo o gene ϕ 3TI-MTP (phi3T) clonado nos sítios de EcoRI. Gene de resistência a tetraciclina (*tetR*), origem de replicação (p15A), gene de resistência ao cloranfenicol (*CmR*).

Foi também realizado o teste da funcionalidade do gene, após a clonagem do plasmídeo em *E. coli*, usando a enzima Fnu4HI, um isoesquizômero de Cac824I, cuja ação no vetor sem metilação seria digestão em 43 sítios (Figura 14). A presença de digestão parcial do plasmídeo pACYC- ϕ 3TI após o tratamento com a enzima mostrou que o sistema não foi corretamente replicado pela *E. coli* DH5 α .

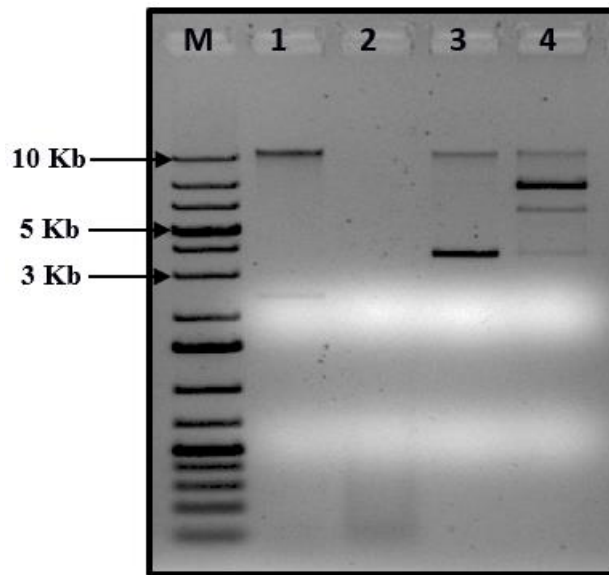


Figura 14 – Perfil de digestão dos vetores pACYC184 e pACYC- ϕ 3TI pela Fnu4HI. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). 1: pACYC184 intacto, 2: pACYC184 digerido com enzima Fnu4HI, 3: pACYC- ϕ 3TI intacto, 4: pACYC- ϕ 3TI digerido com a enzima Fnu4HI.

6.1.2. Síntese química do gene otimizado de DNA metiltransferase do fago ϕ 3T de *B. subtilis*

Além da abordagem de metilação descrita acima, considerando o funcionamento inadequado da versão inalterada do gene ϕ 3T, foi desenhada uma outra versão da metilase do fago ϕ 3T. Nessa construção, a região do fago ϕ 3T contendo a sequência foi clonado sob o controle do promotor do gene *lacI* e o sinal de terminação da transcrição do gene *rrnB* (rRNA), ambos de *E. coli* DH5 α . O gene ϕ 3TI foi também otimizado a partir da substituição do códon de iniciação atípico, TTG, pelo códon de iniciação canônico, ATG, e sintetizado na forma de um fragmento de 1535 pb. A sequência sintética foi clonada no sítio de EcoRI do vetor pACYC184. O gene otimizado foi denominado ϕ 3TIm e o vetor resultante foi denominado pACYC- ϕ 3TIm (Figura 15).

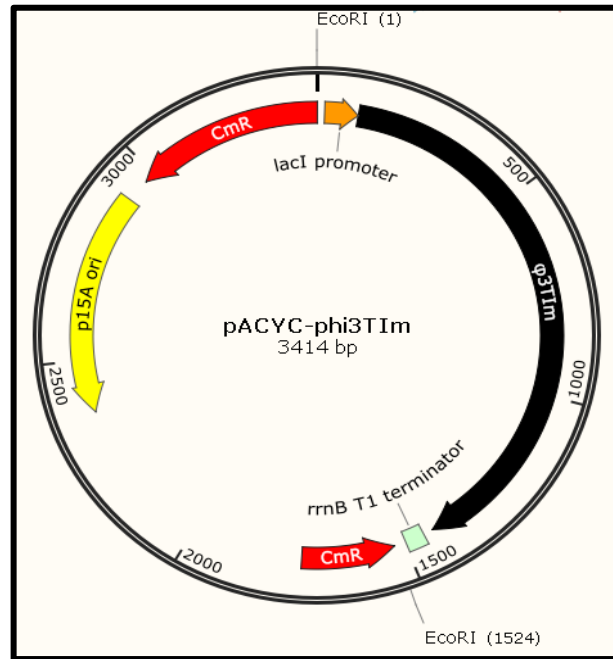


Figura 15 - Mapa físico do plasmídeo pACYC-φ3TIm. Este plasmídeo é derivado do vetor pACYC184 contendo o gene da metilase otimizado $\phi 3TIm$ clonado nos sítios de EcoRI. Gene de resistência a tetraciclina (*tetR*), origem de replicação (p15A), gene de resistência ao cloranfenicol (*CmR*).

Para confirmar a capacidade do gene otimizado em metilar DNA, foi realizado novamente o teste de resistência a digestão à pela enzima Fnu4HI, sendo a ausência de cortes indicador da atividade de gene. O vetor contendo o gene da metilase não foi digerido pela Fnu4HI conforme demonstrado na figura 16.

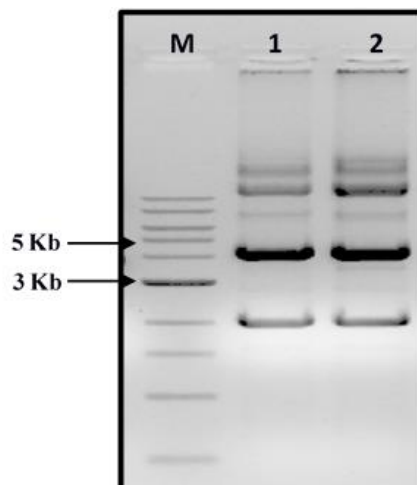


Figura 16 – Confirmação da ausência de digestão do vetor pACYC-φ3TIm pela Fnu4HI. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: 1 kb DNA Ladder (NEB). 1: pACYC-φ3TIm intacto, 2: pACYC-φ3TIm digerido com enzima Fnu4HI.

Algumas espécies de clostrídios, como *C. acetobutylicum*, possuem um sistema de restrição formado por endonucleases que clivam DNA sem metilação específica, impedindo a entrada de material genético exógeno e, inviabilizando as modificações genéticas para melhoria do desempenho metabólico. Para superar os efeitos desta barreira de restrição, várias estratégias foram relatadas na literatura: a modificação do vetor antes da transferência, nessa estratégia uma metiltransferase funcional é selecionada e utilizada para metilar o DNA antes da transformação (MERMELSTEIN & PAPOUTSAKI, 1993; YASUI *et al.*, 2009); utilização de plasmídeos contendo nenhum ou menos sítios de restrição reconhecidos pelos sistemas de restrição do hospedeiro (LEE *et al.*, 1992), o problema para esta estratégia é que a redução dos locais de restrição não pode ser universalmente aplicada a vetores de modificação; a inativação temporária dos sistemas de restrição sob algumas condições anormais (EDWARDS, HELM & MALOY, 1999), embora às vezes eficaz, a perda da função de restrição está sempre associada à perda da função de modificação, o que significa que o fenótipo será revertido quando as células se recuperaram de condições anormais e, por fim a inativação do sistema de restrição (DONG *et al.*, 2010; CROUX *et al.*, 2016), que é um método limpo e preferível, mas muitas vezes limitado pela disponibilidade das ferramentas genéticas.

A identificação da sequência de reconhecimento de uma enzima, permitiu a utilização de metodologias para proteger os plasmídeos que serão transformados, via metilação. E para proteção do DNA é necessário então, a metilação destas sequencias por uma metiltransferase específica, como a codificada pelo fago $\phi 3TI$ de *B. subtilis* - $\phi 3TI$ -MTP que metila a sequência 5'-GCNGC-3' (MERMELSTEIN & PAPOUTSAKI, 1993). A metilação do DNA pode ser realizada *in vivo* expressando a metiltransferase em estirpes de clonagem ou, *in vitro* se a metiltransferase estiver disponível comercialmente (JENNERT *et al.*, 2000).

A construção de um vetor para a metilação de plasmídeos *in vivo* descrita por Mermelstein e Papoutsaski (1993) é a metodologia mais utilizada para suplantar o sistema de restrição em *C. acetobutylicum*. Após a descoberta da enzima responsável pelo sistema de restrição neste micro-organismo, Cac824I, e o seu sítio de reconhecimento, a possibilidade de utilizar uma metiltransferase capaz modificar estes sítios mostrou-se útil para que sua manipulação genética fosse alcançada.

Após a determinação da sequência e síntese do gene codificador da metiltransferase ($\phi 3TI$), clonado no vetor pACYC184 e gerando plasmídeo pACYC- $\phi 3TI$, foi submetido à expressão na bactéria *E. coli*. A utilização deste hospedeiro traz várias vantagens como altos níveis de expressão do gene heterólogo, baixo custo, rápido crescimento e ausência de modificações pós-traducionais (TOLIA & JOSHUA-TOR, 2006). A ocorrência da digestão parcial no plasmídeo pACYC- $\phi 3TI$ submetido ao teste com enzima isoesquizomera da Cac824I, a Fnu4HI mostrou que expressão do gene $\phi 3TI$, em *E. coli* DH5 α não foi idealmente realizada.

A produção de proteínas heterólogas pode ser diminuída pelo uso de códons incomuns para o micro-organismo. Se o códon do gene a ser expresso difere significativamente da utilizada por *E. coli*, as concentrações dos tRNA para os codons menos utilizados são insuficientes para traduzir o RNA. O resultado do uso de códons raros pode incluir erros de tradução, como terminação, substituição de aminoácidos e possivelmente de leitura (KANE, 1995; BURGESS-BROWN *et al.*, 2008). Portanto, a manutenção do gene metiltransferase ($\phi 3TI$) oriundo de um fago, com códon de iniciação TTG poderia estar interferindo na expressão da metiltransferase e conseqüentemente na metilação do DNA. O resultado obtido, a digestão parcial do plasmídeo pACYC- $\phi 3TI$, foi diferente dos dados apresentados no trabalho de Mermelstein e Papoutsacki (1993).

Para a obtenção de um sistema de metilação capaz de proteger integralmente o plasmídeo a ser utilizado em *C. acetobutylicum* e, não só melhorar sua expressão em *E. coli* DH5 α , como também tornar possível a integração do gene neste micro-organismo, fazendo dele uma plataforma universal para a metilação plasmídeos, foi realizada a otimização do gene $\phi 3TI$. A padronização da expressão gênica com promotores, sinais de iniciação de tradução, terminadores de transcrição e marcadores selecionáveis, permitem uma combinação rápida e previsível da expressão de genes heterólogos. Para algumas aplicações, como na engenharia metabólica, são exigidos níveis ótimos de ação das enzimas para maximizar sua atividade.

A biologia sintética pode oferecer promotores e sítios de ligação ao ribossomo (RBS) capazes de gerar diferentes níveis de expressão genética para cada propósito (BOYLE E SILVER, 2012; MENG *et al.*, 2013; MARSCHALL, SAGMEISTER & HERWIG, 2017). A estratégia de otimização do gene por troca de códon usa como base o códon mais frequente do hospedeiro para todas as ocorrências de um determinado aminoácido na sequência otimizada (KANE, 1995; KIM & LEE, 2006).

Neste trabalho, a substituição do códon TTG pelo códon ATG permitiu que fossem obtidos melhores resultados, quando comparamos o tratamento do plasmídeo metilado pelo gene original e pelo gene otimizado com a enzima de restrição isoesquizomera a Cac824I, é possível verificar que não houve digestão no plasmídeo pACYC- $\phi 3TIm$. A maioria dos estudos relata exemplos de resultados favoráveis da otimização de códons (SPRINGER & SLIGAR, 1987; KANE, 1995; HU *et al.*, 1996; KIM & LEE, 2006). Porém, outros trabalhos discutem que os efeitos da otimização variam, com base na identidade, densidade e localização dos códons raros, e podem envolver efeitos complexos na estrutura e estabilidade do mRNA (STENSTRÖM *et al.*, 2006; BURGESS-BROWN *et al.*, 2008; BOËL *et al.*, 2016).

O gene sintético otimizado $\phi 3TIm$ obteve melhores resultados quando comparado ao gene original $\phi 3TI$. A resistência do vetor à digestão pela enzima Fnu4HI confirma a capacidade do gene em metilar DNA. As modificações realizadas melhoram a eficiência das transformações e a troca do promotor permitirá que ele seja integrado no genoma de uma *E. coli*. Sendo esta uma estratégia futura para continuidade deste trabalho, a construção de uma linhagem de *E. coli* contendo o gene $\phi 3TIm$ integrado no genoma permitindo o uso de qualquer vetor para ser metilado, independentemente da origem de replicação presente.

6.2. Construção dos vetores de integração para *Clostridium acetobutylicum*

Após a confirmação da criação de uma plataforma de metilação eficaz, foi possível iniciar o desenvolvimento das etapas diretamente relacionadas aos *C. acetobutylicum*. A utilização da técnica Allele-Coupled Exchanged (ACE), também conhecida como dupla recombinação homóloga norteou os experimentos para a modificação genética destes micro-organismos.

A construção dos vetores utilizados para a deleção dos genes alvo consideraram a sequência derivada do vetor pMTL-8000, um vetor modular desenvolvido por Heap e colaboradores (2012), cada cassete foi escolhido de acordo com os objetivos do trabalho, as regiões comuns para clonagem em *E. coli* como origem de replicação e marca de seleção correspondem a *colE1* e ampicilina, respectivamente. Para clostrídios, a origem de replicação RepL e a marca de seleção tianfenicol foram selecionadas. Além das

sequências citadas, também fazem parte do plasmídeo uma sequência composta por um gene adjacente ao alvo, cujo tamanho deve ser de aproximadamente 1200 pb e uma sequência menor correspondente ao gene que será nocauteado, cujo tamanho corresponde a 300 pb, e de um operon contendo o gene *mazF* sob o controle do promotor induzível por lactose. Um dos fatores mais importantes sobre essa técnica é a forma de seleção do segundo evento de recombinação, que corresponde excisão do plasmídeo do genoma. Portanto é necessário que o nocaute do gene traga algum fenótipo selecionável.

6.2.1. Construção do vetor para deleção do gene da Fosfotransacetilase (*pta*)

Para o nocaute do gene *pta* foi necessário o conhecimento da região genômica onde ele está inserido, principalmente dos genes subsequentes. Isto se deve a necessidade de proximidade das regiões em que ocorrerão as recombinações homólogas. A busca por essas informações, sobre genoma sequenciado de *C. acetobutylicum* (AE001437.1), no GeneBank mostrou que o gene subsequente ao de interesse era o gene da acetato-kinase (*ackA*), que continha 1200 pb necessários para que o primeiro evento de recombinação ocorra. A sequência relativa ao gene alvo e segundo evento de recombinação, foi selecionada na região mediana do gene *pta* e é composta por 300 pb, de forma que após a recombinação seria retirado 362 pb do gene. A sequência gerada foi desenhada conforme a figura 17.

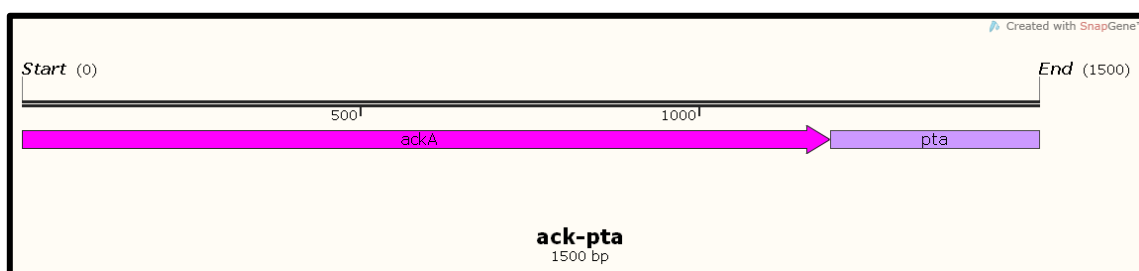


Figura 17 – Desenho esquemático do fragmento dos genes *pta-ackA*. Fragmento do gene *pta* em lilás (300 pb) e em rosa a sequência do gene *ackA* (1200pb).

A síntese das sequências descritas foi realizada pela empresa Epoch Biosciences (EUA) e o plasmídeo resultante foi denominado pMTL-*mazF-pta* (figura 18). A ausência de vetores que pudessem ser usados em clostrídios no laboratório, foi elemento decisivo

para a escolha de sintetizar toda a sequência descrita. Sendo assim, foi incluído sítios para enzima de restrição BamHI flanqueando o cassete dos genes *ack-pta*, para que o vetor pudesse ser reutilizado em outras abordagens.

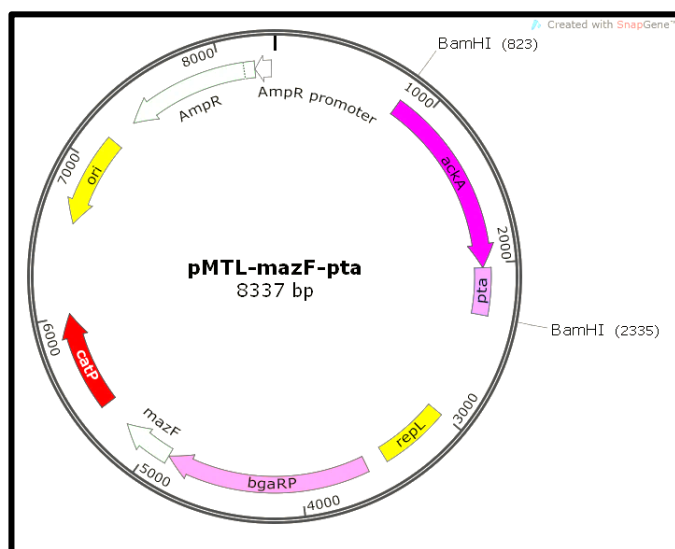


Figura 18 – Mapa físico do vetor de integração em *C. acetobutylicum* - pMTL-mazF-pta. ORI – origem de replicação de *E. coli*, *ackA* – gene da acetato quinase, *pta* – fragmento do gene da fosfotransacetilase, *repL* – proteína de replicação, *bgaRP* – promotor e regulador da β -galactosidase de *E. coli* modificados, *mazF* – interferase de *C. perfringens* e *catP* – resistência a tianfenicol, sítios para enzima de restrição BamHI.

6.2.2. Construção do vetor para deleção do gene da butirato quinase (*buk*)

A construção do vetor pMTL-mazF-pta, gerou uma ferramenta ideal para o nocaute de genes em *C. acetobutylicum*, utilizando a metodologia de dupla recombinação homóloga. A retirada da sequência dos genes *ack-pta* através da digestão pela enzima BamHI, gerou o vetor pMTL-mazF, no qual é possível colocar outras sequências de interesse para o nocaute dos genes nesse micro-organismo. A presença do gene *mazF*, codificador da toxina MazF, permite a deleção de genes, mesmo que não possuam fenótipo selecionável.

O segundo vetor de integração foi construído com base no vetor pMTL-mazF e o gene escolhido para o nocaute foi o gene da butirato quinase, associado a formação do butirato. O acesso ao genoma sequenciado de *C. acetobutylicum* (AE001437.1) permitiu a identificação do gene subsequente a ser utilizado no primeiro evento de recombinação. Entretanto, o gene da fosfotransbutirilase (*ptb*) não possuía 1200 pb conforme seria

necessário à estratégia. A alternativa encontrada foi adicionar parte da sequência do gene adjacente ao gene *ptb* completando o tamanho necessário para o primeiro evento de recombinação. Portanto, foram adicionados 300 pb do gene *cac3077* a sequência de 906 pb do gene *ptb*, formando junto a sequência de 300 pb do gene *buk* o cassete de nocaute (Figura 19), flanqueado por sítios de BamHI, que poderiam então ser clonados no vetor pMTL-mazF. Desta forma o plasmídeo para a deleção do gene *buk* foi clonado gerando o vetor pMTL-mazF-buk (Figura 20).

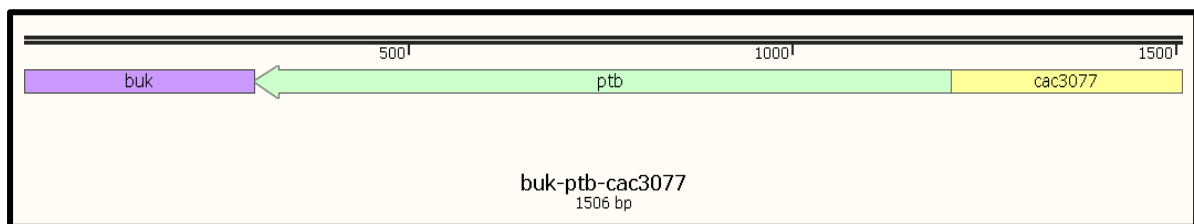


Figura 19 - Desenho esquemático do fragmento dos genes *buk-ptb-cac3077*. Em lilás, fragmento do gene *buk* (300 pb), em verde a sequência do gene *ptb* (906 pb), em amarelo fragmento do gene *cac3077* (300 pb).

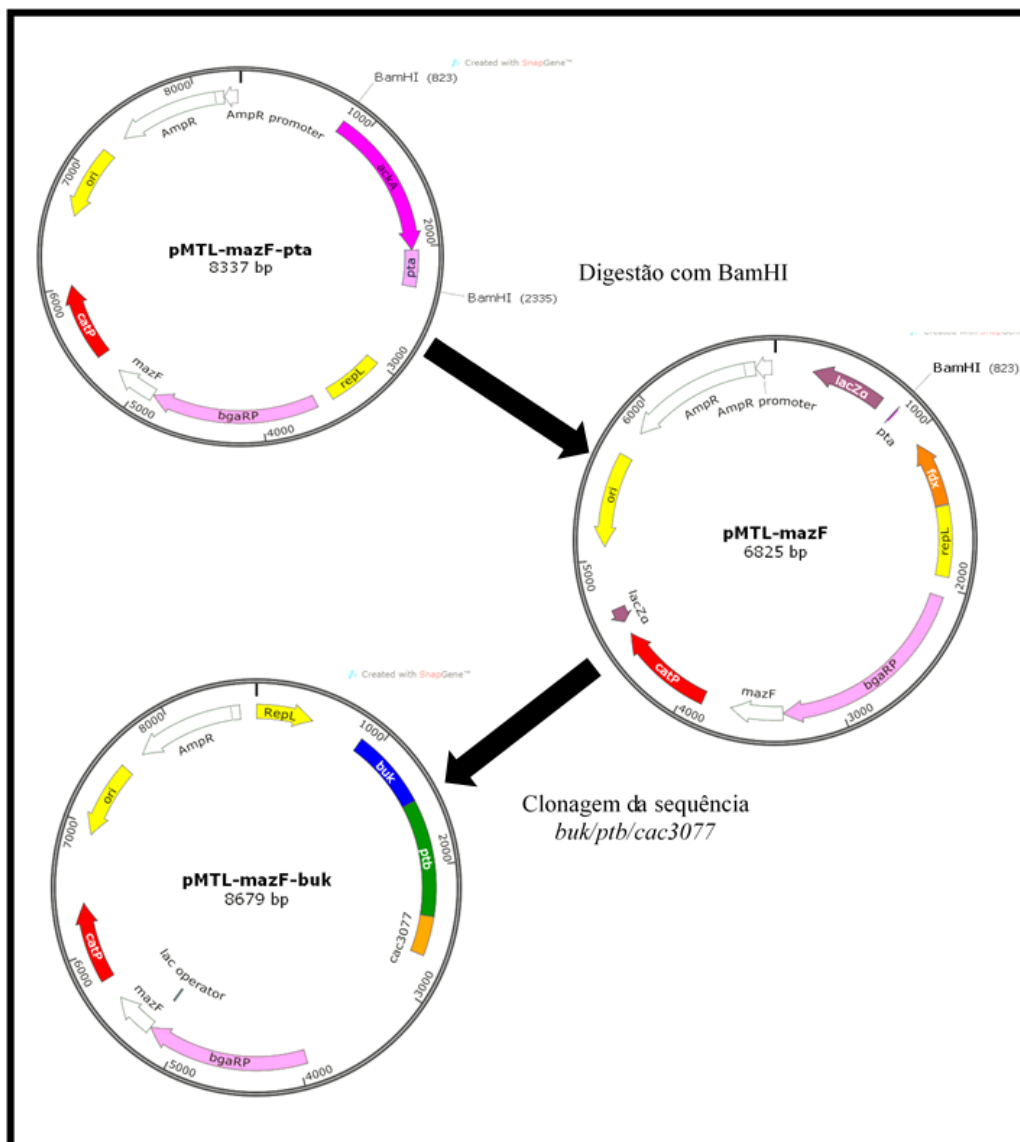


Figura 20 - Construção do vetor pMTL-mazF-buk. Digestão do plasmídeo pMTL-mazF-pta com a enzima BamHI, gerando o vetor pMTL-mazF. O fragmento *ptb-buk-cac*, com sítios para BamHI nas extremidades foi ligado ao vetor anterior. Gerando o vetor pMTL-mazF-buk.

Considerando a necessidade de metilação dos plasmídeos para a transformação em *C. acetobutylicum*, foi realizado um teste após a clonagem desses plasmídeos em *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo pACYC- ϕ 3TIm, para a confirmação da metilação e resistência ao corte realizado pela enzima de restrição Fnu4HI, cuja ação no vetor pMTL-mazF-pta sem metilação foi o corte em 31 sítios e no vetor pMTL-mazF-buk em 32 sítios, gerando os perfis da figura 21. Os plasmídeos clonados na *E. coli* contendo o vetor de metilação ficaram imune à digestão com Fnu4HI.

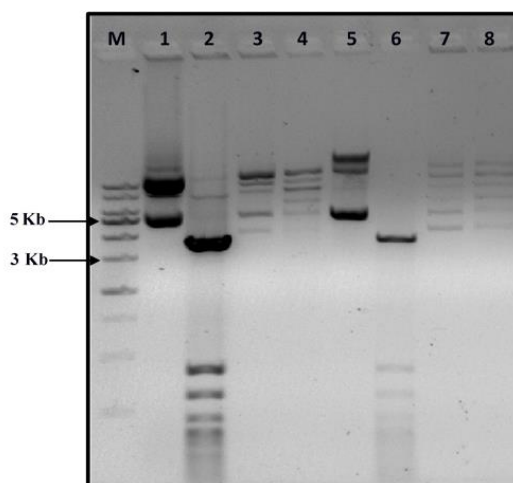


Figura 21 – Perfil de digestão dos vetores para clostrídio pela Fnu4HI. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: 1 kb DNA Ladder (NEB). 1: pMTL-mazF-pta intacto sem metilação, 2: pMTL-mazF-pta sem metilação digerido com enzima Fnu4HI, 3: pMTL-mazF-pta intacto com metilação, 4: pMTL-mazF-pta com metilação digerido com enzima Fnu4HI, 5: pMTL-mazF-buk intacto sem metilação, 6: pMTL-mazF-buk sem metilação digerido com enzima Fnu4HI, 7: pMTL-mazF-buk intacto com metilação, 8: pMTL-mazF-buk com metilação digerido com enzima Fnu4HI.

A engenharia metabólica baseada em modificações genéticas é uma ótima estratégia para o estudo do complexo metabolismo do gênero *Clostridium* spp., bem como para a construção de linhagens com fenótipos desejáveis. Várias ferramentas de engenharia genética para a manipulação de clostrídios foram desenvolvidas, no entanto, ainda existem muitas limitações para o uso eficiente dessas ferramentas (HEAP *et al.*, 2010; AL-HINAI *et al.*, 2012; JANG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013).

Estratégias que procuraram usar métodos baseados em recombinação para inativar genes de espécies como o *C. acetobutylicum* foram prejudicadas pela falta de marcadores de seleção positiva para uso e, portanto, ocorria a integração de todo o plasmídeo no gene alvo. Tais mutantes eram intrinsecamente instáveis, uma consequência da presença de regiões de DNA duplicadas, através das quais outros eventos recombinação homóloga levavam à excisão do plasmídeo integrado (GREEN *et al.*, 1996; NAIR *et al.*, 1998). A observação desses dados levou ao desenvolvimento de uma nova abordagem especializada na dupla recombinação homóloga, a troca alélica aclopada (Allele-Coupled Exchange – ACE), por Heap e colaboradores (2012).

Com base nesse método, foi realizada a construção dos vetores utilizados para o nocaute dos genes associados a via de formação de ácidos (acético e butírico) neste trabalho. Para essa construção foi preciso identificar a sequência do gene alvo e do gene diretamente adjacente, para que estas fossem sintetizadas em tamanhos específicos, isto

se deve a interferência do tamanho do fragmento no processo de integração homóloga, o uso de braços de homologia altamente assimétricos dita a ordem dos eventos de recombinação. Um braço de homologia longo dirige o primeiro evento de recombinação (integração de plasmídeo) e um braço de homologia muito mais curto dirige o segundo evento de recombinação (excisão de plasmídeo) (HEAP *et al.*, 2012; EHSAAN *et al.*, 2016).

Para a deleção do gene *pta* foi utilizada a seleção em fluoracetato, composto semelhante ao acetato, que ao ser metabolizado gera composto tóxico para a célula inibindo o crescimento (JUNELLE *et al.*; 1987). Para a deleção do gene *buk*, pela ausência de um composto para esta seleção, foi realizada pelo sistema da interferase (*mazF*) como descrito por Al-Hinai e colaboradores (2012). A obtenção de mutantes foi positiva para ambas as técnicas.

A redução da formação de subprodutos pode ser considerada como uma estratégia geral para a engenharia metabólica de cepas direcionadas a produção de biocombustíveis, e aplicável a quase todos os tipos de micro-organismos produtores (PYNE *et al.*, 2014). O *C. acetobutylicum* possui um complexo metabolismo fermentativo com a formação de variados produtos e subprodutos (DÜRRE, 2008; BOYLE & SILVER, 2012). A geração de diferentes nocautes de *C. acetobutylicum* foi motivada pela redução da formação de subprodutos para aumentar o fluxo de carbonos para formação de álcoois (GIRBAL *et al.*, 1995; DESAI *et al.*, 1999). Portanto, os genes associados a via de formação do acetato (*pta*) e do butirato (*buk*) foram selecionados para realização do nocaute.

6.3. Deleção do gene da Fosfotransacetilase (*pta*)

A estratégia para o nocaute do gene *pta* contou com a característica selecionável da ausência deste gene, ou seja, na presença do gene intacto a célula é capaz de metabolizar do fluoracetato de sódio, gerando compostos tóxicos à vida do micro-organismo. Entretanto, a ausência do gene funcional permite que ela não seja capaz de metabolizar o composto e sobreviva. Sendo assim, para selecionar o primeiro evento de recombinação o antibiótico tianfenicol foi utilizado e para o segundo evento de recombinação o fluoracetato de sódio (Sigma-Aldrich).

O processo realizado para a transformação da cepa de *C. acetobutylicum* visando a deleção de gene *pta* teve início com o cultivo do micro-organismo em meio YTG, por 24h a 37°C. Após esse período, foram coletadas as células, para a realização da eletrotransformação com o plasmídeo pMTL-mazF-pta. O período de recuperação foi de 24h para posterior seleção dos transformantes em meio contendo o antibiótico tianfenicol. O período de incubação das placas foi de 72h para a obtenção de transformantes (Figura 22). Este resultado indicou a possível primeira integração do plasmídeo ao genoma.

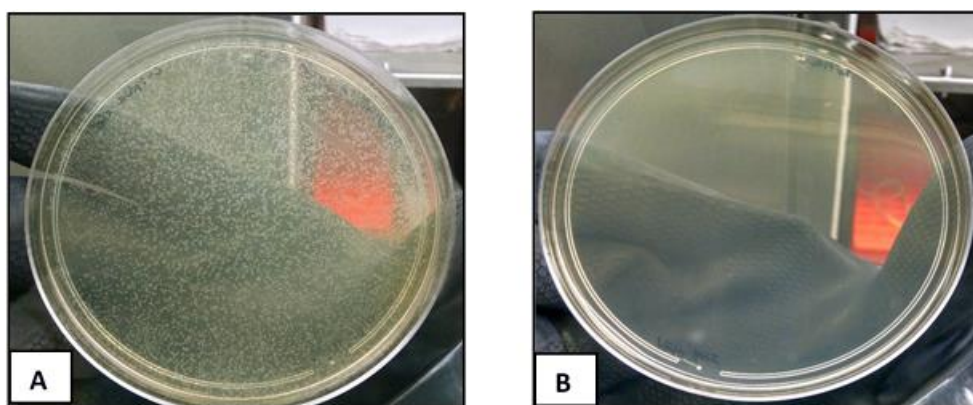


Figura 22 - Seleção da eletrotransformação de *C. acetobutylicum* com o vetor pMTL-mazF-pta. Placas contendo tianfenicol para seleção dos transformantes. *C. acetobutylicum* com pMTL-mazF-pta (A). Controle negativo (B), células que foram eletroporadas sem o plasmídeo e semeadas em meio com antibiótico.

Considerando este resultado, a segunda etapa do experimento foi realizada, com a transferência de 10 clones escolhidos aleatoriamente. Destes, apenas três apresentaram crescimento (Figura 23), e foram repicados para novo meio cultura, também contendo o fluoracetato de sódio. A partir deste segundo cultivo, as células foram transferidas para meio YTG, para posterior extração do DNA genômico para confirmação do nocaute.



Figura 23 - Seleção dos clones em meio contendo Fluoracetato de sódio. Clones que apresentaram crescimento no meio mínimo com o agente de seleção, fluoracetato de sódio.

Para confirmar a deleção foi realizada a amplificação por PCR utilizando os iniciadores *pta-F* e *ack-R* que se anelam na região correspondente ao início do gene *pta* e ao início do gene *ackA*, respectivamente. O resultado obtido mostrou a perda dos 362 pb do gene *pta* para os clones A1 e A2. O clone A3 apresentou amplificação em ambos os tamanhos mostrando que poderia haver células sem deleção presentes no meio (figura 24).

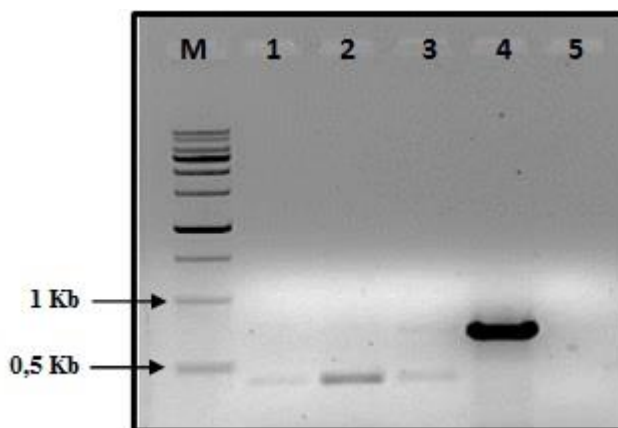


Figura 24 – Confirmação do nocaute do gene *pta*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: 1 kb DNA Ladder (NEB). 1: Clone A1, 2: Clone A2, 3: Clone A3, 4: Selvagem, 5: Controle negativo da reação.

Uma vez confirmado o nocaute do gene da fosfotransacetilase (*pta*), foi realizada a análise da produção do ácido acético pela cepa mutada. Desta forma seria possível avaliar a interferência dessa deleção não só na formação do acetato como também sua influência na produção de álcoois. Este teste foi realizado a partir do cultivo da cepa selvagem e do clone A2, que apresentou maior crescimento celular, em meio YTG por 48h, pois a partir desse período o micro-organismo passa a reabsorver o acetato presente no meio. Foram retiradas alíquotas dos meios para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O cromatograma apresentado na figura 25 revela uma expressiva redução na produção do acetato, muito embora não tenha havido eliminação completa da produção deste ácido a diminuição na produção indica a possibilidade de existirem outras rotas para sua expressão. Outro dado presente no cromatograma foi o aumento da produção de etanol pela cepa mutada quando comparada a selvagem, mostrando que a redução na formação de acetato interfere positivamente na formação etanol.

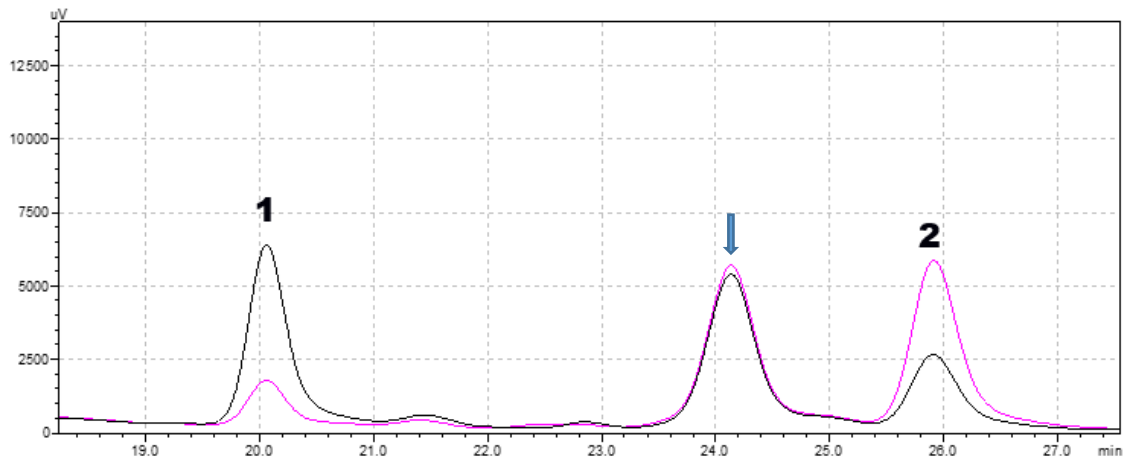


Figura 25 - Perfil cromatográfico em HPLC da produção de ácidos do clone A2 (48 h). Cromatografia realizada em coluna de fase ROA (Rezex Phenomenex, 300 x 7.6 mm). 1: fração correspondente ao tempo de retenção de acetato (20 min); 2: fração correspondente ao tempo de retenção de etanol (26 min). A linha preta representa a cepa selvagem e a linha rosa representa a cepa A2. Seta representa a fração correspondente ao tempo de retenção de um composto não identificado.

A formação de butanol também foi analisada, diferentemente dos ácidos, os solventes em *C. acetobutylicum* são formados ao final da fase exponencial de crescimento, entre 72 h e 96 h. Portanto, foram recolhidas alíquotas do cultivo após 96 h para a análise da presença de butanol por cromatografia. O resultado obtido revelou que embora a produção tenha sido muito baixa, ainda sim, a cepa A2 conseguiu superar a cepa selvagem, sendo então escolhida para a continuidade do trabalho (Figura 26).

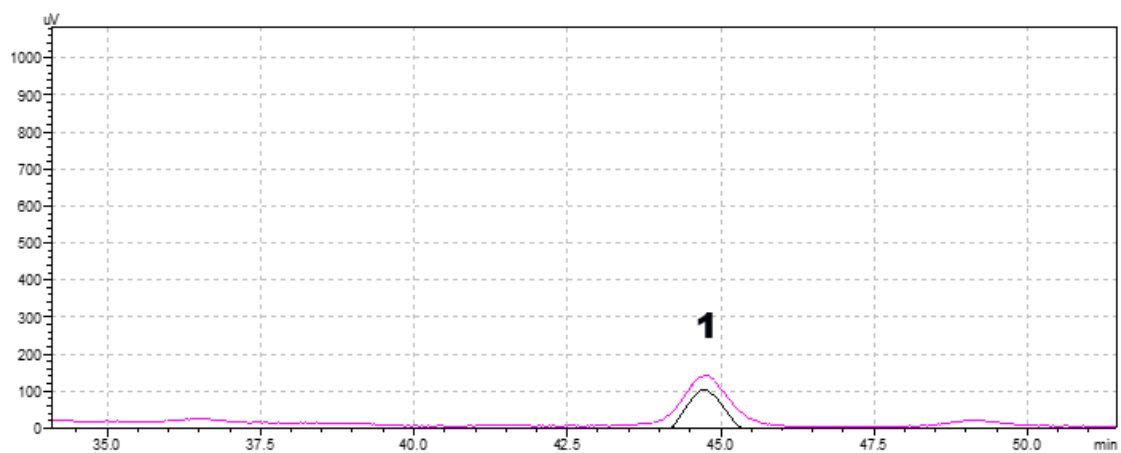


Figura 26 - Perfil cromatográfico em HPLC da produção de butanol do clone A2 (96 h). Cromatografia realizada em coluna de fase ROA (Rezex Phenomenex, 300 x 7.6 mm). 1: fração correspondente ao tempo de retenção do butanol (44 min); A linha preta representa a cepa selvagem e a linha rosa representa a cepa A2.

O mutante A2 (Δpta) teve a produção de ácido acético reduzida quando comparado com a cepa selvagem. A deleção do gene *pta* realizada em outros trabalhos

confirmam a redução da produção de ácido acético sem eliminá-la por completo, isto se deve a presença de outras enzimas atuantes da via de formação deste ácido, como a acetato quinase, cujo gene (*ackA*) está localizado no mesmo operon que o gene *pta* (BOYNTON, BENETT & RUDOLPH, 1996; JANG *et al.*, 2012; LEHMANN *et al.*, 2012). Essa redução também sugere que as enzimas envolvidas na formação de ácido podem ter especificidade por diferentes substratos. Green e colaboradores (1996), relataram que a deleção da via de formação do acetato (deleção do gene *pta*) em *C. acetobutylicum* reduziu os níveis de ácido acético formado em comparação com o selvagem, sob condições favoráveis à formação de ácido (pH 5,5).

A produção de etanol e butanol observada na cepa A2 apresentou um aumento relativo que pode estar associado ao desvio do fluxo de carbono da formação do ácido para a formação de álcoois. A reassimilação dos ácidos está diretamente associada a formação dos solventes, entretanto a perda de carbonos nesse processo é grande, o que influencia diretamente a produção de solventes (BENNETT *et al.*, 1995). Sendo, a redução da perda de carbonos na via de formação do ácido acético a possível explicação para o aumento na produção de solventes. Este aumento também foi observado no trabalho realizado por Green e colaboradores (1996), porém, Jang e colaboradores (2012) relataram um aumento na produção de butanol, mas não houve alteração na concentração de etanol obtido. Já no trabalho de Lehmann e colaboradores (2012) não houve mudanças significativas na produção dos álcoois. A variação dos resultados apresentados nos diferentes trabalhos pode estar relacionada a diferentes condições de cultivo e diferentes técnicas moleculares utilizadas (LEE *et al.*, 2008; LÜTKE-EVERSLOH, 2014).

6.4. Deleção do gene da Butirato quinase (*buk*)

Os resultados obtidos na deleção do gene da fosfotranscetilase se mostraram promissores para a obtenção de melhorias na produção dos álcoois em *C. acetobutylicum*. Portanto, a deleção do gene associado à formação de ácido butírico foi escolhido, pois permitiria não só a eliminação da formação do ácido butírico, como também poderia afetar positivamente a produção de álcoois como foi visto nos primeiros resultados da deleção do gene associado a formação de ácido acético.

O nocaute do gene *buk*, entretanto não contou com a seleção por características fenotípicas, sendo necessária a utilização do sistema de expressão da toxina MazF para selecionar o segundo evento de recombinação. Contudo, o processo de seleção do primeiro evento de integração do plasmídeo pMTL-mazF-buk ao genoma pode ser realizado como no processo anterior, utilizando o antibiótico tianfenicol.

A transformação foi realizada nas cepas selvagem e na A2 visando a deleção de gene *buk*. Para a realização da eletrotransformação foi utilizado o plasmídeo pMTL-mazF-buk. O período de recuperação foi de 24h para posterior seleção dos transformantes em meio contendo o antibiótico tianfenicol. O período de incubação foi de 72h para a obtenção de transformantes (Figura 27). Este resultado indicou a possível primeira integração do plasmídeo ao genoma.



Figura 27 - Seleção em meio contendo Tianfenicol. Clones que apresentaram crescimento no meio após eletrotransformação.

Considerando os transformantes obtidos, a etapa de seleção do segundo evento de recombinação foi realizada. Neste caso os micro-organismos resultantes foram transferidos para um meio mínimo sólido sem a presença de glicose, que foi substituída pela lactose para fins de seleção. Mesmo após 120 h de incubação as placas não apresentaram colônias. A alternativa encontrada foi cultivar os mutantes em meio mínimo líquido com lactose adicionada. A presença de lactose ativou a expressão da toxina nos clones que ainda apresentassem o plasmídeo pMTL-mazF-buk integrado ao genoma. Entretanto, células que não apresentassem o plasmídeo também poderiam crescer nesse meio, inviabilizando a obtenção de uma cultura pura de células mutantes.

Foram realizadas quatro passagens sucessivas em meio mínimo contendo lactose até que uma cultura pura fosse encontrada. As cepas obtidas foram nomeadas como AB1, AB2 e AB3, para àquelas oriundas da cepa A2 (com gene *pta* deletado) e não foram obtidas mutantes a partir da selvagem. Os clones obtidos foram transferidos para meio YTG e seu DNA genômico foi extraído para confirmação da integração por amplificação gênica utilizando os iniciadores buk-R e ptbc-F, que se anelam no final do gene *buk* e no início do gene *ptb* respectivamente. A figura 18 mostra o resultado da amplificação e a perda de 165 pb no gene *buk* entre o clone AB1 e a cepa selvagem, enquanto no clone AB2 não houve amplificação, o clone AB3 apresentou ampliações inespecíficas (Figura 28).

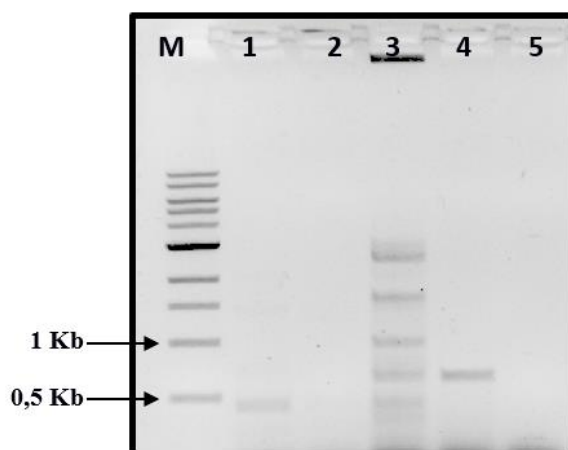


Figura 28 - Confirmação do nocaute do gene *buk*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: 1 kb DNA Ladder (NEB). 1: Clone AB1, 2: Clone AB2, 3: Clone AB3, 4: Selvagem, 5: Controle negativo da reação.

A confirmação da deleção dos genes a partir da amplificação por PCR demonstrou que a metodologia utilizada foi bem sucedida. Entretanto, para verificar como a deleção desses genes afetou o metabolismo do micro-organismo em relação a produção de ácidos e solventes, foi realizada a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A cepa escolhida para a realização dos testes foi a AB1, pois teve sua mutação confirmada. Esta cepa foi cultivada por 48 horas e os resultados comprovaram a diminuição na produção de ácido bûtirico, com níveis ainda menores que da produção de ácido acético, quando comparado com a cepa selvagem. Outro dado que chamou a atenção foi a produção de etanol pela cepa mutada, quando comparada à selvagem os níveis foram semelhantes mostrando que houve redução na formação de etanol, diferentemente da cepa A2 (gene *pta* deletado) (Figura 29). Todos os cromatogramas para

a análise da produção de ácidos no tempo de 48 h apresentaram a retenção de uma fração desconhecida em 24 min. Que será estudada para posterior identificação.

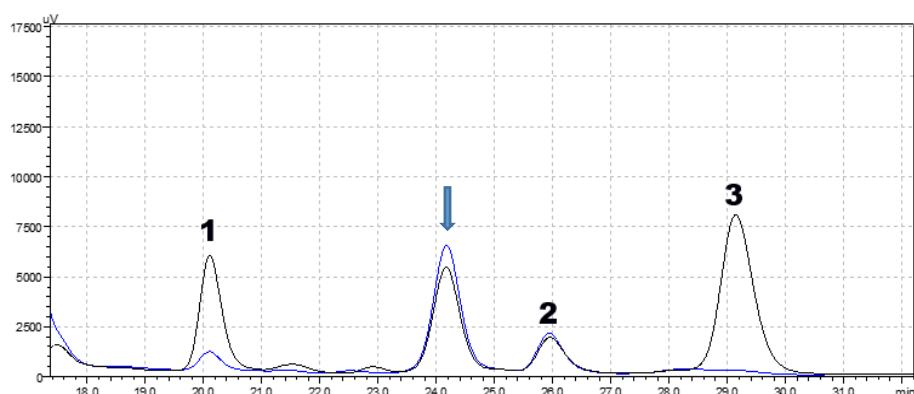


Figura 29 - Perfil cromatográfico em HPLC da produção de ácidos do clone AB1 (48 h). Cromatografia realizada em coluna de fase ROA (Rezex Phenomenex, 300 x 7.6 mm). 1: fração correspondente ao tempo de retenção de acetato (20 min); 2: fração correspondente ao tempo de retenção de etanol (26 min); 3: fração correspondente ao tempo de retenção do butirato (29 min). A linha preta representa a cepa selvagem e a linha azul representa a cepa AB1. Seta representa a fração correspondente ao tempo de retenção de um composto não identificado.

A formação de butanol na cepa AB1, diferentemente dos dados obtidos para a cepa A2 (deleção *pta*), nas alíquotas recolhidas após o cultivo por 96 h, revelaram que não houve alteração na produção de butanol quando comparada com a cepa selvagem. Contudo mais experimentos devem ser realizados para confirmar esses dados (Figura 30).

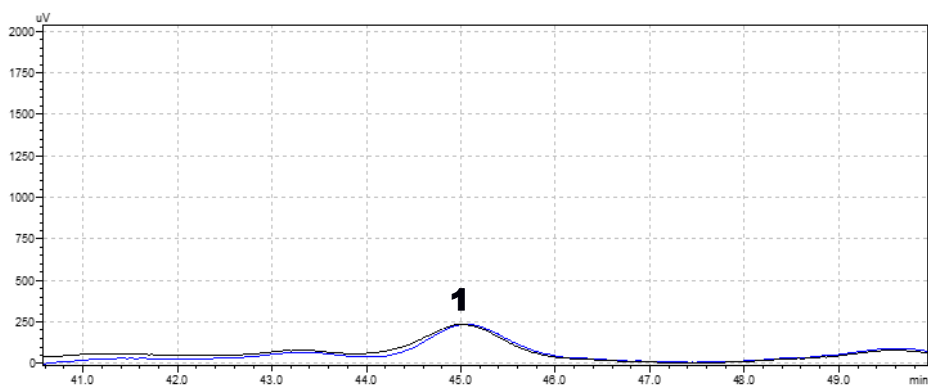


Figura 30 - Perfil cromatográfico em HPLC da produção de butanol do clone AB1 (96 h). Cromatografia realizada em coluna de fase ROA (Rezex Phenomenex, 300 x 7.6 mm). 1: fração correspondente ao tempo de retenção do butanol (44 min); A linha preta representa a cepa selvagem e a linha azul representa a cepa AB1.

A deleção do gene da butirato quinase (*buk*) realizada na cepa A2, resultou na obtenção da cepa AB1 ($\Delta pta\Delta buk$) cuja produção de ácido butírico foi extremamente reduzida quando comparada com a cepa selvagem. Entretanto, não houve diferença quanto a produção de butanol. Em trabalhos cuja deleção do gene *buk* foi reportada, houve o aumento substancial da produção de butanol em cepas mutantes quando comparada com a cepa selvagem (GREEN *et al.*, 1996; DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999; SHAO *et al.*, 2007; SILLERS *et al.*, 2008).

Na maioria dos resultados descritos na literatura, a mutação foi realizada apenas em um dos genes, diferentemente do que foi conseguido neste trabalho, indicando a possibilidade da baixa produção do butanol estar relacionada a deleção combinada dos dois genes. Em contraste com resultados obtidos, apenas o trabalho de Jang e colaboradores (2012), que relata o nocaute dos dois genes combinados, observou-se que o rendimento final do butanol da cepa deficiente em *pta-buk* foi de 0,8 g butanol/g de solventes totais, o que era maior que o dos mutantes nocauteados em apenas um dos genes ou da cepa selvagem.

As linhagens mutantes cresceram mais lentamente do que a selvagem. Parece que durante o crescimento exponencial, as culturas mutantes compensaram a falta de produção de ATP, associada as vias deletadas, através do aumento a produção do outro ácido sem perda significativa no crescimento celular. Este fator pode também estar influenciando a produção de solventes. Considerando os dados acima, serão realizados estudos de fermentação para avaliar os fatores que possam estar influenciando a produção de butanol na cepa AB1.

6.5. Expressão do gene da álcool desidrogenase secundária em *C. acetobutylicum*

6.5.1. Construção do vetor para expressão do gene da álcool desidrogenase secundária (*sadH*);

O *C. acetobutylicum* despertou o interesse da indústria e de pesquisadores por sua capacidade de produzir solventes, principalmente etanol e butanol. Entretanto, para a produção de biocombustíveis, a presença de acetona no meio torna este processo de

produção mais caro. Isto se deve ao custo da retirada desse solvente por métodos físico-químicos. O desenvolvimento de metodologias alternativas baseia-se na engenharia genética para mudar esse quadro.

A utilização de vetores episossomais para expressão em *C. acetobutylicum* já foi descrita, sendo seus resultados controversos em relação a expressão de heteróloga. Para avaliarmos a possibilidade de utilização deste tipo de vetor em *C. acetobutylicum* visando obter apenas a produção de álcoois, foi construído um plasmídeo que, além das regiões para clonagem em *E. coli* e em *C. acetobutylicum*, também tivesse um gene, cuja enzima codificada poderia substituir a produção de acetona por isopropanol. Este gene foi identificado em uma outra espécie do gênero, o *C. beijerinckii*, capaz de obter como produto do seu metabolismo o isopropanol, etanol e o butanol. A enzima responsável por essa conversão é a álcool desidrogenase secundária codificada pelo gene *sadh*.

Para a construção desse plasmídeo foram sintetizadas (IDT, EUA) a sequência do gene *sadh*, oriunda de *C. beijerinckii* idêntica a descrita na literatura (LEE *et al.*, 2008), sob o controle de um promotor e um terminador constitutivos de *C. acetobutylicum*, o P_{fdx} e o T_{fdx}, respectivamente. Flanqueando o gene da álcool desidrogenase secundária foram inseridas duas regiões que apresentam homologia com o gene *pyrE*, HA1 e HA2, assim como a marca de seleção referente a eritromicina e origem de replicação RepL ambos para *C. acetobutylicum*. O plasmídeo resultante foi denominado pHASadH-EmR (Figura 31).

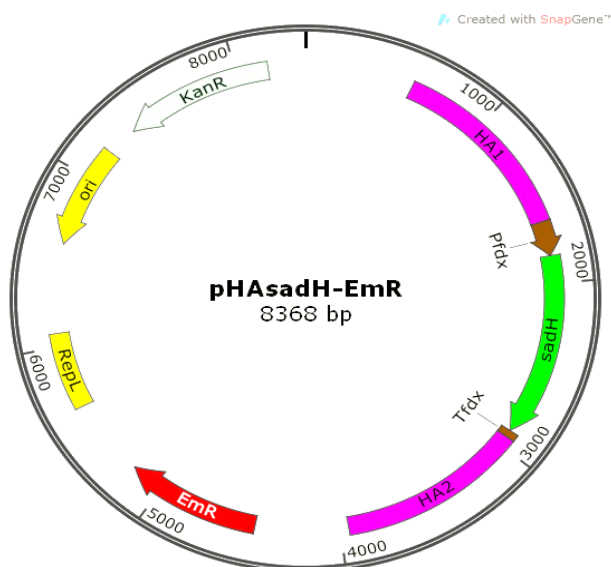


Figura 31 – Mapa físico do vetor de expressão do gene *sadh*- pHASadH-EmR. ORI – origem de replicação para *E. coli*, KanR – kanamicina, HA1 e HA2 – fragmentos de homologia, P_{fdx} – promotor da ferridoxina, *sadh* – gene da álcool desidrogenase secundária de *C. beijerinckii*, T_{fdx}- terminador da ferridoxina, repL – proteína de replicação, EmR – eritromicina

6.5.2. Produção de Isopropanol em *C. acetobutylicum*

Para avaliar a produção de isopropanol em *C. acetobutylicum*, foi realizada a eletrotransformação da cepa selvagem e da AB1. A produção de isopropanol foi avaliada após a análise do meio de cultura por HPLC, e não foi possível verificar a produção de isopropanol em ambas as cepas. Porém foi identificado um aumento substancial da produção de etanol (Figura 32).

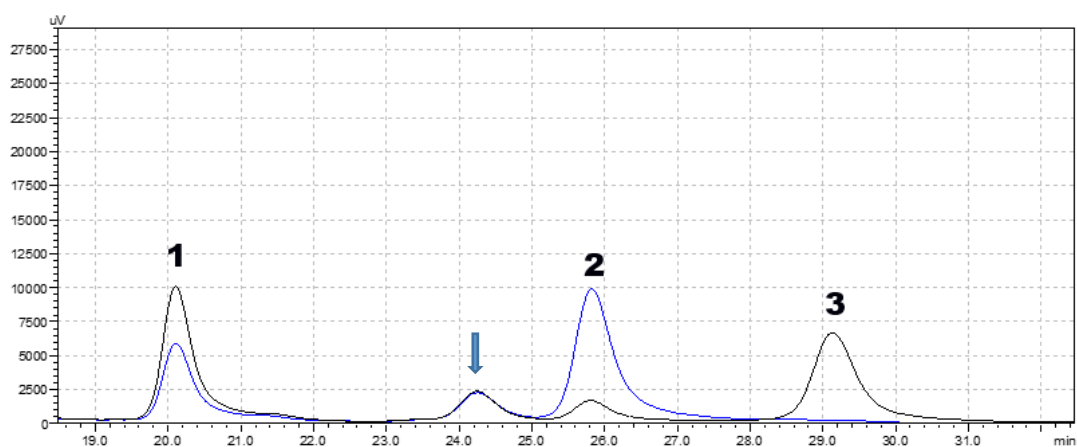


Figura 32 - Perfil cromatográfico em HPLC para análise da produção de Isopropanol AB1 (48 h). Cromatografia realizada em coluna de fase ROA (Rezex Phenomenex, 300 x 7.6 mm). 1: fração correspondente ao tempo de retenção de acetato (20 min); 2: fração correspondente ao tempo de retenção de etanol (26 min); 3: fração correspondente ao tempo de retenção do butirato (29 min). A linha preta representa a cepa selvagem e a linha azul representa a cepa AB1 com pHasadH-EmR. Seta representa a fração correspondente ao tempo de retenção de um composto não identificado.

A comparação entre a cepa AB1 com o plasmídeo e sem o plasmídeo mostraram um aumento substancial na produção de etanol (Figura 33). Sem, contudo, alterar a formação de ácidos e de butanol.

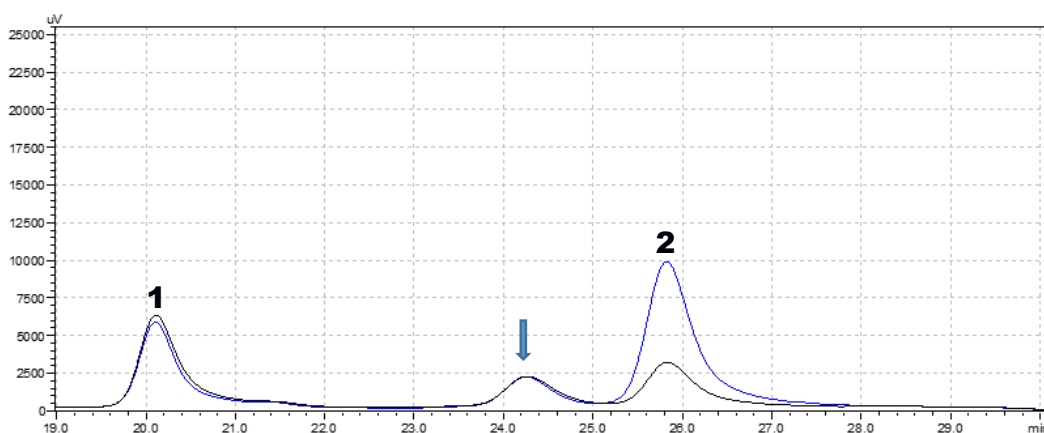


Figura 33 - Perfil cromatográfico em HPLC para comparação da produção de Isopropanol AB1 (48 h). Cromatografia realizada em coluna de fase ROA (Rezex Phenomenex, 300 x 7.6 mm). 1: fração correspondente ao tempo de retenção de acetato (20 min); 2: pico correspondente ao tempo de retenção de etanol (26 min); A linha preta representa a AB1 e a linha azul representa a cepa AB1 com pHASadH-EmR. Seta representa a fração correspondente ao tempo de retenção de um composto não identificado.

A produção de isopropanol em *C. acetobutylicum* foi descrita pela primeira vez por Lee e colaboradores, em 2008. Esta abordagem consistiu na expressão de uma álcool desidrogenase secundária, codificada pelo gene *sadh* (de *C. beijerinckii*). A expressão da enzima foi realizada utilizando vetor episomal e o gene foi colocado sob controle do promotor *Padc* nativo de *C. acetobutylicum*. Os resultados deste trabalho mostraram a possibilidade de se produzir isopropanol, substituindo a acetona, produto indesejado para a produção de biocombustíveis. Dusseaux e colaboradores (2013) publicaram um trabalho semelhante, porém utilizando diferentes promotores de *C. acetobutylicum*, para avaliar a produção de isopropanol nas diferentes fases de crescimento do micro-organismo.

Baseado nestes trabalhos, foi construído um vetor para expressão do gene da álcool desidrogenase secundária (*sadh*) de *C. beijerinckii* utilizando o promotor do gene da ferridoxina descarboxilase (*fdx*) de *C. acetobutylicum* (HEAP *et al.*, 2010). Os primeiros testes mostraram um baixo crescimento dos transformantes das duas linhagens testadas (Selvagem e AB1) em meio contendo antibiótico de seleção (eritromicina). As cromatografias iniciais não mostraram a formação de isopropanol, entretanto, a cepa AB1 apresentou uma produção considerável de etanol, enquanto a produção de butanol se manteve. Uma observação mais apurada destes dados revelou a ausência de produção de acetona da cepa AB1, motivo principal para não haver produção de isopropanol.

Lehmann e Lütke-Eversloh (2011) ao produzirem um mutante butirato/butanol negativo, tiveram um resultado semelhante, com o aumento considerável da produção de etanol. Eles relataram a atividade nitidamente aumentada das enzimas NADH dependentes, indicando a possibilidade deste resultado ser devido a um menor potencial redox apresentado pela modificação da via metabólica de *C. acetobutylicum*.

A utilização da SadH para produzir isopropanol em cepas de *C. acetobutylicum* foi descrita por vários autores e com considerável sucesso (LEE *et al.*, 2008 DAI *et al.*, 2012; DUSSEAUX *et al.*, 2013; JANG *et al.*, 2013). Entretanto até hoje nenhum trabalho relatou a expressão da álcool desidrogenase secundária em uma cepa com mutações simultâneas nos genes *pta* e *buk*. O entendimento da alteração metabólica ocorrida nessa cepa necessitará de mais estudos para ser alcançado. Porém, a expressiva produção de etanol sem alterar a produção de butanol e sem produção de acetona obtida, mostra que a utilização dessa cepa para a produção de álcoois é promissora.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho é pioneiro no Brasil e mostrou que a obtenção de modificações genéticas de *Clostridium acetobutylicum* visando o aumento da produção de álcoois a partir de técnicas de engenharia genética são factíveis e poderão servir como plataforma para futuras adaptações.

Diversas metodologias de modificação genética têm sido desenvolvidas na busca pela melhoria da produção de álcoois em *Clostridium acetobutylicum*. A criação de linhagens capazes de desempenhar uma produtividade alta para estes compostos foi objetivo deste trabalho.

O sistema de metilação *in vivo* descrito neste estudo para proteger o DNA da restrição de Cac824I na transformação de *C. acetobutylicum* foi comprovadamente funcional e deve, portanto, simplificar os próximos trabalhos de engenharia metabólica e análise genética deste organismo.

Foi obtido com sucesso a deleção dos genes da fosfotranscetilase (*pta*) e da butirato quinase (*buk*) associados a produção dos ácidos acético e butírico, respectivamente, utilizado a técnica Allele-Coupled Exchange (ACE). Foi observado para ambos os casos a redução da formação desses compostos nas linhagens obtidas.

A análise da produção dos álcoois, butanol e etanol, mostrou um aumento destes compostos com o nocaute do gene *pta*, associado a formação de acetato. Entretanto, na linhagem com nocaute duplo, do gene *pta* e do gene *buk*, não foi possível detectar uma mudança considerável na formação de álcoois.

A produção de isopropanol em substituição a produção de acetona pela presença do plasmídeo pHASadH-EmR ainda não foi obtida, porém a cepa AB1 foi capaz de produzir etanol em uma escala muito maior do que a cepa sem o plasmídeo.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar experimentos para a quantificação dos solventes produzidos durante o processo de fermentação em escala laboratorial;
- Buscar por novos meios de cultivo visando a melhoria da produção de solventes durante a fermentação;
- Realizar um estudo metabólico mais aprofundado para compreender como as modificações genéticas alcançadas neste estudo afetaram a cepa mutada;
- Desenvolver novas estratégias para alcançar a produção de Isopropanol pela cepa mutada, de forma que a linhagem criada seja ideal para produção de bioálcool;
- Desenvolver técnicas para a integração do gene da álcool desidrogenase secundária (*sadh*) em *C. acetobutylicum*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T.M.I.; CHONG, W.T.; NUR, H.; SEBAYANG, A.H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016.

AL-HINAI, M. A.; FAST, A. G.; PAPOUTSAKIS, E. T. Novel system for efficient isolation of *Clostridium* double-crossover allelic exchange mutants enabling markerless chromosomal gene deletions and dna integration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 22, p. 8112–8121, 2012.

ARO, E.M. From first generation biofuels to advanced solar biofuels. **Ambio**, v. 45(1), p. 24-31, 2016.

AUNE, T. E. V.; AACHMANN, F. L. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1301–1313, 2010.

AWANG, G. M.; JONES, G. A. INGLEDEW, W. M.; KROPINSKI, A. M. B. The Acetone-Butanol-Ethanol fermentation. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 15, p. S33–S67, 1988.

AWUDU, I.; ZHANG, J. Uncertainties and sustainability concepts in biofuel supply chain management: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Elsevier, v. 16(2), p. 1359-1368, 2012.

BAHL, H.; ANDERSCH, W.; GOTTSCHALK, G. Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 201–205, 1982.

BALTZ, R. A.; BURCHAM, A. F.; SITTON, O. C.; BOOK, N. L. The recycle of sulfuric acid and xylose in the prehydrolysis of corn stover. **Energy**, v. 7, n. 3, p. 259–265, 1982.

BAER, S. H.; BLASCHEK, H. P.; SMITH, T. L. Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 2854–2861, 1987.

BENNETT, G. N.; RUDOLPH, F. B.; PAPOUTSAKIS, E.T.; TSUKAGOSHI, N.; UDAKA, S.; YAGI, K.; KONDO, K.; INOUE, K.; KAGAMIYAMA, H.; HASHIMOTO T. The central metabolic pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA in *Clostridium acetobutylicum*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, n. 3, p. 241–249, 1995.

BEREZINA, O. V.; ZAKHAROVA, N. V.; YAROTSKY, C. V.; ZVERLOV, V. V. Microbial producers of butanol. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 625–638, 2012.

BOËL, G.; LETSO, R.; NEELY, H.; PRICE, W. N.; WONG, K.; SU, M.; LUFF, J.; VALECHA, M.; EVERETT, J. K.; ACTON, T. B.; XIAO, R.; MONTELIONE, G. T.; AALBERTS, D. P.; HUNT, J. F. Codon influence on protein expression in *E. coli* correlates with mRNA levels. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 358–363, 2016.

BORDEN, J. R.; PAPOUTSAKIS, E. T. Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 9, p. 3061–8, 2007.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 19–25, 2005.

BOYLE, P. M.; SILVER, P. A. Parts plus pipes: Synthetic biology approaches to metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 3, p. 223–232, 2012.

BOYNTON, Z. L.; BENNETT, G. N.; RUDOLPH, F. B. Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2758–66, 1996.

BUDAY, Z.; LINDEN, J. C.; KARIM, M. N. Improved acetone-butanol fermentation analysis using subambient HPLC column temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 1, p. 24–27, 1990.

BURGESS-BROWN, N. A.; SHARMA, S.; SOBOTT, F.; LOENARZ, C.; OPPERMAN, U.; GILEADI, O. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. **Protein Expression and Purification**, v. 59, n. 1, p. 94–102, 2008.

CARTMAN, S. T.; HEAP, J. T.; KUEHNE, S.; COOKSLEY, C. M.; EHSAAN, M.; WINZER, K.; MINTON, N. P. Clostridial gene tools. In: **Systems Biology of Clostridium**. IMPERIAL COLLEGE PRESS, Londres, p. 21–55, 2014.

CARTÓN, A.; BENITO, G. G.; REY, J. A.; DE LA FUENTE, M. Selection of adsorbents to be used in an ethanol fermentation process. Adsorption isotherms and kinetics. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p. 75–78, 1998.

CATO, E. P.; STACKEBRANDT, E. Taxonomy and Phylogeny. In: **Clostridia**. Boston, MA: Springer US, p. 1–26, 1989.

CHANAL, A.; MINGARDON, F.; BAUZAN, M.; TARDIF, C.; FIEROBE, H. Scaffoldin modules serving as “cargo” domains to promote the secretion of heterologous cellulosomal cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6277–80, 2011.

CHARUBIN, K.; BENNETT, R. K.; FAST, A. G.; PAPOUTSAKIS, E. T. Engineering *Clostridium* organisms as microbial cell-factories: challenges and opportunities. **Metabolic Engineering**, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717618302362>> Acesso em 25 de Julho 2018.

CHEN, J.-S.; HIU, S. F. Acetone-butanol-isopropanol production by *Clostridium beijerinckii* (synonym: *Clostridium butylicum*). **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 5, p. 371–376, 1986.

CHEN, J. S. Alcohol dehydrogenase: multiplicity and relatedness in the solvent-producing clostridia. **FEMS microbiology reviews**, v. 17, n. 3, p. 263–73, 1995.

CHEN, C. K.; BLASCHEK, H. P. Effect of acetate on molecular and physiological aspects of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 solvent production and strain degeneration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 499–505, 1999.

CHIAO, J.; SUN, Z. History of the acetone-butanol-ethanol fermentation industry in China: development of continuous production technology. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 13, n. 1–3, p. 12–4, 2007.

CHYLINSKI, K.; LE RHUN, A.; CHARPENTIER, E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. **RNA Biology**, v. 10, n. 5, p. 726–737, 2013.

COLLAS, F.; KUIT, W.; CLÉMENT, B.; MARCHAL, R.; LÓPEZ-CONTRERAS, A. M.; MONOT, F. Simultaneous production of isopropanol, butanol, ethanol and 2,3-butanediol by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 engineered strains. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 45, 2012.

COLLINS, M.D.; LAWSON, P.A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J.J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 812–826, 1994.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A.; ZHANG, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 819–23, 2013.

CORNILLOT, E.; NAIR, R. V.; PAPOUTSAKIS, E.T.; SOUCAILLE, P. The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 17, p. 5442–5447, 1997.

CRABBE, E.; NOLASCO-HIPOLITO, C.; KOBAYASHI, G.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Biodiesel production from crude palm oil and evaluation of butanol extraction and fuel properties. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 65–71, 2001.

CROUX, C.; NGUYEN, N.; LEE, J.; RAYNAUD, C.; SAINT-PRIX, F.; GONZALEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; SOUCAILLE, P. Construction of a restriction-less, marker-less mutant useful for functional genomic and metabolic engineering of the biofuel producer *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 23, 2016.

CUI, G.; HONG, W.; ZHANG, J.; LI, W.; FENG, Y.; LIU, Y.; CUI, Q. Targeted gene engineering in *Clostridium cellulolyticum* H10 without methylation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, n. 3, p. 201–208, 2012.

DAI, Z.; DONG, H.; ZHU, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y.; MA, Y. Introducing a single secondary alcohol dehydrogenase into butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum* Rh8 switches ABE fermentation to high level IBE fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 44, 2012.

DAVIS, L.; MAIZELS, N. DNA nicks promote efficient and safe targeted gene correction. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e23981, 2011.

DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Energy Conversion and Management**, v. 49, n. 8, p. 2106–2116, 2008.

DESAI, R. P.; HARRIS, L. M.; WELKER, N. E.; PAPOUTSAKIS, E. T. Metabolic flux analysis elucidates the importance of the acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. **Metabolic Engineering**, v. 1, n. 3, p. 206–213, 1999.

DOĞAN, O. The influence of n-butanol/diesel fuel blends utilization on a small diesel engine performance and emissions. **Fuel**, v. 90, n. 7, p. 2467–2472, 2011.

DONG, H.; ZHANG, Y.; DAI, Z.; LI, Y. Engineering *Clostridium* strain to accept unmethylated DNA. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. 1–8, 2010.

DONG, H.; TAO, W.; ZHANG, Y.; LI, Y. Development of an anhydrotetracycline-inducible gene expression system for solvent-producing *Clostridium acetobutylicum*: A useful tool for strain engineering. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 1, p. 59–67, 2012.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science (New York, N.Y.)**, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 2014.

DUDLEY, B. **BP Energy Outlook 2017**. Londres, Inglaterra. Disponível em: <<https://www.bp.com/en/global/corporate/investors/results-and-reporting/annual-report.html>> Acesso em Janeiro de 2018.

DÜRRE, P.; KUHN, A.; GOTTWALD, M.; GOTTSCHALK, G. Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 268–272, 1987.

DÜRRE, P.; FISCHER, R. J.; KUHN, A.; LORENZ, K.; SCHREIBER, W.; STÜRZENHOFECKER, B.; ULLMANN, S.; WINZER, K.; SAUER, U. Solventogenic enzymes of *Clostridium acetobutylicum*: catalytic properties, genetic organization, and transcriptional regulation. **FEMS microbiology reviews**, v. 17, n. 3, p. 251–262, 1995.

DÜRRE, P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 6, p. 639–648, 1998.

DÜRRE, P.; BÖHRINGER, M.; NAKOTTE, S.; SCHAFFER, S.; THORMANN, K.; ZICKNER, B. Transcriptional regulation of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 295–300, 2002.

DÜRRE, P.; HOLLERGSCHWANDNER, C. Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. **Anaerobe**, v. 10, n. 2, p. 69–74, 2004.

DÜRRE, P. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 353–62, 2008.

DÜRRE, P. Physiology and sporulation in *Clostridium*. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, 2014.

DUSSÉAUX, S.; CROUX, C.; SOUCAILLE, P.; MEYNIAL-SALLES, I. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol/butanol/ethanol mixture. **Metabolic Engineering**, v. 18, p. 1–8, 2013.

EASAC, The European Academies Science Advisory Council. **The current status of biofuels in the European Union, their environmental impacts and future prospects**. Germany, 2012. Disponível em: <www.easac.eu>. Acesso em: 2018.

EDWARDS, R. A.; HELM, R. A.; MALOY, S. R. Increasing DNA transfer efficiency by temporary inactivation of host restriction. **BioTechniques**, v. 26, n. 5, p. 892–4, 1999.

EHSAAN, M.; KUIT, W.; ZHANG, Y.; CARTMAN, S. T.; HEAP, J. T.; WINZER, K.; MINTON, N. P. Mutant generation by allelic exchange and genome resequencing of the biobutanol organism *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 4, 2016.

ELLABBAN, O.; ABU-RUB, H.; BLAABJERG, F. Renewable energy resources: Current status, future prospects and their enabling technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 748–764, 2014.

ENNIS, B. M.; MARSHALL, C. T.; MADDOX, I. S.; PATERSON, A. H. J. Continuous product recovery by in-situ gas stripping/condensation during solvent production from whey

permeate using *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 10, p. 725–730, 1986.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 6, p. 653–658, 2004.

EZEJI, T.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 1460–1469, 2007.

EZEJI, T.; MILNE, C.; PRICE, N. D.; BLASCHEK, H. P. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1697–712, 2010.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; DAMÁSIO, A. R. L.; PAIXÃO, D. A. A.; ALVAREZ, T. M.; SQUINA, F. M. Applied Metagenomics for Biofuel Development and Environmental Sustainability. In: **Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane**. Cham: Springer International Publishing, p. 107–129, 2017.

FISCHER, R. J.; HELMS, J.; DÜRRE, P. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the sol operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6959–6969, 1993.

GAPES, J. R.; NIMCEVIC, D.; FRIEDL, A. Long-Term Continuous Cultivation of *Clostridium beijerinckii* in a Two-Stage Chemostat with On-Line Solvent Removal. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3210–9, 1996.

GARCÍA, V.; PÄKKILÄ, J.; OJAMO, H.; MUURINEN, E.; KEISKI, R. L. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 2, p. 964–980, 2011.

GIRBAL, L.; CROUX, C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, n. 3, p. 287–297, 1995.

GIRBAL, L.; MORTIER-BARRIÈRE, I.; RAYNAUD, F.; ROUANET, C.; CROUX, C.; SOUCAILLE, P. Development of a sensitive gene expression reporter system and an inducible

promoter-repressor system for *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4985–8, 2003.

GIRBAL, L.; VON ABENDROTH, G.; WINKLER, M.; BENTON, P. M. C.; MEYNIAL-SALLES, I.; CROUX, C.; PETERS, J. W.; HAPPE, T.; SOUCAILLE, P. Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2777–81, 2005.

GOIHERG, E.; Peretz, M.; TEL-OR, S.; DYM, O.; SHIMON, L.; FROLOW, F.; BURSTEIN, Y. Biochemical and structural properties of chimeras constructed by exchange of cofactor-binding domains in alcohol dehydrogenases from thermophilic and mesophilic microorganisms. **Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1943–1953, 2010.

GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytologist**, v. 178, n. 3, p. 473–485, 2008.

GOTTWALD, M.; GOTTSCHALK, G. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. **Archives of Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 42–46, 1985.

GRANA, R.; FRASSOLDATI, A.; FARAVELLI, T.; NIEMANN, U.; RANZI, E.; SEISER, R.; CATTOLICA, R.; SESHADRI, K. An experimental and kinetic modeling study of combustion of isomers of butanol. **Combustion and Flame**, v. 157, n. 11, p. 2137–2154, 2010.

GREEN, E. M.; BOYNTON, Z. L.; HARRIS, L. M.; RUDOLPH, F. B.; PAPOUTSAKIS, E. T.; BENNETT, G. N. Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Microbiology**, v. 142, n. 8, p. 2079–2086, 1996.

GREEN, E. M. Fermentative production of butanol—the industrial perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 337–343, 2011.

GROBBEN, N. G.; EGGINK, G.; CUPERUS, F. P.; HUIZING, H. J. Production of acetone, butanol and ethanol (ABE) from potato wastes: fermentation with integrated membrane extraction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 4–5, p. 494–498, 1993.

GROOT, W. J.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Batch and continuous butanol fermentations with free cells: integration with product recovery by gas-stripping. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 305–308, dez. 1989.

GRUPE, H.; GOTTSCHALK, G. Physiological Events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 12, p. 3896–902, 1992.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 712–725, 2015.

HAN, B.; GOPALAN, V.; EZEJI, T. C. Acetone production in solventogenic *Clostridium* species: new insights from non-enzymatic decarboxylation of acetoacetate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 565–576, 2011.

HARRIS, L. M.; WELKER, N. E.; PAPOUTSAKIS, E. T. Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0a* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 13, p. 3586–3597, 2002.

HARTMANIS, M. G. N.; GATENBECK, S. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1277–83, 1984.

HARTMANIS, M. G. Butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 3, n. 262, p. 617–621, 1987.

HEAP, J. T.; PENNINGTON, O. J.; CARTMAN, S. T.; CARTER, G. P.; MINTON, N. P. The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 3, p. 452–464, 2007.

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

HEAP, J. T.; KUEHNE, S. A.; EHSAAN, M.; CARTMAN, S. T.; COOKSLEY, C. M.; SCOTT, J. C.; MINTON, N. P. The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 1, p. 49–55, 2010.

HU, X.; SHI, Q.; YANG, T.; JACKOWSKI, G. specific replacement of consecutive AGG codons results in high-level expression of human cardiac troponin T in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 7, n. 3, p. 289–293, 1996.

HUANG, L.; GIBBINS, L. N.; FORSBERG, C. W. Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 1043–1047, 1985.

HUANG, H.; LIU, H.; GAN, Y.-R. Genetic modification of critical enzymes and involved genes in butanol biosynthesis from biomass. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 5, p. 651–7, 2010.

HUNT, V. D. **Gasohol Handbook**. New York, NY.: Industrial Press Inc., 1981.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). World Energy Outlook 2015. **World Energy Outlook 2015: Presentation to the press, London**, November, 2015.

IZÁK, P.; SCHWARZ, K.; RUTH, W.; BAHL, H.; KRAGL, U. Increased productivity of *Clostridium acetobutylicum* fermentation of acetone, butanol, and ethanol by pervaporation through supported ionic liquid membrane. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 4, p. 597–602, 2008.

JANG, Y. S.; LEE, J. Y.; LEE, J.; PARK, J. H.; IM, J. A.; EOM, M. H.; LEE, J.; LEE, S. H.; SONG, H.; CHO, J. H.; SEUNG, D. Y.; LEE, S. Y. Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*. **mBio**, v. 3, n. 5, p. 314-323, 2012.

JANG, Y.-S.; MALAVIYA, A.; LEE, J.; IM, J. A.; LEE, S. Y.; LEE, J.; EOM, M.; CHO, J.; SEUNG, D. Y. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the enhanced production of isopropanol-butanol-ethanol fuel mixture. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 4, p. 1083–1088, 2013.

JENNERT, K. C. B.; YOUNG, D. I.; YOUNG, M.; TARDIF, C. Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. **Microbiology**, v. 146, n. 12, p. 3071–3080, 2000.

JIMÉNEZ-BONILLA, P.; WANG, Y. *In situ* biobutanol recovery from clostridial fermentations: a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 469–482, 2018.

JOHNSON, E. A. Clostridia. In: SCHAECHTER, M. **Encyclopaedia of Microbiology**,

San Diego, Elsevier, p. 87–93, 2009.

JOHNSON, J. L. TOTH, J.; SANTIWATANAKUL, S.; CHEN, J.S. Cultures of *Clostridium acetobutylicum* from various collections comprise *Clostridium acetobutylicum*, *clostridium beijerinckii*, and two other distinct types based on dna-dna reassociation. **International journal of systematic bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 420–424, 1997.

JOHNSON, J. L.; FRANCIS, B. S. Taxonomy of the clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. **Journal of General Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 229–244, 1975.

JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-butanol fermentation revisited. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 484–524, 1986.

JONES, D. T.; KEIS, S. Origins and relationships of industrial solvent-producing clostridial strains. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, n. 3, p. 223–232, 1995.

JONES, D. T.; KEIS, S. Species and Strain Identification Methods. In: DÜRRE, P. **Handbook on clostridia**. Florida, Taylor & Francis, p. 3-23, 2005.

JUNELLES, A.-M.; JANATI-IDRISSI, R.; EL KANOUNI, A.; PETITDEMANGE, H.; GAY, R. Acetone-butanol fermentation by mutants selected for resistance to acetate and butyrate halogen analogues. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 3, p. 175–178, 1987.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 494–500, 1995.

KLABUNDE, J.; BISCHOFF, C.; PAPA, A. J. Propanols. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 1–14, 2018.

KIM, S.; LEE, S. B. Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 50, n. 1, p. 49–57, 2006.

KOÇAR, G.; CIVAŞ, N. An overview of biofuels from energy crops: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 28, p. 900–916, 2013.

KORKHIN, Y.; KALB, A. J.; PERETZ, M.; BOGIN, O.; BURSTEIN, Y.; FROLOW, F. NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and

cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, n. 5, p. 967–981, 1998.

KOVÁCS, K.; WILLSON, B. J.; SCHWARZ, K.; HEAP, J. T.; JACKSON, A.; BOLAM, D. N.; WINZER, K.; MINTON, N. P. Secretion and assembly of functional mini-cellulosomes from synthetic chromosomal operons in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 117, 2013.

KOVARIK, B. **Henry Ford, Charles Kettering and the Fuel of the Future**. Disponível em: <<http://www.environmentalhistory.org/billkovarik/about-bk/research/henry-ford-charles-kettering-and-the-fuel-of-the-future/>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

LAPUERTA, M.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; CAMPOS-FERNÁNDEZ, J.; DORADO, M. P. Stability, lubricity, viscosity, and cold-flow properties of alcohol–diesel blends. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 8, p. 4497–4502, 2010.

LEE, S. Y.; PARK, J. H.; JANG, S. H.; NIELSEN, L. K.; KIM, J.; JUNG, K. S. Fermentative butanol production by Clostridia. **Biotechnology and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 209–28, 2008.

LEE, J. Y.; JANG, Y. S.; LEE, J.; PAPOUTSAKIS, E. T.; LEE, S. Y. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* M5 for highly selective butanol production. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 10, p. 1432–1440, 2009.

LEE, J. Y.; JANG, Y. S.; CHOI, S. J.; IM, J. A.; SONG, H.; CHO, J. H.; SEUNG, D. Y.; PAPOUTSAKIS, E. T.; BENNETT, G. N.; LEE, S. Y. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for isopropanol-butanol-ethanol fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1416–23, 2012.

LEE, S. Y.; MERMELSTEIN, L. D.; BENNETT, G. N.; PAPOUTSAKIS, E. T. Vector construction, transformation, and gene amplification in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 665, p. 39–51, 1992.

LEHMANN, D.; HÖNICKE, D.; EHRENREICH, A.; SCHMIDT, M.; WEUSTER-BOTZ, D.; BAHL, H.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Physiological effects of disrupting the acetate

and acetone formation pathways. **Applied Genetics And Molecular Biotechnology**, v. 94, p. 743–754, 2012.

LEPAGE, C.; FAYOLLE, F.; HERMANN, M.; VANDECASTEELE, J.P. Changes in membrane lipid composition of *Clostridium acetobutylicum* during Acetone-Butanol Fermentation: effects of solvents, growth temperature and pH. **Microbiology**, v. 133, n. 1, p. 103–110, 1987.

LI, Q.; CHEN, J.; MINTON, N. P.; ZHANG, Y.; WEN, Z.; LIU, J.; YANG, H.; ZENG, Z.; REN, X.; YANG, J.; GU, Y.; JIANG, W.; JIANG, Y.; YANG, S. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 7, p. 961–972, 2016.

LONG, S.; JONES, D. T.; WOODS, D. R. The relationship between sporulation and solvent production in *Clostridium acetobutylicum* P262. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 8, p. 529–534, 1984.

LOWE, S. E.; JAIN, M. K.; ZEIKUS, J. G. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. **Microbiological reviews**, v. 57, n. 2, p. 451–509, 1993.

LUCON, O.; GOLDEMBERG, J. Energias renováveis: um futuro sustentável. **Revista USP**, v. 72, p. 6–15, 2007.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W. B. Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 1–16, 2015.

LÜTKE-EVERSLOH, T.; BAHL, H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: Recent advances to improve butanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 634–647, 2011.

LÜTKE-EVERSLOH, T. Application of new metabolic engineering tools for *Clostridium acetobutylicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 13, p. 5823–5837, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. In: **Microbiologia de Brock**. São Paulo, Pearson Education do Brasil, 2010.

MAO, S.; LUO, Y.; ZHANG, T.; LI, J.; BAO, G.; ZHU, Y.; CHEN, Z.; ZHANG, Y.; LI, Y.; MA, Y. Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type

Clostridium acetobutylicum DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 6, p. 3046–3061, 2010.

MARIANO, A. P.; QURESHI, N.; FILHO, R. M.; EZEJI, T. C. Bioproduction of butanol in bioreactors: New insights from simultaneous in situ butanol recovery to eliminate product toxicity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 8, p. 1757–1765, 2011.

MARSCHALL, L.; SAGMEISTER, P.; HERWIG, C. Tunable recombinant protein expression in *E. coli*: promoter systems and genetic constraints. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 501–512, 2017.

MATTA-EL-AMMOURI, G.; JANATI-IDRISSI, R.; JUNELLES, A.; PETITDEMANGE, H.; GAY, R. Effects of butyric and acetic acids on acetone-butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. **Biochimie**, v. 69, n. 2, p. 109–115, 1987.

MCCOY, E.; FRED, E. B.; PETERSON, W. H.; HASTINGS, E. G. A cultural study of the acetone butyl alcohol organism. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford University Press, 1926. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/30083289>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

MCNEIL, B.; KRISTIANSEN, B. The Acetone Butanol Fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 31, p. 61–92, 1 jan. 1986.

MENG, H.; WANG, J.; XIONG, Z.; XU, F.; ZHAO, G.; WANG, Y. Quantitative Design of Regulatory Elements Based on High-Precision Strength Prediction Using Artificial Neural Network. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e60288, 2013.

MERMELSTEIN, L. D.; WELKER, N. E.; BENNETT, G. N.; PAPOUTSAKIS, E. T. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Nature Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 190–195, 1992.

MERMELSTEIN, L. D.; PAPOUTSAKIS, E. T. In Vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* Phage +3T I Methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1077–1081, 1993.

METZGER, M. J.; MCCONNELL-SMITH, A.; STODDARD, B. L.; MILLER, A. D. Single-strand nicks induce homologous recombination with less toxicity than double-strand breaks using an AAV vector template. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 3, p. 926–935, 2011.

MINGARDON, F.; CHANAL, A.; TARDIF, C.; FIEROBE, H. The issue of secretion in heterologous expression of *Clostridium cellulolyticum* cellulase-encoding genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2831–8, 2011.

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578–597, 2010.

NAIR, R. V.; PAPOUTSAKIS, E. T. Expression of plasmid-encoded *aad* in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 18, p. 5843–6, 1 set. 1994.

NAIR, R. V.; GREEN, E. M.; WATSON, D. E.; BENNETT, G. N.; PAPOUTSAKIS, E. T. Regulation of the *sol* locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 1, p. 319–30, 1999.

NDABA, B.; CHIYANZU, I.; MARX, S. n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 1–9, 2015.

NI, Y.; SUN, Z. Recent progress on industrial fermentative production of acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 415–423, 2009.

NIELSEN, D. R.; PRATHER, K. J. In situ product recovery of *n*-butanol using polymeric resins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 811–821, 2009.

NÖLLING, J.; BRETON, G.; OMELCHENKO, M. V.; MAKAROVA, K. S.; ZENG, Q.; GIBSON, R. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4823–38, 2001.

NUYTS, S.; VAN MELLAERT, L.; THEYS, J.; LANDUYT, W.; LAMBIN, P.; ANNÉ, J. Increasing specificity of anti-tumor therapy: cytotoxic protein delivery by non-pathogenic clostridia under regulation of radio-induced promoters. **Anticancer research**, v. 21, n. 2A, p. 857–61, 2001.

O'BRIEN, R. W.; MORRIS, J. G. Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of General Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 307–318, 1971.

OSBURN, O. L.; BROWN, R. W.; WERKMAN, C. H. The butyl alcohol-isopropyl alcohol fermentation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 121, p. 685–695, 1937.

PAPOUTSAKIS, E. T. Engineering solventogenic clostridia. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 420–429, 2008.

PASTEUR, L. Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre et déterminant des fermentations. **Académie des Sciences**, Institut de France, Paris, p. 344–347, 1861.

PERALTA-YAHYA, P. P.; KEASLING, J. D. Advanced biofuel production in microbes. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 2, p. 147–162, 2010.

PETERSEN, D. J.; Cary, J. W.; Vanderleyden, J.; Bennett, G. N. Sequence and arrangement of genes encoding enzymes of the acetone-production pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Gene**, v. 123, n. 1, p. 93–97, 1993.

PETITDEMANGE, H.; CHERRIER, C.; RAVAL, G.; GAY, R. Regulation of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductases in Clostridia of the butyric group. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 421, n. 2, p. 334–347, 1976.

PYNE, M. E.; MOO-YOUNG, M.; CHUNG, D. A.; CHOU, C. P. Development of an electrotransformation protocol for genetic manipulation of *Clostridium pasteurianum*. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, 2013.

PYNE, M. E.; BRUDER, M.; MOO-YOUNG, M.; CHUNG, D. A.; CHOU, C. P. Technical guide for genetic advancement of underdeveloped and intractable *Clostridium*. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 3, p. 623–41, 2014.

QURESHI, N.; MADDOX, I. S. Continuous production of acetone-butanol-ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid-liquid extraction. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 2, p. 185–189, 1995.

QURESHI, N.; MEAGHER, M.M.; HUANG, J.; HUTKINS, R.W. Acetone butanol ethanol (ABE) recovery by pervaporation using silicalite–silicone composite membrane from fed-batch reactor of *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Membrane Science**, v. 187, n. 1–2, p. 93–102, 2001.

QURESHI, N.; HUGHES, S.; MADDOX, I. S.; COTTA, M. A. Energy-efficient recovery of butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, n. 4, p. 215–222, 2005.

RAKOPOULOS, D. C. Comparison of combustion, performance, and emissions of hsd diesel engine operating on blends of diesel fuel with ethanol, n-butanol, or butanol isomer ether DEE. **Journal of Energy Engineering**, v. 141, n. 2, p. C4014001, 2015.

RAKOPOULOS, D. C.; RAKOPOULOS, C. D.; GIAKOUMIS, E. G.; KOMNINOS, N. P.; KOSMADAKIS, G. M.; PAPAGIANNAKIS, R. G. Comparative evaluation of ethanol, n-butanol, and diethyl ether effects as biofuel supplements on combustion characteristics, cyclic variations, and emissions balance in light-duty diesel engine. **Journal of Energy Engineering**, v. 143, n. 2, p. 04-16, 2017.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; WRIGHT, J.; AGARWALA, V.; SCOTT, D. A.; ZHANG, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 2013.

RANSON, N. A.; WHITE, H. E.; SAIBIL, H. R. Chaperonins. **The Biochemical journal**, v. 333 (Pt 2), p. 233–42, 1998.

ROCHA, E. P.; DANCHIN, A.; VIARI, A. Universal replication biases in bacteria. **Molecular microbiology**, v. 32, n. 1, p. 11–6, 1999.

ROOD, J; MCCLANE, B; SONGER, J; TITBALL, R. In: **The Clostridia-Molecular Biology and Pathogenesis**. 1th. ed. Melbourne, Australia: Academic Press, 1997.

SALEH-GOHARI, N.; HELLEDAY, T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 12, p. 3683–3688, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH E. F. & MANIATIS T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGEETA, S. M.; PANDE, M.; RANI, M.; GAKHAR, R.; SHARMA, M.; RANI, J.; BHACKARWAR, A. N. Alternative fuels: An overview of current trends and scope for future. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 697–712, 2014.

SAUER, U.; DÜRRE, P. Differential induction of genes related to solvent formation during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture of *Clostridium acetobutylicum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, n. 1, p. 115–120, 1995.

SCOTCHER, M. C.; RUDOLPH, F. B.; BENNETT, G. N. Expression of *abrB310* and *SinR*, and effects of decreased *abrB310* expression on the transition from acidogenesis to solventogenesis, in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1987–95, 1 abr. 2005.

SHAO, L.; HU, S.; YANG, Y.; GU, Y.; CHEN, J.; YANG, Y.; JIANG, W.; YANG, S. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*. **Cell Research**, v. 17, n. 11, p. 963–965, 2007.

SCHLITTLER, L. A. F. S. **BETA 1-4 Biotecnologia - Sobre**. Disponível em: <<http://beta1-4.com.br/sobre/>>. Acesso em: 3 set. 2017.

SHINTO, H.; TASHIRO, Y.; KOBAYASHI, G.; SEKIGUCHI, T.; HANAI, T.; KURIYA, Y.; OKAMOTO, M.; SONOMOTO, K. Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone–butanol–ethanol fermentation. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1452–1461, 2008.

SHINTO, H.; TASHIRO, Y.; YAMASHITA, M.; KOBAYASHI, G.; SEKIGUCHI, T.; HANAI, T.; KURIYA, Y.; OKAMOTO, M.; SONOMOTO, K. Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone–butanol–ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 1, p. 45–56, 2007.

SIEMERINK, M. A. J.; KUIT, W.; CONTRERAS, A. M. L.; EGGINK, G.; VAN DER OOST, J.; KENGEN, S. W. M. D-2,3-butanediol production due to heterologous expression of an acetoin reductase in *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 8, p. 2582–8, 2011.

SILLERS, R.; CHOW, A.; TRACY, B.; PAPOUTSAKIS, E. T. Metabolic engineering of the non-sporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of the electron balance. **Metabolic engineering**, v. 10, n. 6, p. 321–32, 2008.

SILLERS, R.; AL-HINAI, M. A.; PAPOUTSAKIS, E. T. Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. **Biotechnology and bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 38–49, 2009.

SHMAKOV, S.; SMARGON, A.; SCOTT, D.; COX, D.; PYZOCHA, N.; YAN, W.; ABUDAYYEH, O. O.; GOOTENBERG, J. S.; MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; SEVERINOV, K.; ZHANG, F.; KOONIN, E. V. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 169–182, 2017.

SOKHANSANJ, S.; TURHOLLOW, A.; CUSHMAN, J.; CUNDIFF, J. Engineering aspects of collecting corn stover for bioenergy. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 5, p. 347–355, 2002.

SOREK, R.; LAWRENCE, C. M.; WIEDENHEFT, B. CRISPR-Mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 237–266, 2013.

SPRINGER, B. A.; SLIGAR, S. G. High-level expression of sperm whale myoglobin in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 8961–5, 1987.

STENSTRÖM, C. M.; JIN, H.; MAJOR, L. L.; TATE, W. P.; ISAKSSON, L. A. Codon bias at the 3'-side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 263, n. 1–2, p. 273–284, 2001.

STEPHENS, G. M.; HOLT, R. A.; GOTTSCHAL, J. C.; MORRIS, J. G. Studies on the stability of solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 58, n. 6, p. 597–605, 1985.

SULLIVAN, L.; BENNETT, G. N. Proteome analysis and comparison of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Spo0A strain variants. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 298–308, 2006.

TAO, L.; HE, X.; TAN, E. C. D.; ZHANG, M.; ADEN, A. Comparative techno-economic analysis and reviews of n-butanol production from corn grain and corn stover. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 8, n. 3, p. 342–361, 2014.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG Jr., J. C. Effects of ethanol concentration and stripping temperature on continuous fermentation rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 311–316, 1997.

TAYLOR, C. P.; TUMMALA, S.; MOLRINE, D.; DAVIDSON, L.; FARRELL, R. J.; LEMBO, A.; HIBBERD, P. L.; LOWY, I.; KELLY, C. P. Open-label, dose escalation phase I study in healthy volunteers to evaluate the safety and pharmacokinetics of a human monoclonal antibody to *Clostridium difficile* toxin A. **Vaccine**, v. 26, n. 27–28, p. 3404–9, 2008.

TERRACCIANO, J. S.; KASHKET, E. R. Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 86–91, 1986.

TOLIA, N. H.; JOSHUA-TOR, L. Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. **Nature Methods**, v. 3, n. 1, p. 55–64, 2006.

TSUEY, L. S.; ARIFF, A. B.; MOHAMAD, R.; RAHIM, R. A. Improvements of GC and HPLC analyses in solvent (acetone-butanol-ethanol) fermentation by *Clostridium saccharobutylicum* using a mixture of starch and glycerol as carbon source. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, n. 4, p. 293–298, 2006.

THORMANN, K.; FEUSTEL, L.; LORENZ, K.; DÜRRE, P.; NAKOTTE, S. Control of butanol formation in *Clostridium acetobutylicum* by transcriptional activation. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 7, p. 1966–1973, 2002.

TOMAS, C. A.; WELKER, N. E.; PAPOUTSAKIS, E. T. Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4951–4965, 2003.

TRACY, B. P.; JONES, S.W.; FAST, A.G.; INDURTHI, D.C.; PAPOUTSAKIS, E.T. Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 364–81, 2012.

TUMMALA, S. B.; WELKER, N. E.; PAPOUTSAKIS, E. T. Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3793–9, 1999.

TUMMALA, S. B.; WELKER, N. E.; PAPOUTSAKIS, E. T. Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 1923–1934, 2003.

VANE, L. M. Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 6, p. 553–588, 2008.

WALTER, K. A.; NAIR, R. V.; CARY, J. W.; BENNETT, G. N.; PAPOUTSAKIS, E. T. Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Gene**, v. 134, n. 1, p. 107–111, 1993.

WANG, Y.; ZHANG, Z. T.; SEO, S. O.; CHOI, K.; LU, T.; JIN, Y. S.; BLASCHEK, H. P. Markerless chromosomal gene deletion in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR/Cas9 system. **Journal of Biotechnology**, v. 200, 2015.

YAN, Y.; LIAO, J. C. Engineering metabolic systems for production of advanced fuels. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 471–479, 2009.

YANG, X.; TSAO, G. T. Enhanced acetone-butanol fermentation using repeated fed-batch operation coupled with cell recycle by membrane and simultaneous removal of inhibitory products by adsorption. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, n. 4, p. 444–450, 1995.

YASUI, K.; KANO, Y.; TANAKA, K.; WATANABE, K.; SHIMIZU-KADOTA, M.; YOSHIKAWA, H.; SUZUKI, T. Improvement of bacterial transformation efficiency using plasmid artificial modification. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 1, p. e3, 2009.

YU, M.; ZHANG, Y.; TANG, I.; YANG, S. T. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 4, p. 373–382, 2011.

ZHANG, Y.; MA, Y.; YANG, F.; ZHANG, C. Continuous acetone–butanol–ethanol production by corn stalk immobilized cells. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 1117–1121, 2009.

ZEIKUS, J. G. Importance of hydrogen metabolism in regulation of solventogenesis by *Clostridium acetobutylicum*. **Developments in industrial microbiology**, v. 2, n. 1, p. 64–68, 1985.

10. PATENTE



08/08/2017 870170056958
19:03



03.158.8.6.17.0696481.1

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 017042 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: BETA 1-4 CONSULTORIA E DESENVOLVIMENTO DE
TECNOLOGIAS QUÍMICAS E BIOTECNOLÓGICAS LTDA.

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 11697466000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Microempresa assim definida em lei

Endereço: Av. Henrique Dodsworth, 133/1408 - Copacabana

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 22061-030

País: Brasil

Telefone: 552125230231

Fax:

Email: las@beta1-4.com.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 08/08/2017 às 19:03, Petição 870170056958

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO PARA MODIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS, VETOR PARA MODIFICAR CÉLULA DE BACTÉRIAS, USO DE BACTÉRIAS
Resumo: A PRESENTE INVENÇÃO OBJETIVA PROVIDER PROCESSO PARA MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO CLOSTRIDIUM NÃO PATOGÊNICAS, PREFERENCIALMENTE BACTÉRIAS DO GÊNERO CLOSTRIDIUM PRODUTORES DE ÁLCOOL, QUE EM SEGUIDA, SERÃO USADAS PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS A PARTIR DE FERMENTAÇÃO DE BIOMASSA EM QUE AS REFERIDAS BACTÉRIAS SÃO MODIFICADAS GENETICAMENTE ATRAVÉS DA DELEÇÃO DOS GENES PTA E BUK E DA INSERÇÃO DO GENE SADH.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Ana Cristina Almeida Muller

Numero OAB:

Numero API: 1421

CPF/CNPJ: 02192408765

Endereço: Avenida Almirante Barroso, 52, 33º andar - Centro

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20031-000

Telefone: (21) 3824-5757

Fax: (21) 3824-5740

Email: mail@bmapi.com.br

Escritório:

Nome ou Razão Social: BM&A Propriedade Intelectual Ltda

CPF/CNPJ: 10443525000155