





"MÉTODO PARA FERMENTAR ANAEROBICAMENTE GLICEROL PARA PRODUZIR UM PRODUTO; E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE 1,2-PDO".

PEDIDOS RELACIONADOS ANTERIORES

5 Este pedido reivindica a prioridade dos pedidos provisórios anteriores U.S. 60/788.512, depositado em 31 de março de 2006, e 60/867.581, depositado em 28 de novembro de 2006, ambos aqui integralmente incorporados por referência.

DECLARAÇÃO DE PESQUISA COM PATROCÍNIO FEDERAL

10 Esta invenção foi patrocinada em parte com verbas governamentais e o Governo Americano pode ter certos direitos na invenção.

REFERENCIA A APÊNDICE MICROFILMADO

Não aplicável

CAMPO DA TÉCNICA

15 A invenção refere-SE ao desenvolvimento de condições de cultivo apropriadas para o crescimento fermentativo de bactérias (isto é, na ausência de receptores de elétrons) em um substrato de glicerol. A invenção tem usos particulares para o desenvolvimento de métodos e cepas  
20 capazes de converter glicerol em produtos de maior valor, como etanol, hidrogênio, formato, succinato e 1,2-propanodiol.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

25 Grandes quantidades de glicerol são produzidas como um subproduto da produção de biodiesel, e se prevê que a produção de glicerol continue a aumentar por causa do tremendo crescimento global na produção de biodiesel. O

atual excesso de glicerol já resultou em uma redução de ~10 vezes no preço nos últimos dois anos.

Glicerol bruto, portanto, tornou uma fonte de carbono atraente para processos de fermentação, em parte por causa de seu baixo custo. Não apenas o glicerol é abundante, mas seu estado mais reduzido, em comparação com açúcares celulósicos, promete um aumento significativo no rendimento de produto de substâncias químicas cuja produção a partir de açúcares seja limitada pela disponibilidade de equivalentes redutores. Tirar vantagem do estado mais reduzido do carbono no glicerol requeriria o uso de fermentações anaeróbicas (isto é, de outra forma, o receptor de elétrons "tirará" elétrons, em vez de serem "depositados" no produto desejado, incluindo combustíveis ou compostos reduzidos). O potencial de uso do glicerol como uma fonte de carbono em processos de fermentação poderia ser prejudicado, entretanto, pela incapacidade de microorganismos industriais, como *Escherichia coli* (o cavalo de batalha da moderna biotecnologia), de fermentarem glicerol na ausência de receptores de elétrons externos. A capacidade de fermentar glicerol se restringe a muito poucos organismos, a maioria deles incapazes de aplicação industrial devido à patogenicidade, exigência de condições anaeróbicas estritas, falta de conhecimento fisiológico e ferramentas genéticas para sua modificação e elevadas exigências nutricionais.

O glicerol pode ser diretamente oxidado pela enzima glicerol desidrogenase (GldA, codificada por *gldA*)

GldA, que é caracterizada como uma glicerol desidrogenase do tipo II (glyDH-II), seja críptica ou não expressada em cepas do tipo selvagem de E. coli. A ativação de GldA em E. coli requeria a inativação de glpK, glpR e glpD seguida por um procedimento de mutagênese e seleção, que resultava em uma cepa mutante que recuperava sua capacidade de metabolizar glicerol (Jin et al., 1983; Tanh et al., 1982a, b). Entretanto, mesmo nessa cepa mutante, GldA não confere a E. coli a capacidade de metabolizar fermentativamente glicerol (Jin et al., 1983; Tanh et al., 1982a, b).

O que se precisa na técnica é de um método de bioconversão do excesso global de glicerol barato em outras substâncias químicas de matéria-prima. O método seria especialmente vantajoso caso se baseasse em fermentação anaeróbica para tirar vantagem do estado mais reduzido do carbono no glicerol. Um processo anaeróbico também ofereceria vantagens de custo, pois seus processos aeróbicos correspondentes requerem maiores investimentos de capital e exibem maiores custos operacionais.

20

#### EXPOSIÇÃO DA INVENÇÃO

Descobrimos que E. coli é, de fato, capaz de fermentar glicerol na ausência de receptores de elétrons sob certas condições. Nossos achados representam um novo paradigma para fermentação de glicerol em E. coli e outras bactérias entéricas e permitem o desenvolvimento de plataformas microbianas para converter glicerol bruto de baixo valor substâncias químicas e combustíveis de maior

25

Descreve-se um método de fermentação de glicerol em que o pH, concentração de CO<sub>2</sub>, concentração de glicerol, concentração de potássio, concentração de fosfato e concentrações de hidroxiacetona (HA) são controlados para  
5 permitir o metabolismo fermentativo de glicerol em precursores químicos desejados.

Uma fermentação de glicerol aperfeiçoada pode ser obtida quando o pH é quase neutro a levemente ácido. Em uma modalidade preferida, o pH é de 5,5-7,5, mais preferivelmente  
10 o pH é de 6,0-6,5, em uma modalidade mais preferida, o pH é de cerca de 6,3.

As concentrações de CO<sub>2</sub> estão inevitavelmente ligadas ao pH e diminuem quando o pH aumenta, porque o CO<sub>2</sub> é convertido em bicarbonato, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Aumentando-se o CO<sub>2</sub> para 20  
15 - 30%, os efeitos negativos de um pH aumentado acima de 7,0 podem ser reduzidos. Observou-se uma melhor fermentação de glicerol com pH 6,3 e 10% de CO<sub>2</sub>, pH 7,5 e 20% de CO<sub>2</sub>. Maiores concentrações de CO<sub>2</sub> também são benéficas.

Dado o estado altamente reduzido do carbono no glicerol, a manutenção de um equilíbrio redox se torna muito  
20 "delicada", porque a incorporação de glicerol na massa celular resulta na geração líquida de equivalentes redutores. H<sub>2</sub> serve de doador de elétrons em várias reações (por exemplo, fumarato redutase) e, portanto, compensa o  
25 equilíbrio redox. Se a concentração de H<sub>2</sub> for diminuída, isso não acontece, e a fermentação de glicerol se processa de maneira ótima. Aumentando-se o espaço superior, o H<sub>2</sub> foi

lavagem do espaço superior com gás inerte ou CO<sub>2</sub> remove o excesso de H<sub>2</sub> e aumenta ainda mais a fermentação de glicerol. Borrifar ou borbulhar gás através da cultura remove a maior parte do H<sub>2</sub> e proporciona as melhores 5 condições de fermentação de glicerol.

Uma melhor fermentação de glicerol pode ser obtida quando as concentrações de matéria-prima de glicerol são altas, por exemplo, maiores que 5 ou 10 g/L, ou mesmo maiores (25 g/L, 50 g/L, 75 g/L, 100 g/L). Em uma modalidade 10 preferida, as concentrações de glicerol são maiores que 100 g/L.

Uma melhor fermentação de glicerol pode ser obtida com baixas concentrações de potássio e de fosfato. As concentrações de potássio eram, de preferência, menores que 15 10 mM, mais preferivelmente menores que 5 ou 2 mM e, o mais preferivelmente, menores que 0,6 mM. As concentrações de fosfato eram, de preferência, menores que 50 mM, mais preferivelmente menores que 25 ou 10 mM. Mais preferivelmente, são menores que 5 mM e, o mais preferivelmente, menores que 20 1,3 mM. Baixos fosfato e potássio favorecem a operação das vias de glicerol desidrogenase-diidroxiacetona quinase e 1,2-PDO, esta última permitindo condições equilibradas de redox.

A suplementação da cultura com HA (pelo menos 10, 25 20 ou 30 mM) melhorou ainda mais as condições da cultura. A suplementação com triptona não foi requerido, quando a cultura foi suplementada com HA.

Em uma modalidade, a fermentação de glicerol foi otimizada por cultivo de *E. coli* com 10 g/L de glicerol a pH 6,3 com 0,6 mM de potássio e 1,3 mM de fosfato a 37°C, enquanto se borrifava com CO<sub>2</sub>, Ar ou N<sub>2</sub>.

5 Em outras modalidades, a invenção pode ser usada para aplicações específicas como a síntese de produtos finais desejados, como succinato, etanol, formato ou hidrogênio e 1,2-PDO usando-se glicerol como a fonte de carbono.

10

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIGURA 1. Fermentação de glicerol por *E. coli* MG1655 em meio mínimo (MM) suplementado com 2 g/L de triptona. Crescimento celular (▲), consumo de glicerol (■) e acumulação de etanol (●), succinato (□) e formato mais acetato (□).

15

FIGURA 2. Efeito da concentração de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e glicerol. Na<sup>+</sup> (34 mM), K<sup>+</sup> (128 mM) e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (98 mM) foram adicionados ao meio conforme indicado. A menos que indicado de outra forma, os experimentos foram conduzidos a pH 7,5, 20 37°C, 10 g/L de glicerol, 2 g/L de triptona e lavagem do espaço superior com argônio. Mostram-se a fermentação de glicerol (linha) e o crescimento celular (barras): a cor da barra indica pH 6,3 (cinza) ou 7,5 (branca).

20

FIGURA 3. Um novo paradigma para fermentação de 25 glicerol em *E. coli* e outras bactérias entéricas que possuem uma glyDH do tipo II. A via proposta para a conversão de glicerol no intermediário glicolítico DHAP em *E. coli* é

25

FIGURA 4. Co-produção de etanol (linha)-H<sub>2</sub> (barras cheias) e etanol (linha)-ácido fórmico (barras abertas) durante a fermentação de glicerol. (I) MG1655: pH 6,3, Argônio; (II)  $\Delta$ hycB: pH 7,5, Argônio. HycB é um componente  
5 requerido do sistema FHL.

FIGURA 5. Produção de ácido succínico a partir de glicerol: (I) MG1655: pH 6,3, Argônio; (II) MG1655: pH 6,3, 10%CO<sub>2</sub>, (III) MG1655: pH 7,5, 20% CO<sub>2</sub>; e (IV)  $\Delta$ dhaKLM(pZSKLcf): pH 7,5, 20% CO<sub>2</sub>. O plasmídeo pZSKLcf  
10 expressa Subunidades DhaKL da DHA quinase de *C. freundii*.

#### MELHOR MODO DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

A invenção apresenta um novo método de fermentação de glicerol com bactérias para produzir compostos químicos úteis.

15 Um gene "críptico" é um que não seja expresso ou cujas condições para a expressão do gene sejam desconhecidas.

"Desproporcionar" é oxidar e reduzir.

Os termos "disrupção" e "cepas de disrupção",  
20 conforme aqui usados, referem-se a cepas celulares em que o gene nativo ou promotor tenha sofrido mutação, esteja deletado, interrompido ou regulado negativamente, de modo a diminuir a atividade da enzima codificada por ele. Um gene está completamente (100%) reduzido por eliminação ou remoção  
25 da seqüência de DNA genômico inteira. O uso de uma mutação de deslocamento de quadro, códon de parada precoce, mutações pontuais de resíduos críticos ou deleções ou inserções e

impedindo completamente a transcrição e/ou tradução da proteína ativa.

"Dissimilação" é o processo metabólico pelo qual organismos convertem substâncias em compostos excretados.

5 O termo "exógeno" indica que a proteína ou ácido nucléico é uma molécula não nativa introduzida de fora do organismo ou sistema, sem referência à espécie de origem. Por exemplo, um peptídeo exógeno pode ser aplicado à cultura celular; um RNA exógeno pode ser expressado por um DNA  
10 recombinante transfectado em uma célula; ou um gene nativo pode estar sob o controle de seqüências reguladoras exógenas.

"Fermentação" significa o metabolismo ou dissimilação de uma fonte de carbono na ausência completa de  
15 receptores de elétrons externos: nenhuma oxigênio, nenhum nitrato, e outros.

"Via funcional de 1,2-propanodiol" significa que as bactérias expressam funcionalmente os genes (e, portanto, as enzimas) necessários para preparar 1, 2-PDO por uma ou  
20 mais vias diferentes. Por exemplo, genes funcionais de *mgsA* (metilglioxal sintetase: MGS), *yeaE*, *yghZ* e *yafB* (aldo-ceto redutase: AKR), *gldA* (glicerol desidrogenase, GldA) são todos requeridos. Uma distinção importante é que um dado organismo poderia ter os genes/enzimas de uma via  
25 específica, mas a via ser críptica.

"Via funcional da glicerol desidrogenase do tipo II-diidroxiacetona quinase" significa que as bactérias têm

partir de glicerol na ausência de receptores de elétrons externos por conversão de glicerol em DHA em DHAP. Por exemplo, as bactérias têm de ter GldA (gldA) e DHA quinase ativas (DHAK: dhaKLM).

5                   “Via funcional da  $F_0F_1$  ATP sintetase” significa que as bactérias têm todas as enzimas necessárias para acoplar a síntese de ATP com a bomba de prótons. Por exemplo, as bactérias têm de ter óperons atp funcionando, incluindo atpF e atpD.

10                   “Via funcional da formato-hidrogênio liase (FHL)” significa que as bactérias têm todas as enzimas necessárias para desproporcionar formato em  $CO_2$  e hidrogênio. Por exemplo, formato desidrogenase ativa (por exemplo, FDH-F: fdhF) e hidrogenase 3 (óperons hyc).

15                   “Via funcional de 1, 3-propanodiol” significa os genes ou enzimas requeridos para preparar 1,3-PDO. Por exemplo, glicerol desidratase (GD) e/ou 1,3-PDO redutase (1,3-PDOR) estão inativas ou ausentes em uma célula desprovida da via funcional de 1, 3-propanodiol.

20                   “Glicerol” é descrito em NCBI™ PubChem nº 753 e CAS Reg nº 56-81-5, aqui incorporados por referência.

                  “Superexpressado” significa que o gene (ou proteína) está modificado para ter atividade aumentada em comparação com o tipo selvagem. Isso pode ser feito por  
25                   adição de mais cópias de um gene em uma célula, por mutação do gene para deletar seqüências inibitórias, por remoção de inibidores ou por alteração da proteína para aumentar a

Conforme aqui usado, "recombinante" refere-se a, é derivado de ou contém material manipulado geneticamente.

"Atividade reduzida" ou "inativar" é aqui definido como sendo uma redução de pelo menos 75% na atividade da proteína, em comparação com uma espécie de controle apropriada. De preferência, uma redução de atividade de pelo menos 80, 85, 90 ou 95% é atingida e, na modalidade mais preferida, a atividade é eliminada (100%). As proteínas podem ser inativadas com inibidores, por mutação ou por supressão da expressão ou tradução e outros. "Mutante nulo" ou "mutação nula" significa que a atividade da proteína é completamente inativada. Em um exemplo, o plasmídeo de controle é inserido sem o gene de interesse. Em outro exemplo, o gene de interesse é completamente removido por recombinação. Além disso, o gene de interesse pode ser removido por inativação, mutação ou truncamento, o que elimina a atividade.

Os termos "succinato" e "ácido succínico" e "formato" e "ácido fórmico" são aqui usados de maneira intercambiável. As presentes substâncias químicas podem ser encontradas na base de dados da NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE<sup>®</sup> PUBCHEM<sup>™</sup> ([pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)) aqui incorporada por referência. Vias metabólicas bacterianas podem ser encontradas em Principles of Biochemistry 2<sup>a</sup> ed., de Lehninger (1993), aqui incorporado por referência, assim como muitos outros textos de bioquímica.

Tabela 1. Genes e Enzimas

Gene	(Abreviação) Nome da proteína (Acc. No.)
adhE	acetaldeído-CoA desidrogenase (GenBank n° NP_415757)
atpD	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATP sintetase subunidade beta (GenBank n° NP_418188)
atpF	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATP sintetase subunidade B (GenBank n° NP_418192)
cydA	citocromo D terminal oxidase, subunidade I (GenBank n° NP_415261)
cyoB	citocromo O ubiquinol oxidase, subunidade I (GenBank n° NP_414965)
dhaK	(DHAK) diidroxiacetona quinase subunidade K (domínio N-terminal no GenBank n° NP_415718)
dhaK	(DHAK) diidroxiacetona quinase, subunidade 1 de <i>Citrobacter freundii</i> (GenBank n° AAB48843)
dhaL	(DHAL) diidroxiacetona quinase subunidade L (domínio C-terminal no GenBank n° NP_415717)
dhaM	(DHAM) diidroxiacetona quinase subunidade M (subunidade fosfotransferase fusionada em NP_415716)
fdhF	formato desidrogenase-H, FDH (subunidade selenopolipeptídio no GenBank n° NP_418503)
fixA	(ETF) flavoproteína de transferência de elétrons (GenBank n° NP_414583)
frdA	(Frd) fumarato redutase (GenBank n° NP_418578)
fucO	(FucO) L-1,2-propanodiol oxidoreductase (GenBank n° NP_417279)
gldA	(GDHA) glicerol desidrogenase (GenBank n° NP_418380)
glpA	sn-gliccrol-3-fosfato desidrogenase anaeróbica (GenBank n° NP_416744)

Tabela 1. Genes e Enzimas (continuação)

Gene	(Abreviação) Nome da proteína (Acc. No.)
glpD	sn-glicerol-3-fosfato desidrogenase aeróbica (GenBank n° NP_417884)
hycB	parte hidrogenase 3 do complexo formato hidrogênio liase (FHL) (subunidade Fe-S no GenBank n° NP_417204)
mgsA	metilglioxal sintetase (GenBank n° NP_415483)
pta	fosfato acetiltransferase (GenBank n° NP_416800)
trkA	componente de membrana periférica transportador de íon potássio (GenBank n° NP_417748)
yafB	2,5-diceto-D-gluconato redutase B (GenBank n° NP_414743)
yeaE	Aldo/ceto redutase (GenBank n° NP_754080)
yghZ	Aldo/ceto redutase (GenBank n° NP_417474)
dhaR	(dhaS ou dhaR) ativador transcricional do óperon dhaKLM do tipo HTH

## EXEMPLO 1: MATERIAIS E MÉTODOS

Em todo este pedido, mutantes de disrupção de gene são citados usando-se a seguinte nomenclatura:  $\Delta$ gene1 para uma disrupção simples do gene1 ou  $\Delta$ gene1 $\Delta$ gene2 para uma disrupção dupla.

E. coli K12 do tipo selvagem cepas MC4100 (ATCC 35695), W3110 (ATCC 27325), E. coli B do tipo selvagem (ATCC 11303) e as bactérias entéricas *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* NCDC 279-56 (ATCC 13047), *Buttiauxella agrestis*

richardii (ATCC 33998) foram obtidas na AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION<sup>®</sup>. As cepas recombinantes mutantes únicas  $\Delta$ pta,  $\Delta$ adhE,  $\Delta$ cydA,  $\Delta$ cyoB,  $\Delta$ frdA,  $\Delta$ fixA,  $\Delta$ glpA,  $\Delta$ glpD,  $\Delta$ mgsA,  $\Delta$ yeaE,  $\Delta$ yghZ,  $\Delta$ yafB,  $\Delta$ fucO,  $\Delta$ atpF,  $\Delta$ atpD,  $\Delta$ pykF e  
5  $\Delta$ hycB foram obtidas no Projeto Genoma de E. coli (Universidade de Wisconsin-Madison, www.genome.wisc.edu) ou construídas usando-se o método descrito por Datsenko e Wanner (2000). K12 cepa MG1655 (F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1) foi usada como o tipo selvagem para a criação de mutantes  
10 de disrupção de gene. As cepas  $\Delta$ gldA,  $\Delta$ dhaKLM e  $\Delta$ fdhF foram construídas tanto em MG1655, quanto em W3110 (ATCC 27325). Disrupções de múltiplos genes foram conseguidas por combinação de mutações únicas mediante uso de transdução de fago P1. Cada mutação foi adicionada à cepa uma de cada vez,  
15 após a remoção do cassete de canamicina.

Os plasmídios pZSKLM (que expressa subunidades DhaKLM de DHA quinase de E. coli) e pZSKLcf (que expressa subunidades DhaKL de DHA quinase de Citrobacter freundii) foram gentilmente fornecidos pelo Dr. B. Erni, Universidade  
20 de Berna, Suíça (Bachler et al., 2005). O plasmídio pZSKLM\_gldA, que expressa as enzimas DHAK e GldA, foi construído da seguinte maneira. O quadro de leitura aberto completo do gene gldA, juntamente com seu sítio de ligação a ribossomo, foram amplificados por PCR. Os sítios PstI e MluI  
25 foram introduzidos mediante o primer em ambas as extremidades do produto de PCR para facilitar a clonagem do gene gldA a jusante do óperon dhaKLM no plasmídio pSZKLM.

com PstI e MluI, ligados, transformados em DH5 $\alpha$  e triados quanto a colônias positivas. Uma construção bem sucedida do plasmídeo foi verificada por PCR e mediante caracterização das atividades da enzima codificada. Os plasmídios foram transformados nas cepas de E. coli e selecionados em Luria Bertani (LB) suplementado com antibióticos apropriados.

Procedimentos padronizados de DNA recombinante foram usados para a clonagem, isolamento do plasmídeo, transdução do fago P1, eletroporação e reação em cadeia de polimerase (PCR) (Sambrook et al., 1989). As cepas foram mantidas em estoques de glicerol a 32,5% a -80°C. As placas foram preparadas usando-se meio LB contendo 1,5% de agar. Antibióticos e indutores foram incluídos quando apropriado nas seguintes concentrações: 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, 30  $\mu$ g/mL de cloranfenicol, 50  $\mu$ g/mL de canamicina e 12,5  $\mu$ g/mL de tetraciclina, 0,001-0,1 mM de IPTG e 100 ng/mL de anidrotetraciclina.

Usou-se o meio mínimo (MM) projetado por Neidhardt et al. (1974) suplementado com 0,03-0,2% de triptona, 5  $\mu$ M de selenita e 1,32 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em vez de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a menos que especificado de outra forma. O próprio MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanossulfônico) só foi incluído em experimentos conduzidos em tubos (veja abaixo) ou em experimentos em que não se usou nenhuma suplementação com triptona. Quando indicado, o meio foi suplementado com concentrações específicas dos seguintes compostos: fosfatos de sódio e potássio monobásico e dibásico, fosfatos de amônio

cloreto de potássio, sulfato de potássio, L-aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas. Todas as substâncias químicas foram obtidas na SIGMA-ALDRICH® Co. (St Louis, MS), a menos que especificado de outra forma.

5                    Todos os experimentos foram conduzidos sob condições anaeróbicas e, a menos que indicado de outra forma, a 37°C. Experimentos em tubos foram conduzidos em tubos anaeróbicos lacrados (tubos HUNGATE™: BELLCO GLASS® Inc., NJ, USA) completamente cheios de meio ou continuamente  
10    borrifados com argônio (pH inicial de 7,2). Os sistemas de fermentação e sua operação sob condições anaeróbicas, juntamente com técnicas de preparação de inóculo, foram descritos em outro lugar (Dharmadi et al., 2006).

                  Antes do uso, as culturas de estoque (armazenadas  
15    como estoques de glicerol a -80°C) foram espalhadas sobre placas LB e incubadas durante uma noite a 37°C em um jarro anaeróbico OXOID™ com o kit de geração de gás CO<sub>2</sub> (OXOID® Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK). Usou-se uma única colônia para inocular tubos HUNGATE™ de 17,5 mL completamente  
20    cheios de meio (MM suplementado com 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de glicerol). Os tubos foram incubados a 37°C até se atingir uma OD<sub>550</sub> de ~0,4. Um volume apropriado dessa pré-cultura de crescimento ativo foi centrifugado, e a pelota foi lavada e usada para inocular  
25    350 mL de meio em cada fermentador, com a densidade óptica de partida alvo de 0,05 a 550 nm.

                  As fermentações foram conduzidas em um sistema de

Suíça) com seis recipientes de 500 mL de volume de trabalho e controle independente de temperatura, pH e velocidade do agitador (200 rpm.). O sistema estava completamente equipado e controlado por computador usando-se o software do fabricante IRIS NT. Cada recipiente foi equipado com um condensador para evitar a evaporação, que foi operado com um suprimento de metanol-água de resfriamento a 0°C. As condições anaeróbicas foram mantidas por lavagem do espaço superior com argônio de pureza ultra-alta (MATHESON TRI-GAS<sup>®</sup>, Inc., Houston, TX) a 0,01 LPM. Um coletor de oxigênio (ALLTECH ASSOCIATES<sup>®</sup>, Inc., Deerfield, IL) foi usado para eliminar vestígios de oxigênio da corrente gasosa. Para manter a esterilidade, filtros HEPA de 0,2 µm e 0,45 µm (MILLIPORE<sup>®</sup>, Billerica, CA) foram usados para encaixe nas linhas de entrada e saída, respectivamente.

A densidade óptica foi medida a 550 nm e usada como uma estimativa da concentração celular (1 O.D. = 0,34 g de DW/L). Após a centrifugação, o sobrenadante foi armazenado a -20°C para análise por HPLC. Para quantificar as concentrações de glicerol, lactato, acetato, formato, succinato e etanol, as amostras foram analisadas com HPLC de exclusão de íons usando-se um sistema SHIMADZU PROMINENCE SIL 20<sup>TM</sup> (SHIMADZU SCIENTIFIC INSTRUMENTS<sup>®</sup> Inc., Columbia, MD) equipado com uma coluna de ácido orgânico HPX-87H (BIORAD<sup>®</sup>, Hercules, CA). As condições operacionais para otimizar a separação de pico (30 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em fase móvel, temperatura da coluna de 42°C) foram determinadas usando-se

2005). A produção de hidrogênio foi medida em amostras selecionadas usando-se cromatografia gasosa. O hidrogênio também podia ser calculado como a diferença entre quantidades molares de (etanol + acetato) e formato. As concentrações de 1,2-PDO foram determinadas mediante experimentos de NMR (ressonância magnética nuclear), conforme descrito abaixo e usando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão.

As identidades dos produtos de fermentação foram confirmadas mediante um experimento de NMR 1D 1H (Próton). 60  $\mu$ L de D<sub>2</sub>O e 1  $\mu$ L de padrão interno de NMR a 600 mM TSP (ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-D<sub>4</sub>, sal sódico) foram adicionados a 540  $\mu$ L da amostra. A solução resultante foi, então, transferida para um tubo de NMR de 5 mm, e a espectroscopia NMR 1D próton foi realizada a 25°C em um espectrômetro VARIAN<sup>®</sup> 500MHz INOVA<sup>™</sup> equipado com uma sonda PENTA<sup>™</sup>. Foram usados os seguintes parâmetros: 8.000 Hz de largura de varredura; 2,8 segundos de tempo de aquisição; 256 aquisições; 6,3  $\mu$ s de largura de pulso; 1,2 s de retardo de repetição de pulso; e pré-saturação durante 2 segundos. O espectro resultante foi analisado usando-se o software FELIX<sup>™</sup> 2001 (ACCELRYS SOFTWARE<sup>®</sup> Inc., Burlington, MA). Os picos foram identificados por seus deslocamentos químicos e valores de acoplamento J, que foram obtidos em experimentos separados, em que as amostras receberam adições de padrões metabólicos (concentração final de 2 mM).

A caracterização adicional das amostras foi

(Espectroscopia de Correlação). Um espectro COSY com filtragem quântica dupla, com supressão de solvente de porta de água, foi obtido usando-se a seqüência de pulso wgdqfcsy, que é parte do pacote BIOPACK™ de seqüências de pulso (VARIAN®, Inc.). Foram usados os seguintes parâmetros: 6.000 Hz de largura de varredura; 0,5 segundos de tempo de aquisição; 600 pontos complexos em dimensão t1; 32 transitórios; 5,5 µs de largura de pulso; e 1 segundo de retardo de relaxamento.

10 A incorporação de glicerol na biomassa proteínogênica foi avaliada por fermentação de glicerol marcado com 50% de U-<sup>13</sup>C em E. coli. Após 3 dias (72 h), os tubos foram colhidos, e o caldo de fermentação foi centrifugado. As pelotas de células foram lavadas uma vez  
15 com solução de NaCl a 9 g/L e novamente centrifugadas. As pelotas de células resultantes foram hidrolisadas com HCl a 6N em ebulição constante a 110°C durante 24 horas, usando-se o sistema de hidrólise REACTI-THERM™ (PIERCE®, Rockford, IL). Para remover o HCl, a solução resultante foi submetida  
20 a uma vaporização rápida a 75°C sob vácuo durante 2 horas, usando-se o sistema CENTRIVAP™ (LABCONCO® Corp., Kansas City, MO). A amostra seca foi reconstituída em 1 mL de D<sub>2</sub>O (Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, MA), congelada a -80°C e subseqüentemente liofilizada no sistema de  
25 liofilização 4.5L FREEZONE™ (LABCONCO® Corp) durante 24 horas. A amostra foi, então, reconstituída em 600 µL de D<sub>2</sub>O e filtrada para remover as partículas de células. Um □L de

transferido para um tubo de NMR. Para determinar o enriquecimento com  $^{13}\text{C}$ , as amostras foram analisadas usando-se spin eco de 1D próton com e seu pulsos concorrentes de  $90^\circ$  no carbono<sup>50</sup>. O pulso de  $90^\circ$  no carbono refocalizou os

5 átomos de carbono  $^{13}\text{C}$ , suprimindo, dessa forma, os satélites de  $^{13}\text{C}$  que surgem devido ao acoplamento de spin próton-carbono. Esse fenômeno não ocorreu para os átomos de carbono  $^{12}\text{C}$ . Para esses experimentos, usamos a seqüência de pulsos comercialmente disponível pwxcal no espectrômetro 500 MHz

10 Varian INNOVA<sup>TM</sup>. Foram usados os seguintes parâmetros: 8.000 Hz de largura de varredura; 2,7 segundos de tempo de aquisição; 256 transitórios; e pwx1 0 e  $90^\circ$  a  $25^\circ\text{C}$ . Os aminoácidos individuais foram identificados com base nos deslocamentos químicos e na estrutura fina dos espectros.

15 Para realizar ensaios enzimáticos, células de culturas anaeróbicas de uma  $\text{OD}_{550}$  de  $\sim 0,7$  foram colhidas por centrifugação (2 min,  $10.000 \times g$ ), lavadas com 9 g/litro de NaCl e armazenadas como pelotas de células a  $-20^\circ\text{C}$ . As células foram ressuspendidas em 0,2 mL do respectivo tampão

20 e permeabilizadas por misturação de remoinho com clorofórmio (Tao et al., 2001). A glicerol desidrogenase foi ensaiada por medição da alteração na absorbância a 340 nm e  $25^\circ\text{C}$  em uma mistura contendo 50 mM de Tris•HCl (pH 7,6), 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{NAD}^+$ , 10 mM de glicerol e 10 - 100  $\mu\text{L}$  de

25 extrato celular bruto. A atividade da glicerol desidrogenase com HA, a atividade da metilglicoxal redutase, a atividade da aldo-ceto redutase e a linearidade das reações (concentração

preparações. Os resultados foram expressos como micromoles minuto<sup>-1</sup> miligrama de proteína celular<sup>-1</sup> e era médias para pelo menos três preparações celulares.

As taxas específicas de crescimento celular ( $\mu$ ), consumo de glicerol e síntese de produto foram estimadas traçando-se a concentração total de células, glicerol ou produto versus a integral da concentração celular (ICC) e ajuste desses gráficos a funções polinomiais.

#### EXEMPLO 2: FERMENTAÇÃO DE GLICEROL E EFEITO DA

10

#### COMPOSIÇÃO DO MEIO

Embora se acredite que o metabolismo de glicerol em *E. coli* esteja restrito a condições respiratórias, descobrimos que esse organismo pode metabolizar glicerol na ausência de receptores de elétrons. A Fig. 1 mostra um perfil de fermentação típico para a cepa do tipo selvagem MG1655 em um meio suplementado com 2 g/L de triptona (detalhes adicionais foram apresentados nos pedidos provisórios 60/788.512 e 60/867.581 e em Gonzalez et al., 2007). Aproximadamente 1-2 g/L of glicerol foram deixados não fermentados no meio das culturas em fase estacionária. Etanol, 1,2-propanodiol (1,2-PDO) e ácidos succínico, acético e fórmico foram identificados como produtos de fermentação usando-se diferentes técnicas de NMR.

Em seguida, buscamos identificar o efeito de vários parâmetros sobre a fermentação de glicerol. Potássio, fosfato, sódio, glicerol, HA, pH e CO<sub>2</sub> foram titulados para o crescimento celular de acordo com métodos típicos.

Os meios típicos usados em estudos anteriores do metabolismo de glicerol em *E. coli* continham altos níveis de fosfato, potássio e sódio, cuja principal finalidade era controlar o pH da cultura de 7-7,5. Esse meio foi inicialmente relatado por Tanaka et al. (1967) e subseqüentemente usado pela maioria dos investigadores em estudos do metabolismo de glicerol em *E. coli*. Descobrimos que a suplementação de nosso meio com esses níveis de fosfato, potássio e sódio (isto é, 34 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 64 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) prejudicava gravemente a fermentação de glicerol (Fig. 2) - um efeito que é particularmente prejudicial a pH alcalino. Potássio e fosfato, mas não o sódio, foram responsáveis pelo efeito negativo (Fig. 2). A análise dos padrões de consumo de glicerol em nossos experimentos mostrou que quantidades significativas de glicerol permaneciam não metabolizadas no meio (tipicamente 10 - 30 mM), sugerindo a existência de uma concentração de limiar que limita a fermentação anaeróbica de glicerol. Interessantemente, estudos anteriores do metabolismo de glicerol também foram conduzidos a concentrações de glicerol tipicamente variando de 20 a 30 mM. Sabemos agora que a fermentação de glicerol e o crescimento celular foram completamente prejudicados quando se usou um meio contendo altos níveis de fosfato e potássio, 2 g/L de glicerol e conduzindo-se a fermentação a pH 7,5 e 37°C (Fig. 2).

Tomados juntos, nossos resultados demonstram claramente que as tentativas anteriores de fermentar

sucedidas, porque os experimentos foram todos conduzidos em condições que afetavam negativamente a fermentação de glicerol. Essas condições incluem o uso de pH neutro a alcalino (7-7,5), altas concentrações de potássio e fosfato, concentrações de glicerol relativamente baixas, 37°C e recipientes fechados. A última é uma condição que demonstramos que prejudica a fermentação de glicerol devido à acumulação de hidrogênio e o efeito resultante sobre o equilíbrio redox.

#### 10 EXEMPLO 3: VIAS E MECANISMOS DE FERMENTAÇÃO DE GLICEROL

A fermentação anaeróbica de glicerol em bactérias entéricas é considerada há muito tempo um privilégio de espécies que tenham uma via de 1,3-PDO ativa. Demonstramos, entretanto, que a *E. coli* pode metabolizar fermentativamente glicerol de maneira independente do 1,3-PDO, contanto que uma via funcional de 1,2-PDO e vias de glyDH-II-DHAK estejam presentes.

Com base em nossos achados, descritos em maiores detalhes em Dharmadi, et al. (2006), Gonzalez et al., 2007 e nos pedidos provisórios 60/867.581 e 60/788.512 (todos aqui incorporados por referência), propomos um novo paradigma para a fermentação de glicerol em bactérias entéricas, em que: (i) a via de 1,2-PDO proporciona um meio para consumir equivalentes redutores gerados durante a síntese da massa celular, permitindo, dessa forma, condições equilibradas de redox e (ii) a síntese de etanol, mediante uma via equilibrada de redox, atende às exigências de energia,

(Fig. 3). Também se descobriu que a atividade dos sistemas de formato hidrogênio-liase e  $F_0F_1$ -ATPase facilita o metabolismo fermentativo de glicerol, provavelmente ajudando a manter o pH intracelular e o suprimento de  $CO_2$ .

5 Demonstramos que a via que converte glicerol em intermediários glicolíticos é composta por duas enzimas (Fig. 3): uma glicerol desidrogenase (glyDH) e uma DHA quinase (DHAK), a primeira com um papel fisiológico anteriormente desconhecido.

Tabela 2. Crescimento celular durante a fermentação de glicerol<sup>1,2</sup>

10

Cepa	Proteína GldA	Taxa de Crescimento $\mu_M \pm DP^3$	Rendimento de Crescimento $Y_{X/S} \pm DP^4$	1,2-PDO <sup>5</sup> (mM)
W3110	glyDH-II	0,031 $\pm$ 0,002	32,2 $\pm$ 3,1	SIM
MG1655	glyDH-II	0,040 $\pm$ 0,003	32,9 $\pm$ 2,9	SIM
MC4100	glyDH-II	0,029 $\pm$ 0,004	54,9 $\pm$ 8,8	SIM
E.coli B	glyDH-II	0,036 $\pm$ 0,002	34,1 $\pm$ 2,7	SIM
E.cloacae	glyDH-II	0,022 $\pm$ 0,002	30,9 $\pm$ 2,8	SIM
L.richardii	glyDH-III	ND	ND	ND
B.agrestis	glyDH-IV	ND	ND	ND
S.plymuthica	NENHUMA	ND	ND	ND

<sup>1</sup> Os experimentos foram conduzidos na presença de 0,2% de triptona e 10 g/L de glicerol.

<sup>2</sup> NG: nenhum crescimento observado; ND: nenhuma detectada; DP: desvio padrão.

<sup>3</sup>  $\mu_M$ : taxa de crescimento específico máxima ( $h^{-1}$ ) calculada durante o crescimento exponencial.

<sup>4</sup>  $Y_{X/S}$ : rendimento de crescimento (mg de células/g de glicerol) calculado como o aumento na massa celular por glicerol consumido.

<sup>5</sup> A síntese de 1,2-PDO foi identificada mediante NMR, conforme descrito

Nossos achados de que a cepa MG1655 pode fermentar glicerol é uma característica genérica da espécie *E. coli*, pois outras cepas (W3110, MC4100 e *E. coli* B) também foram capazes de fermentar glicerol (Tabela 2). Como duas outras glyDHs, a saber, glyDH-III e glyDH-IV, foram identificadas em membros das Enterobacteriaceae, investigamos seu envolvimento na fermentação anaeróbica de glicerol. Apenas a cepa *Enterobacter cloacae* NCDC 279-56, que, como a *E. coli*, possui uma glyDH-II (2), foi capaz de fermentar glicerol (Tabela 2). Nossos resultados preliminares com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* parecem indicar que vias similares poderiam sustentar a fermentação de glicerol nesse organismo.

As vias acima proporcionam o quadro de referência para explicar o efeito observado do pH e concentrações de potássio, fosfato e glicerol sobre a fermentação de glicerol (veja o EXEMPLO 2, pedido provisório 60/867.581 e Gonzalez et al., 2007). Por exemplo, altos níveis de fosfato promovem a decomposição tanto de DHA, quando de HA (dois intermediários chave nas vias acima mencionadas) e afetam negativamente a atividade de GldA e sua indução por HA. Além disso, a MG sintetase, uma enzima chave responsável pela síntese de 1,2-PDO, é inibida por altos níveis de fosfato. Altas concentrações de potássio aumentam a toxicidade de MG, um intermediário chave na síntese de 1,2-PDO. A baixa afinidade de GldA pelo glicerol [ $K_m$  é de 3-40 mM] explica tanto as exigências de altas concentrações de glicerol para

seu metabolismo fermentativo, quanto nossa observação de que 10-30 mM de glicerol permaneceram não metabolizados no meio.

O efeito do pH sobre a fermentação de glicerol também pode estar relacionado a seu impacto sobre as vias  
5 acima mencionadas (veja o EXEMPLO 2, pedido provisório 60/867.581 e Gonzalez et al., 2007). GldA exibe uma forte dependência do pH com maior atividade oxidativa a pHs muito alcalinos e atividade redutora em condições neutras a alcalinas. Condições ácidas reduzem não apenas a atividade  
10 de glyDH, mas também as atividades redutoras de MG, que são requeridas para a síntese de 1,2-PDO. Condições alcalinas, por outro lado, aumentam a toxicidade de MG, um intermediário chave na síntese de 1,2-PDO. Evidentemente, o pH intracelular precisa ser cuidadosamente controlado para  
15 evitar baixas atividades de enzimas chave e a toxicidade de MG. Por exemplo, embora um pH extracelular de 6,3 aparentemente previna a toxicidade de MG, as células ainda requereriam um sistema que evitasse que o pH caísse abaixo dos níveis permissíveis para as atividades de glyDH e  
20 MGR/AKR. Com a conversão de ácido fórmico em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, sabe-se que o sistema FHL evita a acidificação citoplasmática, o que poderia explicar por que FHL é requerido para a fermentação de glicerol em condições ácidas. Todavia, a atividade de FHL poderia gerar um excesso de hidrogênio que,  
25 caso acumulado, afetaria negativamente a fermentação de glicerol. Em condições alcalinas, o sistema F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase poderia ser requerido para evitar a alcalinização do

EXEMPLO 4: MELHORA DA PRODUTIVIDADE E POSSIBILIDADE DA  
FERMENTAÇÃO DE GLICEROL EM MEIOS INDUSTRIAIS

Para demonstrar as implicações de nossos achados na melhora da fermentação de glicerol, superexpressamos a via tronco descoberta (GldA-DHAK) na cepa do tipo selvagem MG1655 e observamos um aumento de mais de 2 vezes tanto no crescimento celular, quanto na fermentação de glicerol. A amplificação da via de GldA-DHAK foi conseguida por transformação de MG1655 com o plasmídeo pZSdhaKLM\_gldA. Aumentos adicionais na produtividade poderiam requerer uma superexpressão sincronizada de enzimas glicolíticas (por exemplo, triose-fosfato isomerase) juntamente com a via de GldA-DHAK. Além disso, vários aperfeiçoamentos à base do processo, incluindo otimização adicional do meio de cultura, sistema de cultivo e modo de operação, estão sendo implementados.

A aplicação da fermentação de glicerol em níveis industriais requereria o uso de glicerol derivado durante a produção de biodiesel. Observamos um crescimento celular e uma fermentação de glicerol similares quando MG1655 foi cultivado em glicerol puro e duas amostras de glicerol obtidas em uma instalação de biodiesel operada pela Companhia Química FutureFuel: após 48 horas de cultivo, as células fermentaram 4 (puro), 3,9 (refinado) e 3,8 (bruto) g/L de glicerol e atingiram uma densidade óptica de 1,2 (puro), 0,96 (refinado) e 0,98 (bruto).

A substituição da suplementação com triptona por

outro fator chave para o sucesso comercial. Entretanto, já demonstramos que a suplementação do meio com liquor de infusão de milho (um suplemento barato usado em fermentação industrial) sustenta a fermentação de glicerol em níveis similares aos observados com a suplementação com triptona (Dharmadi et al., 2006).

Também obtivemos mutantes de MG1655 capazes de crescer em meio mínimo sem nenhuma suplementação (uma OD<sub>550</sub> de 0,36 e 8,1 g/L de glicerol fermentado). Esses mutantes foram gerados mediante múltiplas rodadas de seleção para cepas capazes de fermentar glicerol em meios contendo quantidades decrescentes de HA ou triptona (pedido provisório 60/867.581).

#### EXEMPLO 5: PRODUTOS DO GLICEROL

Também fizemos demonstrações exemplificativas da formação de produtos usando glicerol como a fonte de carbono e os meios acima descritos. Por exemplo, demonstramos a produção de etanol na FIG. 4. Nossos resultados indicaram que pequenas modificações genéricas e ambientais tornam *E. coli* um bom biocatalisador para a conversão de glicerol em etanol e H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (pH 6,3) ou etanol e formato (pH 7,5 e disrupção do sistema FHL). A produção de etanol mediante fermentação de açúcar, em contraste, não ofereceria a possibilidade de co-produção de H<sub>2</sub> e formato, representando, assim, um processo menos eficiente. Aperfeiçoamentos adicionais dos rendimentos de etanol-H<sub>2</sub> e etanol-formato resultarão da eliminação das vias de succinato e acetato

provisório 60/867.581). O aperfeiçoamento nas produtividades e o uso de meio industrial são conforme acima descritos no EXEMPLO 4.

Outro exemplo é o ácido succínico, cuja produção a  
5 partir de açúcares é limitada pela disponibilidade de  
equivalentes redutores. Felizmente, sua síntese a partir de  
glicerol é possível mediante uma via equilibrada de redox.  
Entretanto, uma produção muito baixa de succinato a partir  
de glicerol foi observada em nossos experimentos com MG1655,  
10 uma consequência do glicerol sendo diferenciada pela via de  
GldA-DHAK dependente de PEP (isto é, baixa disponibilidade  
de PEP). Pela substituição de DHAK dependente de PEP de *E.*  
*coli* por DHAK dependente de ATP de *C. freundii*, juntamente  
com o uso de pH e concentração de CO<sub>2</sub> apropriados,  
15 conseguimos um aumento de quase 10 vezes no rendimento de  
succinato (FIG. 4), usando os meios acima descritos.  
Aperfeiçoamentos adicionais no rendimento de succinato  
resultarão da eliminação das vias de etanol e acetato  
(mutações *adhE* e *pta*: Gonzalez et al., 2007 e pedido  
20 provisório 60/867.581). O aperfeiçoamento na produtividade e  
o uso de meio industrial são conforme acima descritos no  
EXEMPLO 4, com a exceção de que a DHAK dependente de ATP de  
*C. freundii* será superexpressada, em vez da DHAK nativa.  
Para tornar a via de ácido succínico mais favorável  
25 energeticamente, eliminamos a fosfoenolpiruvato carboxilase  
de *E. coli* (PEPC, codificada pelo gene *ppc*) e a  
superexpressão de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK)

outros microorganismos, conforme descrito na base de dados de enzimas BRENDA (Schomburg et al., 2004). Uma maior produção de energia pela via de succinato (diferentemente da PEPC, PEPCK gera ATP) deve resultar tanto em maiores 5 produtividades, quanto maior rendimento.

Outro produto cuja síntese se beneficiaria do estado altamente reduzido do carbono em glicerol é o 1,2-PDO. A amplificação da via de GldA-DHAK não apenas resultou em uma produtividade aumentada, mas também levou a um 10 aumento de quase 20 vezes na síntese de 1,2-PDO: enquanto MG1655 produziu apenas 0,026 mM de 1,2-PDO, a cepa recombinante MG1655 (pZSdhaKLM\_gldA) acumulou 0,51 mM desse produto. Esses resultados provavelmente são devidos ao envolvimento de GldA na síntese de 1,2-PDO (Gonzalez et al., 15 2007).

Estamos agora desenvolvendo várias estratégias para produzir altos níveis de 1,2-PDO a partir de glicerol, que são descritas a seguir:

(1) Substituição da DHAK dependente de PEP nativa 20 (dhaKLM) de *E. coli* pela DHAK dependente de ATP (subunidades dhaKL) de *C. freundii* e sua superexpressão juntamente com glicerol desidrogenase nativa (gldA).

(2) Superexpressão das enzimas metilglioal sintetase, glicerol desidrogenase e metilglioal redutase, 25 todas envolvidas na conversão de DHAP em 1,2-PDO (Gonzalez et al., 2007 e pedido provisório 60/867.581).

(3) Aumento da disponibilidade de NADPH para

conversão de NADH em NADPH mediante superexpressão de transidrogenases ou manipulação da especificidade de co-fator de enzimas nas vias metabólicas centrais, incluindo glicerol desidrogenase, glicerol-3-P desidrogenase, 5 gliceraldeídos desidrogenase, piruvato desidrogenase e outras. Alternativamente, a variação dessas enzimas que, em sua forma nativa, usam NADP como co-fator pode ser clonada de outros organismos e expressada em *E. coli*.

(4) Manipulação de uma glicerol desidratase (GD, 10 que, na natureza, desidrata glicerol por conversão em 3-hidroxi propionaldeído) para a conversão de glicerol em HA em uma etapa. HA é, então, convertida em 1,2-PDO por GldA ou outras enzimas em *E. coli*, conforme já demonstramos em experimentos em que HA inicialmente presente no meio de 15 cultura foi estequiometricamente convertida em 1,2-PDO (pedido provisório 60/867.581). Essa via evitará metilglioal como intermediário (um produto muito tóxico) e representa uma via mais eficiente em termos de energia para a conversão de glicerol em 1,2-PDO, pois nenhum ATP é consumido, 20 resultando em um aumento significativo nos rendimentos. A GD manipulada é obtida por mutagênese de GD de *C. butyricum* (*dhaB1*), que, diferentemente de outras GDs, não requer a coenzima B<sub>12</sub> para sua atividade. Também estamos conduzindo uma busca de uma GD microbiana nativa que possa converter 25 glicerol em HA. Uma vez encontrada, essa atividade será clonada e expressada em *E. coli*.

(5) Estratégias química (glicerol em HA) e

glicerol em HA foi eficientemente conseguida com um processo que usa um catalisador sólido, temperatura moderada (~200°C) e pressão atmosférica (Crabtree et al., 2006). Os únicos produtos são HA e água. Demonstramos a conversão eficiente de HA em 1,2-PDO por células de *E. coli* em um meio contendo glicerol (Gonzalez et al., 2007 e pedido provisório 60/867.581). A quantidade de glicerol consumida é mínima, e a conversão estequiométrica de HA em 1,2-PDO é conseguida em uma fermentação muito curta.

Os resultados acima descritos e mostrados nas Figuras 4 e 5 demonstram claramente a possibilidade de se desenvolver uma plataforma para a produção de combustíveis e substâncias químicas reduzidas a partir de glicerol. Produtos adicionais cuja produção mediante fermentação de glicerol seria vantajosa incluem propanolamidas, ácido propiônico, butanol e outros (Gonzalez et al., 2007). Esses processos permitiriam a implementação de verdadeiras bio-refinarias e revolucionaria a indústria de biocombustíveis, melhorando grandemente seus aspectos econômicos.

REFERÊNCIAS:

Todas as referências são aqui relacionadas para conveniência do leitor. Todas são incorporadas por referência em sua inteireza.

1. Bachler, C., et al., B. *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. *EMBO J.* 24:283-293 (2005).

2. Crabtree, S., et al., Optimize glycol production from biomass. *Hydrocarbon Processing*: 87-92 (2006).
3. Datsenko, K.A., Wanner. B.L. One-step  
5 inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6640-5 (2000).
4. Dharmadi, Y., & R. Gonzalez. A better global resolution function and a novel iterative stochastic search  
10 method for optimization of HPLC separation. *J. Chromatogr. A.* 1070:89-101 (2005).
5. Dharmadi, Y., et al., Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 94:821-829  
15 (2006).
6. Gonzalez, R., et al., A New Paradigm for Glycerol Fermentation in *Escherichia coli* and other Enteric Bacteria and its Implications for the Biofuel Industry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (In Press) (2007).
7. Jin, R.Z., et al., Experimental evolution of  
20 a novel pathway for glycerol dissimilation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Evol.* 19:429-436 (1983).
8. Kang Y, et al., Systematic mutagenesis of the *Escherichia coli* genome. *J Bacteriol* 186:4921-4930 (2004).
9. Neidhardt, F.C., et al., Culture medium for  
25 enterobacteria. *J. Bacteriol.* 119:736-747 (1974).

10. Sambrook, J., et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, 1989).

11. Schomburg I., et al., BRENDA, the enzyme  
5 database: updates and major new developments. Nucleic Acids Res. D431-433 (2004).

12. Tang, J.C., et al., Immunochemical properties  
of NAD<sup>+</sup>-linked glycerol dehydrogenases from *Escherichia coli*  
and *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. 152:1169-1174  
10 (1982).

13. Tang, J.C., et al., Derepression of an NAD-  
linked dehydrogenase that serves an *Escherichia coli* mutant  
for growth on glycerol. J. Bacteriol. 152:1001-1007 (1982).

14. Tanaka, S., et al., Replacement of a  
15 phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a  
nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for  
the utilization of mannitol. J. Bacteriol. 93:642-648  
(1967).

15. Tao, H., et al., Engineering a homo-ethanol  
20 pathway in *Escherichia coli*: increased glycolytic flux and  
expression levels of glycolytic genes during xylose  
fermentation. J. Bacteriol. 183:2979-2988 (2001).

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para fermentar anaerobicamente glicerol para produzir um produto, **caracterizado** pelo fato de compreender:

5 o cultivo de uma célula bacteriana em um meio sob condições anaeróbicas de modo que o glicerol seja convertido em um produto,

em que a dita célula bacteriana é desprovida de uma via funcional de 1,3-propanodiol, mas tem uma via  
10 funcional de 1,2-propanodiol, uma via funcional da glicerol desidrogenase do tipo II-diidroxiacetona quinase e uma via funcional de  $F_0F_1$ -ATPase,

em que o dito meio compreende pelo menos 10 g/L de glicerol como a fonte de carbono, menos de 10 mM de  
15 potássio, menos de 50 mM de fosfato,  $CO_2$  maior que ou igual a 10% e um pH entre 5,0 e 7,5.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o meio é suplementado com hidroxiacetona (HA), mas não com triptona.

20 3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o meio é suplementado com 30 mM de HA.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a célula bacteriana também  
25 tem uma via funcional de FHL, quando o pH do meio é menor que ou igual a 6,5.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o CO<sub>2</sub> é de pelo menos 20% quando o pH é de cerca de 7.5.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o meio tem menos de ou igual a 2 mM de potássio e menos de ou igual a 10 mM de fosfato.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o meio tem menos de ou igual a 1 mM de potássio e menos de ou igual a 5 mM de fosfato.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o dito produto é selecionado do grupo que consiste em etanol, ácido succínico, ácido fórmico, hidrogênio, 1,2-PDO, propanolamidas, ácido propiônico e butanol.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o meio tem menos de ou igual a 1 mM de potássio e menos de ou igual a 2 mM de fosfato.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o pH é de cerca de 6,3, e o meio é borrifado com um gás inerte, e o dito produto é etanol e hidrogênio.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que uma via nativa de glicerol desidrogenase-diidroxiacetona quinase está superexpressada, uma pta e uma frdA estão inativadas, o glicerol é glicerol bruto, e o meio também compreende liquor de infusão de milho, mas não triptona.

12. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a célula bacteriana é desprovida de uma enzima FHL funcional, o pH é de cerca de 7, e o meio é borrifado com um gás inerte, e o dito produto  
5 é etanol e formato.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que uma via nativa de glicerol desidrogenase-diidroxiacetona quinase está superexpressada, uma pta e uma frdA são inativadas, o glicerol é glicerol  
10 bruto, e o meio também compreende liquor de infusão de milho, mas não triptona.

14. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a dita célula bacteriana é desprovida de subunidades de diidroxiacetona quinase nativa e  
15 expressa uma diidroxiacetona quinase de *C. freundii*, e o dito produto é succinato.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o meio compreende 10-20% de CO<sub>2</sub>, e o pH é de 6-7,5.

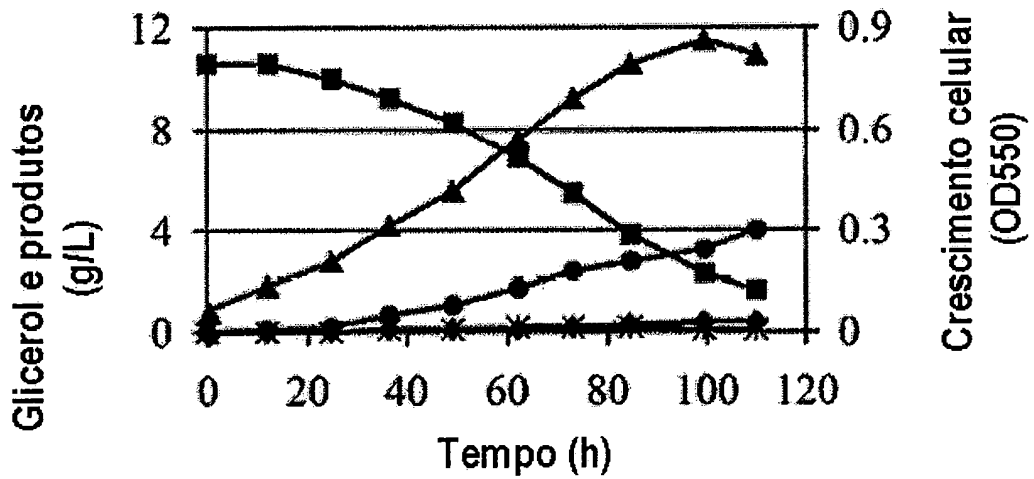
20 16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que uma glicerol desidrogenase nativa e diidroxiacetona quinase de *C. freundii* estão superexpressadas, uma fosfoenolpiruvato carboxilase está inativada, uma fosfoenolpiruvato carboxiquinase de *E. coli*  
25 ou *A. succinogenes* está superexpressada, uma pta e uma adhE são inativadas, o glicerol é glicerol bruto, e o meio também compreende liquor de infusão de milho.

17. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que uma glicerol desidrogenase nativa e uma diidroxiacetona quinase estão superexpressadas, e o dito produto é 1,2-PDO.

5 18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que a diidroxiacetona quinase nativa é substituída por diidroxiacetona quinase de *C. freundii*, e as enzimas metilglioal sintetase, glicerol desidrogenase e metilglioal redutases estão todas  
10 superexpressadas.

19. Método, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que uma glicerol desidratase manipulada ou de ocorrência natural capaz de converter glicerol em hidroxiacetona está superexpressada.

FIG. 1



▲ = Crescimento celular ; ■ = glicerol ; ● = etanol ; ◆ = succinato ; \* = formato mais acetato

FIG. 2

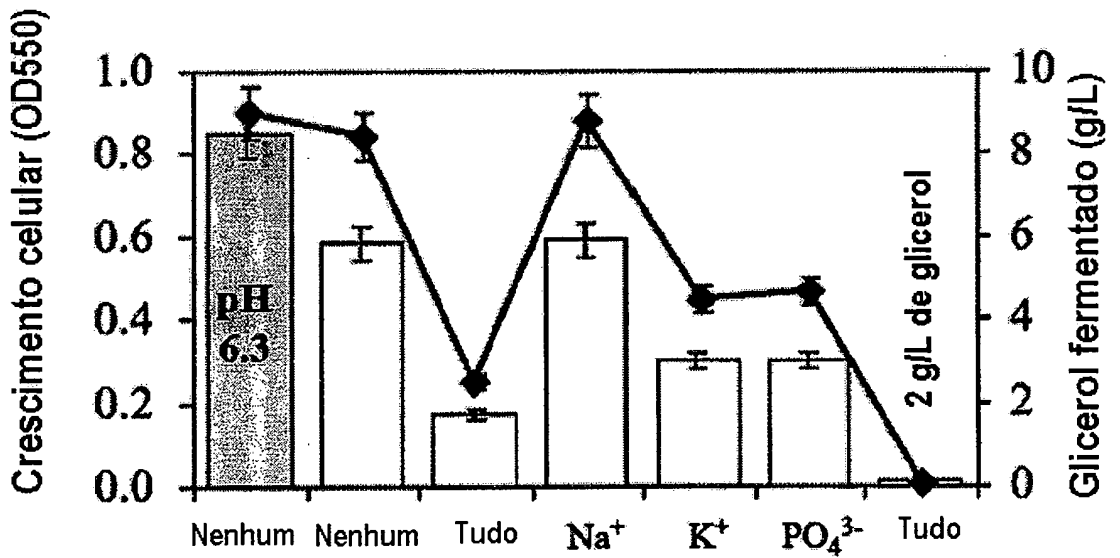


FIG. 3

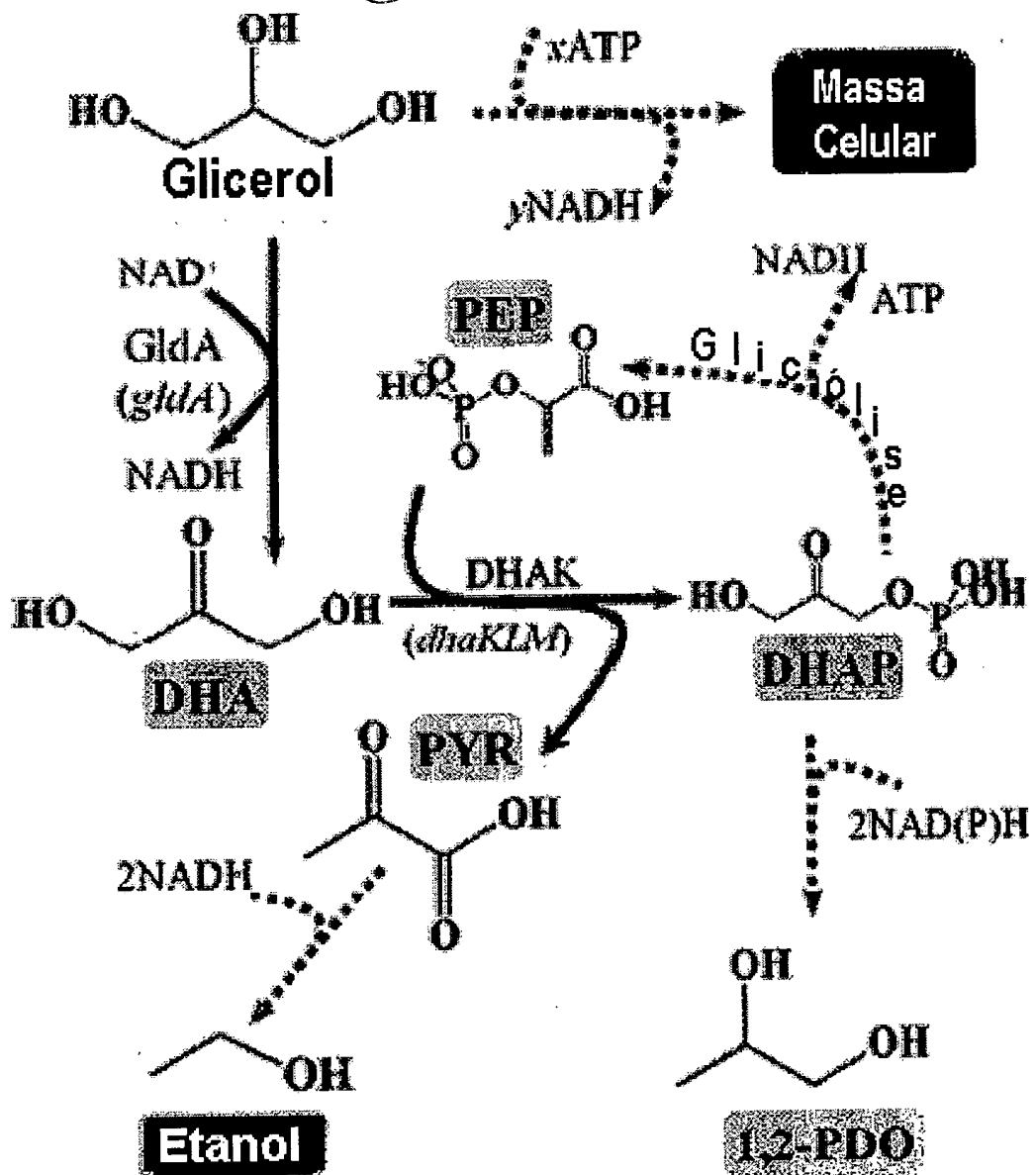
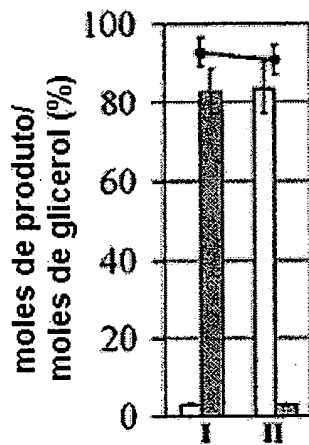
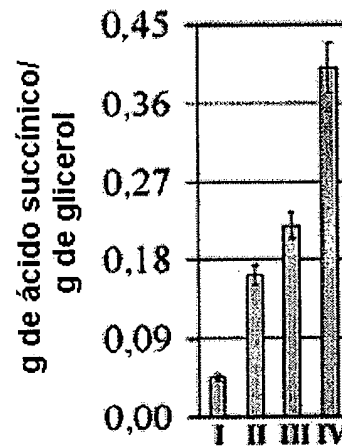


FIG. 4



Linha = Etanol  
 Barra aberta = Ácido fórmico  
 Barra sombreada = H<sub>2</sub>  
 I = MG1655, pH 6,3, 10% de CO<sub>2</sub>  
 II =  $\Delta$ hycB: pH 7,5, Argônio

FIG. 5



Barra sombreada = ácido succínico  
 I = MG1655, pH 6,3, Argônio  
 II = MG1655, pH 6,3, 10% de CO<sub>2</sub>  
 III = MG1655, pH 7,5, 20% de CO<sub>2</sub>  
 IV =  $\Delta$ dhaKLM (pZSKLcf), pH 7,5, 20% de CO<sub>2</sub>

RESUMO

"MÉTODO PARA FERMENTAR ANAEROBICAMENTE GLICEROL  
PARA PRODUZIR UM PRODUTO; E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE 1,2-PDO"

A invenção se refere ao desenvolvimento de  
5 condições de cultivo apropriadas para que uma bactéria  
cresça anaerobicamente (fermentativamente) em um substrato  
de glicerol. O método requer o cultivo de bactérias com uma  
via funcional de 1,2-propanodiol e uma via funcional da  
glicerol desidrogenase do tipo II-diidroxiacetona quinase em  
10 um meio de cultura contendo altas concentrações de glicerol,  
um pH neutro a levemente ácido, baixos níveis de potássio e  
fosfato e altos níveis de CO<sub>2</sub>, de modo que o glicerol seja,  
dessa forma, convertido em um produto desejável, como  
etanol, hidrogênio, formato, succinato ou 1,2-propanodiol.