

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**JULIA DE VASCONCELLOS CASTRO**

**ENGENHARIA GENÔMICA APLICADA À  
DETECÇÃO PRECOCE E AO MONITORAMENTO  
DAS MUDANÇAS FISIOLÓGICAS  
DA *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

Florianópolis – SC  
Agosto de 2015



**JULIA DE VASCONCELLOS CASTRO**

**ENGENHARIA GENÔMICA APLICADA À  
DETECÇÃO PRECOCE E AO MONITORAMENTO  
DAS MUDANÇAS FISIOLÓGICAS  
DA *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador:  
Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Co-orientador:  
Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

Florianópolis – SC  
Agosto de 2015

Castro, de Vasconcellos Julia

**Engenharia Genômica aplicada à detecção precoce e ao monitoramento das mudanças fisiológicas da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1 - Engenharia Genômica; 2 - Genômica Comparativa; 3 - Engenharia Metabólica; 4 - Engenharia de Bioprocessos; 5 - Fermentação ABE; 6 - *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

**Engenharia Genômica aplicada à detecção precoce e ao monitoramento das mudanças fisiológicas da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

Por

**Julia de Vasconcellos Castro**

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
**Orientador / Presidente**

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior  
**Co-Orientador**

---

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado  
**Coordenador do POSENQ**

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão  
**Membro Interno**

---

Prof. Dr. Marcus Adonai Castro da Silva  
**Membro Externo**

---

Profa. Dra. Gisele Serpa  
**Membro Externo**

---

Profa. Dra. Andrea de Lima Pimenta  
**Membro Externo**

---

Dra. Fernanda Vieira Berti  
**Membro Participante**



Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica, coordenado pelo Prof. Dr. Luismar Marques Porto, e foi desenvolvido nos Laboratórios InteLab - Laboratório de Tecnologias Integradas e EngeBIO - Laboratório de Engenharia Bioquímica, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina.





***“Imagination is more important than knowledge.  
For knowledge is limited to all we now know and understand,  
while imagination embraces the entire world,  
and all there ever will be to know and understand.”***

***- Albert Einstein -***



## **Engenharia Genômica aplicada à detecção precoce e ao monitoramento das mudanças fisiológicas da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

A fermentação ABE (acetona-butanol-etanol) da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, muito usada industrialmente até 1940, é um dos mais importantes bioprocessos industriais. Recentemente, o interesse nesse processo foi retomado devido à necessidade de substituir fontes combustíveis fósseis por vetores energéticos renováveis, principalmente biogás e biobutanol. O objetivo desta tese é contribuir para uma melhor compreensão dos problemas associados com a detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824 em fermentações tipo batelada. Pretende-se também refinar o entendimento desse comportamento variável utilizando a informação genômica disponível desta bactéria e assim contribuir para mostrar como algumas ferramentas da Engenharia Genômica podem incorporar novas informações aos métodos tradicionais de monitoramento de bioprocessos. É proposta a incorporação em três diferentes níveis, a saber: (i) nível genômico, (ii) nível metabólico e (iii) nível fenotípico. No nível genômico, a presente pesquisa detectou que existem seis regiões de alta similaridade, nas quais foram identificados 15 genes já mapeados. O gene *rpoB* foi identificado como um forte candidato a marcador molecular de variabilidade fenotípica. Foi proposta uma relação entre a regulação da transcrição do gene *rpoB* e o pH do meio de cultura. No nível metabólico, dois modelos metabólicos foram desenvolvidos, um modelo simplificado de 20 reações e um modelo genômico completo de 502 reações. Foi detectado que o modelo simplificado era mais adequado para detectar as mudanças fenotípicas da bactéria. Foi criado um modelo simplificado protonado que integra informações do pH do meio de cultura. No nível fenotípico, a técnica de coloração de Gram mostrou-se eficiente na detecção precoce das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum*. Foi demonstrada uma correlação entre os dados de fermentação e mudanças fisiológicas da parede celular da bactéria. Sugere-se, portanto, um novo método de detecção precoce e monitoramento do estado fisiológico da *C. acetobutylicum* ATCC 824 (e outras espécies de *Clostridium*) utilizando técnicas de coloração de Gram para determinar o estado fisiológico no qual a bactéria se encontra, e quais os principais produtos metabólicos da sua fermentação.

**Palavras Chave:** Engenharia Genômica; Genômica Comparativa; Engenharia Metabólica; Engenharia de Bioprocessos; Fermentação ABE; *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.



**A Genomic Engineering approach to achieve early detection and monitoring of physiological changes of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

The problem of renewable and sustainable energy is challenging and requires innovative approaches. The production of biohydrogen, and biofuels in general, particularly biobutanol in the so-called ABE fermentation by *Clostridium acetobutylicum*, discovered in 1861 by Louis Pasteur, although extensively studied, still lacks some fundamental understanding to facilitate monitoring changes in the physiological state and optimization. Here we propose a genomic engineering approach, divided in three levels: i) genomic, ii) metabolic, iii) phenotypic. At the genomic level, a comparative whole-genome study was performed comparing *C. acetobutylicum* with six other chosen microorganisms and a *in silico* Gram type experiment; The whole-genome analysis detected one major gene, the *rpoB* gene, implied in acquired antibiotic resistance, and possibly implicated in phenotypic variation during ABE fermentation. A possible link between the pH regulation and *rpoB* expression is suggested. The 16S rRNA analysis consistently showed Gram-positive classification for the *C. acetobutylicum* strain used, incapable of detecting the existent phenotypic variations. At the metabolic level, two metabolic network models were developed: a simplified, core model, with 20 reactions, and a genome-wide model, comprising 502 reactions; to translate the molecular and biochemical information to a useful engineering level, a phenotypic relation between the Gram stain response and pH developed during batch fermentation was analyzed. The simplified core metabolic network successfully captured the observed strain metabolic profile. Additional regulatory mechanism was added to the simplified metabolic model with the integration of pH regulation. Using the Gram staining method, we demonstrated a strong correlation between bacterial growth and morphological changes of the cell wall that is useful in monitoring early detection of the metabolic stages of *C. acetobutylicum* ABE fermentation. The Gram staining technique is proposed as an efficient, low cost method to identify the physiological state of the bacteria culture and its connection with the fermentation state.

**Keywords:** Genomic Engineering, Comparative Genomics, Metabolic Engineering, Bioprocess Engineering, ABE fermentation, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.



## LISTA DE FIGURAS

---

<i>Figura 1-1 - Diagrama estrutural do documento</i> .....	35
<i>Figura 2-1 - Representação gráfica do padrão de metabolismo da Clostridium acetobutylicum ATCC 824. (adaptado de: www.sbi.uni-rostock.de)</i> .....	41
<i>Figura 2-2 - Representação da relação entre as mudanças fenotípicas (fase acidogênica e fase solventogênica) e morfológicas (formatos: vegetativo, clostridial, endósporo e esporo) apresentadas pela Clostridium acetobutylicum ATCC 824. (adaptado de: www.sbi.uni-rostock.de por CASTRO (2010))</i> .....	43
<i>Figura 2-3 - Representação das mudanças morfológicas apresentadas pela Clostridium acetobutylicum ATCC 824 (AL-HINAI; JONES; PAPOUTSAKIS, 2015).</i> .....	43
<i>Figura 2-4 - Diagrama funcional da abordagem sistêmica da Engenharia Genômica: do genótipo ao fenótipo. (adaptado de PORTO 2004, 2008)</i> .....	47
<i>Figura 3-1 - Metodologia utilizada na Análise de Engenharia Metabólica</i> .....	58
<i>Figura 3-2 - Rede metabólica simplificada da C. acetobutylicum ATCC 824. São 20 reações e 25 metabólitos (13 são considerados metabólitos internos e 12 externos. (OLIVEIRA, 2008).</i> .....	59
<i>Figura 3-3 - Reações auxiliares, v16 e v17 que correspondem, respectivamente, a velocidade de crescimento celular e a ATPase a) Modelo Experimental de Papoutsakis (1984) ; b) Modelo modificado por Castro (2010).</i> .....	60
<i>Figura 3-4 - Fluxograma do processo de cultura e manutenção do microorganismo</i> .....	63
<i>Figura 3-5 - Representação do reator anaeróbico e do Aparato Experimental Acoplado: (i) Reator anaeróbio batelada; (ii) Frasco de segurança; (iii) Dispositivo para captação do CO<sub>2</sub>; (iv) Dispositivo para mensuração do volume de hidrogênio formado.</i> .....	66
<i>Figura 3-6 - Reatores anaeróbicos utilizados e aparato experimental acoplado</i> .....	68
<i>Figura 3-7 - Esquema metodológico utilizado para amostragem</i> .....	70
<i>Figura 4-1 - Análise comparativa de genoma completo de bactérias Gram variáveis utilizando o genoma da C. acetobutylicum ATCC 824 como referência.</i> .....	78

## LISTA DE FIGURAS

---

<i>Figura 4-2 - Representação gráfica dos genes da C. acetobutylicum ATCC 824 encontrados na região conservada 6. (fonte: NCBI) .....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 4-3 - Mecanismo de ação dos dois métodos experimentais (aqui reproduzidos in silico) para identificação da classificação de Gram através da análise do RNA 16S.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 4-4 - Alinhamento do primer Gram positivo .....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 4-5 - Alinhamento do primer Gram negativo.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 4-6 - Alinhamento da sonda Gram positiva .....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 4-7 - Alinhamento da sonda Gram negativa .....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 4-8 - Representação da matriz estequiométrica do modelo simplificado da C. acetobutylicum ATCC 824 .....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 4-9 - Representação da matriz estequiométrica do modelo em escala genômica construído da C. acetobutylicum ATCC 824.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 4-10 - Frequência de aparecimento (eixo y) de cada composto (eixo x) nas reações do modelo em escala genômica da C. acetobutylicum ATCC 824. Os compostos com maior frequência de aparecimento (próxima a 90) são ATP e NADPH. ....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 4-11 - Resultado da Análise de Balanço de Fluxo para o modelo genômico completo construído. (a) Gráfico do tipo “código de barras” para o fenótipo acidogênico da C. acetobutylicum ATCC 824; (b) Índice das principais reações (reações com maiores fluxos) do fenótipo acidogênico. ....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 4-12 - Esquema que mostra a mudança na representação das reações da rede metabólica do modelo simplificado para o modelo simplificado protonado (THIELE; PALSSON, 2010).....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 4-13 - Representação da rede metabólica simplificada protonada da C. acetobutylicum ATCC 824.....</i>	<i>102</i>
<i>Figura 4-14 - Resultado da Análise de Fluxo Metabólico para o modelo genômico completo construído. (a) Gráfico do tipo “código de barras” para o fenótipo acidogênico da C. acetobutylicum ATCC 824; (b) Índice das principais reações (reações com maiores fluxos) do fenótipo acidogênico. ....</i>	<i>104</i>
<i>Figura 4-15 - Perfis de concentração celular (g/ℓ), produção acumulada de hidrogênio (ℓ H<sub>2</sub>/ ℓ meio) (a) e consumo de substrato (g/ℓ) e pH (b), durante a fermentação anaeróbica de Clostridium acetobutylicum ATCC 284 em meio RCM, a 37°C e 120 rpm. Os algarismos romanos</i>	



## LISTA DE FIGURAS

---

<i>correspondem aos pontos onde as amostras foram avaliadas quanto à resposta ao teste de Gram e morfologia. ....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 4-16 - Resposta da avaliação diferencial colorimétrica utilizando a técnica de Gram para amostras de C. acetobutylicum ATCC 824 anaerobicamente incubada a 37°C, 120 rpm, em meio RCM. Os índices em algarismos romanos correspondem aos períodos de fermentação representados na Figura 4-15. ....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 4-17 - Análise da primeira e segunda derivada das curvas cinéticas apresentadas na Figura 4-15. Os numerais romanos representam os seis pontos temporais utilizados para avaliação da resposta ao teste colorimétrico de Gram e eles correspondem aos representados nas Figura 4-15 e Figura 4-16. ....</i>	<i>113</i>



## LISTA DE TABELAS

---

<i>Tabela 3-1 - Espécies Gram variáveis utilizadas e seus respectivos números de acesso no GenBank</i> .....	54
<i>Tabela 3-2 - Composição do Meio de Crescimento e Manutenção</i> .....	65
<i>Tabela 3-3 - Volumes de água, amostra e reagentes utilizados na dosagem de Glicose.</i> .....	72
<i>Tabela 4-1 - Número de janelas conservadas entre os genomas das bactérias Gram variáveis analisadas e o genoma da C. acetobutylicum ATCC 824 em cada um dos níveis de conservação avaliados (75, 85 e 95%)</i> .....	79
<i>Tabela 4-2 - Intervalo das regiões conservadas entre os genomas das bactérias Gram variáveis analisadas e o genoma da C. acetobutylicum ATCC 824.</i> .....	80
<i>Tabela 4-3 - Microrganismos e respectivos códigos de identificação e classificação de Gram</i> .....	81
<i>Tabela 4-4 - Genes conservados entre todas as seis bactérias Gram variáveis analisadas e a C. acetobutylicum ATCC 824 com pelo menos 75% de identidade de pares de base. Círculos cheios (●) indicam 95% de conservação; círculos concêntricos (◎) indicam 85% de conservação; círculos vazados (○) indicam 75% de conservação.</i> .....	81
<i>Tabela 4-5 - Relação entre os microrganismos Gram variáveis e a resistência adquirida ao antibiótico (Rifamicina) ligada a mutações no gene rpoB.</i> .....	83
<i>Tabela 4-6 - Símbolos alternativos utilizados na nomenclatura das bases</i> .....	85
<i>Tabela 4-7 - Dados experimentais e de simulação para os dois modelos considerados no trabalho.</i> .....	98
<i>Tabela 4-8 - Valores dos parâmetros referentes à modelagem de cinética de crescimento celular, consumo de substrato e produção de hidrogênio.</i> .....	108



<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	25
1.2. PROBLEMA DE PESQUISA .....	28
1.3. MOTIVAÇÃO E RELEVÂNCIA .....	30
1.5. INSERÇÃO .....	32
1.6. OBJETIVOS.....	33
1.6.1. OBJETIVO GERAL.....	33
1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
1.7. ESTRUTURA DO DOCUMENTO .....	34
1.8. DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO .....	36
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>39</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>53</b>
3.1. ANÁLISE DE GENÔMICA COMPARATIVA .....	54
3.1.1. ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMA COMPLETO.....	54
3.1.1.1. Sequências Utilizadas .....	54
3.1.1.2. Ferramentas de Bioinformática.....	55
3.1.1. ANÁLISE DE GRAM COMPUTACIONAL.....	56
3.1.1.1. Sequências Utilizadas .....	56
3.1.1.2. Ferramentas de Bioinformática.....	56
3.2. ANÁLISE DE ENGENHARIA METABÓLICA .....	57
3.2.1. MODELOS DE REDE METABÓLICA.....	58
3.2.1.1. Modelos Simplificado.....	58
3.2.1.1. Modelo em Escala Genômica.....	60
3.2.2. ANÁLISE DE BALANÇO DE FLUXO (FBA) E ANÁLISE DE FLUXO METABÓLICO (MFA) .....	61
3.2.2.1. Softwares .....	61
3.1. ANÁLISE FENOTÍPICA DE BIOPROCESSO .....	62
3.1.1. MICRORGANISMO .....	62
3.1.1.1. Cultura de Referência Certificada (CRC).....	63
3.1.1.2. Cultura de Reserva (CR) .....	63
3.1.1.3. Cultura de Trabalho (CT) .....	64

3.1.1.4.	Inóculo.....	65
3.1.2.	MEIOS DE CULTURA - COMPOSIÇÃO.....	65
3.1.3.	ENSAIOS FERMENTATIVOS.....	66
3.1.3.1.	Reator Anaeróbico.....	66
3.1.3.2.	Definição das Condições de Operação.....	67
3.1.3.3.	Procedimento de Amostragem.....	68
3.1.4.	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	71
3.1.5.	DETERMINAÇÃO DO PH.....	71
3.1.6.	DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR.....	71
3.1.7.	DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE SUBSTRATO.....	71
3.1.8.	DETERMINAÇÃO DO HIDROGÊNIO PRODUZIDO.....	73
3.1.9.	ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO MICRORGANISMO.....	73
3.1.9.1.	Microscopia de Contraste de Fase.....	73
3.1.9.2.	Coloração de Gram.....	74
3.1.10.	MODELOS CINÉTICOS.....	74
<b>4.</b>	<b><u>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u></b>	<b>77</b>
<b>4.1.</b>	<b>ANÁLISE DE GENÔMICA COMPARATIVA.....</b>	<b>77</b>
4.1.1.	ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMA COMPLETO.....	77
4.1.2.	ANÁLISE DE GRAM COMPUTACIONAL.....	84
<b>4.2.</b>	<b>ANÁLISE DE ENGENHARIA METABÓLICA.....</b>	<b>88</b>
4.2.1.	MODELOS DE REDE METABÓLICA.....	88
4.2.1.1.	Modelos Simplificado.....	88
4.2.1.2.	Modelo em Escala Genômica.....	89
4.2.2.	ANÁLISE DE BALANÇO DE FLUXO.....	97
4.2.3.	MODELO SIMPLIFICADO PROTONADO.....	100
4.2.4.	ANÁLISE DE FLUXO METABÓLICO.....	103
<b>4.3.</b>	<b>ANÁLISE FENOTÍPICA DE BIOPROCESSO.....</b>	<b>106</b>
<b>5.</b>	<b><u>CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</u></b>	<b>115</b>
<b>6.</b>	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b>119</b>
<b>7.</b>	<b><u>APÊNDICE I.....</u></b>	<b>129</b>
7.1.	INDICADORES DE AVALIAÇÃO.....	129

7.2. ATIVIDADES REALIZADAS .....	132
<b><u>8. APÊNDICE II.....</u></b>	<b>135</b>
8.1. ARTIGO SUBMETIDO .....	135
<b><u>9. APÊNDICE III.....</u></b>	<b>151</b>
9.1. ANÁLISE DE GENÔMICA COMPARATIVA – JANELAS CONSERVADAS .....	151
<b><u>10. APÊNDICE IV.....</u></b>	<b>185</b>
10.1. ANÁLISE DE ENGENHARIA METABÓLICA – RESTRIÇÕES DO MODELO EM ESCALA GENÔMICA .....	185





## 1. INTRODUÇÃO

*Eu acredito que um dia água será utilizada como combustível, e o hidrogênio e o oxigênio que a constituem, serão utilizados, separados ou juntos, como uma inesgotável fonte de calor e luz, de intensidade tal que o carvão não é capaz de alcançar. Eu acredito que, quando os depósitos de carvão se esgotarem, a água o substituirá, e será o carvão do futuro.*

*[Tradução livre da pesquisadora]*

*- Júlio Verne (The Mysterious Island 1875) -*

### 1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

---

Em 1874, Júlio Verne pronunciou em seu livro “A Ilha Misteriosa” (no original em francês, *L’île mystérieuse*) problemas energéticos que o mundo vem assistindo nos últimos tempos, e compartilhou a sua visão sobre a indispensável busca pelo desenvolvimento sustentável. Processos biotecnológicos industriais desempenham um papel fundamental na busca de soluções para esse desafio. Dentre esses processos, a fermentação ABE (acetona-butanol-etanol) da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, muito usada industrialmente até 1940, é um dos mais importantes bioprocessos industriais. Recentemente, o interesse nesse processo foi retomado devido à necessidade de substituir fontes combustíveis fósseis por vetores energéticos renováveis, principalmente biohidrogênio e biobutanol.

A *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresenta um metabolismo bifásico, sendo uma fase acidogênica, caracterizada pela produção de ácidos e hidrogênio e uma fase solventogênica, caracterizada pela produção de etanol, butanol e acetona. Sua flexibilidade metabólica também é expressa em termos da variação morfológica e composição da parede celular. Pesquisas anteriores realizadas pela presente autora demonstraram que é possível utilizar glicerol como única fonte de carbono em fermentações ABE com *C. acetobutylicum* ATCC 824. Esse novo processo apresentou variações fisiológicas diferentes das fermentações ABE tradicionais (a partir de

glicose), produzindo menos hidrogênio e mais butanol. Ficou evidenciado que, independentemente do produto final desejado, biohidrogênio ou biobutanol, há uma necessidade de monitorar o perfil metabólico que se estabelece em diferentes condições de operação e de cultura.

Tais pesquisas também demonstraram, ao investigar a variação fenotípica da *C. acetobutylicum* ATCC 824 utilizando a técnica de coloração de Gram, resultados divergentes da literatura, que apresenta a bactéria como Gram positiva. Foi então sugerido que os resultados Gram negativos obtidos eram reflexos das alterações na composição da parede celular, devido a mudanças nas condições ambientais e morfológicas que ocorrem durante o processo.

Nesse contexto, o objetivo desta tese é contribuir para uma melhor compreensão dos problemas associados com a detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824 em fermentações tipo batelada. Pretende-se também refinar o entendimento desse comportamento variável utilizando a informação genômica disponível desta bactéria e assim contribuir para mostrar como algumas ferramentas da Engenharia Genômica podem incorporar novas informações aos métodos tradicionais de monitoramento de bioprocessos. É proposta a incorporação em três diferentes níveis, a saber: (i) nível genômico, (ii) nível metabólico e (iii) nível fenotípico.

A pesquisa busca responder às seguintes perguntas: (i) Quais marcadores no material genético da bactéria estão relacionados com as mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824? (ii) Que modelo metabólico pode ser utilizado para representar as mudanças de fase do metabolismo da *C. acetobutylicum* ATCC 824? (iii) De que maneira o método de monitoramento tradicional do bioprocessos pode ser aprimorado para utilizar as variáveis fenotípicas na detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824?

Para responder a essas perguntas, foram feitas análises específicas para cada um dos níveis propostos (i) Análise de Genômica Comparativa: (i\_a) análise de genoma completo entre microrganismos que também apresentam resposta Gram variável ao teste de Gram buscando encontrar regiões conservadas de alta similaridade e genes marcadores filogenéticos que possam estar relacionados com esse comportamento variável (i\_b) análise de Genômica Comparativa para mimetizar as técnicas experimentais de identifi-

cação de Gram a partir da análise do rRNA 16S (ii) Análise de Engenharia Metabólica para prever a produção final e mimetizar as variações fisiológicas e contribuir para o entendimento da relação do metabolismo com a fisiologia (iii) Análise de Bioprocesso para utilizar a resposta do teste colorimétrico de Gram na avaliação dos limites que regem o comportamento fenotípico variável.

### 1.2. PROBLEMA DE PESQUISA

---

*“Curiouser and curiouser!”*

– *Lewis Carroll, Alice in Wonderland* –

As considerações referidas na introdução deixam claro o interesse em estudar os problemas associados à detecção precoce e ao monitoramento das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824.

Sobre este tema, algumas questões importantes podem ser feitas, e o propósito desta pesquisa é investigar as respostas para algumas delas, como explicitado a seguir:

- (i) Quais marcadores no material genético da bactéria estão relacionados com as mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824?
- (ii) Qual o modelo metabólico pode ser utilizado para representar as mudanças de fase do metabolismo da *C. acetobutylicum* ATCC 824?
- (iii) De que maneira o método de monitoramento tradicional do bioprocessamento pode ser aprimorado para utilizar as variáveis fenotípicas na detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824?

Para responder a essas perguntas, utilizam-se as seguintes ferramentas da Engenharia Genômica:

- (i) Genômica Comparativa, para comparação de sequência de genomas e identificação de regiões de alta similaridade;
- (ii) Engenharia Metabólica, para entendimento do metabolismo e a sua forma de relacionamento com a fisiologia;
- (iii) Engenharia de Bioprocessos, para avaliação dos limites macroscópicos que regem o comportamento fenotípico variável.

### 1.3. MOTIVAÇÃO E RELEVÂNCIA

---

A relevância de elucidar os problemas associados à detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 em fermentações batelada e de desenvolver um novo método para determinar o estado fisiológico no qual a bactéria se encontra e quais os principais produtos metabólicos da sua fermentação utilizando técnicas de coloração de Gram - pode ser argumentada em termos de quatro eixos distintos, porém inter-relacionados, que virão por impactar quatro diferentes dimensões. Tais dimensões são: (i) Impactos sociais; (ii) Impactos econômicos; (iii) Impactos na área da educação e (iv) Impactos na área da saúde.

- (i) Impactos sociais: A busca pela substituição de fontes de energia convencionais e combustíveis fósseis por vetores energéticos renováveis, principalmente biohidrogênio e biobutanol são elementos importantes de conscientização social, quanto à necessidade de se adotar novas abordagens para a utilização de energia nas sociedades modernas.
  
- (ii) Impactos econômicos: A monitoração da variabilidade metabólica de microrganismos constitui-se em uma vantagem para maximizar o desempenho de processos biotecnológicos. Pretende refinar o entendimento deste comportamento utilizando a informação genômica disponível e pretende-se contribuir para elucidar a conexão entre as sequências do genoma e as funções e características expressas. A contribuição também se dá ao propor a utilização de um método simples e de baixo custo de identificação fenotípica indireta (teste colorimétrico de Gram) para melhor definição dos limites das variáveis macroscópicas de bioprocessos que controlam a variabilidade fenotípica.

- (iii) Impactos na área da educação: Nesse contexto, a atual pesquisa contribui para mostrar como algumas ferramentas da Engenharia Genômica podem incorporar novas informações aos métodos tradicionais de monitoramento de bioprocessos e consolidar os conceitos e as aplicações dessa nova área de conhecimento.
  
- (iv) Impactos na área da saúde: Variações fisiológicas também estão presentes em outras espécies de *Clostridium* (*Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetanie* *Clostridium perfringens*) e estão intimamente ligadas à patogenicidade. Sendo assim, novas informações sobre a identificação do estado fisiológico destes microrganismos são de grande interesse médico, principalmente na antecipação da escolha do regime antibiótico profilático a ser empregado.

### 1.5. INSERÇÃO

---

De acordo com a classificação das áreas do conhecimento publicada pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES<sup>1</sup>, em 31/03/2009, a presente tese se insere em um contexto multidisciplinar de pesquisa, na interface entre as áreas de Ciências Biológicas I II e III (Bioquímica dos Microrganismos, Metabolismo e Bioenergética, Biologia Molecular), Engenharia II – Processos Bioquímicos, com aporte metodológico das ferramentas oferecidas pela Estatística e Bioinformática.

No Programa de Pós Graduação em Engenharia Química (PPGENQ), a inserção também acontece interdisciplinarmente, e as linhas de pesquisa das quais este projeto participa são: (i) “Processos Biotecnológicos” e “Engenharia Genômica e Engenharia Biomédica”, mais especificamente nos campos de Bioinformática e Engenharia Metabólica;

A inserção se dá também em termos de dois Laboratórios do POSENQ – EngeBIO (Laboratório de Engenharia Bioquímica), do Grupo de Engenharia Bioquímica; e InteLab (Laboratório de Tecnologias Integradas) do Grupo de Engenharia Genômica.

---

<sup>1</sup> A classificação da CAPES das Áreas do Conhecimento está disponível para download em: <http://www.capes.gov.br/avaliacao/tabela-de-areas-de-conhecimento>



## 1.6. OBJETIVOS

---

*“The inventor...looks upon the world  
and is not contented with things as they are”*

– Alexander Graham Bell –

### 1.6.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo desta tese é contribuir para uma melhor compreensão dos problemas associados com a detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 em fermentações batelada.

### 1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Análise de Genômica Comparativa: Avaliar através de análise computacional quais marcadores no material genético da *C. acetobutylicum* ATCC 824 estão relacionados com as mudanças fisiológicas, utilizando ferramentas de Engenharia Metabólica (Genômica Comparativa) para identificação de regiões de alta similaridade e também para mimetizar metodologias experimentais;
- (ii) Análise de Engenharia Metabólica: Avaliar diferentes abordagens de Engenharia Metabólica, com vistas a selecionar um modelo que represente o sistema fisiológico variável, para entendimento do metabolismo e a sua forma de relacionamento com a fisiologia da *C. acetobutylicum* ATCC 824.
- (iii) Análise Fenotípica de Bioprocesso: Investigar, utilizando recursos da engenharia de bioprocessos, a existência de correlação entre o estado metabólico da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os limites das variáveis macroscópicas de bioprocessos que controlam a variabilidade fenotípica.

### 1.7. ESTRUTURA DO DOCUMENTO

---

Este documento é estruturado da maneira como segue e é representado na Figura 1-1.

Este primeiro capítulo, de natureza introdutória, apresenta o contexto da pesquisa, expõe os problemas de pesquisa, bem como as justificativas e relevância da investigação, sua inserção e a definição de seus objetivos (geral e específicos).

O segundo capítulo, de natureza teórica, apresenta o estado da arte e os conceitos que fundamentam o trabalho.

A seguir, o terceiro capítulo de natureza metodológica, apresenta a descrição dos materiais e métodos experimentais e computacionais utilizados no desenvolvimento deste estudo.

O quarto capítulo reúne e apresenta os resultados obtidos, relacionados a cada nível a partir do qual a investigação é desenvolvida.

O quinto capítulo reúne as conclusões apresentadas e estabelece a interconexão entre os objetivos específicos e o objetivo geral da tese.

As referências bibliográficas apresentam os principais trabalhos que embasaram teórica e metodologicamente esta tese.

Os capítulos subsequentes (Apêndices I, II e III) apresentam os indicadores de avaliação resultantes deste estudo, o manuscrito submetido para a revista *Biosystems Engineering* e resultados complementares da Análise Genômica Comparativa de Genoma Completo e da Análise de Engenharia Metabólica realizadas.

Capítulo 1 - Introdução

Capítulo 2 - Fundamentação Teórica

Capítulo 3 - Metodologia

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Capítulo 5 - Conclusões e Sugestões

Referências Bibliográficas

Apêndice I - Indicadores de Avaliação

Apêndice II - Artigo Submetido

Apêndice III - Resultado da Análise de Genoma Comparativa

Apêndice III - Restrições do Modelo em Escala Genômica

**Figura 1-1 - Diagrama estrutural do documento**

### 1.8. DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

---

#### **Engenharia Genômica aplicada à detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

##### Por quê?

- A fermentação ABE (acetona-butanol-etanol) é um dos mais importantes bioprocessos industriais e, recentemente, o interesse neste processo foi retomado devido à necessidade de substituir fontes combustíveis fósseis por vetores energéticos renováveis, principalmente biohidrogênio e biobutanol.
- Pesquisas anteriores realizadas pela presente autora provaram que é possível utilizar glicerol como única fonte de carbono em fermentações ABE com *C. acetobutylicum* ATCC 824 para produzir hidrogênio e que se pode aproveitar diretamente esse hidrogênio para gerar energia elétrica em células a combustível. Entretanto, a caracterização deste novo processo apresentou mudanças fisiológicas diferentes das fermentações ABE tradicionais (a partir de glicose), produzindo assim menos hidrogênio e mais butanol. Evidencia-se então que, independentemente do produto final desejado, biohidrogênio ou biobutanol, ainda há uma necessidade de se monitorar o perfil metabólico que se estabelece em diferentes condições de operação e de cultura.
- Ao investigar a caracterização microbiológica da *C. acetobutylicum* ATCC 824 através da técnica de coloração de Gram, Castro (2010) obteve resultados divergentes da literatura, que apresenta a bactéria como Gram positiva. Foi sugerido que os resultados Gram negativos obtidos eram reflexos de alterações na composição da membrana celular, devido às mudanças nas condições ambientais que ocorrem durante o processo em batelada. Foi argumentado que tal resultado, se comprovado, poderia abrir caminho para o desenvolvimento de um novo método de detecção precoce e monitoramento do estado fisiológico da *C. acetobutylicum* ATCC 824.
- O presente trabalho, além de monitorar tais mudanças do estado fisiológico, pretende refinar o entendimento deste comportamento utilizando a informação genômica disponível desta bactéria. Espera-se que uma análise da sequência do genoma e do seu metabolismo contribua para elucidar a conexão entre as sequências do genoma e as funções e características expressas, ou seja, o seu fenótipo.

##### Para quê?

- O objetivo desta tese é contribuir para uma melhor compreensão dos problemas associados com a detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 em fermentações batelada.
- Também pretende-se contribuir para mostrar como algumas ferramentas da Engenharia Genômica, no caso Genômica Comparativa e Engenharia Metabólica, podem incorporar novas informações aos métodos tradicionais de monitoramento de bioprocessos. Mais especificamente, é proposta a incorporação destas novas técnicas em três diferentes níveis, a saber: (i) nível genômico, (ii) nível metabólico e (iii) nível fenotípico.

##### Perguntas de Pesquisa

- Quais marcadores no material genético da bactéria estão relacionados com as mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824?
- Que modelo metabólico pode ser utilizado para representar as mudanças de fase do metabolismo da *C. acetobutylicum* ATCC 824?
- De que maneira o método de monitoramento tradicional do bioprocessos pode ser aprimorado para utilizar as variáveis fenotípicas na detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824?

## Metodologia

- Análise de Genômica Comparativa:
  - Foi realizada uma análise de genoma completo entre microrganismos que também apresentam resposta Gram variável ao teste de Gram, utilizando a ferramenta wgVISTA (whole genome VISTA), buscando encontrar nas regiões conservadas de alta similaridade genes marcadores filogenéticos que possam estar relacionados com esse comportamento variável.
  - Foi aplicada uma técnica de bioinformática que utiliza genômica comparativa para mimetizar as técnicas experimentais de identificação de Gram a partir da análise do rRNA 16S. Pretende-se assim identificar qual a resposta gerada por este microrganismo que apresenta a resposta de Gram associada ao estado fisiológico.
- Análise de Engenharia Metabólica:
  - Foram comparadas as respostas de dois modelos metabólicos: um modelo contínuo simplificado e um modelo genômico aqui construído, resultante da combinação do trabalho de duas redes metabólicas preliminares (Lee, 2008; Senger, 2008). Foi utilizada análise de balanço de fluxo para prever a produção final e mimetizar as variações fisiológicas e para entendimento do metabolismo e a sua forma de relacionamento com a fisiologia.
- Análise Fenotípica de Bioprocesso:
  - Foram monitoradas experimentalmente as mudanças fisiológicas de *C. acetobutylicum* ATCC 824 durante fermentação batelada, utilizando variáveis macroscópicas tais como: crescimento celular, consumo de substrato, variação do pH e formação de produto; relacionando-as com a resposta ao teste colorimétrico de Gram para avaliação dos limites que regem o comportamento fenotípico variável.

## Respostas e Contribuições Originais

- Na busca de marcadores filogenéticos, a presente pesquisa detectou que existem 6 regiões de alta similaridade, nas quais foram identificados 15 genes já mapeados. O gene *rpoB* foi identificado como um forte candidato a marcador molecular de variabilidade fenotípica. Foi proposta uma relação entre a regulação da transcrição do gene *rpoB* e o pH do meio de cultura.
- A análise do rRNA 16S da *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresentou resposta Gram positiva nos dois testes *in silico* realizados. A presença de um marcador simultâneo de Gram negatividade ou um terceiro marcador genético, no caso para a Gram variabilidade, não foi evidenciada. A qualificação Gram positiva foi mantida e sugere-se, portanto, que devem existir marcadores em outros *loci* do genoma bacteriano.
- O modelo simplificado se mostrou mais preciso em prever a produção final de hidrogênio e butanol, após aplicada uma análise de balanço de fluxo (FBA) para simular fermentações da *C. acetobutylicum* ATCC 824. Ficaram evidenciadas as diferentes aplicações, vantagens, desvantagens e perspectivas de cada um desses modelos. Foi criado um modelo simplificado protonado que integra informações do pH do meio de cultura.
- A técnica de coloração de Gram mostrou-se eficiente na detecção precoce das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* em fermentações batelada. Foi demonstrada uma correlação entre os dados de fermentação e mudanças fisiológicas da parede celular da bactéria. Foi proposto o conceito de divisão em três fases, admitindo uma fase intermediária transicional que caracteriza melhor as mudanças fisiológicas da bactéria do que a classificação bifásica tradicional. Foi proposto um modelo cinético do processo e elaborado um critério objetivo para definir os três estágios de fermentação, com vistas a alcançar a detecção precoce das mudanças fisiológicas. Esse método é considerado preciso somente quando utilizado para detecção precoce das mudanças metabólicas a partir de dados de crescimento bacteriano e consumo de substrato. Sugere-se, portanto, um novo método de detecção precoce e monitoramento do estado fisiológico da *C. acetobutylicum* ATCC 824 (e outras espécies de Clostridium), utilizando técnicas de coloração de Gram para determinar o estado fisiológico no qual a bactéria se encontra e quais os principais produtos metabólicos da sua fermentação serão produzidos.



## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

“If I have seen further than others, it is by standing  
upon the shoulders of giants”

– Isaac Newton –

Em 1874, Júlio Verne pronunciou em seu livro “A Ilha Misteriosa” (no original em francês, *L’île mystérieuse*) problemas energéticos que o mundo vem assistindo nos últimos tempos, e compartilhou a sua visão sobre a indispensável busca pelo desenvolvimento sustentável. Hoje, mais de 130 anos depois, encontramos frente a desafios que extrapolam a previsão da ficção científica, onde as atuais preocupações com o abastecimento de combustíveis fósseis se somaram aos constantes alertas ambientais sobre o aquecimento global e poluição e exercem uma pressão na busca de novas fontes de energia renováveis (CASTRO, 2010).

Processos biotecnológicos industriais desempenham um papel fundamental na busca de soluções para esses desafios (FORMENTI et al., 2014). No caso específico da produção de biocombustíveis por microrganismos, os principais produzidos atualmente são o etanol e o biodiesel, especialmente no Brasil (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2007a, 2007b). Entretanto, outros biocombustíveis de grande interesse também poderão vir a ser produzidos pela indústria biotecnológica com a ajuda da Engenharia Genômica (PORTO, 2004). Monitorar e interpretar rapidamente mudanças no perfil da cultura de microrganismos constitui-se em uma vantagem para maximizar o desempenho desses processos biotecnológicos (CLEMENTSCHITSCH; BAYER, 2006; FERNANDES et al., 2011).

Dentre esses processos, a fermentação ABE (acetona-butanol-etanol) com bactérias do gênero *Clostridium* é um dos mais importantes bioprocessos industriais (AL-HINAI; JONES; PAPOUTSAKIS, 2015; JONES; WOODS, 1986; LEE et al., 2008b; PATAKOVA et al., 2013).

A fermentação anaeróbia da *C. acetobutylicum* foi descrita pela primeira vez em 1862 por Louis Pasteur, que afirmou “*l’alcool butylique est un produit ordinaire de la fermentation butyrique*” (PASTEUR, 1862). Cinquenta anos depois, Chaim Weizmann isolou pela primeira vez a cepa que seria mais tarde classificada como

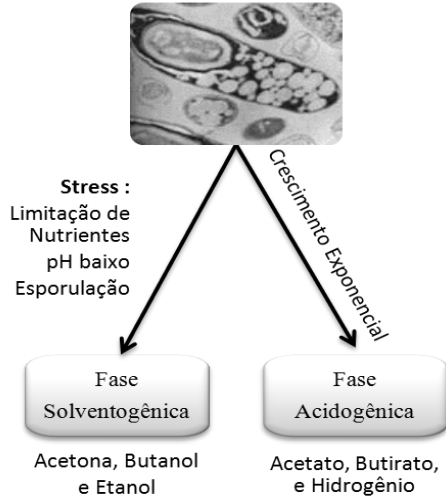
*Clostridium acetobutylicum* e a qualificou como microrganismo produtor de etanol, butanol e acetona. Este último solvente era de extrema importância na época, pois era necessário em grandes quantidades para a produção de cordite, usado como propelente para armas de fogo, artilharia e armas navais. (JONES; WOODS, 1986). O processo ABE permitia a produção de grandes quantidades de acetona, para fabricação de munição, e gerava butanol e etanol como subprodutos. Após a guerra, a fermentação ABE se tornou uma fonte importante de butanol e a obtenção industrial de butanol por via fermentativa foi muito usada industrialmente até 1940, quando novos processos baseados em craqueamento de hidrocarbonetos e técnicas de destilação do petróleo a tornaram economicamente inviável (GREEN, 2011; JONES; WOODS, 1986; LEE et al., 2008b). Recentemente, o interesse neste processo foi retomado devido à necessidade de substituir fontes de combustíveis fósseis por vetores energéticos renováveis, principalmente biohidrogênio e biobutanol (AL-HINAI; JONES; PAPOUTSAKIS, 2015; TRACY et al., 2012).

Entre as espécies de *Clostridium*, a *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 é a melhor caracterizada tanto do ponto de vista genético quanto metabólico, e ferramentas de engenharia genética para modificações em seu genoma já estão disponíveis (HEAP et al., 2007; LEE et al., 2008a).

A *C. acetobutylicum* ATCC 824 faz parte do grupo de bactérias do gênero *Clostridium*. É um grupo diversificado de bactérias classificadas como Gram positivas, anaeróbias, que incluem algumas espécies patogênicas (*Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, e *Clostridium perfringens*) e um grande número de espécies que produzem acetona, butanol, etanol, isopropanol, e ácidos orgânicos por fermentação de uma variedade de fontes de carbono (NOLLING et al., 2001).

Uma característica típica da fermentação de *Clostridium* é o seu padrão considerado bifásico, ilustrado na Figura 2-1. (GRUPE; GOTTSCHALK, 1992; JONES; VAN DER WESTHUIZEN; LONG, 1982; SPATH; SILLERS; PAPOUTSAKIS, 2003).





**Figura 2-1 - Representação gráfica do padrão de metabolismo da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. (adaptado de: [www.sbi.uni-rostock.de](http://www.sbi.uni-rostock.de))**

A primeira fase é a fase acidogênica, durante a qual ocorre crescimento exponencial e os principais produtos são ácido acético, ácido butírico e hidrogênio. A produção de ácido causa uma queda de pH.

Em resposta a condições desfavoráveis do meio ambiente (queda de pH, limitação de nutrientes, etc.), o metabolismo das células sofre uma alteração. Vários fatores são apontados como agentes principais dessa mudança metabólica. Estudos recentes consideram esse fenômeno como uma estratégia da célula para se livrar do acúmulo interno de ácidos não dissociados e NADH, que em altas concentrações são tóxicos para a célula (ALSAKER; PAREDES; PAPOUTSAKIS, 2010; SENGER; PAPOUTSAKIS, 2008a).

Em seguida se inicia a fase solventogênica (a segunda fase), em que os ácidos produzidos são reabsorvidos, e ocorre concomitante com o consumo contínuo de carboidratos. A cultura, agora em estágio estacionário de crescimento, produz solventes (acetona, butanol e etanol). A fase solventogênica é fortemente acoplada à esporulação da bactéria (DT Jones et al., 1982).

O complexo metabolismo anaeróbico da *C. acetobutylicum* tem sido alvo de muitos estudos, entretanto, a mudança da fase acidogênica para a fase solventogênica, é consequência de uma

mudança no padrão de expressão gênica, os fatores desencadeantes dessa mudança metabólica de estado fisiológico ainda não são totalmente compreendidos (AL-HINAI; JONES; PAPOUTSAKIS, 2015; GIRBAL et al., 1995; JONES et al., 2008).

Alterações fenotípicas significativas (ver Figura 2-2) tais como mudanças na composição de membrana celular e variações morfológicas ocorrem ao longo das mudanças no metabolismo da *C. acetobutylicum* (FINCH et al., 2011; JONES; VAN DER WESTHUIZEN; LONG, 1982; SPATH; SILLERS; PAPOUTSAKIS, 2003).

As células acidogênicas vegetativas apresentam-se em formato de bastonetes e se reproduzem rapidamente. Sua membrana celular permite livre acesso aos ácidos formados durante esse crescimento, quando estão na forma protonada (ALSAKER; PAREDES; PAPOUTSAKIS, 2010; TRACY; GAIDA; PAPOUTSAKIS, 2008).

Os ácidos na forma não dissociada, quando se acumulam no meio intracelular, têm efeitos lesivos à membrana. Em resposta a essa agressão, o processo de esporulação é iniciado e as células vão gradativamente mudando o seu formato de bastonete para um formato mais arredondado, característico de esporos. Essa transição está representada na Figura 2-3

Uma vez iniciada a esporulação, a composição lipídica da membrana é transformada e é observado um aumento no conteúdo de ácidos graxos, fenômeno conhecido como adaptação homeoviscosa. Essa habilidade da célula de modificar a relação entre os ácidos graxos insaturados e os lipídeos ajuda a manter ativa a fluidez da membrana e os sistemas de transporte. (TOMAS; BEAMISH; PAPOUTSAKIS, 2004).

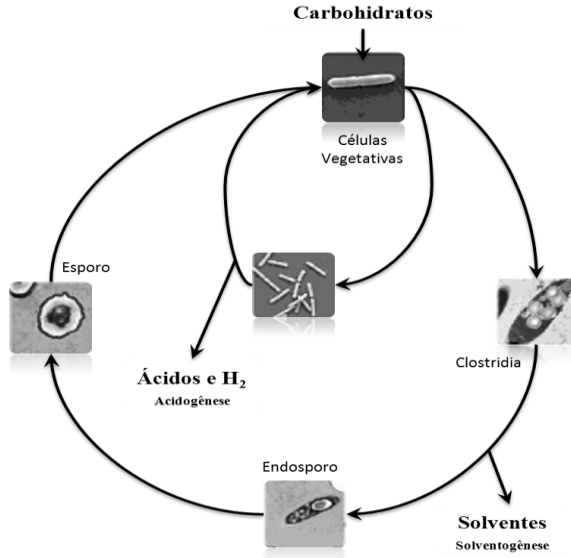


Figura 2-2 - Representação da relação entre as mudanças fenotípicas (fase ácido-gênica e fase solventogênica) e morfológicas (formatos: vegetativo, clostridial, endósporo e esporo) apresentadas pela *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. (adaptado de: [www.sbi.uni-rostock.de](http://www.sbi.uni-rostock.de) por CASTRO (2010))



Figura 2-3 - Representação das mudanças morfológicas apresentadas pela *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (AL-HINAI; JONES; PAPOUTSAKIS, 2015).

Esta complexa heterogeneidade fenotípica microbiana é um problema importante no contexto de fermentações industriais clostridiais e pode conduzir a dificuldades em monitorar o bioprocessos correspondente (FORMENTI et al., 2014; KHANAL et al., 2004; SCHUSTER et al., 2001; ZIGOVÁ; ŠTURDÍK, 2000).

Trazendo estas considerações sobre as necessidades de novos vetores energéticos (especialmente biohidrogênio e biobutanol) para o contexto brasileiro, pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica e Engenharia Tecidual do Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab), em parceria com o Laboratório de Engenharia Bioquímica (EngeBIO), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), buscaram melhor entendimento do processo de produção biológica de hidrogênio (MUCCILLO; PORTO, 2007; OLIVEIRA; PORTO, 2008) e identificaram a conveniência de promover a conversão microbiológica de glicerol a hidrogênio, através de fermentação ABE (CASTRO, 2010). Tal processo, caso implementado, apresentaria: uma solução para um problema ambiental em função do excesso de produção de glicerol pelas usinas de biocombustíveis no Brasil; uma solução econômica, pois transforma um resíduo problemático, do qual o excesso afeta negativamente a valorização do biodiesel; e uma solução energética para a indústria de biodiesel, uma vez que esse hidrogênio gerado pode ser convertido em eletricidade, promovendo o aumento da competitividade (PAPANIKOLAOU et al., 2008; SARMA et al., 2012; YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

Nesse cenário, um avanço recente resultante do trabalho de mestrado da presente autora deu um passo importante para o desenvolvimento de um novo processo microbiológico de transformação de glicerol em hidrogênio. Foi demonstrado que é possível utilizar glicerol como única fonte de carbono em fermentações ABE com *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 para produzir hidrogênio e que se pode aproveitar diretamente esse hidrogênio como energia elétrica utilizando células a combustível (CASTRO, 2010). Ao investigar a variação fenotípica da *C. acetobutylicum* ATCC 824 utilizando a técnica de coloração de Gram, durante o novo processo desenvolvido, Castro (2010) obteve resultados divergentes da literatura, que apresenta a bactéria como Gram positiva. Nessa pesquisa, foi sugerido que os resultados Gram negativos obtidos eram reflexos das alterações na composição da membrana celular, devido às mudanças nas condições ambientais e

morfológicas que ocorrem durante o processo. Foi argumentado que tal resultado, se comprovado, poderia abrir caminho para o desenvolvimento de um novo método de detecção precoce e monitoramento do estado fisiológico da *C. acetobutylicum* ATCC 824 (e outras espécies de *Clostridium*) (CASTRO, 2010).

Uma avaliação dos perfis de produção de hidrogênio, consumo de substrato, e variação do pH do meio de cultura nos mostra que este novo processo apresentou um comportamento predominantemente solventogênico desde o início. Também se observou que diferentemente das fermentações com glicose, a mudança fisiológica entre as fases não acompanha a queda do pH do meio de cultura. Como a maior parte da produção de hidrogênio está associada ao crescimento exponencial do microrganismo e à fase acidogênica (SALIMI et al., 2010; TACONI; VENKATARAMANAN; JOHNSON, 2009), este fato resulta numa menor produção de biohidrogênio e maior produção de biobutanol.

Evidencia-se então que, independentemente de qual o produto final desejado, biohidrogênio ou biobutanol, ainda há necessidade de se determinar o perfil metabólico que se estabelece em diferentes condições de operação e de cultura. Portanto, o desenvolvimento de métodos de monitoramento e detecção precoce destas mudanças de fase durante a fermentação é desejável e importante para avaliar o efeito das condições de processamento na formação de produto.

O estado atual de monitoramento de bioprocessos desenvolveu-se a partir da Engenharia Química (CLEMENTSCHITSCH; BAYER, 2006). Usualmente, apenas um pequeno número de variáveis de bioprocessos é acompanhado, seguido de caracterização detalhada do produto final. Assume-se que a manutenção das condições ambientais dentro dos limites validados leva à padronização na formação do produto (FORMENTI et al., 2014). Os dispositivos de medição disponíveis em biorreatores industriais são frequentemente limitados a sensores de pH, oxigênio dissolvido e temperatura, dispostos em um único local, muitas vezes com gradientes de concentração. Estes instrumentos exibem um valor médio para todo o processo, mas a informação disponível sobre a heterogeneidade espacial no tanque é muito limitada. Os atuais conceitos de monitoramento não consideram a dinâmica do processo de síntese bioquímica ou a complexa interação entre o microrganismo e o meio (FORMENTI et al., 2014). Uma maneira de

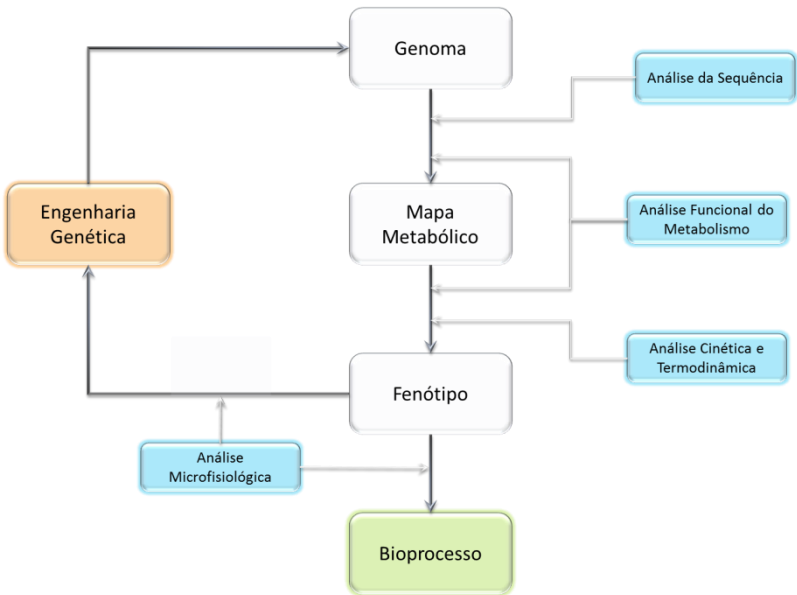
refinar o entendimento do comportamento de microrganismos é utilizar a informação genômica dos mesmos (PORTO, 2000, 2004, 2008).

No caso específico da Fermentação ABE, as variáveis macroscópicas de bioprocessamento usualmente acompanhadas para monitoramento são o pH, o crescimento celular, a produção de metabólitos de interesse e o consumo de substrato. Mais especificamente, o perfil de variação do pH do meio de cultura é utilizado para definir a mudança metabólica entre as fases solventogênica e acidogênica (FERCHICHI et al., 2005; HUANG; FORSBERG; GIBBINS, 1986; MILLAT et al., 2013; ROOS; MCLAUGHLIN; PAPOUTSAKIS, 1985; SALIMI et al., 2010). Alguns estudos dividem a segunda fase em duas categorias: solventogênica, que seria caracterizada pela formação de butanol e acetona em resposta à concentração intracelular de ácidos; e alcologênica, cujos principais produtos seriam o etanol e butanol é acompanhada do acúmulo de NADH intracelular (GIRBAL et al., 1995). Mais recentemente, seis etapas metabólicas foram caracterizadas, utilizando como critério de separação o fluxo de prótons através da membrana celular (SENGER; PAPOUTSAKIS, 2008a). Sabe-se que o processo fermentativo é um processo contínuo e que a representação em fases é apenas uma ferramenta para facilitar o entendimento e acompanhar o processo. Entretanto, a classificação usual em duas fases que utiliza o pH como critério de separação entre as fases aponta a mudança fenotípica do metabolismo durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo, ou seja, qualquer intervenção a ser feita para evitar uma mudança de fase, nesse momento da fermentação, seria complicada. Sendo assim, é desejável a determinação de um critério de detecção precoce destas variações fenotípicas.

A Engenharia Genômica (ver Figura 2-4), aqui entendida como um conjunto de abordagens e métodos de engenharia, utiliza-se dos fundamentos da Engenharia Química para abordar de maneira sistêmica os aspectos da interação organismo/ambiente que determinam os comportamentos dinâmicos não lineares dos sistemas biológicos, (PORTO 2004, 2008).

Enquanto abordagem integrada, essa área de estudo faz uso de ferramentas de bioinformática e técnicas experimentais de Engenharia Genética. Também aplica um conjunto de técnicas de biologia de sistemas, como Engenharia Metabólica para estudar

informação genômica como um sistema e poder extrair características de bioprocessos.



**Figura 2-4 - Diagrama funcional da abordagem sistêmica da Engenharia Genômica: do genótipo ao fenótipo. (adaptado de PORTO 2004, 2008)**

A Figura 2-4 mostra como a Engenharia Genômica permite uma visão sistêmica para a obtenção de propriedades fenotípicas de interesse, a partir das sequências de bases e de aminoácidos que constituem o DNA/RNA e proteínas. A expressão intrinsecamente controlada do conjunto de genes do microrganismo permite a modulação do fenótipo. Nesta abordagem integrada (ver Figura 2-4), a análise microfisiológica embasa a conexão entre as sequências do genoma e as funções/características expressas, ou seja, o fenótipo.

Algumas técnicas experimentais que utilizam informações e/ ou técnicas de Engenharia Genômica foram desenvolvidas com o intuito de monitorar as mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e importantes avanços tecnológicos já foram alcançados. Entre eles, se destaca um método de análise transcricional baseado em tecnologia de *microarray* que relacionou característi-

cas metabólicas e morfológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824 com o perfil de transcrição do microrganismo, ajudando a elucidar alguns eventos genéticos associados com a diferenciação fenotípica (JONES et al., 2008). Estudos transcricionais podem ser uma ferramenta poderosa para análises de Engenharia Genômica, entretanto ainda são altamente laboriosas, lentas e dispendiosas (SMITH; XUAN; ZHANG, 2008), o que limita a sua aplicação.

Um método de citometria de fluxo para detecção das mudanças na composição lipídica da membrana da *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 foi desenvolvido por Linhova (2010), onde duas fases metabólicas distintas podiam ser identificadas utilizando marcadores fluorescentes (LINHOVA et al., 2010, 2012). No entanto, sabe-se que a *C. pasteurianum* NRRL B -598 não segue o padrão típico de fermentação ABE estabelecido para *C. acetobutylicum* ATCC 824, e que a citometria de fluxo empregada para análises microbiológicas ainda é considerada, uma tecnologia complexa e cara, e ainda requer consenso e aceitação mais ampla da comunidade científica (Fernandes et al., 2011 ).

A técnica de coloração de Gram é considerada o alicerce da área de identificação de microrganismos e taxonomia (BARTHOLOMEW; MITTWER, 1952). Este protocolo colorimétrico de várias etapas sequenciais divide as bactérias em dois grupos, baseado na estrutura da sua parede celular e pode ser considerado um método simples e barato, quando comparado com os métodos citados anteriormente.

No cenário do que foi exposto até agora e para contribuir para a incorporação das novas informações que Engenharia Genômica pode fornecer aos métodos tradicionais de monitoramento de bioprocessos, a presente pesquisa utiliza algumas ferramentas da Engenharia Genômica à detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824 em fermentações batelada. Mais especificamente, será proposta a incorporação dessas novas técnicas em três diferentes níveis, a saber: **(i) nível genômico, (ii) nível metabólico e (iii) nível fenotípico.**

A contribuição a nível genômico se dará de duas maneiras:

**A primeira contribuição a nível genômico** está embasada na teoria de *Phylogenetic Footprinting*. Essa teoria considera que mutações em regiões funcionais do genoma se acumulariam mais lentamente do que em regiões não funcionais, pois estariam sob pressão evolutiva. Desta forma, genes e elementos regulatórios



que propiciam uma vantagem evolutiva ao microrganismo sofreriam mudanças a uma velocidade mais lenta do que as demais sequências. Sendo assim, é esperado que tais elementos estejam mais conservados nas sequências de DNA de espécies consideradas próximas na árvore de evolução filogenética e que possuem as mesmas características (Cliften et al., 2003). Pode-se admitir que as variações fenotípicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824 consistem em uma vantagem evolutiva, uma vez que a variação da composição lipídica da membrana permite melhor adaptação às mudanças do ambiente (Tracy et al., 2008; Alsaker et al., 2010). Propõe-se que tais variações podem ser detectadas indiretamente através de testes microbiológico por coloração diferencial (teste de Gram). Será então proposta uma análise de genoma completo entre microrganismos que também apresentam resposta Gram variável ao teste de Gram buscando encontrar regiões conservadas de alta similaridade e genes marcadores filogenéticos que possam estar relacionados com esse comportamento.

O conceito da **segunda contribuição a nível genômico** nesta tese foi inspirado em dois métodos experimentais indiretos de avaliação de Gram que utilizam sequências específicas de iniciadores (*primers*) e sondas (*probes*) que se ligam seletivamente a regiões do rRNA 16S de bactérias Gram positivas ou Gram negativas (Klausegger et al., 1999; Klaschik et al., 2002). A *C. acetobutylicum* ATCC 824 é um microrganismo que apresenta a resposta do teste colorimétrico de Gram aparentemente associada ao estado fisiológico. Dado o fato de que microrganismos Gram positivos e Gram negativos apresentam um marcador genético indireto específico, localizado no rRNA 16S (Klausegger et al., 1999; Klaschik et al., 2002), que permite diferenciação, foi então formulada a seguinte questão: que tipo de marcador genético estaria presente no rRNA 16S da *C. acetobutylicum* ATCC 824? Possíveis respostas para esse microrganismo seriam: apresentar o marcador de sua atual classificação Gram positiva; apresentar simultaneamente os marcadores Gram positivo e Gram negativo; apresentar um terceiro marcador genômico, no caso um marcador específico para microrganismos que apresentem comportamento Gram variável; ou não apresentar nenhum marcador específico para a diferenciação de Gram nesse locus. Para responder tal questão será proposta a realização de uma análise de Gram computacional, que utiliza Genômica Compa-

rativa para mimetizar as técnicas experimentais de identificação de Gram a partir da análise do rRNA 16S.

A **contribuição a nível metabólico** se dará através de uma análise funcional do mapa metabólico. Vários modelos estequiométricos foram concebidos para representar o metabolismo da *C. acetobutylicum*; desde os mais simples, com apenas 14 reações (DESAI; NIELSEN; PAPOUTSAKIS, 1999; PAPOUTSAKIS, 1984); até modelos em escala genômica com mais de 500 reações (DUROT; BOURGUIGNON; SCHACHTER, 2009; LEE et al., 2008a; SENGER; PAPOUTSAKIS, 2008a). Uma análise dinâmica do metabolismo também foi realizada e fornece alguns dados também sobre a cinética (SHINTO et al., 2007). No entanto, estas redes metabólicas ainda se encontram num estágio inicial e, como todo modelo metabólico, necessita de constante revisão e cura de informações. Sendo assim, o presente trabalho propôs a construção de um modelo metabólico em escala genômica baseado nos modelos já publicados e sua comparação com o modelo simplificado proposto por Castro (2010) utilizando a Análise de Balanço de Fluxo (FBA), também chamada de análise baseada em restrições, que é uma abordagem amplamente utilizada para estudar redes metabólicas. A FBA calcula o fluxo de metabólitos através de uma rede metabólica, permitindo assim prever a velocidade de crescimento de um organismo ou a velocidade de produção de metabólitos de interesse (CASTRO, 2010; THIELE; PALSSON, 2010). Pretende-se avaliar se é possível a utilização de modelos metabólicos para representar as mudanças de fase do metabolismo da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e qual a complexidade de informação necessária para que tal modelo seja capaz de prever a produção de metabólitos de interesse.

A **contribuição a nível fenotípico** se dará investigando se a utilização de respostas da análise microfisiológica (medidas indiretas da variação da composição da parede celular através da resposta ao teste colorimétrico de Gram) poderá contribuir para monitorar e detectar antecipadamente a mudança de estado metabólico da bactéria e quais os produtos metabólicos da sua fermentação. Pretende-se, dessa maneira, determinar se o método de monitoramento tradicional do bioprocessamento (mede apenas variáveis macroscópicas com pH, consumo de substrato e crescimento do microrganismo) pode ser aprimorado para utilizar as variáveis feno-

típicas na detecção precoce e no monitoramento das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824?

Esta investigação fenotípica é uma continuação do trabalho proposto por Castro (2010) e pode abrir caminho para o desenvolvimento de um novo método de identificação metabólica da *C. acetobutylicum* ATCC 824 (e outras espécies de *Clostridium*).



### 3. METODOLOGIA

*“Creativity is inventing, experimenting, growing,  
taking risks, breaking rules, making mistakes  
and having fun”  
– Mary Lou Cook –*

Neste capítulo, encontram-se a descrição dos materiais e métodos utilizados no desenvolvimento deste estudo. Para facilitar a apresentação, as informações foram divididas em três partes principais, que correspondem aos três diferentes níveis de abordagem do problema aqui propostos, a saber: (i) nível genômico, (ii) nível metabólico e (iii) nível fenotípico.

A primeira parte é referente aos métodos computacionais empregados na Análise de Genômica Comparativa e está dividida em duas partes: Análise Comparativa de Genoma Completo e Análise de Gram Computacional.

A segunda parte apresenta a metodologia computacional empregada na Análise de Engenharia Metabólica.

Finalmente, a terceira parte descreve a metodologia experimental e os procedimentos analíticos empregados na Análise Fenotípica de Bioprocesso.

Os componentes experimentais e computacionais da pesquisa foram desenvolvidos nos Laboratórios EngeBIO - Laboratório de Engenharia Bioquímica, coordenado pelo Dr. Agenor Furigo Junior, e InteLAB - Laboratório de Tecnologias Integradas, coordenado pelo Dr. Luismar Marques Porto, localizados no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina.

### 3.1. ANÁLISE DE GENÔMICA COMPARATIVA

#### 3.1.1. ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMA COMPLETO

Foi realizada uma análise de genoma completo par a par entre o genoma de microrganismos que também apresentam resposta Gram variável ao teste de Gram e o genoma da *C. acetobutylicum*. O objetivo foi encontrar nas regiões conservadas de alta similaridade, genes marcadores filogenéticos que possam estar relacionados com esse comportamento fenotípico variável.

##### 3.1.1.1. SEQUÊNCIAS UTILIZADAS

Microrganismos previamente citados como Gram variáveis em literatura foram selecionados com base na disponibilidade e qualidade do seu genoma completo sequenciado.

Suas sequências completas do genoma foram obtidas em formato FASTA no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e foram posteriormente comparadas par a par com o genoma completo da *C. acetobutylicum* ATCC 824 (AE001437.1).

As espécies Gram variáveis utilizadas e seus respectivos números de acesso no GenBank estão listadas a seguir:

**Tabela 3-1 - Espécies Gram variáveis utilizadas e seus respectivos números de acesso no GenBank**

<b>Microrganismo</b>	<b>GenBank</b>	<b>Gram</b>	<b>Código</b>
<i>Borrelia burgdorferi</i> ZS7	CP001205.1	Gram -	Bb
<i>Chlamydomphila pneumonia</i> AR39	AE002161.1	Gram -	Cp
<i>Ehrlichia chaffeensis</i> str. Arkansas	CP000236.1	Gram -	Ec
<i>Listeria monocytogenes</i> 08-5578	CP001602.1	Gram +	Lm
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	AE000516.2	Gram +	Mt
<i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> SS14	CP000805.1	Gram -	Tp
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AE001437.1	Gram +	Ca

### 3.1.1.2. FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

As sequências foram alinhadas globalmente através da ferramenta computacional wgVista (*whole genome vista*), disponível na plataforma VISTA tools ([genome.lbl.gov/vista](http://genome.lbl.gov/vista)), utilizando a sequência da *C. acetobutylicum* ATCC 824, (AE001437.1) como referência.

O alinhamento global foi realizado utilizando o algoritmo Shuffle-LAGAN. O tamanho de janela utilizado para calcular o *score* de conservação foi de 100 pares de bases (valor padrão). O valor utilizado para determinar a largura mínima necessária para definir se uma região é ou não conservada foi de 100 pares de bases (valor padrão).

Para determinar a percentagem mínima de conservação ideal para a atual investigação foi realizada uma varredura especificando um grau de conservação mínimo de 75%, 85% e 95% entre cada par de genomas comparados.

As respostas obtidas para cada comparação genômica completa par a par microrganismo foram analisadas em conjunto para determinação de faixas ou regiões de maior conservação comuns entre elas.

As ferramentas de bioinformática utilizadas para determinar quais genes estão presentes em cada área conservada determinada e quais as suas respectivas funções foram as seguintes:

- NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)
- KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*),
- STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*),
- UniProt (*Universal Protein Resource*).

Foram considerados genes candidatos a serem possíveis marcadores filogenéticos relacionados com o comportamento fenotípico variável do grupo estudado os genes que estiverem conservados nos seis microrganismos com pelo menos 75% de identidade conservada.

### 3.1.1. ANÁLISE DE GRAM COMPUTACIONAL

Foi aplicada uma técnica de bioinformática que utiliza Genômica Comparativa para mimetizar as técnicas experimentais de identificação de Gram a partir da análise do rRNA 16S.

Os dois métodos experimentais indiretos de avaliação de Gram aqui reproduzidos *in silico*, utilizam sequências específicas de iniciadores (*primers*) e sondas (*probes*) que se ligam seletivamente a regiões do rRNA 16S de bactérias Gram positivas ou Gram negativas (Klausegger et al., 1999; Klaschik et al., 2002).

Pretendeu-se identificar qual a resposta gerada pela *C. acetobutylicum*, sendo este um microrganismo que apresenta a resposta de Gram variável e aparentemente associada ao estado fisiológico.

#### 3.1.1.1. SEQUÊNCIAS UTILIZADAS

O número de identificação do GenBank referente à sequência do RNA ribossomal 16S da *C. acetobutylicum* ATCC 824 utilizada foi o U16166.1 e foi obtido no NCBI (National Center for Biotechnology Information).

As sequências genômicas das *probes* Gram negativas (ISN2 5-CCG CAG AAT AAG CAC CGG CTA ACT CCG T-3) e Gram positivas (ISP2 5-CCT AAC CAG AAA GCC ACG GCT AAC TAC GTG-3) foram obtidas no trabalho de Sven Klaschik (2002) e arquivadas em formato FASTA.

As sequências genômicas dos *primers* Gram negativo (68d 5'-AYGACGTCAAGTCMTCATGG-3') e Gram positivo (143 5'-GAYGACGTCAARTCMTCATGC-3') foram obtidas no trabalho de Alfred Klausegger (1999) e arquivadas em formato FASTA.

#### 3.1.1.2. FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

As sequências foram alinhadas globalmente utilizando a ferramenta computacional mVISTA (main vista), disponível na plataforma VISTA tools ([genome.lbl.gov/vista](http://genome.lbl.gov/vista)) utilizando a ferramenta AVID e alinhamento tipo LAGAN.



### 3.2. ANÁLISE DE ENGENHARIA METABÓLICA

---

Com esta Análise de Engenharia Metabólica pretendeu-se avaliar a possibilidade de utilização de modelos metabólicos para representar as mudanças de fase do metabolismo da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e qual a complexidade de informação necessária para que tal modelo seja capaz de prever a produção de metabólitos de interesse.

Foram então comparadas as respostas de dois modelos metabólicos: um modelo contínuo simplificado e um modelo genômico aqui construído, resultante da combinação do trabalho de duas redes metabólicas preliminares (Lee, 2008; Senger, 2008).

Neste estudo, foram impostas aos modelos restrições estequiométricas, de capacidade e termodinâmicas.

As restrições estequiométricas são as restrições impostas pelo balanço de massa e são inseridas pela matriz estequiométrica de reações da rede metabólica definida.

As restrições termodinâmicas são determinadas também pela matriz estequiométrica de reações da rede metabólica e definidas através da reversibilidade e irreversibilidade de cada reação.

As restrições de capacidade são os limites superiores e inferiores, que definem os fluxos máximo e mínimo permitido das reações.

O comportamento da bactéria foi analisado simulando o desempenho metabólico na fase acidogênica. O *toolbox* para Matlab GEnSys foi utilizado para resolver o problema de programação linear gerado (OLIVEIRA; PORTO, 2008). Foi utilizada a técnica de Análise de Balanço de Fluxo (FBA) para prever a produção final e mimetizar as variações fisiológicas e para entendimento do metabolismo e a sua forma de relacionamento com a fisiologia. A Análise de Fluxo Metabólico (MFA) foi realizada e seu resultado foi comparado ao resultado da Análise de Balanço de Fluxo. Um esquema geral da metodologia empregada nesta etapa é apresentado na

Figura 3-1.

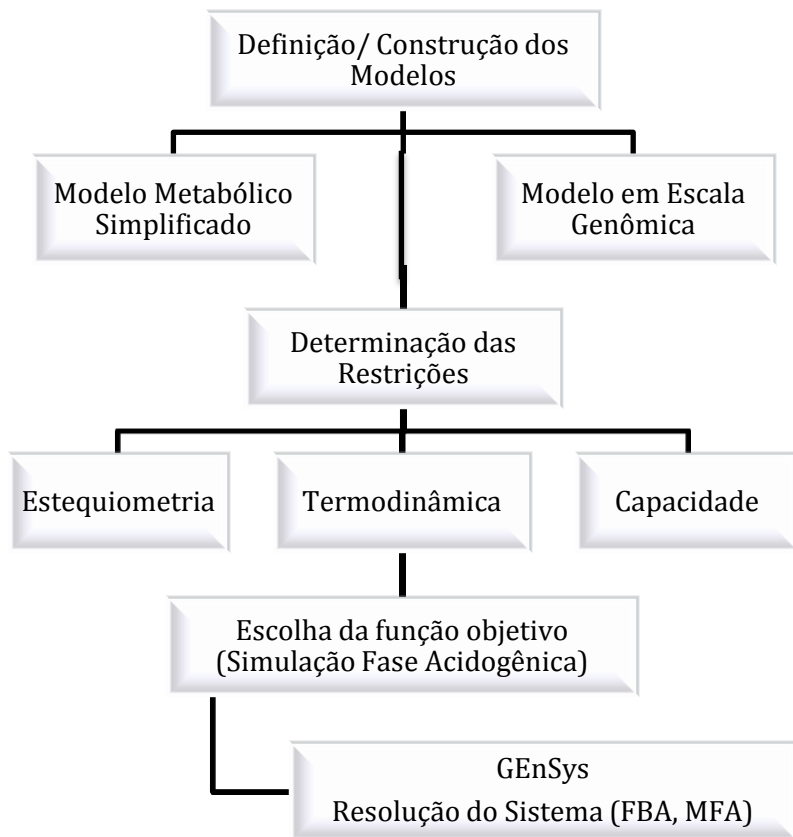
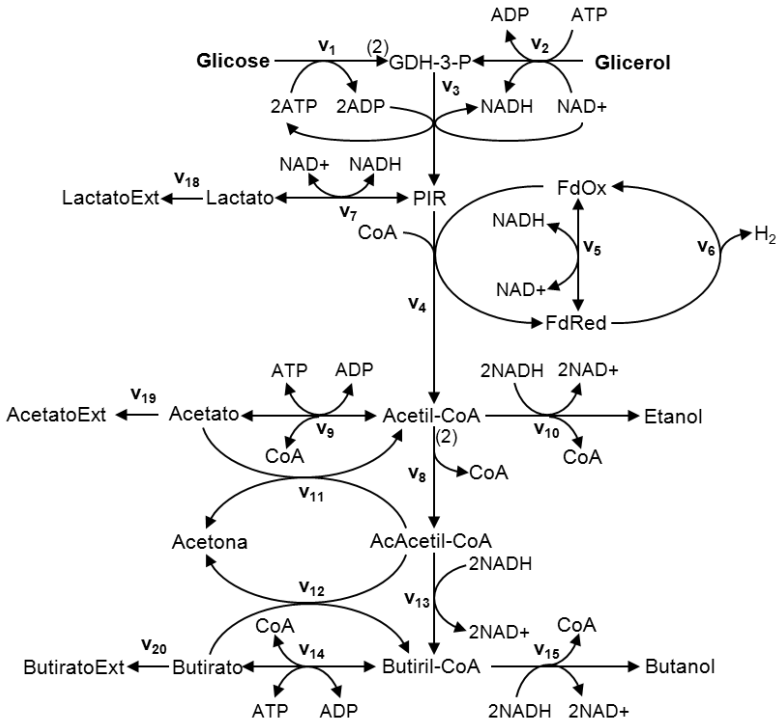


Figura 3-1 - Metodologia utilizada na Análise de Engenharia Metabólica

### 3.2.1. MODELOS DE REDE METABÓLICA

#### 3.2.1.1. MODELOS SIMPLIFICADO

A rede metabólica simplificada utilizada foi a derivada de uma modificação da rede construída por (OLIVEIRA, CASTRO et al., 2008). O diagrama de reações do modelo está representado na Figura 3-2.



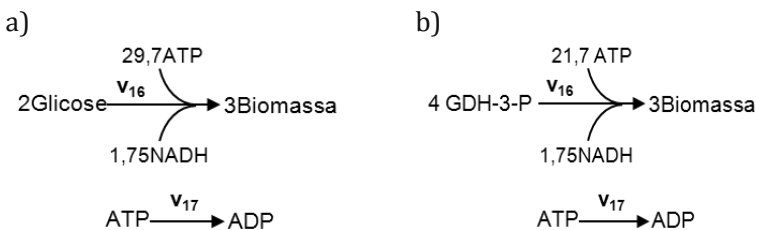
**Figura 3-2 - Rede metabólica simplificada da *C. acetobutylicum* ATCC 824. São 20 reações e 25 metabólitos (13 são considerados metabólitos internos e 12 externos. (OLIVEIRA, 2008).**

Além das 18 reações representadas na Figura 3-2, duas reações auxiliares compunham o modelo, as reações  $v_{16}$  e  $v_{17}$ , que correspondem, respectivamente, a velocidade de crescimento celular e a ATPase.

Foi proposta uma modificação deste modelo no trabalho de Castro (2010) que é apresentada na Figura 3-3. A modificação se apresenta na reação da velocidade de crescimento celular ( $v_{16}$ ), onde a biomassa é gerada a partir do intermediário gliceraldeído-3-fosfato ao invés de ser gerada a partir da glicose, como foi proposto por Papoutsakis (1984).

Os coeficientes da reação proposta por Papoutsakis foram determinados experimentalmente (PAPOUTSAKIS, 1984), e as

modificações aqui propostas foram realizadas através de uma relação estequiométrica simples e resultaram no seguinte modelo:



**Figura 3-3 - Reações auxiliares, v16 e v17 que correspondem, respectivamente, a velocidade de crescimento celular e a ATPase a) Modelo Experimental de Papatoukakis (1984) ; b) Modelo modificado por Castro (2010).**

### 3.2.1.1. MODELO EM ESCALA GENÔMICA

A rede metabólica em escala genômica utilizada foi uma combinação do trabalho de duas redes metabólicas preliminares (LEE et al., 2008a; SENGER; PAPOUTSAKIS, 2008b). No processo de comparação entre os modelos e cura das informações, utilizou-se o modelo de Lee et al. (2008) como modelo de base, alimentado com os parâmetros termodinâmicos (limites máximos e mínimos de fluxo) do trabalho de Senger (2008).

A escolha do modelo de base se deveu principalmente à sua melhor correspondência às propriedades fenotípicas do microrganismo, mas também se levou em consideração a disponibilidade de dados de qualidade para sua correta transposição à ferramenta de suporte computacional utilizada no trabalho (GEnSys). Sendo assim, as reações bioquímicas consideradas continham menos erros, os nomes dos compostos estavam abreviados de maneira satisfatória e uma lista com todos os metabólitos internos e externos foi disponibilizada.

O primeiro passo foi a uniformização de nomenclatura dos metabólitos utilizados em cada modelo. Em seguida, foi realizada a padronização da classificação de cada uma das reações seguindo a numeração proposta pelo KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), verificando então a estequiometria e reversibilidade das reações. Foram então verificadas as informações do gene res-

ponsável por cada reação utilizando as informações disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Foi necessária a definição de localização dos metabólitos. As diferenças entre os conceitos de metabólito intracelular/extracelular e interno/externo foram as definidas por Oliveira (2008) para construção de modelos genômicos utilizados no GEnSys (OLIVEIRA; PORTO, 2008). Foi então considerado metabólito extracelular (intracelular) o composto que está no exterior (interior) do espaço delimitado pela membrana. Externo, no entanto, é aquele metabólito que: aparece apenas no lado esquerdo das reações irreversíveis da qual participa; aparece apenas no lado direito das reações irreversíveis da qual participa; aparece apenas uma vez no lado esquerdo ou direito de uma reação reversível.

Reações de transporte para dentro da célula foram adicionadas para todos os metabólitos intracelulares utilizados como reagentes em reações irreversíveis, mas classificados como externos pelo GEnSys. Reações de transporte para fora da célula foram adicionadas para todos os metabólitos intracelulares gerados como produtos em reações irreversíveis, mas classificados como externos pelo GEnSys. Por fim, supôs-se que somente uma fonte de carbono estava disponível no meio de cultura (no caso, glicose) e que o fluxo de transporte de aminoácidos para o interior das células era nulo (ou seja, os aminoácidos eram todos produzidos pelas vias biossintéticas correspondentes).

### **3.2.2. ANÁLISE DE BALANÇO DE FLUXO (FBA) E ANÁLISE DE FLUXO METABÓLICO (MFA)**

#### **3.2.2.1. SOFTWARES**

Para realização deste trabalho, foi utilizado o GEnSys 1.0 (disponível em [www.intelab.gensys.ufsc.br](http://www.intelab.gensys.ufsc.br)), um programa desenvolvido por Oliveira (2008) implementado em Matlab<sup>®2</sup>. O *toolbox* GEnSys reúne os principais métodos computacionais para análise e

---

<sup>2</sup> MATLAB<sup>®</sup> é marca registrada da The Mathworks, Inc.; Natick, MA - Math Works, [www.mathworks.com/](http://www.mathworks.com/)

simulação de redes biológicas, entre eles o FBA e o MFA. (OLIVEIRA; PORTO, 2008). Para a análise de fluxo baseada em restrição, como a FBA, o GEnSys utiliza as rotinas `optimizeCbModel` e `solveCobraLP` do toolbox COBRA3 (BECKER, FEIST et al., 2007).

### 3.1. ANÁLISE FENOTÍPICA DE BIOPROCESSO

---

A Análise Fenotípica de Bioprocesso proposta investigou se a utilização de respostas fenotípicas da análise microfisiológica (medidas indiretas da variação da composição da parede celular através da resposta ao teste colorimétrico de Gram) pode contribuir para monitorar e detectar antecipadamente a mudança de estado metabólico da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e assim prever quais os produtos metabólicos da sua fermentação.

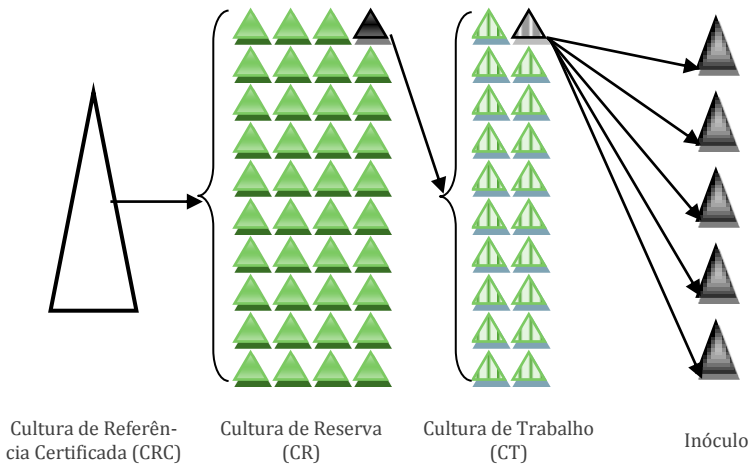
#### 3.1.1. MICRORGANISMO

O microorganismo utilizado neste trabalho foi a *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, proveniente da Coleção de Cultura Tropical Fundação André Tosello – Campinas, SP.

Com o propósito de manter a integridade da cepa utilizada, quatro passagens (transferência da bactéria de uma cultura viável para um novo meio de cultura) foram definidas e são representadas na Figura 3-4. A metodologia foi desenvolvida com base no trabalho de BRYUKHANOV e NETRUSOV, 2006, que avaliou a manutenção e o armazenamento em longo prazo de culturas de microrganismos anaeróbicos, entre eles a *C. acetobutylicum*.

---

<sup>3</sup> O COBRA toolbox está disponível para download em [http://gcr.g.ucsd.edu/Downloads/Cobra\\_Toolbox](http://gcr.g.ucsd.edu/Downloads/Cobra_Toolbox)



**Figura 3-4 - Fluxograma do processo de cultura e manutenção do microorganismo**

### **3.1.1.1. CULTURA DE REFERÊNCIA CERTIFICADA (CRC)**

A linhagem de *C. acetobutylicum* ATCC 824 utilizada nesta pesquisa como Cultura de Referência Certificada (CRC) foi obtida da Coleção de Cultura de Células da Fundação André Tosello. A cultura foi recebida na forma de cultura reativada, em duplicata, acompanhada de certificação, e mantida em refrigerador entre 2°C e 8°C.

### **3.1.1.2. CULTURA DE RESERVA (CR)**

A Cultura de Reserva (CR) foi estabelecida a partir da reativação e repique da CRC. A reativação da CRC foi realizada em meio líquido, aqui referido como Meio de Crescimento e Manutenção, recomendado pela Fundação André Tosello e formulado a partir do *Reinforced Clostridial Medium* (RCM), Oxoid – CM149 (A composição do meio é apresentada na Tabela 3-2).

Amostras da CRC foram retiradas com auxílio de agulha (ou alça) de platina flambada e fria, e então depositadas em garrafas *shott* estéreis contendo o meio de crescimento e manutenção. As

garrafas foram incubadas anaerobicamente a 37°C, por um período de 24 a 48 horas. A anaerobiose foi mantida em jarra de anaerobiose da Permution, por meio do Sistema de Anaerobiose Anaerogen, da Oxoid. Após o período de incubação, a cultura foi fracionada em tubos eppendorfs de 2 ml, com 20% (v/v) de glicerol estéril, e esses mantidos à temperatura de -70°C, em freezer. Semestralmente, um lote com 40 novos repiques foi armazenado, podendo ser utilizado por um período máximo de 2 anos. (BRYUKHANOV e NETRUSOV, 2006)

### **3.1.1.3. CULTURA DE TRABALHO (CT)**

A Cultura de trabalho (CT) constituiu-se de uma subcultura primária de um estoque da cultura de referência. A reativação da cultura de reserva também foi realizada no Meio de Crescimento e Manutenção, recomendado pela Fundação André Tosello e formulado a partir do Reinforced Clostridial Medium (RCM), Oxoid – CM149 (Tabela 3-2). A cultura de reserva foi retirada do ambiente de manutenção (-70°C) e mantida em temperatura ambiente. Após descongelamento, em ambiente estéril, o conteúdo de cada eppendorf foi vertido em garrafa *shott* estéril de 1000 ml contendo 600 ml de meio de crescimento e manutenção.

As garrafas foram incubadas anaerobicamente a 37°C, por um período de 24 a 48 horas. A anaerobiose foi mantida em jarra de anaerobiose da Permution, por meio do Sistema de Anaerobiose Anaerogen, da Oxoid. Após o período de incubação, a cultura foi fracionada em 20 tubos Falcon estéreis, com 30 ml. Os repiques foram devidamente rotulados e mantidos em temperatura entre 2°C e 8°C, em refrigerador. Uma amostra de 30 ml de cada lote de reativação da CR foi analisada quanto aos itens pureza, características morfológicas e fisiológicas, seguindo os procedimentos descritos nas subseções.

A cultura de trabalho foi repicada semestralmente (ou conforme a demanda), até o quinto repique, quando era, então, descartada e substituída por um novo estoque, derivado de uma nova cultura de reserva, e assim sucessivamente. (BRYUKHANOV e NETRUSOV, 2006)



### 3.1.1.4. INÓCULO

O inóculo constitui-se de uma subcultura primária de um estoque da cultura de trabalho. A ativação do inóculo foi realizada no Meio de Crescimento e Manutenção, recomendado pela Fundação André Tosello e formulado a partir do *Reinforced Clostridial Medium* (RCM), Oxoid – CM149 (ver composição - Tabela 3-2). A cultura de trabalho foi retirada do ambiente de manutenção (entre 2°C e 8°C) e mantida em temperatura ambiente. Em ambiente estéril, o conteúdo de cada tubo Falcon (cada tubo contém 30 ml de CT, e o inóculo foi complementado de 10% v/v) foi vertido em garrafa *shott* estéril contendo quantidade suficiente de meio de crescimento e manutenção (90% v/v). O inóculo foi então incubado anaerobicamente a 37°C, por um período de 24 horas. A anaerobiose foi mantida utilizando jarra de anaerobiose da Permutation, juntamente com o Sistema de Anaerobiose Anaerogen, da Oxoid. Após o período de incubação, a cultura está pronta para ser utilizada.

### 3.1.2. MEIOS DE CULTURA - COMPOSIÇÃO

O meio basal utilizado na reativação e manutenção das Culturas de Reserva e de Trabalho foi o indicado pela Fundação André Tosello, formulado a partir do *Reinforced Clostridial Medium* (RCM), Oxoid – CM149, com a seguinte composição:

**Tabela 3-2 - Composição do Meio de Crescimento e Manutenção**

Componente	Concentração (g/ℓ)
Extrato de levedura	3,00
Extrato de carne	10,00
Peptona bacteriológica	10,00
Amido solúvel	1,00
Glicose	5,00
Cloreto de sódio	5,00
Cloreto de cisteína	0,50
Acetato de sódio	3,00

Fonte: **Fundação André Tosello (Campinas - SP)**

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e o meio esterilizado a 121°C por 20 minutos antes de ser utilizado.

### 3.1.3. ENSAIOS FERMENTATIVOS

#### 3.1.3.1. REATOR ANAERÓBICO

O projeto dos biorreatores foi baseado nos trabalhos de (MAEDA, SANCHEZ-TORRES *et al.*, 2008; PAN, FAN *et al.*, 2008). Os reatores e o aparato experimental foram projetados pela pesquisadora e fabricados pela oficina de vidraria da DIST - Indústria, Comércio e Serviços Ltda. Os ensaios fermentativos foram realizados em reatores anaeróbicos conectados a um aparato experimental, representados na Figura 3-5.

Todos os componentes foram conectados por meio de mangueiras e os frascos vedados com rolhas. Foi aplicada uma camada de silicone adicional em todas as conexões. As mangueiras e as rolhas utilizadas eram de silicone ou poliuretano, materiais escolhidos de modo a evitar a fuga de gás pelas junções e conexões.

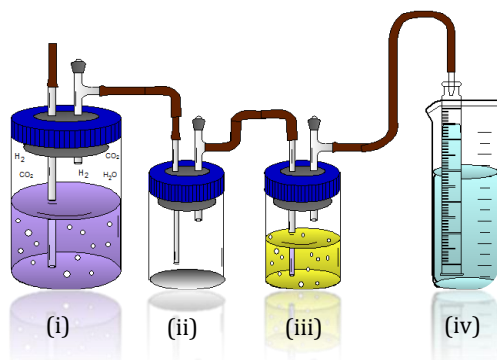


Figura 3-5 - Representação do reator anaeróbico e do Aparato Experimental Acoplado: (i) Reator anaeróbico batelada; (ii) Frasco de segurança; (iii) Dispositivo para captação do CO<sub>2</sub>; (iv) Dispositivo para mensuração do volume de hidrogênio formado.

O aparato experimental capacitado para separação e quantificação do biogás produzido é composto por:

- (i) Reator anaeróbio batelada – constituído por frasco *shott* 1000 ml, rolha de silicone, tubo para coleta/ passagem do biogás produzido e tubo para coleta de amostra/ passagem de gás N<sub>2</sub>.
- (ii) Frasco de segurança – projetado para impedir o contato do reator com a solução de NaOH e medir a passagem do biogás formado
- (iii) Dispositivo para captação do CO<sub>2</sub> (NaOH “trap”) – o biogás formado é borbulhado na solução de NaOH 0,1M; três gotas de fenolftaleína são adicionadas para acompanhamento da saturação da solução.
- (iv) Dispositivo para mensuração do volume de hidrogênio formado – o H<sub>2</sub> formado provoca o deslocamento de uma coluna d’água, sendo este deslocamento observado na bureta graduada.

### **3.1.3.2. DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO**

Os experimentos foram realizados nos reatores anaeróbicos contendo 750 ml de meio de cultura para fermentação e 75 ml de inóculo. O processo de fermentação foi conduzido em uma incubadora com plataforma de agitação orbital, onde a temperatura e a agitação foram mantidas constantes a 37°C e 120 rpm. A anaerobiose do processo foi iniciada após a passagem de gás nitrogênio pelo meio de cultura durante 15 minutos. Os reatores estavam acoplados ao sistema operacional, sistema esse que se encontrava anexo à incubadora, conforme ilustrado na Figura 3-6.



Figura 3-6 - Reactores anaeróbicos utilizados e aparato experimental acoplado

### ***3.1.3.3. PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM***

Durante os ensaios fermentativos, foram extraídas alíquotas para realização dos procedimentos analíticos.

Antes de cada amostra ser coletada, uma porção de aproximadamente 5,0 ml era descartada em receptor adequado e esterilizada, para garantir a representatividade da amostra recolhida para análise.

Cada amostragem retirava aproximadamente 5,0 ml do caldo fermentativo em intervalos de tempo alternados. As amostras foram coletadas com seringas de plástico de 10,0 ml. A cada tempo de amostragem, quatro amostras eram extraídas, uma de cada reator do ensaio.

Após cada amostragem, o volume retirado de cada reator (aproximadamente 5,0 ml) era vertido em tubos Falcon previamente identificados. O conteúdo era então homogeneizado em um agitador de tubos tipo vortex. Após a homogeneização, a determinação potenciométrica do pH de cada amostra era realizada e, em seguida, a determinação turbidimétrica do crescimento celular.

O conteúdo de cada tubo Falcon era dividido em tubos eppendorfs (tipo cone) de 1,5 ml com o auxílio de micropipeta calibrada. Cada amostra gerava três tubos eppendorfs com 1,5 ml cada e um quarto tubo, que armazenava o restante do conteúdo (amostra reserva de segurança). Os dezesseis tubos eppendorfs eram centrifugados por 10 minutos e rotação de 3000rpm. Em seguida, os quatro tubos de reserva eram rotulados e mantidos em temperatura entre 2°C e 8°C, em refrigerador, e os outros doze eppendorfs (cada três derivados de uma amostra de cada um dos quatro reatores) eram então separados em sobrenadantes e precipitados, gerando agora 12 tubos de sobrenadantes e 12 tubos de precipitados.

De cada uma das doze amostras de sobrenadante, 1µl eram retirados com o auxílio de micropipeta calibrada (após homogeneização em agitador de tubos tipo vortex). A amostra era então diluída em NaCl 0,9%, e a concentração de substrato determinada.

A Figura 3-7 apresenta o fluxograma metodológico utilizado durante o procedimento de amostragem e coleta de dados. Destaca-se, no fluxograma, que as análises para determinação do consumo de substrato (método colorimétrico - enzimático), a determinação turbidimétrica do crescimento celular e as análises morfológicas foram realizadas em triplicata.

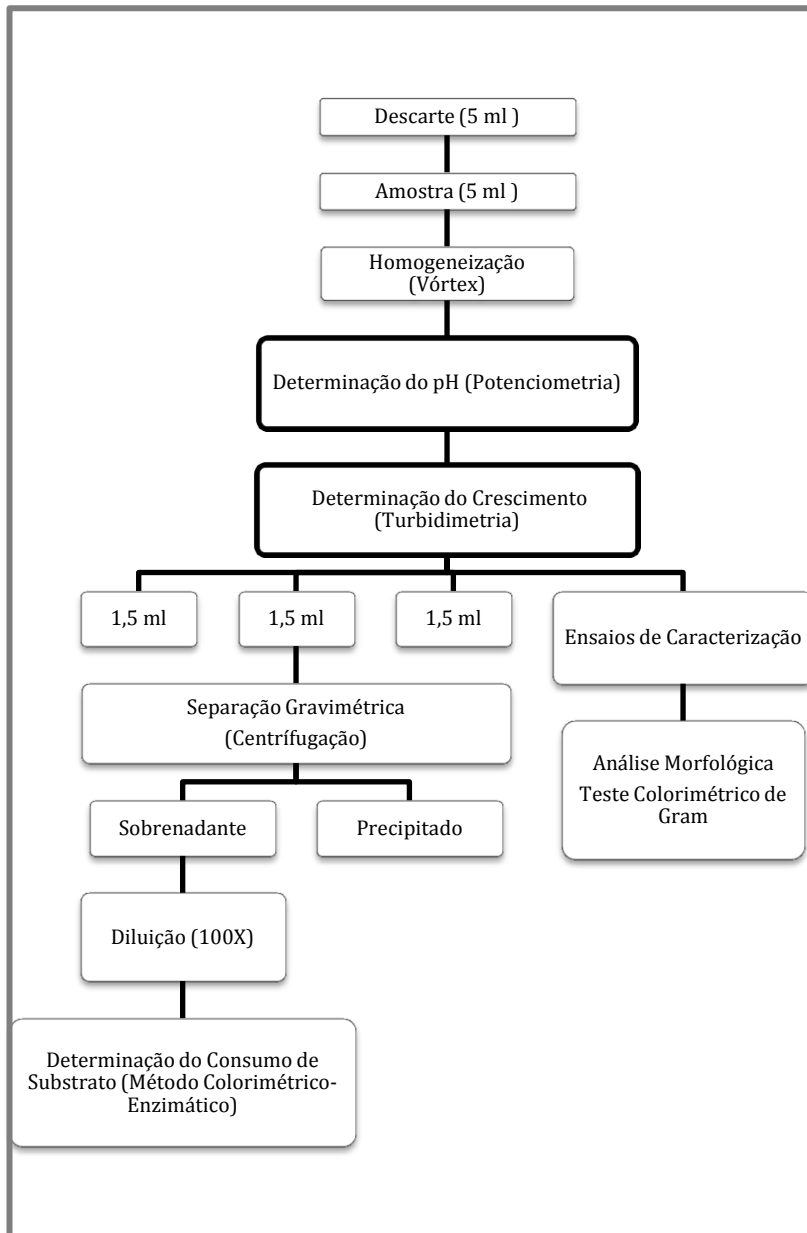


Figura 3-7 - Esquema metodológico utilizado para amostragem

### 3.1.4. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

### 3.1.5. DETERMINAÇÃO DO PH

A determinação do pH foi feita através de leitura direta de alíquotas de 5 ml do caldo fermentativo, em potenciômetro.

### 3.1.6. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

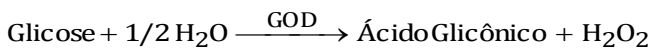
O crescimento celular foi avaliado pelo método turbidimétrico; as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro SP-1105 (Biosystems) com comprimento de onda de 600 nm (triplicata). A correlação entre a concentração de microrganismos e a absorbância foi calculada utilizando a equação de Beer-Lambert,  $ABS = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right) = \varepsilon \cdot C \cdot L$ , onde ABS é a absorbância medida,  $I_0$  é a intensidade da luz incidente a um dado comprimento de onda,  $I$  é a intensidade transmitida pela amostra,  $l$  é o comprimento da célula (distância que a luz percorreu por ela),  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção mássica e  $C$  é a concentração da substância em (mol/ l). O coeficiente de extinção mássica foi selecionado da literatura e é dado por  $\varepsilon_1 = 5,0 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Desai, Nielsen, & Papoutsakis, 1999; Harris, Blank, Desai, Welker, & Papoutsakis, 2001; J. K. McLaughlin, C. L. Meyer, & Eleftherios T. Papoutsakis, 1985; Tomas, Beamish, & Papoutsakis, 2004).

### 3.1.7. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE SUBSTRATO

Para verificação do consumo de glicose foi utilizado kit colorimétrico Glicose - PP (Gold Analisa Diagnóstica), baseado no método enzimático-colorimétrico.

Método reacional: Nesse método, a glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância medida em 500

nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra. A reação é representada a seguir:



Componentes:

- Padrão - Contém glicose 100 mg/dℓ.
- Reagente de Cor - Contém tampão pH 7,5 de fosfato 70 mmol/ℓ, fenol 5,0 mmol/ℓ, glicose oxidase > 10000 U/ℓ, peroxidase > 1000 U/ℓ, e 4-aminoantipirina 0,4 mmol/ℓ.

Linearidade e Limite de Detecção:

- A reação é linear até 500 mg/ dℓ (28 mmol/ℓ).
- O Limite de detecção (verificado no comprimento de onda em 500nm) é de 0,23 mg/ dℓ até 500 mg/ dℓ.

Para valores maiores do que 500 ml/ dℓ, a amostra foi diluída com água destilada para a determinação e o resultado obtido, multiplicado pelo fator de diluição.

Preparo: O preparo das amostras devidamente diluídas, assim como das soluções padrão e branco, foi realizado em tubos de ensaio de 10 ml, de acordo com a Tabela 3-3.

**Tabela 3-3 - Volumes de água, amostra e reagentes utilizados na dosagem de Glicose.**

<b>Tubos</b>	<b>Branco</b>	<b>Amostra</b>	<b>Padrão</b>
Amostra	—	20 μℓ	—
Padrão	—	—	20 μℓ
Reagente de Cor	2000 μℓ	2000 μℓ	2000 μℓ

Foram adicionados 2000 μℓ do reagente de cor às alíquotas de amostras e padrão; na sequencia, essa mistura foi homogeneizada e incubada durante 10 minutos a 37°C. Os valores de absorbância do Padrão (Ap) e da Amostra (A) foram lidos contra o Branco, a um comprimento de onda de 500 nm, em espectrofotômetro



com cubetas de vidro. A reação é estável por até duas horas. A concentração de glicose foi calculada segundo a equação abaixo:

$$\text{Concentração de Glicose (mg/dℓ)} = \frac{A \times C_p}{A_p} \times F_d$$

A = Absorbância da amostra

A<sub>p</sub> = Absorbância do padrão

C<sub>p</sub> = Concentração do padrão (100 mg/dℓ)

F<sub>d</sub> = Fator de diluição

### **3.1.8. DETERMINAÇÃO DO HIDROGÊNIO PRODUZIDO**

O volume de hidrogênio produzido foi determinado acumulativamente através da medida do deslocamento da coluna de água conforme ilustrado no item (iv) da Figura 3-5.

A temperatura foi acompanhada por termômetro e os valores de pressão atmosférica foram extraídos do site Weather Underground 2010 (<http://portuguese.wunderground.com>) que fornece valores das condições do tempo por hora. O volume foi corrigido utilizando a equação de estado de Van der Waals e os valores foram reportados nas condições normais de temperatura e pressão - CNTP (273,15 K; 101 325 Pa).

### **3.1.9. ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO MICRORGANISMO**

#### ***3.1.9.1. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE***

As características morfológicas da cepa utilizada foram avaliadas diretamente por Microscopia de Contraste de Fase. Uma alíquota de 1 μℓ foi retirada do inóculo (não corado) e depositada no centro de uma lâmina de microscópio e visualizada ao microscópio de contraste de fase em imersão (1000x).

### 3.1.9.2. COLORAÇÃO DE GRAM

Um dos principais métodos de diagnóstico microbiológico por coloração diferencial é a coloração de Gram. Para a realização do método foi seguido o protocolo operacional descrito a seguir:

- Fixar o esfregaço na temperatura ambiente.
- Corar com Violeta de Cristal (1 minuto); escorrer e lavar com um filete de água destilada;
- Aplicar Iodo de Gram (1 minuto); escorrer e lavar com um filete de água destilada;
- Descorar com álcool etílico (99,5% GL) até que o corante não se desprenda mais (10 a 20 segundos); lavar com um filete de água destilada;
- Corar com Fuscina Fenicada (30 segundos); lavar com um filete de água destilada;
- Deixar secar a temperatura ambiente.

### 3.1.10. MODELOS CINÉTICOS

Para descrever a cinética de crescimento foi utilizada a equação de Gompertz modificada (MU; WANG; YU, 2006; ZWIETERING et al., 1990), onde  $X$  é concentração celular ( $g/\ell$ );  $X_0$ , concentração inicial celular ( $g/\ell$ );  $\Delta X_{max}$ , concentração máxima de crescimento celular ( $g/\ell$ );  $R_{max,X}$ , velocidade máxima de crescimento celular ( $g/\ell/h$ );  $\lambda$ , tempo da fase lag (h);  $t$ , tempo de fermentação (h):

$$X - X_0 = \Delta X_{max} \times \exp \left\{ - \exp \left[ \left( \frac{R_{max,X} \times e}{\Delta X_{max}} \right) \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

O consumo de substrato foi expresso através do modelo de Gompertz modificado (MU; WANG; YU, 2006; PAN et al., 2008), onde  $S$  é concentração de substrato ( $g/\ell$ );  $S_0$ , concentração inicial de substrato ( $g/\ell$ );  $S_{max}$ , concentração máxima de consumo de substrato ( $g/\ell$ );  $R_{max,S}$ , velocidade máxima de consumo de substrato ( $g/\ell/h$ ):

$$S_0 - S = S_{\max} \times \exp \left\{ -\exp \left[ \left( \frac{R_{\max,S} \times e}{S_{\max}} \right) \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (2)$$

A produção de hidrogênio também pode ser descrita pelo modelo de Gompertz modificado (MU; WANG; YU, 2006; MU; YU; WANG, 2007), onde  $PH_2$  é a razão volume de hidrogênio acumulado /volume de meio ( $\ell/\ell$ );  $PH_{2\max}$ , volume de hidrogênio acumulado /volume de meio máximo ( $\ell/\ell$ );  $R_{\max,S}$ , velocidade máxima de consumo de substrato ( $g/\ell/h$ ):

$$PH_2 = PH_{2\max} \times \exp \left\{ -\exp \left[ \left( \frac{R_{\max,H_2} \times e}{PH_{2\max}} \right) \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

*"In the field of observation chance favors  
only the prepared mind"*  
– Louis Pasteur –

Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos em três seções, que correspondem aos três diferentes níveis de abordagem do problema aqui propostos, a saber: (i) nível genômico, (ii) nível metabólico e (iii) nível fenotípico.

A primeira seção trata da Análise de Genômica Comparativa e está dividida em duas partes: Análise Comparativa de Genoma Completo e Análise de Gram Computacional. A segunda seção apresenta os resultados da Análise de Engenharia Metabólica. Na terceira seção, são apresentados os resultados da Análise Fenotípica de Bioprocesso.

Os métodos computacionais deste trabalho foram obtidos utilizando o pacote computacional MATLAB®. As determinações experimentais da pesquisa foram desenvolvidas nos Laboratórios ENGBIO - Laboratório de Engenharia Bioquímica, coordenado pelo Prof. Dr. Agenor Furigo Junior, e Intelab – Laboratório de Tecnologias Integradas, coordenado pelo Prof. Dr. Luismar Marques Porto, no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, em Florianópolis.

### 4.1. ANÁLISE DE GENÔMICA COMPARATIVA

---

#### 4.1.1. ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMA COMPLETO

A análise comparativa de genoma completo entre microrganismos que também apresentam resposta Gram variável ao teste de Gram buscou encontrar regiões conservadas de alta similaridade e genes marcadores filogenéticos que possam estar relacionados com esse comportamento.

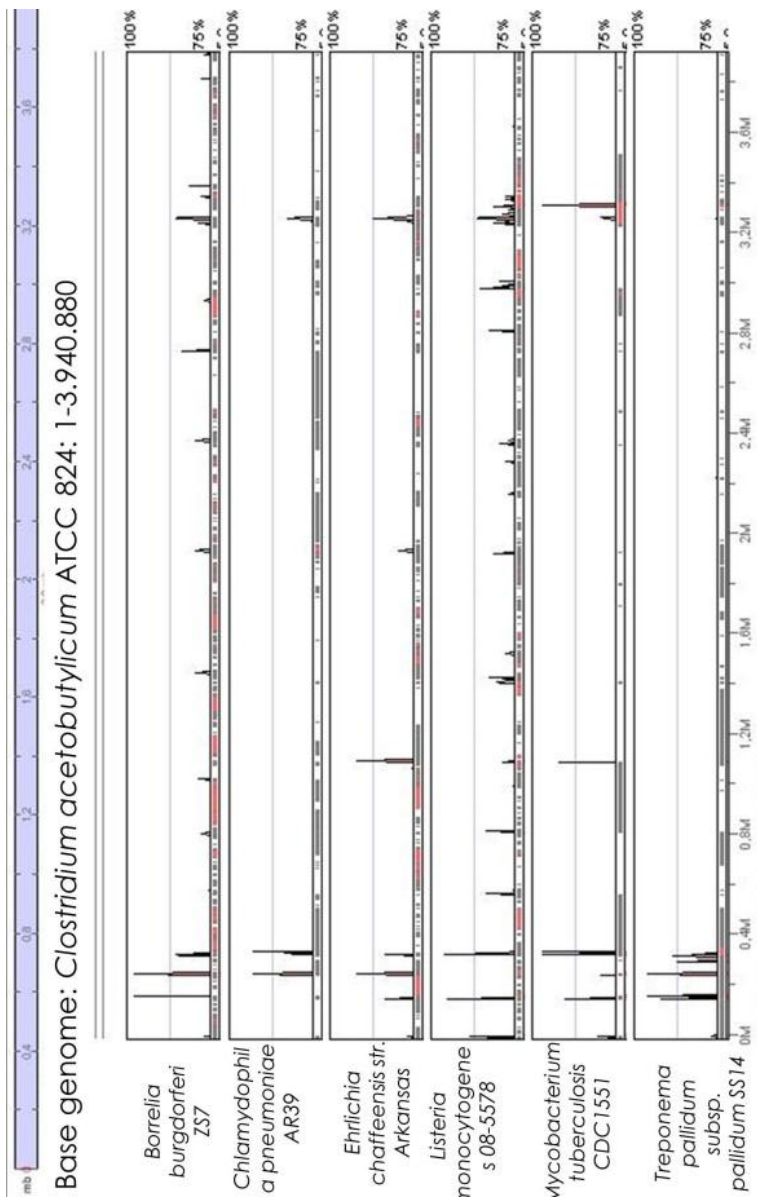


Figura 4-1 - Análise comparativa de genoma completo de bactérias Gram variáveis utilizando o genoma da *C. acetobutylicum* ATCC 824 como referência.

A Figura 4-1 mostra o resultado de alinhamento global de genoma completo obtido com o programa wgVista. Os picos indicam os níveis de conservação ao longo das sequências (entre 75% e 100%). Cada linha apresenta a comparação da sequência genômica par a par de uma das espécies com a sequência da bactéria de referência, no caso a *C. acetobutylicum* ATCC 824. As regiões de alta similaridade entre as sequências são coloridas automaticamente pelo programa, sendo que os éxons estão representados em azul escuro, UTRs (untranslated regions) estão representadas em azul claro e sequências não codificantes (que não codificam sequências de proteínas) estão representadas em rosa. Algumas sequências não codificantes de DNA são transcritas em moléculas de RNA não codificantes (por ex., tRNA, rRNA, etc). Outras funções de sequências não codificantes de DNA incluem regulação da transcrição e tradução de sequências codificantes, iniciadores de replicação do DNA, entre outras.

O resultado da varredura especificando um grau de conservação mínimo de 75%, 85% e 95% entre cada par de genomas comparados, respectivamente, está exposto na Tabela 4-1. Está apresentado o número de janelas (de aproximadamente 100 pb) conservadas entre cada espécie analisada e a *C. acetobutylicum* ATCC 824 em cada um dos níveis de conservação avaliados. No Apêndice III encontram-se os documentos completos com os respectivos intervalos de conservação para cada uma das janelas de conservação encontradas.

**Tabela 4-1 - Número de janelas conservadas entre os genomas das bactérias Gram variáveis analisadas e o genoma da *C. acetobutylicum* ATCC 824 em cada um dos níveis de conservação avaliados (75, 85 e 95%)**

Microrganismo	Janelas Conservadas		
	75%	85%	95%
<i>Borrelia burgdorferi</i> ZS7	285	115	14
<i>Chlamydomphila pneumonia</i> AR39	118	33	1
<i>Ehrlichia chaffeensis</i> str. Arkansas	211	60	2
<i>Listeria monocytogenes</i> 08-5578	401	139	40
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	123	92	11
<i>Treponema pallidum</i> subsp. pallidum SS14	141	96	12

Estas janelas foram agrupadas utilizando critério visual (disponibilizado na ferramenta VISTA browser). Foram então encontradas seis regiões conservadas, cujos intervalos estão expostos na

Tabela 4-2.

**Tabela 4-2 - Intervalo das regiões conservadas entre os genomas das bactérias Gram variáveis analisadas e o genoma da *C. acetobutylicum* ATCC 824.**

<b>Região Conservada</b>	<b>Intervalo (pb)</b>
1	0000001-0025000
2	0150000-0200000
3	0250000-0280000
4	0300000-0350000
5	0700000-1200000
6	3200000-3500000

Esses intervalos compreendem as regiões determinadas pelas regiões conservadas entre cada um dos microrganismos e a *C. acetobutylicum* ATCC 824. A Tabela 4-3 apresenta os códigos de identificação de cada microrganismo.

Foram identificados 15 genes (ver Tabela 4-4) localizados nestas seis áreas altamente conservadas que atendiam aos critérios determinados na seção 3.1.1.2. Foi definido que seriam considerados genes candidatos a serem possíveis marcadores filogenéticos relacionados com o comportamento fenotípico variável do grupo estudado os que estiverem conservados nos seis microrganismos com pelo menos 75% de identidade conservada.

Foram avaliados quais genes poderiam estar relacionados com a variação fenotípica apresentada pela *C. acetobutylicum* ATCC 824, que pode se exibir em termos da resposta Gram variável ao teste de Gram. A Tabela 4-4 apresenta a relação destes genes e sua respectiva função.



Tabela 4-3 - Microrganismos e respectivos códigos de identificação e classificação de Gram

Microrganismo	Gram	Código
<i>Borrelia burgdorferi</i> ZS7	Gram -	Bb
<i>Chlamydophila pneumonia</i> AR39	Gram -	Cp
<i>Ehrlichia chaffeensis</i> str. Arkansas	Gram -	Ec
<i>Listeria monocytogenes</i> 08-5578	Gram +	Lm
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	Gram +	Mt
<i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> SS14	Gram -	Tp
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Gram +	Ca

Tabela 4-4 - Genes conservados entre todas as seis bactérias Gram variáveis analisadas e a *C. acetobutylicum* ATCC 824 com pelo menos 75% de identidade de pares de base. Círculos cheios (●) indicam 95% de conservação; círculos concêntricos (◎) indicam 85% de conservação; círculos vazados (○) indicam 75% de conservação.

Região	Bb	Cp	Ec	Lm	Mt	Tp
<b>1 - 25000</b>						
CA Cr001 - rRNA: 16Sa rRNA	◎	◎	◎	◎	◎	◎
CA Cr002 - rRNA: 23Sa rRNA	●	◎	◎	●	●	●
<b>150000 - 200000</b>						
CA Cr004 - rRNA - 16Sb rRNA	◎	◎	◎	◎	◎	◎
CA Cr005 - rRNA - 23Sb rRNA	◎	○	◎	●	●	●
CA Cr007 - rRNA - 16Sc rRNA	◎	○	◎	◎	◎	◎
CA Cr010 - rRNA - 16Sd rRNA	◎	◎	◎	◎	◎	◎
CA Cr011 - rRNA - 23Sd rRNA	●	○	◎	●	●	●
<b>250000 - 280000</b>						
CA Cr014 - rRNA: 23Se rRNA	●	◎	◎	●	●	●
<b>300000 - 350000</b>						
CA Cr023 - rRNA: 23Sh rRNA	●	◎	◎	●	●	●
CA Cr026 - rRNA: 23Si rRNA	●	◎	◎	●	●	●
<b>1100000 - 1200000</b>						
CA Cr028 - rRNA 16Sj rRNA	◎	◎	◎	◎	◎	◎
CA Cr029 - rRNA 23Sj rRNA	●	◎	◎	●	●	●
<b>3200000 - 3500000</b>						
rpoB - DNA dir. RNA polimerase βsub.	◎	◎	◎	◎	○	○
CA Cr032 - rRNA 23Sk rRNA	●	◎	◎	●	●	●
CA Cr033 - rRNA 16Sk rRNA	◎	◎	◎	◎	◎	◎

A análise da Tabela 4-4 mostra que, dos 15 genes encontrados, 14 são codificantes de constituintes estruturais do ribossomo. Tal fato é esperado, uma vez que a síntese de ribossomos é um processo bem conservado (BOUDEWIJNS et al., 2006; DE MELO OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, não há evidências que possam ligar tais genes ao comportamento fenotípico variável aqui estudado.

O único gene encontrado, conservado nos sete microrganismos analisados, que não codifica para uma unidade estrutural de ribossomo, é o gene *rpoB*. O gene *rpoB* codifica a subunidade β da RNA polimerase bacteriana e está implicado na resistência a antibióticos de Rifamicina, tais como a Rifampina (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009).

A Figura 4-2 mostra a localização do gene *rpoB* na região conservada (#6), na *C. acetobutylicum* ATCC 284 bem como outros genes o flanqueiam.

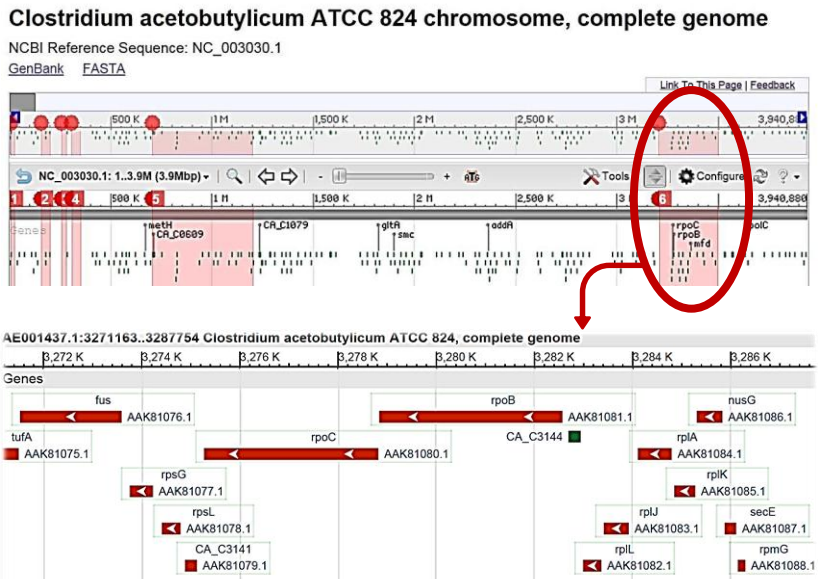


Figura 4-2 - Representação gráfica dos genes da *C. acetobutylicum* ATCC 824 encontrados na região conservada 6. (fonte: NCBI)

O antibiótico se liga diretamente à subunidade  $\beta$  da RNA polimerase e a resistência se dá devido à afinidade reduzida do rpoB pela Rifamicina, após mutações na sequência de aminoácidos. (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009). A Tabela 4-5 mostra a relação entre os microrganismos Gram variáveis e a resistência ao antibiótico (Rifamicina) ligada a mutações no gene rpoB.

**Tabela 4-5 - Relação entre os microrganismos Gram variáveis e a resistência adquirida ao antibiótico (Rifamicina) ligada a mutações no gene rpoB.**

<b>Microrganismo</b>	<b>Resistência Adquirida ligada ao rpoB</b>
<i>Borrelia burgdorferi</i> ZS7	(LEE et al., 2000)
<i>Chlamydomphila pneumonia</i> AR39	(KUTLIN et al., 2005)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i> str. Arkansas	(BISWAS; RAOULT; ROLAIN, 2008)
<i>Listeria monocytogenes</i> 08-5578	(CHENAL-FRANCISQUE et al., 2014)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	(KIM et al., 1999)
<i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> SS14	(KIM et al., 2005)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	(O'CONNOR et al., 2008)

Aqui estamos inferindo que a resistência ao antibiótico, assim como as variações fenotípicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824 consistem em uma vantagem evolutiva e marcam uma variação fenotípica importante. Sendo assim, o rpoB é um forte candidato a marcador molecular de variabilidade fenotípica e está altamente conservado (mínimo de 75%) em todas as seis bactérias comparadas com a *C. acetobutylicum* ATCC 824. Os outros 14 genes igualmente conservados não possuem função reportada relevante para a identificação de variações fenotípicas, conforme proposto neste trabalho.

Durante um estudo transcricional que procurava identificar genes relacionados a uma maior tolerância a altas concentrações de solvente, visando maior produção de biobutanol, foi determinado que a transcrição do gene rpoB (CAC3143) era regulada negativamente no final da fase acidogênica (ou início da fase solventogênica) (BORDEN; PAPOUTSAKIS, 2007). Pode-se então inferir que existe uma relação entre a regulação da transcrição do gene rpoB e o pH

externo do meio de cultura de fermentação, uma vez que a queda do pH do meio de cultura devido à produção de ácidos durante a fase acidogênica é um dos fatores ligados ao início da fase solventogênica.

Caso comprovadas, essas evidências podem ajudar a elucidar os fatores genômicos envolvidos nas mudanças fenotípicas observadas na *C. acetobutylicum* ATCC 824, que são de grande interesse para a indústria de bioprocessos e também para a indústria de medicamentos e antibióticos. Uma análise experimental seria necessária para comprovação da existência de tal relação.

Sugere-se um estudo que avalie a ocorrência de mutação/ resistência adquirida durante as mudanças fenotípicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824 para verificação dessa hipótese de marcação fenotípica pelo *rpoB*. Também é de interesse avaliar como as cepas resistentes aos antibióticos do grupo da Rifamicina diferem das cepas não resistentes na produção de metabólitos de interesse industrial (Biohidrogênio e Biobutanol). É possível avaliar como essa mudança fisiológica influencia no redirecionamento do fluxo de elétrons no mapa metabólico do microrganismo por meio de uma análise de Engenharia Metabólica.

### 4.1.2. ANÁLISE DE GRAM COMPUTACIONAL

A análise de Gram computacional buscou mimetizar as técnicas experimentais de identificação da classificação de Gram a partir da análise do rRNA 16S. Pretendeu-se assim identificar qual a resposta gerada pela *C. acetobutylicum* ATCC 824, sendo este um microrganismo que apresenta a resposta de Gram variável que aparentemente está associada ao seu estado fisiológico.

Os dois métodos experimentais indiretos de avaliação da classificação de Gram aqui reproduzidos *in silico*, utilizaram sequências específicas de iniciadores (*primers*) e sondas (*probes*) que se ligam seletivamente a regiões do rRNA 16S de bactérias Gram positivas ou Gram negativas (KLASCHIK et al., 2002; KLAUSEGGER et al., 1999).

O mecanismo de ação dos *primers* necessitava o alinhamento da última base 3' para a identificação do Gram. Para a identificação do Gram utilizando as sondas foi necessário o alinhamento para a emissão do respectivo sinal fluorescente (Figura 4-4). A Tabela 4-6

apresenta o significado dos símbolos alternativos utilizados na nomenclatura das bases.

- Primer Gram positivo 143 (5'-GAYGACGTC AARTCMTCATGC-3')
  - Primer Gram negativo 68d (5'-AYGACGTC AAGTCMTCATGG-3')
- } **Necessário alinhamento da última base 3'**
- Sonda Gram positiva  
ISP2 (5'-CCT AAC CAG AAA GCC ACG GCT AAC TACGTG-3')
  - Sonda Gram negativa  
ISN2 (5'-CCG CAG AAT AAG CAC CGG CTA ACT CCG T-3')
- } **Necessário alinhamento da sonda**

**Figura 4-3 - Mecanismo de ação dos dois métodos experimentais (aqui reproduzidos *in silico*) para identificação da classificação de Gram através da análise do RNA 16S.**

**Tabela 4-6 - Símbolos alternativos utilizados na nomenclatura das bases.**

Símbolo	Significado
B	exceto A (C ou G ou T ou U)
D	exceto C (A ou G ou T ou U)
H	exceto G (A ou C ou T ou U)
V	exceto T (A ou C ou G)
K	Keto (G ou T)
M	aMina (A ou C)
R	puRina (A ou G)
Y	pYrimidina (C or T or U)
S	“Strong” (C ou G)
W	“Weak” (A ou T)
I	Inosina
N	Desconhecida (A ou C ou G ou T)

As figuras a seguir, Figura 4-4, Figura 4-5, Figura 4-6 e Figura 4-7, mostram o resultado do alinhamento global obtido com o programa mVista entre o RNA 16S da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e o *primer* Gram positivo, o *primer* Gram negativo, a sonda Gram positiva e a sonda Gram negativa, respectivamente.

```

000001081 GTGAGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT 000001140
>>>>>>>          || ||||| || ||||| <<<<<<<<
000000001 -----GANGACGTCAANTCNCATGC----- 000000021
    
```

Figura 4-4 - Alinhamento do *primer* Gram positivo

```

000001081 GTGAGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT 000001140
>>>>>>>          | ||||| || ||||| <<<<<<<
000000001 -----ANGACGTCAAGTCNCATGC----- 000000020
    
```

Figura 4-5 - Alinhamento do *primer* Gram negativo

```

000000361 GTGATGAAGGTCITTCGGATCGTAAAACCTGTCTTATGGGACGATAATGACGGTACCATA 000000420
>>>>>>>          || | <<<<<<<
000000001 -----CCTAA 000000005

000000421 GGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT 000000480
>>>>>>>          || ||||| ||||| ||||| <<<<<<<
000000006 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG----- 000000030
    
```

Figura 4-6 - Alinhamento da sonda Gram positiva

```

000000121 ATACCCGATAATACTCGAGAATCGCATGATTCITGAGCCAAAGGATTTATTCGCTATGAG 000000180
>>>>>>>          ||||| ||| <<<<<<<
000000001 ---CCGCAGGAT----- 000000009

000000181 ATGACCCCGCGCGCATTAGCTTGTGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGATGCGT 000000240
>>>>>>>          <<<<<<<
000000000 ----- 000000000

000000241 AGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGAACCTGAGACAGGTCACGACTCCTACGG 000000300
>>>>>>>          <<<<<<<
000000000 ----- 000000000

000000301 GAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGA 000000360
>>>>>>>          <<<<<<<
000000000 ----- 000000000

000000361 GTGATGAAGGTCITTCGGATCGTAAAACCTGTCTTATGGGACGATAATGACGGTACCATA 000000420
>>>>>>>          <<<<<<<
000000000 ----- 000000000

000000421 GGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT 000000480
>>>>>>>          |||| | ||||| ||| <<<<<<<
000000010 ---AAGCACCGGCTAACTCCGT----- 000000028
    
```

Figura 4-7 - Alinhamento da sonda Gram negativa

Analisando os resultados do alinhamento das seqüências, podemos perceber que as seqüências do *primer* e da sonda Gram positiva foram alinhadas com o rRNA 16S da *C. acetobutylicum*, e as seqüências do *primer* e da sonda Gram negativa não foram alinhadas.

Foi conjecturada a hipótese de que, sendo a *C. acetobutylicum* ATCC 824 um microrganismo que apresenta a resposta do teste colorimétrico de Gram aparentemente associada a um determinado

estado fisiológico, este poderia apresentar os seguintes marcadores: o marcador de sua atual classificação Gram positiva; apresentar simultaneamente os marcadores Gram positivo e Gram negativo; apresentar um terceiro marcador genômico, no caso um marcador específico para microrganismos que apresentem comportamento Gram variável; ou não apresentar nenhum marcador específico para a diferenciação de Gram nesse *locus*.

Verificou-se que a *C. acetobutylicum* apresentou resultado Gram positivo nos dois métodos de identificação reproduzidos: pareamento das sondas e pareamento dos *primers*. A qualificação Gram positiva foi mantida e sugere-se, portanto, que devem existir marcadores em outros *loci* do genoma bacteriano.

Cabe aqui ressaltar que testes de identificação de Gram são muito utilizados em tratamentos de infecção hospitalar, principalmente para a determinação precoce da escolha do antibiótico (KLASCHIK et al., 2002; KLAUSEGGER et al., 1999; MORIN et al., 2000). Os dois métodos aqui reproduzidos foram desenvolvidos para agilizar o início do tratamento e substituir o método tradicional colorimétrico de identificação de Gram em intervenções hospitalares ((KLASCHIK et al., 2002; KLAUSEGGER et al., 1999)). Uma vez que o antibiótico escolhido muitas vezes tem ação dependente da composição/formação da parede celular (por isso a importância da avaliação da qualificação de Gram), é importante observar a possibilidade de se obter um falso positivo, no caso em que a cultura esteja em estado fenotípico que apresenta a composição da parede celular semelhante à de bactérias Gram negativas. Como o resultado do teste depende apenas da sequência do DNA do microrganismo, que é estática, ele não consegue captar as mudanças metabólicas e pode induzir a um eventual tratamento ineficaz.

## 4.2. ANÁLISE DE ENGENHARIA METABÓLICA

### 4.2.1. MODELOS DE REDE METABÓLICA

Conforme descrito na Metodologia, serão apresentados os dois modelos utilizados para a análise de engenharia metabólica. Neste trabalho, dois modelos foram utilizados, a saber (consultar seção 3.2.1 - Modelos de Rede Metabólica para mais informações): a) Modelo simplificado, composto por 20 reações que representam o metabolismo simplificado da *C. acetobutylicum* ATCC 824; b) Modelo em escala genômica, composto por 502 reações que representam o metabolismo completo da *C. acetobutylicum* ATCC 824. Pretendia-se avaliar se é possível a utilização de modelos metabólicos para representar as mudanças de fase do metabolismo da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e qual a complexidade de informação necessária para que tal modelo seja capaz de prever a produção de metabólitos de interesse.

#### 4.2.1.1. MODELOS SIMPLIFICADO

O modelo metabólico simplificado utilizado está apresentado abaixo:

v1_Glu: Glucose + 2ATP	->	2ADP_x + 2G3P
v2_Gly: Glycerol + NAD+_x + ATP	->	NADH + ADP_x + G3P
v3_: G3P + 2ADP_x + NAD+_x	->	Pyr + 2ATP + NADH
v4_: Pyr + Fdoxi + CoA	->	Acetyl-CoA + Fdred
v5_NADH: Fdoxi + NADH	<->	Fdred + NAD+_x
v6_Hydrogen: Fdred	->	Fdoxi + H2
v7_Lactate: Pyr + NADH	<->	NAD+_x + Lactate
v8_: 2 Acetyl-CoA	->	CoA + AcAcetyl-CoA
v9_Acetate: Acetyl-CoA + ADP_x	<->	ATP + CoA + Acetate
v10_Ethanol: Acetyl-CoA + 2NADH	->	CoA + 2NAD+_x + Ethanol
v11_Aceto1: Acetate + AcAcetyl-CoA	->	Acetyl-CoA + Acetone
v12_Aceto2: Butyrate + AcAcetyl-CoA	->	Butyryl-CoA + Acetone
v13_: AcAcetyl-CoA + 2NADH	->	Butyryl-CoA + 2NAD+_x
v14_Butyrate: Butyryl-CoA + ADP_x	<->	CoA + ATP + Butyrate
v15_Butanol: Butyryl-CoA + 2NADH	->	CoA + 2NAD+_x + Butanol
v16_Biomass: 4G3P + 21.7ATP + 1.75NADH->		3Biomass
v17_: ATP	->	ADP_x
v18_Latic_x: Lactate	->	Latic_Acid
v19_Acetic_x: Acetate	->	Acetic_Acid
v20_Butyric_x: Butyrate	->	Butyric_Acid



O modelo simplificado consiste de 20 reações e 25 metabólitos; destes, 13 são considerados metabólitos internos e 12 são externos. Há duas reações auxiliares, v16 e v17, que correspondem, respectivamente, à velocidade de crescimento celular e à ATPase. A reação da velocidade de crescimento celular (v16) foi modificada do modelo original por Castro (2010), onde a biomassa é gerada a partir do intermediário gliceraldeído-3-fosfato ao invés de ser gerada a partir da glicose.

Foi realizada uma análise da topologia da matriz estequiométrica simplificada. A Figura 4-8 representa este resultado e mostra a matriz estequiométrica associada ao modelo simplificado da *C. acetobutylicum* ATCC 824: as entradas não nulas da matriz estequiométrica,  $S$ , são marcadas em preto, e as nulas em branco.

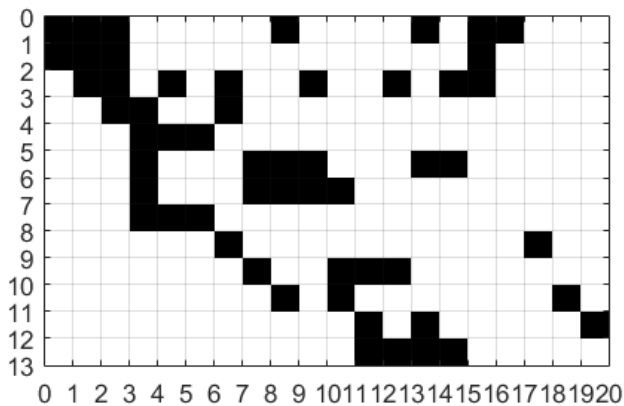


Figura 4-8 - Representação da matriz estequiométrica do modelo simplificado da *C. acetobutylicum* ATCC 824

#### 4.2.1.2. MODELO EM ESCALA GENÔMICA

O modelo metabólico genômico construído está apresentado abaixo:

%%%

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

R001: GLC(Ext) + PEP -> G6P + PYR  
R002: FRU(Ext) + PEP -> PYR + F1P  
R003: MNL(Ext) + PEP -> MNL1P + PYR  
R004: MAN(Ext) + PEP -> MAN6P + PYR  
R005: LCTS(Ext) + PEP -> LCTS6P + PYR  
R006: SUCR(Ext) + PEP -> SUC6P + PYR  
R007: MALT(Ext) + PEP -> MALT6P + PYR  
R008: ACGAM(Ext) + PEP -> ACGAM6P + PYR  
R009: DXYL(Ext) <-> DXYL  
R010: LARAB(Ext) <-> LARAB  
R011: GAL(Ext) <-> GAL  
R012: NO2(Ext) -> NO2  
R013: N2(Ext) -> N2  
R014: CO2(Ext) <-> CO2  
R015: H2 -> H2(Ext)  
R016: NH3(Ext) -> NH3  
R017: ETOH -> ETOH(Ext)  
R018: BUOH -> BUOH(Ext)  
R019: ACETONE -> ACETONE(Ext)  
R020: ACETOIN -> ACETOIN(Ext)  
R021: SO4(Ext) + ATP -> SO4 + ADP + Pi  
R022: Pi(Ext) -> Pi  
R023: Pi(Ext) + ATP -> ADP + 2 Pi  
R024: GLY(Ext) <-> GLY  
R025: LALA(Ext) <-> LALA  
R026: LVAL(Ext) <-> LVAL  
R027: LLEU(Ext) <-> LLEU  
R028: LILE(Ext) <-> LILE  
R029: LGLU(Ext) <-> LGLU  
R030: LGLN(Ext) <-> LGLN  
R031: LMET(Ext) <-> LMET  
R032: LCYS(Ext) <-> LCYS  
R033: LASP(Ext) <-> LASP  
R034: LASN(Ext) <-> LASN  
R035: LPRO(Ext) <-> LPRO  
R036: LTRP(Ext) <-> LTRP  
R037: LTYR(Ext) <-> LTYR  
R038: LHis(Ext) <-> LHis  
R039: LPHE(Ext) <-> LPHE  
R040: LSER(Ext) <-> LSER  
R041: LTHR(Ext) <-> LTHR  
R042: LLYS(Ext) <-> LLYS  
R043: LARG(Ext) <-> LARG  
R044: LALA(Ext) + ATP -> LALA + ADP + Pi  
R045: LVAL(Ext) + ATP -> LVAL + ADP + Pi  
R046: LTHR(Ext) + ATP -> LTHR + ADP + Pi  
R047: LCYS(Ext) + ATP -> LCYS + ADP + Pi  
R048: LILE(Ext) + ATP -> LILE + ADP + Pi  
R049: LASN(Ext) + ATP -> LASN + ADP + Pi  
R050: LASP(Ext) + ATP -> LASP + ADP + Pi  
R051: LGLN(Ext) + ATP -> LGLN + ADP + Pi  
R052: LGLU(Ext) + ATP -> LGLU + ADP + Pi  
R053: LARG(Ext) + ATP -> LARG + ADP + Pi  
R054: LHis(Ext) + ATP -> LHis + ADP + Pi  
R055: LLYS(Ext) + ATP -> LLYS + ADP + Pi  
R056: LPRO(Ext) + ATP -> LPRO + ADP + Pi  
R057: LMET(Ext) + ATP -> LMET + ADP + Pi  
R058: AC <-> AC(Ext)  
R059: BU <-> BU(Ext)  
R060: PROP <-> PROP(Ext)  
R061: MAL <-> MAL(Ext)  
R062: UREA -> UREA(Ext)  
R063: NA <-> NA(Ext)  
R064: LAC <-> LAC(Ext)  
R065: PYR <-> PYR(Ext)  
R066: GLYCALD -> GLYCALD(Ext)  
R067: PABA(Ext) -> PABA  
R068: GLYC <-> GLYC(Ext)  
R069: FORM <-> FORM(Ext)  
R070: bDGLC(Ext) <-> GLC(Ext)  
R071: CO2 <-> HCO3  
R072: H2O2 <-> H2O2(Ext)  
R073: Ppi -> 2 Pi  
R074: ATP -> ADP + Pi  
R075: bDG6P + ADP <-> ATP + bDGLC  
R076: bDGLC <-> GLC  
R077: GLC + ATP <-> G6P + ADP  
R078: G6P <-> F6P  
R079: bDG6P <-> F6P  
R080: F6P + ATP -> FDP + ADP  
R081: FDP -> F6P + Pi  
R082: FDP -> DHAP + GA3P  
R083: DHAP <-> GA3P  
R084: GA3P + Pi + NAD <-> 13DPG + NADH  
R085: 13DPG + ADP <-> 3PG + ATP  
R086: 13DPG -> 3PG + Pi  
R087: 3PG <-> 2PG  
R088: 2PG <-> PEP  
R089: PEP + ADP -> PYR + ATP  
R090: PYR + NADH <-> LAC + NAD  
R091: PYR + COA + Fd(Ox) -> ACCOA + CO2 + Fd(Red)  
R092: Fd(Red) + NAD <-> Fd(Ox) + NADH  
R093: Fd(Red) + NADP -> Fd(Ox) + NADPH  
R094: Fd(Red) -> Fd(Ox) + H2  
R095: 2HBUT + NAD <-> 2OBUT + NADH  
R096: 2OBUT + COA -> PROCOA + FORM  
R097: PROCOA + Pi -> PROPP + COA  
R098: PROPP + ADP -> PROP + ATP  
R099: ACCOA + NADH <-> ACAL + COA + NAD  
R100: ACAL + NADH <-> ETOH + NAD  
R101: ACCOA + Pi <-> ACTP + COA  
R102: ACTP + ADP <-> AC + ATP  
R103: 2 ACCOA -> ACTACCOA + COA  
R104: ACTACCOA + NADH -> 3HB COA + NAD  
R105: 3HB COA -> CRTCOA  
R106: CRTCOA + 2 NADH + Fd(Ox) -> BU COA + 2 NAD + Fd(Red)  
R107: BU COA + Pi -> BUP + COA  
R108: BUP + ADP -> BU + ATP  
R109: BU COA + NADH <-> BUAL + COA + NAD  
R110: BUAL + NADH <-> BUOH + NAD

- R111: ACTAC -> ACETONE + CO2  
R112: THMPP + PYR -> HETHMPP + CO2  
R113: HETHMPP + PYR -> ACLAC + THMPP  
R114: ACLAC -> ACETOIN + CO2  
R115: AC + ACTACCOA -> ACCOA + ACTAC  
R116: BU + ACTACCOA -> BUCOA + ACTAC  
R117: PYR + ATP + HCO3 -> ADP + Pi + OAA  
R118: OAA + NADH <-> MAL + NAD  
R119: MAL <-> FUM  
R120: FUM + Fd(Red) <-> SUCC + Fd(Ox)  
R121: SUCC + ACTACCOA -> ACTAC + SUCCOA  
R122: CIT <-> ICIT  
R123: ICIT + NAD <-> AKG + CO2 + NADH  
R124: Fd(Ox) + AKG + COA <-> Fd(Red) + SUCCOA + CO2  
R125: F6P + GA3P <-> E4P + DXU5P  
R126: DXU5P <-> DRU5P  
R127: R5P <-> DRU5P  
R128: R5P + DXU5P <-> S7P + GA3P  
R129: S7P + GA3P <-> E4P + F6P  
R130: R5P + ATP -> PRPP + AMP  
R131: 2DDGLCN + ATP -> 2DDG6P + ADP  
R132: 2DDG6P <-> GA3P + PYR  
R133: DRIB + ATP -> R5P + ADP  
R134: R5P <-> R1P  
R135: DXYL + NADPH <-> XOL + NADP  
R136: XOL + NAD <-> DXYLU + NADH  
R137: DXYLU + ATP <-> DXU5P + ADP  
R138: LARAB <-> LRBL  
R139: LRBL + ATP <-> LRU5P + ADP  
R140: LRU5P <-> DXU5P  
R141: F1P + ATP <-> FDP + ADP  
R142: F1P -> DHAP + GLYALD  
R143: MNL1P + NAD <-> F6P + NADH  
R144: MAN6P <-> F6P  
R145: FRU + ATP -> F6P + ADP  
R146: LCTS6P <-> GLC + GAL6P  
R147: GAL6P <-> TAG6P  
R148: TAG6P + ATP <-> TAGDP + ADP  
R149: TAGDP <-> DHAP + GA3P  
R150: GAL + ATP -> GAL1P + ADP  
R151: UDPGLC + GAL1P <-> G1P + UDPGAL  
R152: UDPGAL <-> UDPGLC  
R153: G1P + UTP -> UDPGLC + PPi  
R154: G1P <-> G6P  
R155: SUC6P -> FRU + G6P  
R156: MALT6P -> GLC + G6P  
R157: MALT -> 2 GLC  
R158: MALT + Pi -> bDGLC + bDG1P  
R159: bDG1P <-> bDG6P  
R160: G1P + ATP -> ADPGLC + PPi  
R161: ADPGLC -> ADP + Glycogen  
R162: Glycogen + Pi -> G1P  
R163: CLB(Ext) -> 2 bDGLC(Ext)  
R164: F6P + LGLN -> GAM6P + LGLU  
R165: F6P + NH3 <-> GAM6P  
R166: GAM6P + AC <-> ACGAM6P  
R167: GAM6P -> GAM1P  
R168: GAM1P + ACCOA -> ACGAM1P + COA  
R169: ACGAM1P + UTP <-> UACGGAM + PPi  
R170: UACGGAM + PEP <-> UACCG + Pi  
R171: UACCG + NADPH -> UAMR + NADP  
R172: dTTP + G1P -> TDPGLC + PPi  
R173: TDPGLC <-> TDPGAL  
R174: TDPGLC -> TDPDhdGLC  
R175: TDPDhdGLC -> GDPoRHAM  
R176: TDPDhdGLC -> TDPoRHAM  
R177: GDPoRHAM + NADPH -> GDPoRHAM + NADP  
R178: TDPoRHAM + NADPH -> TDPRHAM + NADP  
R179: PYR + ATP -> PEP + AMP + Pi  
R180: MAL + NAD -> PYR + CO2 + NADH  
R181: MAL + NADP -> PYR + CO2 + NADPH  
R182: ACCOA + ATP + HCO3 <-> MALCOA + ADP + Pi  
R183: ACCOA + 3MOB -> 2IPPMAL + COA  
R184: PYR + COA -> ACCOA + FORM  
R185: CO2 + MECORR -> ACCOA + CORRR208  
ASPALA1 LASP + ATP + LCITR -> AMP + PPi + ARG5UC  
R186: NO2 + 6 Fd(Red) -> NH3 + 6 Fd(Ox)  
R187: N2 + 16 ATP + 8 Fd(Red) -> 16 Pi + 16 ADP + 8 Fd(Ox) + 2 NH3 + H2  
R188: LGLU + ATP + NH3 -> LGLN + ADP + Pi  
R189: LGLN + AKG + NADPH -> 2 LGLU + NADP  
R190: LASP + LGLN + ATP -> LASN + LGLU + AMP + PPi  
R191: AKG + NH3 + NADPH <-> LGLU + NADP  
R192: LASP -> FUM + NH3  
R193: LASN -> LASP + NH3  
R194: CYST -> LHCYS + NH3 + PYR  
R195: SO4 + ATP -> APS + PPi  
R196: APS + ATP -> PAPS + ADP  
R197: PAPS + TRD(Red) -> PAP + TRD(Ox) + SO3  
R198: PAP -> AMP + Pi  
R199: SO3 + 3 NADPH -> S + 3 NADP  
R200: LSER + ACCOA -> ACSER + COA  
R201: S + ACSER -> LCYS + AC  
R202: LHMS + SUCCOA -> SUCHMS + COA  
R203: SUCHMS + LCYS -> CYST + SUCC  
R204: AKG + LASP <-> OAA + LGLU  
R205: LGLU <-> DGLU  
R206: LGLN + ATP + DNAD -> LGLU + AMP + PPi + NAD  
R207: 4ABUT + AKG <-> SUCCSA + LGLU  
R208: LASP + ATP + LCITR -> AMP + PPi + ARG5UC  
R209: ARG5UC -> FUM + LARG  
R210: LASP -> bALA + CO2

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

R211: PYR + LGLU <-> LALA + AKG  
R212: LALA <-> DALA  
R213: LASP + O2 -> OAA + NH3 + H2O2  
R214: 2 DALA + ATP -> DALADALA + ADP + Pi  
R215: PYR + DGLU <-> AKG + DALA  
R216: LASP + ATP -> 4PASP + ADP  
R217: 4PASP + NADPH -> ASPSA + Pi + NADP  
R218: ASPSA + NADPH <-> LHMS + NADP  
R219: LHMS + ATP -> PHOM + ADP  
R220: PHOM -> LTHR + Pi  
R221: LTHR <-> GLY + ACAL  
R222: GLY + MLTHF <-> THF + LSER  
R223: LSER -> PYR + NH3  
R224: 3PG + NAD -> 3PHP + NADH  
R225: 3PHP + LGLU -> LPSE + AKG  
R226: LPSE -> LSER + Pi  
R227: GLYCAC + NAD <-> HPYR + NADH  
R228: SUCHMS <-> 2OBUT + SUCC + NH3  
R229: CYST + AC <-> ACHMS + LCYS  
R230: ACHMS + S -> LHCYS + AC  
R231: SUCHMS + S -> LHCYS + SUCC  
R232: LHMS + AMET -> LMET + AHCYS  
R233: LHCYS + 5MTHF -> LMET + THFR256  
LYS1 ASPSA + PYR -> 23DHDP  
R234: AHCYS -> RHCYS + ADE  
R235: RHCYS -> LHCYS + DRIB  
R236: ATP + LMET -> AMET + Pi + PPI  
R237: AMET -> AMETA + CO2  
R238: AMETA + PTRC -> METADN + SPERMD  
R239: METADN -> ADE + 5METRIB  
R240: S + PYR + NH3 -> LCYS  
R241: LTHR -> 2OBUT + NH3  
R242: 2OBUT + HETHMPP -> 2AHBUT + THMPP  
R243: 2AHBUT <-> 3H3MOP  
R244: 3H3MOP + NADPH <-> 23DHMP + NADP  
R245: 23DHMP -> 3MOP  
R246: 3MOP + LGLU <-> LILE + AKG  
R247: ACLAC <-> 3H3MOB  
R248: 3H3MOB + NADPH <-> 23DHMB + NADP  
R249: 23DHMB -> 3MOB  
R250: 3MOB + LGLU <-> LVAL + AKG  
R251: 2IPPMAL <-> 2IPPM  
R252: 2IPPM <-> 3IPPMAL  
R253: 3IPPMAL + NAD <-> 2IPSUCC + NADH  
R254: 2IPSUCC -> 4MOP + CO2  
R255: 4MOP + LGLU <-> LLEU + AKG  
R256: ASPSA + PYR -> 23DHDP  
R257: 23DHDP + NADPH <-> THDP + NADP  
R258: THDP + SUCCOA -> SL2A60 + COA  
R259: SL2A60 + LGLU <-> SL26DA + AKG  
R260: SL26DA -> SUCC + 26DAP-LL  
R261: 26DAP-LL <-> 26DAP-M  
R262: 26DAP-M -> LLYS + CO2  
R263: LLYS -> CDV + CO2  
R264: LGLU + ATP -> GLU5P + ADP  
R265: GLU5P + NADPH <-> GLU5SA + NADP + Pi  
R266: GLU5SA <-> 1PYR5C  
R267: 1PYR5C + NADPH <-> LPRO + NADP  
R268: LORN + AKG <-> GLU5SA + LGLU  
R269: LARG -> LORN + UREA  
R270: CBP + LORN <-> LCITR + Pi  
R271: PRPP + ATP -> PRBATP + PPI  
R272: PRBATP -> PRBAMP + PPI  
R273: PRBAMP -> PRFP  
R274: PRFP -> PRLP  
R275: PRLP + LGLN -> AICAR + LGLU + EIG3P  
R276: EIG3P -> IMACP  
R277: IMACP + LGLU <-> HISP + AKG  
R278: HISP -> HISTD + Pi  
R279: HISTD + NAD -> HISTDAL + NADH  
R280: HISTDAL + NAD -> LHis + NADH  
R281: LHis + AMET -> MLHis + AHCYSR304  
UREA1 LGLU + ACCOA -> ACGLU + COA  
R282: PEP + E4P -> 2DDA7P + Pi  
R283: 2DDA7P -> 3DHQ + Pi  
R284: 3DHQ <-> 3DHSK  
R285: 3DHSK + NADPH <-> SKM + NADP  
R286: SKM + ATP -> SKM3P + ADP  
R287: SKM3P + PEP <-> 3PSME + Pi  
R288: 3PSME -> CHOR + Pi  
R289: CHOR + LGLN -> ANTH + PYR + LGLU  
R290: ANTH + PRPP -> PRAN + PPI  
R291: PRAN <-> 2CPR5P  
R292: 2CPR5P -> 3IG3P + CO2  
R293: 3IG3P -> INDOLE + GA3P  
R294: LSER + INDOLE -> LTRP  
R295: CHOR <-> PPHN  
R296: PPHN -> PHPYR + CO2  
R297: PHPYR + LGLU <-> LPHE + AKG  
R298: PHPYR + DGLU <-> DPHE + AKG  
R299: PPHN + NAD -> 34HPP + CO2 + NADH  
R300: 34HPP + LGLU <-> LTyr + AKG  
R301: MTYRAM + AMET -> HOR + AHCYS  
R302: LTyr + AKG <-> 34HPP + LGLU  
R303: 4H2KPM -> SUCCSA + PYR  
R304: LGLU + ACCOA -> ACGLU + COA  
R305: ACGLU + ATP -> ACGLU5P + ADP  
R306: ACGLU5P + NADPH -> ACGLU5SA + Pi + NADP  
R307: ACGLU5SA + LGLU <-> ACORN + AKG  
R308: ACORN + LGLU <-> LORN + ACGLU  
R309: H2O2 + 2 GTH(Red) -> GTH(Ox)  
R310: PRPP + LGLN -> PRAM + PPI + LGLU  
R311: PRAM + GLY + ATP -> GAR + ADP + Pi  
R312: GAR + 10FTHF -> FGAR + THF  
R313: FGAR + LGLN + ATP -> FGAM + LGLU + ADP + Pi  
R314: FGAM + ATP -> AIR + ADP + Pi

R315: AIR + HCO3 <-> PRAIC  
R316: PRAIC + LASP + ATP -> SAICAR + ADP + Pi  
R317: SAICAR <-> FUM + AICAR  
R318: AICAR + 10FTHF -> FPRICA + THF  
R319: FPRICA <-> IMP  
R320: IMP + LASP + GTP -> DCAMP + GDP + Pi  
R321: DCAMP -> AMP + FUM  
R322: AMP + ATP <-> 2 ADP  
R323: ATP + TRD(Red) ->dATP + TRD(Ox)  
R324: dATP + PYR ->dADP + PEP  
R325: ADP + TRD(Red) ->dADP + TRD(Ox)  
R326: dADP + ADP <->dAMP + ATP  
R327: AMP + PPI<-> ADE + PRPP  
R328: ADE + 2DR1P <->dADN + Pi  
R329: dADN ->dINS + NH3  
R330: dINS + Pi<-> HXAN + 2DR1P  
R331: HXAN + R1P <-> INS + Pi  
R332: ADN -> INS + NH3  
R333: ADN + Pi<-> ADE + R1P  
R334: ADE -> HXAN + NH3  
R335: HXAN + PRPP <-> IMP + PPI  
R336: IMP + NAD -> XMP + NADH  
R337: XMP + NH3 + ATP -> GMP + PPI + AMP  
R338: XMP + LGLN + ATP -> GMP + PPI + LGLU + AMP  
R339: GMP + NADPH -> IMP + NH3 + NADP  
R340: GMP + PPI<-> GUA + PRPP  
R341: GUA -> XAN + NH3  
R342: XAN + PRPP <-> XMP + PPI  
R343: XANT + Pi<-> XAN + R1P  
R344: GMP + ATP <-> GDP + ADP  
R345: GDP + PEP <-> GTP + PYR  
R346: GTP + TRD(Red) ->dGTP + TRD(Ox)  
R347: dGTP + PYR <->dGDP + PEP  
R348: GDP + TRD(Red) ->dGDP + TRD(Ox)  
R349: LGLN + 2 ATP + HCO3 -> LGLU + CBP + 2 ADP + Pi  
R350: CBP + LASP -> CBASP + Pi  
R351: CBASP <-> DHOR-S  
R352: DHOR S + NAD <-> OROT + NADH -  
R353: OROT + PRPP -> OROT5P + PPI  
R354: OROT5P -> UMP + CO2  
R355: UMP + ATP <-> UDP + ADP  
R356: UDP + ATP <-> UTP + ADP  
R357: UTP + NH3 + ATP -> CTP + ADP + Pi  
R358: UTP + LGLN + ATP -> CTP + LGLU + ADP + Pi  
R359: CTP -> UTP + NH3  
R360: CTP + ADP <-> CDP + ATP  
R361: CDP + ADP <-> CMP + ATP  
R362: CTP + TRD(Red) ->dCTP + TRD(Ox)  
R363: CDP + TRD(Red) ->dCDP + TRD(Ox)  
R364: TRD(Ox) + NADPH -> TRD(Red) + NADP  
R365: dCTP + ADP <->dCDP + ATP  
R366: dCDP + ADP <->dCMP + ATP  
R367: dCMP ->dUMP + NH3  
R368: UTP + TRD(Red) ->dUTP + TRD(Ox)  
R369: dCTP ->dUTP + NH3  
R370: dUTP ->dUMP + PPI  
R371: dUTP + ADP <->dUDP + ATP  
R372: dUDP + ADP <->dUMP + ATP  
R373: UDP + TRD(Red) ->dUDP + TRD(Ox)  
R374: dUMP + MLTHF ->dTMP + DHF  
R375: dTMP + ATP <->dTDP + ADP  
R376: dTDP + ATP <->dTTP + ADP  
R377: ATP + GLYCAC -> ADP + 3PG  
R378: ATP + GLYC -> ADP + GLYC3P  
R379: GLYC3P + 0.073 C140-ACP + 0.521 C160-ACP + 0.065 C161-ACP + 0.036 C180-ACP + 0.102 C181-ACP + 0.022 C17CYC-ACP + 0.181 C19CYC-ACP -> 1MAG + ACP  
R380: 1MAG + 0.073 C140-ACP + 0.521 C160-ACP + 0.065 C161-ACP + 0.036 C180-ACP + 0.102 C181-ACP + 0.022 C17CYC-ACP + 0.181 C19CYC-ACP -> PA + ACP  
R381: ATP + 12DAG -> ADP + PA  
R382: GLYC3P + NAD <-> DHAP + NADH  
R383: GLYC3P + NADP <-> DHAP + NADPH  
R384: PA + CTP -> CDP-DAG + PPI  
R385: CDP-DAG + GLYC3P -> CMP + PGP  
R386: PGP -> PG + Pi  
R387: 2 PG -> CDL + GLYC  
R388: PG + CDP-DAG -> CDL + CMP  
R389: CDP-DAG + LSER -> CMP + PS  
R390: PS -> PE + CO2  
R391: 12 PG -> 12 12DAG + POLYGP  
R392: ACCOA + ACP <-> ACACP + COA  
R393: MALCOA + ACP <-> MALACP + COA  
R394: ACACP + 6 MALACP + 12 NADPH -> 12 NADP + C140-ACP + 6 CO2 + 6 ACP  
R395: ACACP + 7 MALACP + 14 NADPH -> 14 NADP + C160-ACP + 7 CO2 + 7 ACP  
R396: ACACP + 7 MALACP + 13 NADPH -> 13 NADP + C161-ACP + 7 CO2 + 7 ACP  
R397: ACACP + 8 MALACP + 16 NADPH -> 16 NADP + C180-ACP + 8 CO2 + 8 ACP  
R398: ACACP + 8 MALACP + 15 NADPH -> 15 NADP + C181-ACP + 8 CO2 + 8 ACP  
R399: C161-ACP + AMET -> C17CYC-ACP + AHCYS  
R400: C181-ACP + AMET -> C19CYC-ACP + AHCYS  
R401: DMPP + IPDP -> GRDP + PPI  
R402: GRDP + IPDP -> FRDP + PPI  
R403: FRDP + IPDP -> GGRDP + PPI  
R404: GGRDP + 7 IPDP -> UDCPDP + 7 PPI  
R405: PYR + GA3P -> dXYLU5P + CO2  
R406: dXYLU5P + NADPH -> MERYTH4P + NADP  
R407: MERYTH4P + CTP -> CDPMERYTH + PPI

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

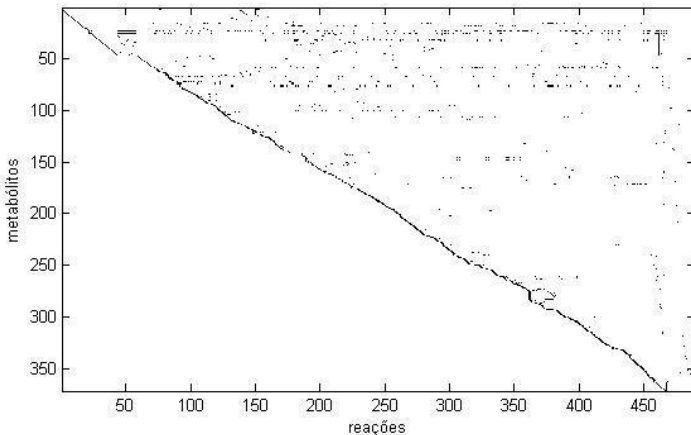
R408: CDPMERYTH + ATP -> CDPMERY2P + ADP  
R409: CDPMERY2P -> MERYcDP + CMP  
R410: MERYcDP + ProDTH -> HMB4DP + ProDS  
R411: LASP + FORM + ACCOA -> QULN  
R412: QULN + PRPP -> NAMN + PPi + CO2  
R413: ATP + NAMN -> PPi + DNAD  
R414: ATP + NAD <-> ADP + NADP  
R415: NA + PRPP -> NAMN + PPi  
R416: ATP + NMN -> PPi + NAD  
R417: NAMNs + Pi <-> NA + R1P  
R418: 3MOB + MLTHF -> THF + 2DHP  
R419: 2DHP + NADPH -> PANT + NADP  
R420: ATP + PANT + bALA -> AMP + PPi + PNT0  
R421: ATP + PNT0 -> ADP + 4PPAN  
R422: ATP + 4PPAN + LCYS -> ADP + Pi + 4PPCYS  
R423: CTP + 4PPAN + LCYS -> CDP + Pi + 4PPCYS  
R424: 4PPCYS -> PAN4P + CO2  
R425: ATP + PAN4P -> PPi + DPCOA  
R426: ATP + DPCOA -> ADP + COA  
R427: ATP + 4PCYS -> ADP + 4PPCYS  
R428: ATP + PAN -> ADP + PAN4P  
R429: DRU5P -> DB4P + FORM  
R430: 4R5AU + DB4P -> DMLZ + Pi  
R431: GTP -> FORM + 25DRAPP + PPi  
R432: 25DRAPP -> 5APRBU + NH3  
R433: 5APRBU + NADP -> 5APRU + NADPH  
R434: 5APRU -> 4R5AU + Pi  
R435: 2 DMLZ -> RIBFLA + 4R5AU  
R436: ATP + RIBFLA -> ADP + FMN  
R437: ATP + FMN -> PPi + FAD  
R438: RIBFLA -> DMBZID  
R439: NAMN + DMBZID -> NA + 5PRDMBZ  
R440: GTP -> FAPTP  
R441: FAPTP -> DAPTP + FORM  
R442: DAPTP -> DATHAO  
R443: DATHAO -> AHTHDH  
R444: AHTHDH -> DHNPP + PPi  
R445: DHNPP -> DHNP + Pi  
R446: DHNP -> GLYCALD + AHHMDHP  
R447: ATP + AHHMDHP -> AMP + ADHHP  
R448: ADHHP + PABA -> PPi + DHPT  
R449: AHHMDHP + PABA -> DHPT  
R450: ATP + DHPT + LGLU -> ADP + Pi + DHF  
R451: DHF + NADP <-> FOL + NADPH  
R452: THF + NADP <-> DHF + NADPH  
R453: ATP + 5FTHF -> ADP + Pi + METHF  
R454: METHF -> 5FTHF  
R455: MLTHF + NADH -> 5MTHF + NAD  
R456: 10FTHF <-> METHF  
R457: MLTHF + NADP <-> METHF + NADPH  
R458: THF + FORM + ATP -> ADP + Pi + 10FTHF  
R459: LGLU + NADPH + ATP -> GLU1SA + AMP + NADP + PPi  
R460: GLU1SA -> 5AOP  
R461: 2 5AOP -> PPBNG  
R462: 4 PPBNG -> HMBIL + 4 NH3  
R463: HMBIL -> UPPG3  
R464: CPPP3 + 2 AMET -> PPPG9 + 2 CO2 + 2 LMET + 2 dADN  
R465: 2 AMET + UPPG3 -> 2 AHCYS + PRPCR2  
R466: PRPCR2 + NAD -> SHCL + NADH  
R467: Fe2 + SHCL -> SHEME  
R468: SHCL + COBALT -> CPRPCR2  
R469: CPRPCR2 + AMET -> CPRPCR3 + AHCYS  
R470: CPRPCR3 + AMET -> CPRPCR4 + AHCYS  
R471: CPRPCR4 + AMET -> CPRPCR5A + AHCYS  
R472: CPRPCR5A -> CPRPCR5B + ACAL  
R473: CPRPCR5B + AMET -> CPRPCR6 + AHCYS  
R474: CPRPCR6 + NADPH -> CDHPRCR6 + NADP  
R475: CDHPRCR6 + AMET -> CPRPCR7 + AHCYS  
R476: CPRPCR7 + AMET -> CPRPCR8 + AHCYS + CO2  
R477: CPRPCR8 -> CBRN  
R478: CBRN + 2 LGLN + 2 ATP -> CBRNDA + 2 LGLU + 2 ADP + 2 Pi  
R479: AMET + PRPCR3B -> AHCYS + PRPCR4  
R480: AMET + PRPCR4 -> AHCYS + PRPCR5  
R481: PRPCR6A + NADPH -> PRPCR6B + NADP  
R482: PRPCR8 -> HGBRN  
R483: ACBRNDA + 4 LGLN + 4 ATP -> ACBRNHA + 4 LGLU + 4 Pi + 4 ADP  
R484: ATP + ACBRNHA + 1APROH -> ADP + Pi + ACBA  
R485: ACBA + ATP -> ACBAP + ADP  
R486: ACBA + GTP -> ACBAP + GDP  
R487: ACBRNHA + APROHP + ATP -> ACBAP + ADP + Pi  
R488: ACBAP + GTP -> AGDPCBA + PPi  
R489: AGDPCBA + ARBZL -> CACO + GMP  
R490: ARBZL5P -> ARBZL + Pi  
R491: HIPCOA + NAD -> IPCHCCOA + NADH  
R492: MTNOL + O2 + NAD -> MTNAL + NADH  
R493: HDMHCOA + NAD -> DMMOHCOA + NADH  
R494: 1.118 dATP + 0.501 dCTP + 1.118 dTTP + 0.501 dGTP + 4.403 ATP -> 4.403 ADP + 4.403 Pi + 3.236 PPi + DNA  
R495: 1.05 ATP + 1.124 CTP + 0.873 UTP + 0.832 GTP -> 1.554 ADP + 1.554 Pi + 3.879 PPi + RNA  
R496: 0.775 LALA + 0.133 LARG + 0.156 LASN + 0.156 LASP + 1.216 LCYS + 0.127 LGLN + 0.127 LGLU + 1.078 GLY + 0.146 LHis + 0.436 LILE + 0.429 LLEU + 0.336 0.801 LTYR + 1.172

LVAL + 37.195 ATP -> 37.195 ADP + 37.195 Pi  
 LLYS + 0.783 LMET + 0.185 LPHE + 0.457  
 LPRO + 0.427 LSER + 0.41 LTHR + 0.043 LTRP + PROTEIN  
 R497: 0.8 PE + 0.397 PG + 0.109 CDL -> PLIPID  
 R498: 0.518 POLYGP + 0.129 LLYS + 0.129 UACGAM + 0.129 ATP -> TEICH + 0.129 UDP + 0.129 ADP + 0.129 Pi  
 R499: 0.215 NAD + 0.192 NADP + 0.199 COA + 0.321 THF + 0.313 FMN + 0.182 FAD -> TRACE  
 R500: 1.064 UAMR + 1.064 UACGAM + 1.106 LALA + 1.106 LGLU + 1.106 DALADALA + 1.106 26DAP-M + 4.425 ATP -> PEPTIDO + 1.106 DALA + 1.106 UDP + 1.106 UMP + 4.425 ADP + 4.425 Pi  
 R501: 2.058 UDPGLC + 4.115 UDPGAL -> 6.173 UDP + CARBO  
 R502: 0.5284 PROTEIN + 0.0655 RNA + 0.026 DNA + 0.076 PLIPID + 0.1009 PEPTIDO + 0.08 TEICH + 0.0432 CARBO + 0.0494 TRACE + 40 ATP -> BIOMASS + 40 ADP + 40 Pi

%%%

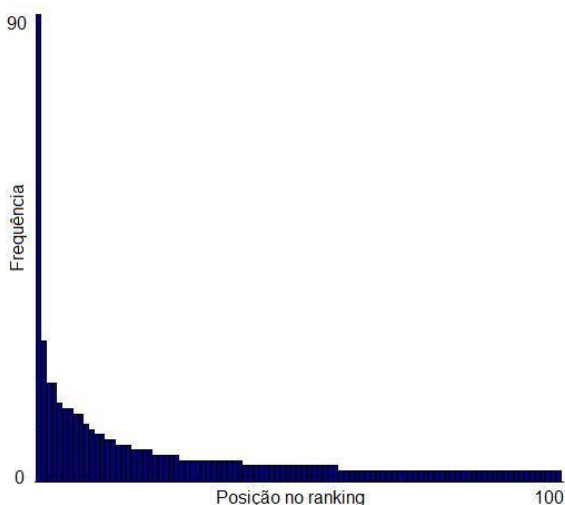
O modelo em escala genômica aqui construído consiste de 502 reações. Foi realizada uma análise da topologia da matriz estequiométrica em escala genômica. As restrições aplicadas ao modelo estão expostas no Apêndice I.

A Figura 4-9 representa este resultado e mostra a matriz estequiométrica associada ao modelo em escala genômica da *C. acetobutylicum* ATCC 824: as entradas não nulas de S são marcadas em preto, e as nulas, em branco. Fica clara a esparsidade da matriz: as reações contêm poucos componentes na média e cada componente participa também na média, de poucas reações. O espaço nulo (*null space*) para o modelo usado neste trabalho tem dimensão 123 (ou seja, 123 vetores na base).



**Figura 4-9 - Representação da matriz estequiométrica do modelo em escala genômica construído da *C. acetobutylicum* ATCC 824.**

Para melhor compreensão da topologia da rede, pode-se representar em um gráfico a frequência de aparecimento nas reações (eixo  $y$ ) de cada componente (eixo  $x$ ). Na Figura 4-10, pode-se verificar o perfil de tal gráfico para a rede metabólica em escala genômica da *C. acetobutylicum* ATCC 824: poucos componentes estão presentes em muitas reações e muitos componentes em poucas, e os compostos com maior frequência de aparecimento como reagentes são ATP e NADPH. Redes com essa propriedade são conhecidas como *scale-free networks* e aparecem inúmeras vezes, nos mais diversos contextos: biológicos, técnicos e sociais (MITCHELL, 2009). Foi calculada a taxa de participação média dos componentes em cada reação (soma dos elementos não nulos de cada coluna de  $S$ ), resultando no valor 4.728. Ou seja, na média, cada reação tem a participação de somente 4.7 metabólitos, aproximadamente (seja como reagentes ou como produtos).



**Figura 4-10 -** Frequência de aparecimento (eixo  $y$ ) de cada composto (eixo  $x$ ) nas reações do modelo em escala genômica da *C. acetobutylicum* ATCC 824. Os compostos com maior frequência de aparecimento (próxima a 90) são ATP e NADPH.

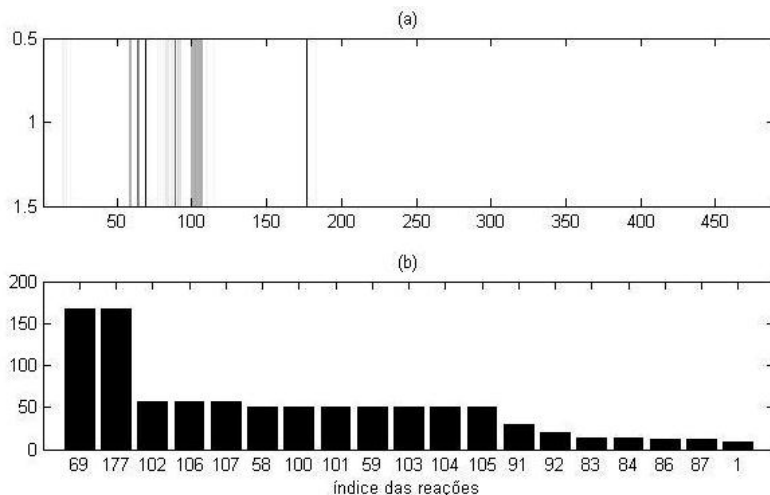
Os modelos propostos acima foram utilizados para a realização da Análise de Balanço de Fluxo (FBA), conforme descrito a seguir.



#### 4.2.2. ANÁLISE DE BALANÇO DE FLUXO

Os modelos foram avaliados para o fenótipo correspondente à fase acidogênica (utilizando para isso a maximização da produção de biomassa como função objetivo). Em uma primeira etapa de análise da rede metabólica, obteve-se a solução correspondente à fase acidogênica para o modelo genômico. O objetivo era visualizar qual o formato de distribuição do vetor resposta para o fenótipo acidogênico. Para melhor visualização do vetor solução (que é composto por cerca de 500 fluxos internos), foi utilizado um gráfico semelhante a um código de barras. Esse gráfico é composto por um número de colunas igual ao número de reações internas da rede metabólica e cada coluna é representada por uma tonalidade de cinza correspondente à magnitude do fluxo da respectiva reação (relativa ao maior fluxo). Assim, a coluna 20, que correspondente à reação de número 20, é representada em preto se o fluxo dessa reação for máximo e em branco, caso o fluxo seja igual a zero, e por um valor de cinza proporcional à intensidade do fluxo da reação em casos intermediários. Na segunda etapa de análise, a solução gerada por cada um dos modelos para a fase acidogênica foi comparada a valores experimentais obtidos da literatura. O objetivo foi encontrar o modelo que mais se adequava aos dados *in vitro*.

O gráfico do tipo código de barras para o modelo genômico no fenótipo acidogênico é mostrado na Figura 4-11, bem como o gráfico com os principais fluxos. É sabido que a solução de um problema de otimização convexo está localizada nos vértices ou nas arestas do espaço solução que representa as restrições do problema (ORTH; THIELE; PALSSON, 2010). Já que as arestas são formadas por pontos em que vários fluxos são iguais a zero (valor mínimo possível para todas as reações irreversíveis, por exemplo), a solução para o problema de otimização utiliza uma pequena parcela das reações possíveis da rede metabólica, como se observa na Figura 4-11a. A Figura 4-11b mostra o índice das principais reações e seus respectivos valores. É interessante observar que as reações 177, 106, 100, 104, 105, 91 e 92 estão relacionadas à regeneração dos agentes de oxirredução (NAD, NADH, NADP, NADPH). A solução caracteriza-se, ainda, pela alta velocidade de formação de formato (69), acetato (58) e butirato (59).



**Figura 4-11 - Resultado da Análise de Balanço de Fluxo para o modelo genômico completo construído. (a) Gráfico do tipo "código de barras" para o fenótipo acidogênico da *C. acetobutylicum* ATCC 824; (b) Índice das principais reações (reações com maiores fluxos) do fenótipo acidogênico.**

A Tabela 4-7 abaixo mostra os dados obtidos a partir dos modelos (a) simplificado e (b) genômico, para entrada fixa de glicose (como única fonte de carbono) e saída máxima de acetato também fixa. Esses dados são comparados com dados experimentais obtidos na fase acidogênica (GIRBAL et al., 1995). Todos os fluxos estão expressos em mmol (g DW h)<sup>-1</sup>.

**Tabela 4-7 - Dados experimentais e de simulação para os dois modelos considerados no trabalho.**

Fluxos	Experimental	Modelo (a)	Modelo (b)
Glicose	8,72	8,72	7,72
Etanol	0,26	$5,7 \times 10^{-6}$	0,0
Butanol	0,01	0,0	0,0
Acetona	0,02	0,0	8,2
Butirato	6,09	6,89	50
Acetato	3,67	13,3	0,0
CO <sub>2</sub>	16,6	-	10
H <sub>2</sub>	19,1	19,46	0,0
Crescimento	-	1,035	0,0

Pretendia-se, com esta comparação, avaliar se é possível a utilização de modelos metabólicos para representar as mudanças de fase do metabolismo da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e qual a complexidade de informação necessária para que tal modelo seja capaz de prever a produção de metabólitos de interesse. Como a validação consistia em comparar com dados experimentais, apenas os fluxos de saída medidos em experimentos relatados em literatura foram utilizados (GIRBAL et al., 1995).

Os dois modelos genômicos utilizados para a construção do modelo genômico aqui proposto, dado o seu caráter inicial ainda não curado, não conseguiram representar os estados fisiológicos da *Clostridium*. Os resultados do modelo genômico aqui construído, apesar de se aproximarem um pouco mais dos dados experimentais, ainda não conseguiram captar tais mudanças fenotípicas. Chama atenção o fato de o modelo genômico não prever produção de hidrogênio na fase acidogênica. Isto se deve à utilização, por parte do modelo, de outras fontes que não ferredoxina para restaurar o potencial de oxirredução da célula (NAD/NADH, NADP, NADPH).

O modelo simplificado mostrou uma aderência melhor aos dados experimentais que o modelo genômico. Esta mesma rede simplificada havia sido utilizada com sucesso por Castro (2010) para prever a utilização de novas fontes de carbono, e uma rede similar foi utilizada por Oliveira (2008) para estudar a produção de hidrogênio empregando várias ferramentas de engenharia metabólica (CASTRO, 2010; OLIVEIRA; PORTO, 2008). Sugere-se aqui então que o modelo simplificado seja adotado para análises metabólicas da fermentação ABE por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

Não se pode negar a importância dos modelos em escala genômica no avanço do campo da Engenharia Genômica, tanto que tais modelos têm sido desenvolvidos desde a primeira sequência genômica anotada, no final da década de 1990, e mudaram a forma de se estudar sistemas biológicos como um todo (O'BRIEN; MONK; PALSSON, 2015). Entretanto, ainda há muito a se desenvolver e as informações necessárias para a formulação de um modelo robusto e consistente ainda não estão disponíveis. Espera-se que num futuro próximo tais lacunas do conhecimento tenham sido já preenchidas e modelos genômicos completos façam parte do desenvolvimento, estudo e otimização de bioprocessos (LIU et al., 2015). Entretanto, como bem colocado por Levenspiel (2002) em seu artigo "*Modeling in chemical engineering*", uma estratégia interessante para se utili-

zar no desenvolvimento de modelos é a seguinte: sempre comece pelo modelo mais simples que represente bem o seu problema, e só adicione complexidade quando for necessário, ou seja: “*Keep things as simple as possible, but not simpler*” - Albert Einstein - (LEVENSPIEL, 2002).

### 4.2.3. MODELO SIMPLIFICADO PROTONADO

Uma vez definido que o modelo simplificado é o melhor candidato para representar as mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum*, e dadas as evidências encontradas na presente pesquisa de que o gene *rpoB* é um possível candidato a marcador genético das mudanças fenotípicas da *Clostridium* com ligação comprovada entre sua expressão gênica e o pH externo do meio de cultura, foi identificada a conveniência de se adicionar ao modelo um novo nível de regulação indireta utilizando o conceito de “*specific proton flux state*” (SPFS), desenvolvido por Senger (2008).

O SPFS é baseado na medida do fluxo de entrada e saída de prótons através da membrana celular (SENGER; PAPOUTSAKIS, 2008a). Esta abordagem utiliza a variação dos valores do pH extracelular para ajustar os coeficientes estequiométricos da reação de produção de biomassa do modelo, ou seja, ele considera que a variação no meio ambiente causa uma variação metabólica e esta é revelada pela mudança da velocidade de crescimento do microrganismo.

O modelo simplificado foi então modificado e cada um dos metabólitos foi representado em sua forma protonada. As reações metabólicas foram reavaliadas e reescritas após a realização de um balanço de massa e de carga, como mostrado na Figura 4-12.

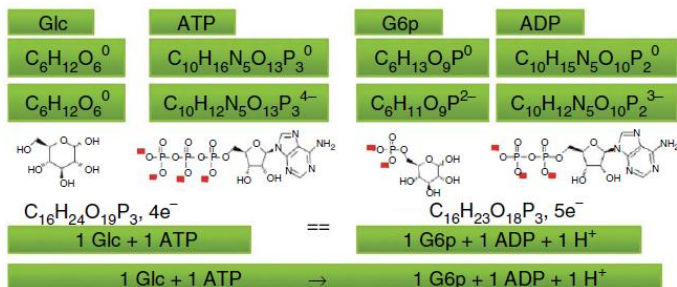


Figura 4-12 - Esquema que mostra a mudança na representação das reações da rede metabólica do modelo simplificado para o modelo simplificado protonado (THIELE; PALSSON, 2010).

O modelo simplificado protonado construído está apresentado abaixo. Um esquema das suas reações metabólicas está representado na Figura 4-13.

%%%

v1_:	Glucose + 2ATP	->	2ADP + 2G3P
v2_:	Glycerol + NAD+ + ATP	->	NADH + ADP + G3P + H2
v3_:	G3P + 2ADP + NAD+	<->	Pyr + 2ATP + NADH
v4_:	Pyr + 2Fdoxi + CoA	<->	AcetylCoA + 2Fdred + 2H+
v5_:	Fdoxi + NADH + H+	<->	Fdred + NAD+
v6_:	Fdred	<->	Fdoxi + H2
v7_:	Pyr + NADH + H+	<->	NAD+ + Latic_Acid
v8_:	2AcetylCoA	<->	CoA + AcAcetylCoA
v9_:	AcetylCoA + ADP	<->	ATP + CoA + Acetic_Acid
v10_:	AcetylCoA + 2NADH + 2H+	->	CoA + 2NAD+ + Ethanol
v11_:	Acetic_Acid + AcAcetylCoA	->	AcetylCoA + Acetone
v12_:	Butyric_Acid + AcAcetylCoA	->	ButyrylCoA + Acetone
v13_:	AcAcetylCoA + 2NADH + 2H+	->	ButyrylCoA + 2NAD+
v14_:	ButyrylCoA + ADP	<->	CoA + ATP + Butyric_Acid
v15_:	ButyrylCoA + 2NADH + 2H+	->	CoA + 2NAD+ + Butanol
v16_:	4G3P + 12,4 Y ATP + Y NADH	->	YNAD+ + 12,4 Y ADP + 3Biomass
v17_:	3H+ + ATP	<->	3H+ + ADP
v18_:	Latic_Acid	->	Lactate + H+
v19_:	Acetic_Acid	->	Acetate + H+
v20_:	Butyric_Acid	->	Butyrate + H+
v21_:	H2	<->	H2ext

%%%

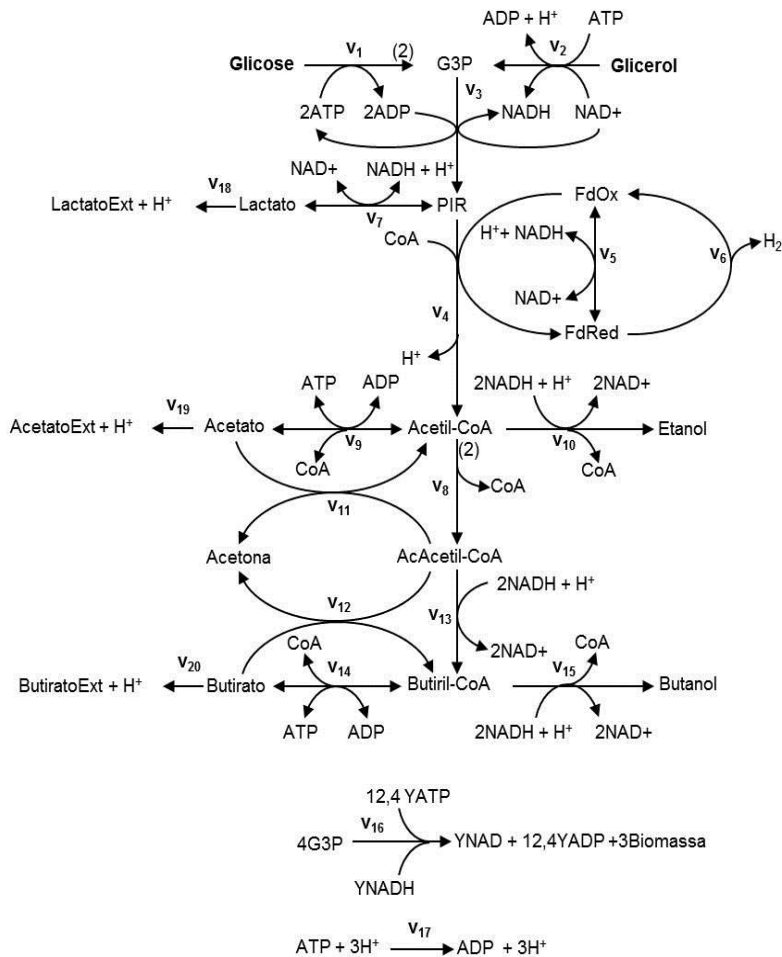


Figura 4-13 - Representação da rede metabólica simplificada protonada da *C. acetobutylicum* ATCC 824.

O modelo simplificado protonado aqui proposto, entretanto, necessita de validação para determinar se a adição desta camada de regulação irá deixar os resultados da análise de FBA mais próximos do resultado experimental.

#### 4.2.4. ANÁLISE DE FLUXO METABÓLICO

A análise de fluxo metabólico (MFA) foi realizada para avaliar a diferença entre as duas análises (FBA e MFA). Para tal propósito, as duas análises foram realizadas no modelo em escala genômica aqui construído e seus resultados foram comparados. A MFA particiona os fluxos de uma rede metabólica em fluxos medidos ( $v_m$ ) e fluxos estimados ( $v_c$ ) permitindo que se estime (calcule) um conjunto de fluxos a partir da medição de um subconjunto dos fluxos da rede (em geral, fluxos externos).

O sistema de equações descrito pode ter: a) uma; b) nenhuma; ou c) infinitas soluções, dependendo das dimensões da matriz  $G_c$  e do seu posto. Em geral, o sistema de equações é sub-determinado, ou seja, possui infinitas soluções e métodos matemáticos devem ser empregados para escolher uma dentre as possíveis opções pertencentes ao espaço solução. Duas técnicas amplamente empregadas são: a) a pseudo-inversa; e b) otimização de alguma função objetivo.

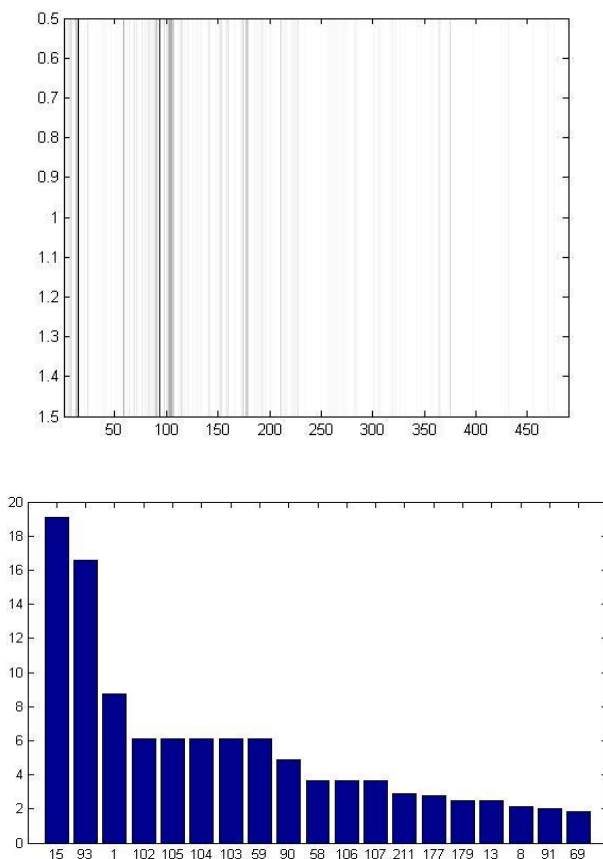
O uso da pseudo-inversa possibilita calcular  $v_c$  de tal forma que a norma euclidiana de  $v_c$  seja a mínima possível. Embora matematicamente elegante esta solução pode guardar pouca razoabilidade biológica, uma vez que seria improvável a utilização da norma euclidiana do vetor de fluxos como o critério principal para escolha de uma solução (embora a norma esteja associada à quantidade de enzima produzida e, em última instância, à energia de manutenção de um estado fisiológico do indivíduo). Já a otimização de uma função objetivo permite ajustar o vetor de fluxos estimados à realidade biológica mais coerente para o sistema vivo em questão: seja ela a maximização de biomassa ou manutenção de integridade do genoma. Neste caso, a análise do fluxo metabólico se aproxima da análise de balanço de fluxo, com a diferença de que o grau de liberdade para variação de determinados fluxos ( $v_m$ ) é eliminado. Sendo assim o método que utiliza a pseudo-inversa será utilizado.

Exposto o método, fica claro que a solução obtida com o método da pseudo-inversa depende da sensibilidade da matriz  $G_c$ : se esta for mal condicionada, uma pequena variação dos fluxos medidos pode resultar em grande variação do fluxo calculado.

Por outro lado, quando a solução é obtida pela otimização de uma função objetivo, outra sensibilidade da solução aparece: aquela

relacionada à velocidade de variação da função objetivo para cada um dos fluxos. Portanto, estrutura da matriz (sensibilidade, dada, dentre outras formas, pela razão entre maior e menor valor singular) e função objetivo exerce grande impacto na solução obtida para o problema de estimação de fluxos internos.

A Figura 4-14 mostra o resultado da Análise de Fluxo Metabólico para o modelo genômico completo construído.



**Figura 4-14 - Resultado da Análise de Fluxo Metabólico para o modelo genômico completo construído. (a) Gráfico do tipo “código de barras” para o fenótipo acidogênico da *C. acetobutylicum* ATCC 824; (b) Índice das principais reações (reações com maiores fluxos) do fenótipo acidogênico.**



A Figura 4-14 apresenta o gráfico do tipo código de barras resultante da análise de fluxo metabólico para o modelo genômico da *Clostridium*.

Pode-se perceber ao analisar o gráfico tipo código de barras do resultado da análise MFA que este se difere substancialmente e é bem menos “vazio” do que o obtido com a análise de FBA (Figura 4-11) do mesmo modelo (modelo genômico). Essa diferença pode ser decorrente da simplificação da função objetivo na análise de balanço de fluxos: um ser vivo otimiza, certamente, uma função mais complexa e que envolve mais compromissos do que aquela considerada (otimização de biomassa). No entanto, mais da metade (12) dos vinte principais fluxos é o mesmo em ambos os casos. Dentre as reações, cujos fluxos figuram entre os principais em ambas simulações, grande parte está relacionada à interconversão de agentes de oxirredução utilizados na biossíntese de moléculas maiores (reações 91, 104, 105, 106 e 177). Além disso, destaca-se a presença de reações de oxirredução da ferredoxina entre os principais fluxos da análise de fluxo metabólico (reação de índice 93, por exemplo), o que não acontece na análise de balanço de fluxos.

Pode-se concluir que a Análise de Fluxo metabólico é indicada para os casos onde se deseja um melhor entendimento da distribuição interna dos fluxos metabólicos em diferentes condições. Como o objetivo do presente trabalho está focado na utilização de modelos metabólicos para representar as mudanças de fase do metabolismo da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e principalmente na determinação dos principais produtos metabólicos estão sendo formados, a abordagem da Análise de Balanço de Fluxo se mostrou mais indicada.

### 4.3. ANÁLISE FENOTÍPICA DE BIOPROCESSO

---

A Análise Fenotípica de Bioprocesso teve o objetivo de investigar se a utilização de respostas fenotípicas da análise microfisiológica (medidas indiretas da variação da composição da parede celular através da resposta ao teste colorimétrico de Gram) pode contribuir para monitorar e detectar antecipadamente a mudança de estado metabólico da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e assim prever quais os produtos metabólicos da sua fermentação. Ou seja, determinar se o método de monitoramento tradicional do bioprocesso (que mede apenas variáveis macroscópicas com pH, consumo de substrato e crescimento do microrganismo) poderia ser aprimorado para utilizar as variáveis fenotípicas na detecção precoce e no monitoramento das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824.

Esta investigação fenotípica é uma continuação do trabalho proposto por Castro (2010) e pode abrir caminho para o desenvolvimento de um novo método de identificação metabólica da *C. acetobutylicum* ATCC 824 (e outras espécies de *Clostridium*).

Para investigar a existência de correlação entre o estado metabólico da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os limites das variáveis macroscópicas de bioprocesso que controlam a variabilidade fenotípica, os principais parâmetros de bioprocesso (formação de produto, consumo de substrato, crescimento do microrganismo e pH) foram acompanhados.

A Figura 4-15 a e b apresenta os perfis de crescimento celular, o consumo de substrato e a produção acumulada de hidrogênio medidos e ajustados pelas equações (1), (2) e (3) respectivamente, estão demonstrados na Figura 4-15. Os parâmetros estimados das equações estão dispostos na Tabela 4-8.

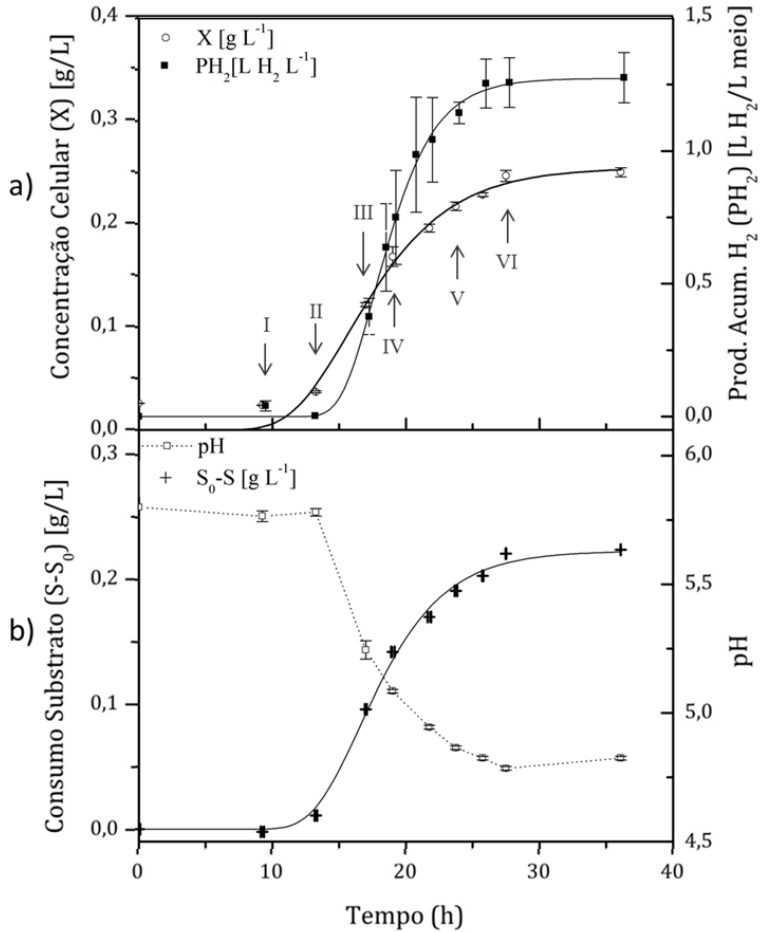


Figura 4-15 - Perfis de concentração celular (g/ℓ), produção acumulada de hidrogênio (ℓ H<sub>2</sub>/ ℓ meio) (a) e consumo de substrato (g/ℓ) e pH (b), durante a fermentação anaeróbica de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 284 em meio RCM, a 37°C e 120 rpm. Os algarismos romanos correspondem aos pontos onde as amostras foram avaliadas quanto à resposta ao teste de Gram e morfologia.

**Tabela 4-8 - Valores dos parâmetros referentes à modelagem de cinética de crescimento celular, consumo de substrato e produção de hidrogênio.**

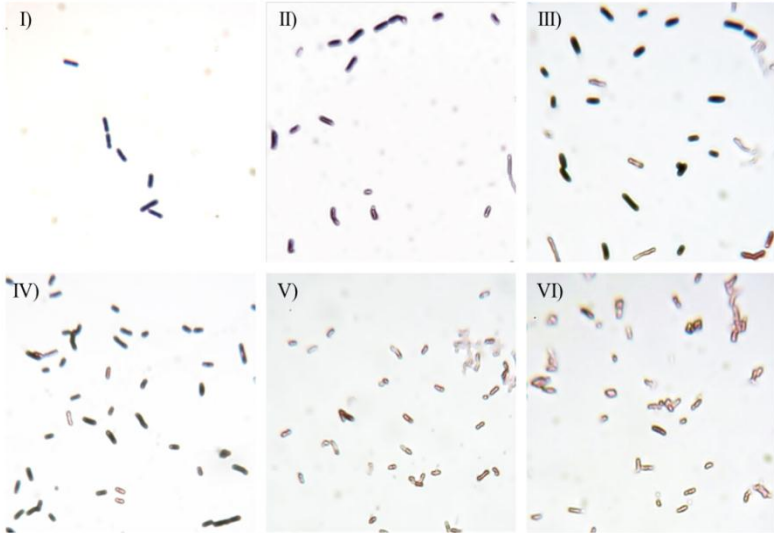
Parâmetro	Valor	Desvio Padrão
Equação 1 - cinética de crescimento celular		
$\Delta X_{max}$	0,255 g/ℓ	0,012
$R_{max,X}$	0,022 g/ℓ/H	0,003
$\lambda$	11,40 h	0,85
$R^2$	0,978	-
Equação 2 - cinética de consumo de substrato		
$S_{max}$	0,223 g/ℓ	0,005
$R_{max,S}$	0,023 g/ℓ/h	0,002
$\lambda$	13,00 h	0,38
$R^2$	0,996	-
Equação 3 - cinética de produção de hidrogênio		
$PH_{2max}$	1,27 ℓ H <sub>2</sub> /ℓ meio	0,018
$R_{max,H_2}$	0,189 ℓ H <sub>2</sub> /ℓ meio	0,012
$\lambda$	15,18 h	0,23
$R^2$	0,996	-

O Modelo de Gompertz modificado, amplamente utilizado para descrever o comportamento de processos fermentativos de produção de hidrogênio em reatores batelada (MU; YU; WANG, 2007; WANG; WAN, 2009), mostrou-se adequado para representar o consumo de substrato, a produção de hidrogênio e o crescimento bacteriano ( $R^2 > 0,95$ ).

Foi possível observar um comportamento típico da fermentação ABE, com o crescimento vegetativo inicial, seguido da produção de ácidos e hidrogênio, que provoca uma queda abrupta do pH depois de 13 horas de fermentação. A queda no pH é seguida de uma desaceleração no crescimento microbiano até alcançar o estágio estacionário típico da fase solventogênica. No fim da fermentação, podemos perceber um leve aumento no pH do meio de cultura, provavelmente causado pela reassimilação de ácidos (GRUPE; GOTTSCHALK, 1992).

Para acompanhar as adaptações de forma e, indiretamente, as mudanças na composição da membrana celular da *C. acetobutylicum* ATCC 824 durante a fermentação, seis pontos foram selecionados para realização de avaliação morfológica e análise colorimétrica de

Gram. Estes pontos correspondem aos indicados por algarismos romanos (I, II, III, IV, V e VI) na Figura 4-15 a. A resposta dessa avaliação morfológica e colorimétrica está apresentada na Figura 4-16



**Figura 4-16 - Resposta da avaliação diferencial colorimétrica utilizando a técnica de Gram para amostras de *C. acetobutylicum* ATCC 824 anaerobicamente incubada a 37°C, 120 rpm, em meio RCM. Os índices em algarismos romanos correspondem aos períodos de fermentação representados na Figura 4-15.**

O método de avaliação morfológica por microscopia de contraste de fase foi realizado conforme descrito no item 3.1.9.1 do capítulo de metodologia. As variações morfológicas consideradas para diferenciação dos estágios de forma na amostra foram baseadas na classificação feita por Spath (2003) (SPATH; SILLERS; PAPOUTSAKIS, 2003). Inicialmente, os resultados da avaliação morfológica mostraram que, no ponto I, a cultura exibia a forma típica vegetativa, ou seja, se encontrava em formato de bastonete. Nos pontos II, III e IV, podemos perceber um aumento na largura e um formato mais arredondado, que ilustra a transição entre o formato de bastonete e o formato de esporo. No final da fermentação, representado pelos pontos V e VI, já é possível identificar células em estágio avançado de diferenciação, como esporos e endósporos, o que é a resposta esperada para a queda de pH apresentada, que é um dos

principais fatores ligados ao início da solventogênese e esporulação. (AL-HINAI; JONES; PAPOUTSAKIS, 2015; GRIMMLER et al., 2011; TOMAS; BEAMISH; PAPOUTSAKIS, 2004).

A caracterização colorimétrica de Gram foi conduzida pelo método tradicional, ou seja, células que apresentam coloração roxo escura são consideradas Gram positivas e células que apresentam coloração rosa são consideradas Gram negativas.

No começo da fermentação (representado pelo ponto I) as células mostraram resposta de coloração roxa típica de células Gram positivas. Uma análise da resposta mostrada nos pontos II, III e IV nos mostra que é possível identificar tanto bactérias tingidas de roxo (Gram positivas) quanto bactérias tingidas de rosa. Podemos perceber que a relação entre o número de bactérias que apresentam resposta Gram positiva e o número de bactérias que apresenta resposta Gram negativa vai aumentando ao longo da fermentação, e supõe-se que isto é um reflexo da diminuição da camada de peptidoglicano na membrana celular (ATRIH; FOSTER, 1999; BEVERIDGE, 2002). No fim da fermentação e início da solventogênese (representado pelos pontos V e VI), as células se encontravam com coloração rosa, resposta típica de bactérias Gram negativas.

Estes resultados estão de acordo com os do trabalho de Beveridge (1990) que encontrou comportamento similar para bactérias do tipo *Bacillus*, *Butyrivibrio* e *Clostridium*, concluindo que estas também apresentavam uma mudança na resposta ao teste colorimétrico de Gram à medida que a cultura evoluía devido à uma série de eventos distintos, entre eles a diminuição da parede celular (BEVERIDGE, 1990).

Um paralelo também pode ser traçado entre estes resultados e as mudanças observadas durante fermentação clostridial quando as células eram marcadas com os marcadores fluorescentes de viabilidade Syto-9 (verde) e PI (vermelho), onde células acidogênicas apresentaram coloração predominantemente vermelha e células solventogênicas apresentaram coloração predominantemente verde (JONES et al., 2008). Podemos concluir que esse efeito reflete as mudanças fenotípicas da *Clostridium* que ocorrem devido à adaptação do microrganismo às alterações do ambiente, como a variação do pH e que isto pode causar variabilidade na resposta ao teste de Gram (BARTHOLOMEW; MITTWER, 1952).

Sabe-se que o processo fermentativo é um processo contínuo e que a representação em fases é apenas uma ferramenta para facilit-

tar o entendimento e acompanhar o processo. Entretanto, a classificação usual em duas fases, que utiliza o pH como critério de separação entre as fases, aponta a mudança fenotípica do metabolismo durante o crescimento exponencial, ou seja, qualquer intervenção a ser feita para evitar uma mudança de fase nesse momento da fermentação seria desafiadora, do ponto de vista prático. Sendo assim, é desejável a determinação de um critério de detecção precoce destas variações fenotípicas.

Com este propósito, é proposto aqui que a caracterização da fermentação por *C. acetobutylicum* seja reformulada para uma divisão em três fases, ao invés da divisão bifásica tradicional. Esta é fundamentada nas variações fenotípicas aqui observadas e representadas pela variabilidade da resposta ao teste colorimétrico de Gram, sendo estas as seguintes:

- (1) A **fase acidogênica (G+)**, representada aqui pelo ponto I, que ocorre no início da fermentação, onde há uma aceleração do crescimento bacteriano. Nesta fase são produzidos principalmente ácidos e hidrogênio; ainda não existem condições ambientais de estresse agindo sobre a membrana, ou seja, as bactérias têm a composição da parede celular intacta e apresentam resposta Gram positiva.
- (2) Em seguida está a **fase transicional (T)**, aqui representada pelos pontos II, III e IV, onde é possível encontrar tanto bactérias Gram positivas quanto bactérias Gram negativas, uma vez que a queda do pH do meio de cultura representa uma condição de estresse que tem efeitos lesivos à parede celular; o processo de esporulação é iniciado, e as células vão gradativamente mudando o seu formato de bastonete para um formato mais arredondado, característico de esporos. Uma vez iniciada a esporulação, a composição lipídica da membrana é transformada, e é observado um aumento no conteúdo de ácidos graxos, o que pode causar uma variação na resposta do teste de Gram.
- (3) A **fase solventogênica (G-)**, aqui representada pelos pontos V e VI, ocorre quando há uma desaceleração do crescimento e a cultura atinge um regime

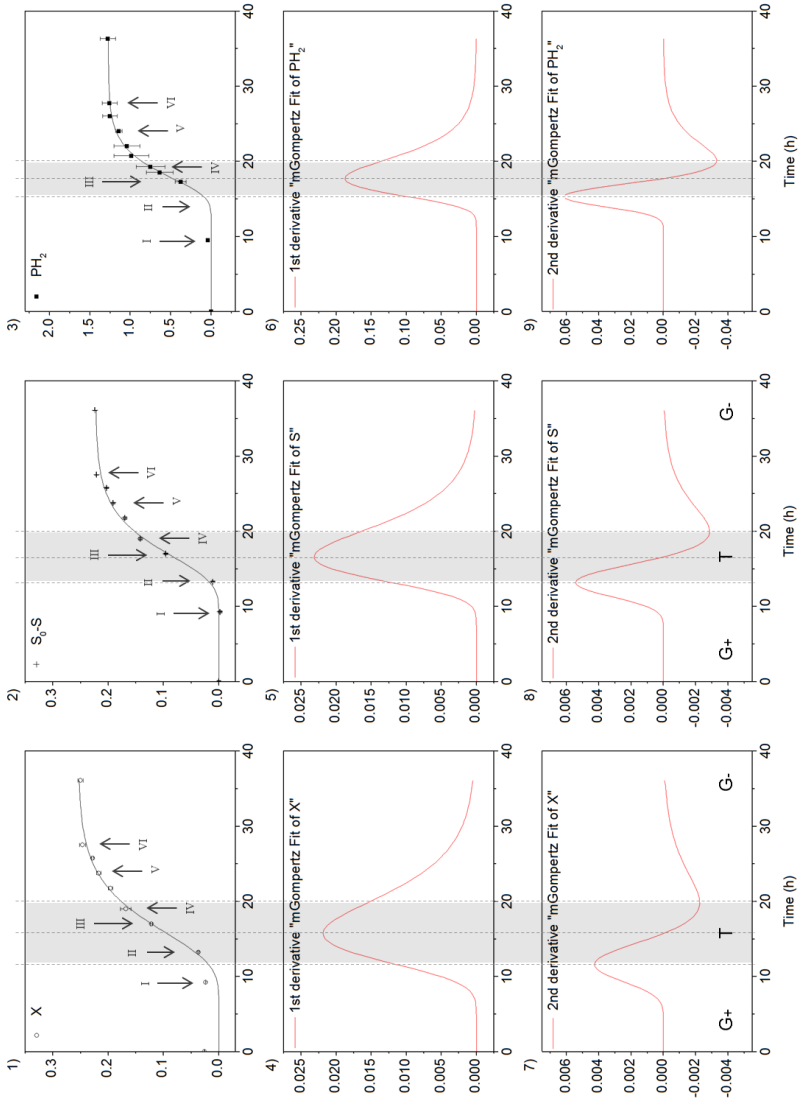
estacionário. Neste estágio, a cultura apresenta coloração típica de bactérias Gram negativas.

A divisão em fases é uma ferramenta muito usada e extremamente útil para identificação e estudo de estágios de fermentação. Entretanto, a definição dos limites que permeiam estas fases não é uma tarefa simples. Condições de contorno para fases de fermentação clostridial já foram definidas com base em morfologia celular (SPATH; SILLERS; PAPOUTSAKIS, 2003), propriedades ópticas (SCHUSTER et al., 1998), composição química das células (SCHUSTER et al., 2001), anisotropia da polaridade elétrica (JUNNE et al., 2008), e até mesmo diferença de picos de voltagem utilizando células a combustível microbianas (FINCH et al., 2011).

Jones e colaboradores (2008), a princípio, sugeriram uma divisão em três fases e estabeleceu que o início da fase intermediária (entre a exponencial e a estacionária) seria definido graficamente, onde a curva de produção de ácido butírico se encontrasse com a curva de produção de butanol. Depois adicionou um ajuste fino na divisão de fases que re-categorizou a fase estacionária em três estágios: estacionária inicial, estacionária mediana e estacionária final. O ajuste fino foi realizado após análise de expressão gênica temporal (JONES et al., 2008).

Neste trabalho é proposto um critério objetivo para definir os limites das três fases de fermentação aqui indicadas. A Figura 4-17 apresenta uma análise da primeira e segunda derivadas das curvas cinéticas apresentadas na Figura 4-15 a e b.





**Figura 4-17 - Análise da primeira e segunda derivada das curvas cinéticas apresentadas na Figura 4-15. Os numerais romanos representam os seis pontos temporais utilizados para avaliação da resposta ao teste colorimétrico de Gram e eles correspondem aos representados nas Figura 4-15 e Figura 4-16.**

O plote da segunda derivada de uma equação típica de Gompertz Modificada produz uma curva característica com dois extremos distintos de máximo e mínimo. O valor máximo é aqui associado ao fim da fase acidogênica (G+) e com o início da fase transicional (T). Este valor pode ser utilizado para definir e calcular a duração da fase acidogênica (G+). Além disso, a análise de segunda derivada permite definir e calcular a duração da fase transicional (T) a partir da diferença entre os pontos de mínimo e máximo.

Essa abordagem define de forma precisa os limites entre as fases aqui propostas. Mais especificamente, a utilização da análise da segunda derivada da curva cinética sugere que a fase transicional (T) é definida entre os pontos de máxima e mínima aceleração de mudanças das principais variáveis de bioprocessos utilizadas na caracterização da fermentação ABE (neste caso o crescimento bacteriano, consumo de substrato e formação de produto).

Uma avaliação da utilização deste método com a cinética de produção de hidrogênio mostra que a resposta não fornece uma divisão acurada deste processo. Foi observado que a produção deste metabólito não é linearmente acoplada ao crescimento da bactéria e que o progresso de sua produção ocorre subsequentemente ao crescimento. Este fato pode ser observado pela fase lag estendida apresentada na Tabela 4-8. A tabela mostra a diferença de cerca quatro horas de atraso entre as cinéticas. Sendo assim, a utilização desta cinética dá como resposta uma identificação tardia das mudanças fisiológicas do microrganismo.

Por outro lado, o monitoramento da fermentação utilizando a análise da segunda derivada das curvas de crescimento bacteriano e consumo de substrato possibilita a determinação das três fases de fermentação aqui propostas (fase acidogênica G+, fase transicional T e fase solventogênica G-), permitindo assim uma identificação precoce das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

*"Begin at the beginning," the King said, very gravely,  
"and go on till you come to the end: then stop."  
– Lewis Carroll, Alice in Wonderland –*

A Engenharia Genômica permite, através de seu ferramental teórico-computacional e experimental, sistematizar informações oriundas de diversos níveis analíticos.

O objetivo desta pesquisa foi contribuir para a incorporação de novas informações que a abordagem de Engenharia Genômica pode fornecer aos métodos tradicionais de monitoramento de bioprocessos. Mais especificamente, foram utilizadas ferramentas para aprimorar a detecção precoce e monitoramento das mudanças fisiológicas da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 em fermentações ABE. Foi proposta a inclusão dessas novas técnicas em três diferentes níveis, a saber: **(i) nível genômico**, **(ii) nível metabólico** e **(iii) nível fenotípico**.

A investigação a **nível genômico** foi dividida em duas partes e resultou nas seguintes contribuições:

A **(ia) Análise Comparativa de Genoma Completo** buscou encontrar regiões conservadas de alta similaridade e genes marcadores filogenéticos que possam estar relacionados com o comportamento fenotípico variável. Detectou-se que existem seis regiões de alta similaridade, nas quais foram identificados 15 genes já mapeados em outros estudos. Foram avaliados quais desses genes poderiam estar relacionados com o comportamento fenotípico variável. O gene *rpoB* foi identificado como um forte candidato a marcador molecular de Gram variabilidade e pode estar implicado na resistência a antibióticos. Foi proposta uma possível relação entre a regulação da transcrição do gene *rpoB* e o pH externo do meio de cultura de fermentação. Uma análise experimental seria necessária para comprovação da existência de tal relação.

Sugere-se um estudo que avalie a ocorrência de mutação/resistência adquirida durante as mudanças fenotípicas da *C. acetobutylicum* ATCC 824 para verificação dessa hipótese de marcação fenotípica pelo gene *rpoB*. Também é de interesse avaliar como as cepas resistentes aos antibióticos do grupo da Rifamicina diferem

das cepas não resistentes na produção de metabólitos de interesse industrial (Biohidrogênio e Biobutanol). É possível avaliar como essa mudança fisiológica influencia no redirecionamento do fluxo de elétrons no mapa metabólico do microrganismo por meio de uma análise de Engenharia Metabólica.

A **(ib) Análise de Gram Computacional** buscou mimetizar as técnicas experimentais de identificação da classificação de Gram a partir da análise do rRNA 16S. Pretendeu-se assim identificar qual a resposta gerada pela *C. acetobutylicum* ATCC 824, sendo este um microrganismo que apresenta a resposta de Gram variável associada ao seu estado fisiológico. A análise do rRNA 16S da *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresentou resposta Gram positiva nos dois testes *in silico* realizados. A presença de um marcador simultâneo de Gram negatividade ou um terceiro marcador genômico, no caso para a Gram variabilidade, não foi evidenciada. A qualificação Gram positiva deve ser mantida e sugere-se, portanto, que devem existir marcadores em outros *loci* do genoma bacteriano.

Cabe aqui ressaltar que testes de identificação de Gram são muito utilizados em tratamentos de infecção hospitalar, principalmente para a determinação precoce da escolha do antibiótico (KLASCHIK et al., 2002; KLAUSEGGER et al., 1999; MORIN et al., 2000). Os dois métodos aqui reproduzidos visavam agilizar o início do tratamento e substituir o método tradicional colorimétrico de identificação de Gram em intervenções hospitalares (KLASCHIK et al., 2002; KLAUSEGGER et al., 1999). Como o antibiótico escolhido muitas vezes tem ação dependente da composição/formação da parede celular (por isso a importância da avaliação da qualificação de Gram), é importante observar a possibilidade de se obter um falso positivo, no caso em que a cultura esteja em estado fenotípico que apresenta a composição da parede celular semelhante à de bactérias Gram negativas. Como o resultado do teste depende apenas da sequência do DNA do microrganismo, que é estática, ele não consegue captar as mudanças metabólicas existentes, e pode, assim, induzir a uma eventual intervenção antibiótica ineficaz.

A **(ii) Análise de Engenharia Metabólica** realizada buscou avaliar se é possível a utilização de modelos metabólicos para representar as mudanças de fase do metabolismo da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e qual a complexidade de informação necessária para que tal modelo seja capaz de prever a produção de metabólitos de interesse.

O modelo simplificado se mostrou mais preciso em prever a produção final de hidrogênio e butanol, após aplicada uma análise de balanço de fluxo (FBA) para simular fermentações da *C. acetobutylicum* ATCC 824. O modelo genômico aqui construído não conseguiu captar as mudanças fenotípicas da *C. acetobutylicum*. Foi então sugerido que o modelo simplificado seja adotado para análises metabólicas da fermentação ABE por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

Uma vez definido que o modelo simplificado é o melhor candidato para representar as mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum*, e dadas as evidências encontradas na presente pesquisa de que o gene *rpoB* é um possível candidato de marcador genético das mudanças fenotípicas da *Clostridium* e tem ligação comprovada entre sua expressão gênica e o pH externo do meio de cultura, foi identificada a conveniência de adicionar ao modelo um novo nível de regulação indireta utilizando o conceito de “*specific proton flux state*” (SPFS), desenvolvido por Senger (2008). Foi então construído um modelo simplificado protonado. O modelo simplificado protonado é produto deste trabalho, entretanto ainda necessita de teste e validação para determinar se a adição desta camada de regulação irá deixar os resultados da Análise de FBA mais próximas do resultado experimental.

A **(iii) Análise Fenotípica de Bioprocesso** pretendia investigar se a utilização de respostas fenotípicas da análise microfisiológica (medidas indiretas da variação da composição da parede celular através da resposta ao teste colorimétrico de Gram) pode contribuir para monitorar e detectar antecipadamente a mudança de estado metabólico da *C. acetobutylicum* ATCC 824 e assim prever quais os produtos metabólicos da sua fermentação.

A técnica de coloração de Gram mostrou-se eficiente na detecção precoce das mudanças fisiológicas da *C. acetobutylicum* em fermentações batelada. Foi demonstrada uma correlação entre os dados de fermentação e mudanças fisiológicas da parede celular da bactéria. Foi proposto o conceito de divisão em três fases, admitindo uma fase intermediária transicional que caracteriza melhor as mudanças fisiológicas da bactéria do que a classificação bifásica tradicional. Foi proposto um modelo cinético do processo e elaborado um critério objetivo para definir os três estágios de fermentação, com vistas a alcançar a detecção precoce das mudanças fisiológicas. Esse método é considerado preciso somente quando utilizado para

detecção precoce das mudanças metabólicas a partir de dados de crescimento bacteriano e consumo de substrato. Sugere-se, portanto, um novo método de detecção precoce e monitoramento do estado fisiológico da *C. acetobutylicum* ATCC 824 (e outras espécies de *Clostridium*), utilizando técnicas de coloração de Gram para determinar o estado fisiológico no qual a bactéria se encontra e quais os principais produtos metabólicos da sua fermentação serão produzidos.

Ser capaz de monitorar e interpretar rapidamente as mudanças no perfil fisiológico de microrganismos é importante e constitui-se em uma vantagem para maximizar o desempenho de processos biotecnológicos. Caso comprovadas, essas evidências podem ajudar a elucidar os fatores genômicos, moleculares e fenotípicos envolvidos nas mudanças fisiológicas observadas na *C. acetobutylicum* ATCC 824, que são de grande interesse para a indústria. Essa é uma contribuição que se aproveita da abordagem de Engenharia Genômica para a melhor compreensão, avanço e melhorias no monitoramento de bioprocessos.

*“A great pleasure in life is doing  
what people say you cannot do”*

*–Walter Gagehot –*

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKAMBI, T.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 1, p. 37–45, jan. 2009.

AL-HINAI, M. A.; JONES, S. W.; PAPOUTSAKIS, E. T. The *Clostridium* Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 1, p. 19–37, mar. 2015.

ALSAKER, K. V.; PAREDES, C. J.; PAPOUTSAKIS, E. T. Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: Gene-expression-based systems analysis of butanol, butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 9999, n. 9999, p. n/a, 2010.

ATRIH, A.; FOSTER, S. J. The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 299–307, 1999.

BARTHOLOMEW, J. W.; MITTWER, T. The Gram stain. **Bacteriological reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–29, 1952.

BEVERIDGE, T. J. Mechanism of Gram Variability in Select Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 3, p. 1609–1620, 1990.

BEVERIDGE, T. J. The Structure of Bacterial Surfaces and its Influence on Stainability. **Journal of Histotechnology**, v. 25, n. 1, p. 55–60, 2002.

BISWAS, S.; RAOULT, D.; ROLAIN, J.-M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. **International journal of antimicrobial agents**, v. 32, n. 3, p. 207–20, set. 2008.

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, 1 maio 2007.

BOUDEWIJNS, M. et al. 16S rRNA gene sequencing and the routine clinical microbiology laboratory: a perfect marriage? **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3469–3470, 2006.

CASTRO, J. DE V. **Produção biológica de hidrogênio a partir de glicerol por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

CHENAL-FRANCISQUE, V. et al. Highly rifampin-resistant *Listeria monocytogenes* isolated from a patient with prosthetic bone infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1829–30, 1 jan. 2014.

CLEMENTSCHITSCH, F.; BAYER, K. Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts. **Microbial Cell Factories**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2006.

DE MELO OLIVEIRA, M. G. et al. Accurate identification of fastidious Gram-negative rods: integration of both conventional phenotypic methods and 16S rRNA gene analysis. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 162, 2013.

DESAI, R. P.; NIELSEN, L. K.; PAPOUTSAKIS, E. T. Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. **Journal of Biotechnology Modelling in Biochemical Engineering**, v. 71, n. 1-3, p. 191–205, 1999.

DUROT, M.; BOURGUIGNON, P. Y.; SCHACHTER, V. Genome-scale models of bacterial metabolism: reconstruction and applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 164–190, 2009.

FERCHICHI, M. et al. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 4, p. 402–409, 2005.



- FERNANDES, R. L. et al. Experimental methods and modeling techniques for description of cell population heterogeneity. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 575–599, 2011.
- FINCH, A. S. et al. Metabolite analysis of *Clostridium acetobutylicum*: Fermentation in a microbial fuel cell. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 312–315, 2011.
- FORMENTI, L. R. et al. Challenges in industrial fermentation technology research. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 6, p. 727–738, jun. 2014.
- GIRBAL, L. et al. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, n. 3, p. 287–297, 1995.
- GREEN, E. M. Fermentative production of butanol--the industrial perspective. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 337–43, jun. 2011.
- GRIMMLER, C. et al. Genome-Wide Gene Expression Analysis of the Switch between Acidogenesis and Solventogenesis in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2011.
- 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. 3896–3902, 1992.
- HEAP, J. T. et al. The Clostron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 3, p. 452–464, 2007.
- HUANG, L.; FORSBERG, C. W.; GIBBINS, L. N. Influence of External pH and Fermentation Products on *Clostridium acetobutylicum* Intracellular pH and Cellular Distribution of Fermentation Products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1230–1234, 1986.

JONES, D. T.; VAN DER WESTHUIZEN, A.; LONG, S. **Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum* Applied and Environmental Microbiology**, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16346038>>

JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 484–524, 1986.

JONES, S. W. et al. The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. **Genome Biology**, v. 9, n. 7, 2008.

JUNNE, S. et al. Electrooptical measurements for monitoring metabolite fluxes in acetone-butanol-ethanol fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 862–869, 2008.

KHANAL, S. K. et al. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 11, p. 1123–1131, 2004.

KIM, B.-J. et al. Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (rpoB). **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 6, p. 1714–1720, 1 jun. 1999.

KIM, H. et al. Mechanism of natural rifampin resistance of *Streptomyces* spp. **Systematic and applied microbiology**, v. 28, n. 5, p. 398–404, jul. 2005.

KLASCHIK, S. et al. Real-time PCR for detection and differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4304–4307, 2002.

KLAUSEGGER, A. et al. Gram type-specific broad-range PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 464–466, 1999.

KUTLIN, A. et al. Emergence of resistance to rifampin and rifalazil in *Chlamydomytila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 903–7, mar. 2005.

LEE, J. et al. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 849–862, 2008a.

LEE, S. Y. et al. Fermentative butanol production by clostridia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 209–228, 2008b.

LEE, S.-H. et al. Differentiation of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato on the Basis of RNA Polymerase Gene (rpoB) Sequences. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 7, p. 2557–2562, 1 jul. 2000.

LEVENSPIEL, O. Modeling in chemical engineering. **Chemical Engineering Science**, v. 57, n. 22-23, p. 4691–4696, 2002.

LINHOVA, M. et al. Development of Flow Cytometry Technique for Detection of Thinning of Peptidoglycan Layer as a Result of Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. **Folia Microbiologica**, v. 55, n. 4, p. 340–344, 2010.

LINHOVA, M. et al. Rapid flow cytometric method for viability determination of solventogenic clostridia. **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 4, p. 307–311, 2012.

LIU, L. et al. Use of genome-scale metabolic models for understanding microbial physiology. **FEBS Letters**, v. In Press, n. 12, p. 2556–64, 18 jun. 2015.

MILLAT, T. et al. A shift in the dominant phenotype governs the pH-induced metabolic switch of *Clostridium acetobutylicum* in phosphate-limited continuous cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1–16, 2013.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, B. **Resenha Energética Brasileira: Resultados Preliminares de 2007** (M. de M. e Energia, Ed.)Brasilia, 2007a. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br>>

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, B. **Plano Nacional de Energia 2030** (S. de P. e D. Energético, Ed.)Brasilia, 2007b. Disponível em:

<[http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/pne\\_2030/PlanoNacionalDeEnergia2030.pdf](http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/pne_2030/PlanoNacionalDeEnergia2030.pdf)>

MITCHELL, M. **Complexity: A Guided Tour**. [s.l.] Oxford University Press, 2009.

MORIN, A. et al. Methods for Confirming the Gram Reaction of Gram-variable *Bacillus* Species Isolated from Tobacco \*. **Contributions to Tobacco Research**, v. 19, n. 2, p. 0–4, 2000.

MU, Y.; WANG, G.; YU, H. Q. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 11, p. 1302–1307, 2006.

MU, Y.; YU, H. Q.; WANG, G. A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process. **Water Research**, v. 41, n. 5, p. 1152–1160, 2007.

MUCCILLO, D.; PORTO, L. M. **Estudos “in silico” para a Produção Bacteriana de Hidrogênio**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

NOLLING, J. et al. Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 16, p. 4823–4838, 2001.

O'BRIEN, E. J.; MONK, J. M.; PALSSON, B. O. Using Genome-scale Models to Predict Biological Capabilities. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 971–987, maio 2015.

O'CONNOR, J. R. et al. Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2813–7, ago. 2008.

OLIVEIRA, I. L.; PORTO, L. M. **Análise Computacional de Redes Metabólicas com Regulação**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. Ø. O. What is flux balance analysis? **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 245–248, 2010.

PAN, C. M. et al. Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp Fanp2. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3146–3154, 2008.

PAPANIKOLAOU, S. et al. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 1, p. 60–71, 2008.

PAPOUTSAKIS, E. T. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 2, p. Pages: 174–187, 1984.

PASTEUR, L. Quelques résultats nouveaux relatifs aux fermentations acétique et butyrique. **Bulletin de la Société Chimique de Paris**, p. 52–53, 1862.

PATAKOVA, P. et al. Novel and neglected issues of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by clostridia: *Clostridium* metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 1, p. 58–67, 2013.

PORTO, L. M. **A Evolução da Engenharia Química - Perspectivas e Novos Desafios.** Disponível em: <<http://www.hottopos.com/regeq10/luismar.htm>>. Acesso em: 8 jul. 2015.

PORTO, L. M. **O surgimento da engenharia genômica e o impacto dos projetos genoma no desenvolvimento da pesquisa médica e biotecnológica.** Disponível em: <<http://noticias.universia.com.br/ciencia-tecnologia/noticia/2004/03/12/522025/bartigob-surgimento-da-engenharia-genmica-e-impacto-dos-projetos-genoma-no-desenvolvimento-da-pesquisa-medica-e-biotecnologica.html>>. Acesso em: 8 jul. 2015.

PORTO, L. M. **Engenharia genômica: unindo ciências exatas, engenharias e medicina.** Disponível em:

<<http://luismarporto.blogspot.com.br/2008/01/engenharia-genmica-unindo-cincias.html>>. Acesso em: 8 jul. 2015.

ROOS, J. W.; MCLAUGHLIN, J. K.; PAPOUTSAKIS, E. T. The Effect of Ph on Nitrogen Supply, Cell-Lysis, and Solvent Production in Fermentations of *Clostridium-Acetobutylicum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 5, p. 681–694, 1985.

SALIMI, F. et al. Understanding *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolism using genome-scale thermodynamics and metabolomics-based modeling. **IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)**, v. 11, n. PART 1, p. 126–131, 2010.

SARMA, S. J. et al. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6473–6490, abr. 2012.

SCHUSTER, K. C. et al. Development of markers for product formation and cell cycle in batch cultivation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 6, p. 669–676, 1998.

SCHUSTER, K. C. et al. Degeneration of solventogenic *Clostridium* strains monitored by Fourier transform infrared spectroscopy of bacterial cells. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 314–321, 2001.

SENGER, R. S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Genome-Scale Model for *Clostridium acetobutylicum*: Part II. Development of Specific Proton Flux States and Numerically Determined Sub-Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 1053–1071, 2008a.

SENGER, R. S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Genome-Scale Model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic Network Resolution and Analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 1036–1052, 2008b.

SHINTO, H. et al. Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone-butanol-ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 1, p. 45–56, 2007.

SMITH, A. D.; XUAN, Z.; ZHANG, M. Q. Using quality scores and longer reads improves accuracy of Solexa read mapping. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 128, jan. 2008.

SPATH, I.; SILLERS, R.; PAPOUTSAKIS, E. T. **Morphological changes of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 in flask cultures** Papoutsakis Lab. [s.l.] Northwestern University, 2003. Disponível em: <<http://www.papoutsakisresearch.northwestern.edu/imagegallery.htm>>.

TACONI, K. A.; VENKATARAMANAN, K. P.; JOHNSON, D. T. Growth and solvent production by *Clostridium pasteurianum* ATCC® 6013™ utilizing biodiesel-derived crude glycerol as the sole carbon source. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 28, n. 1, p. 100–110, abr. 2009.

THIELE, I.; PALSSON, B. O. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 1, p. 93–121, 2010.

TOMAS, C. A.; BEAMISH, J.; PAPOUTSAKIS, E. T. Transcriptional Analysis of Butanol Stress and Tolerance in *Clostridium acetobutylicum*. **J Bacteriol**, v. 186, n. 7, p. 2006–2018, 2004.

TRACY, B. P. et al. Clostridia: The importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 364–381, 2012.

TRACY, B. P.; GAIDA, S. M.; PAPOUTSAKIS, E. T. Development and Application of Flow-Cytometric Techniques for Analyzing and Sorting Endospore-Forming Clostridia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7497–7506, 2008.

WANG, J. L.; WAN, W. Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 8, p. 3313–3323, 2009.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 213–219, 2007.

ZIGOVÁ, J.; ŠTURDÍK, E. Advances in biotechnological production of butyric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 153–160, 2000.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial-Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.



## 7. APÊNDICE I

### 7.1. INDICADORES DE AVALIAÇÃO

Nesta seção encontram-se listados alguns indicadores de avaliação alcançados durante o período de doutoramento:

Participação na formação acadêmica de alunos de iniciação científica (PIBIC):

<b>Aluno</b>	<b>Período</b>	<b>Título do trabalho</b>
Fernanda Da Costa Pereira	2010_2	<i>Estudos in silico visando à produção de PLA em uma única etapa fermentativa para Clostridium acetobutylicum ATCC 824 e Lactococcus Lactis IL 1403.</i>
Afonso Alborghetti Londero	2010_2	<i>Análise de genoma completo de microrganismos Gram variáveis</i>
Afonso Alborghetti Londero	2011_1	<i>Método de identificação metabólica da Clostridium acetobutylicum para promover a produção de biohidrogênio e biossolventes</i>
Daniela Krahl	2011_1	<i>Análise de marcadores da Gram variabilidade no rRNA 16S da Clostridium acetobutylicum utilizando ferramentas de Genômica Comparativa</i>
Isabel Janke	2011_1	<i>Estudos de Scale-up da Produção de Hidrogênio a Partir do Glicerol</i>
Jéssica Baldin Cruz	2011_1	<i>Cinética do crescimento de Clostridium acetobutylicum ATCC 824 para a produção de biohidrogênio</i>
Jéssica Baldin Cruz	2012_1	<i>Engenharia metabólica de bactérias para produção de hidrogênio a partir de resíduos de biodiesel</i>
Daniel Lopes Rossi	2013_1	<i>Otimização da quantificação de hidrogênio com o uso de células a combustível de troca de próton (PEM)</i>
Beatriz da Rosa Espíndola	2013_2	<i>Cinética de crescimento e produção de celulose bacteriana por Gluconacetobacter hansenii</i>
Jessica da Silveira Luciano	2014_1	<i>Genômica comparativa de sequências de DNA de espécies produtoras de celulose</i>

Participação na equipe de trabalho de elaboração e execução de projetos:

<p><b>GramFlexus</b> - <i>Um Novo Método de Identificação Metabólica da Clostridium acetobutylicum para promover a produção de biohidrogênio e biossolventes.</i>                  Edital: Edital MCT/CNPq 14/2010 - Universal - Faixa B                  Coordenador: Agenor Furigo Jr                  Processo: 484259/2010-5</p>
<p><b>PROPELE</b>- <i>Engenharia Tecidual e Avaliação Pré-Clínica e Clínica de Pele Biopolimérica Imunoativa.</i>                  Edital: Encomendas MCT/FINEP - COBIO                  Coordenador: Luismar Marques Porto                  Processo: 550009/2014-0</p>
<p><b>CELSYS</b> - <i>Engenharia Genômica de Nanofibras de Celulose.</i>                  Edital: Chamada Nº 28/2013 MCTI/CNPq/CT- Biotec - Engenharia de Sistemas Biológico                  Coordenador: Luismar Marques Porto                  Processo: 402901/2013-4</p>
<p><b>BIÔMICA</b> - <i>Tecidos e Órgãos Bioartificiais- Engenharia de Tecidos Moles e Duros, Protótipos Funcionais e Cirurgia Robótica.</i>                  Edital: Encomendas MCT/FINEP - COENG                  Coordenador: Luismar Marques Porto                  Processo: 550084/2014-2</p>

Participação na organização de congressos:

<b>X-Meeting 2011</b>	Comissão Organizadora
<b>COBEQ 2014</b>	Comissão Organizadora

Apresentação de trabalhos em congressos:

<b>X-Meeting 2010</b>	<i>Whole genome conserved sequence analysis of Gram-variable microorganisms</i>	Afonso A. Londero, Julia V. Castro, Luismar M. Porto
<b>X-Meeting 2010</b>	<i>A genome-scale investigation for the one step production of poly lactic acid in a genetically engineered Lactococcus lactis</i>	Fernanda C. Pereira, Julia V. Castro, Luismar M. Porto
<b>X-Meeting 2011</b>	<i>Regulated metabolic model of bacterial hydrogen production from glycerol using the proton flux state concept</i>	Julia V. Castro, Fabio Baldissera, Renata A. N. Pértile, Agenor Furigo Junior, Luismar M. Porto
<b>COBEQ 2012</b>	<i>Caracterização metabólica da fermentação de glicerol pela Clostridium acetobutylicum ATCC 824 para promover a produção de biohidrogênio e biossolventes</i>	Julia V. Castro, Afonso A. Londero, Agenor Furigo Junior, Luismar M. Porto
<b>SINAFERM 2011</b>	<i>GRAM flexus – Um Método de Identificação do Estado Metabólico da Clostridium acetobutylicum ATCC824</i>	Afonso A. Londero, Julia V. Castro, Luismar M. Porto, Agenor Furigo Junior
<b>COBEQ 2012</b>	<i>Glicerol como matéria-prima para produção biológica de hidrogênio</i>	Julia V. Castro, Agenor Furigo Junior, Luismar M. Porto
<b>X-Meeting 2013</b>	<i>Genome-wide Dynamic Analysis: Promises and Pitfalls of Enzyme Kinetics</i>	Luismar M. Porto, Julia V. Castro

**7.2. ATIVIDADES REALIZADAS**

Data de Início: 14/06/2010

	2010_2	2011_1	2011_2	2012_1	2012_2	2013_1	2013_2	2014_1	2014_2	2015_1
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										

	Atividades
1	Elaboração da Proposta de Orientação
2	Revisão bibliográfica
3	Elaboração de projetos de pesquisa para obtenção de financiamento para realização da etapa experimental
4	Elaboração de projeto de pesquisa para realização da etapa biocomputacional
5	Aprovação do projeto <i>GramFlexus - Um Novo Método de Identificação Metabólica da Clostridium acetobutylicum para promover a produção de biohidrogênio e biossolventes</i>
6	Cadastro do projeto <i>Engenharia Metabólica da Clostridium acetobutylicum para promover a produção de biohidrogênio e biossolventes</i>
7	Cadastro do projeto <i>Análise de marcadores da Gram Variabilidade no rRNA 16S da Clostridium acetobutylicum utilizando ferramentas de Genômica Comparativa</i>
8	Execução do projeto <i>GramFlexus</i>
9	Execução do projeto <i>Engenharia. Metabólica</i>
10	Execução do projeto <i>Genômica Comparativa</i>
11	Elaboração de relatório técnico e financeiro do projeto <i>GramFlexus</i>
12	Elaboração de nova Proposta de Orientação
13	Ingresso na equipe de trabalho do projeto <i>PROPELE - Engenharia Tecidual e Avaliação Pré-Clínica e Clínica de Pele Biopolimérica Imunoativa</i>
14	Participação na elaboração de projetos de pesquisa para obtenção de financiamento
15	Aprovação do projeto <i>CELSYS - Engenharia Genômica de Nanofibras de Celulose</i> (parte integrante da equipe de trabalho)
16	Aprovação do projeto <i>BIÔMICA - Tecidos e Órgãos Bioartificiais- Engenharia de Tecidos Moles e Duros, Protótipos Funcionais e Cirurgia Robótica</i> (parte integrante da equipe de trabalho)
17	Revisão da Proposta de Orientação
18	Apresentação de trabalhos em congressos
19	Elaboração de artigos para submissão
20	Disciplinas
21	Qualificação
22	Implementação de críticas e sugestões indicadas pela banca de qualificação
23	Análise crítica e discussão dos resultados e desenvolvimento das conclusões finais
24	Redação do documento final
25	Defesa da Tese



## 8. APÊNDICE II

### 8.1. ARTIGO SUBMETIDO

---

Artigo submetido ao periódico Biosystems Engineering.

#### **MONITORING CHANGES IN THE *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 PHYSIOLOGICAL STATE DURING BATCH PROCESS**

Julia V. Castro<sup>a</sup>; Afonso A. Londero<sup>a</sup>, Agenor Furigo Jr.<sup>a</sup>, Luismar M. Porto<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>*Chemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil*

*\*Corresponding author*

Luismar M. Porto

*Address: Chemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil*

*E-mail: luismar@intelab.ufsc.br*

*Tel: +55 48 37219713*

*Fax: +55 48 37219687*

## MONITORING CHANGES IN THE *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 PHYSIOLOGICAL STATE DURING BATCH PROCESS

### **Abstract**

*Clostridium acetobutylicum* is an anaerobic microorganism involved in the fermentation of acetone, butanol, ethanol and hydrogen. Its fermentation process is typically defined by a biphasic pattern. We propose the concept of three phase fermentation to characterize the fermentation pattern of *C. acetobutylicum*, by including a transitional stage in addition to the typical acidogenic and solventogenic phases. A mathematical model is derived to define the fermentation stages. The metabolic switch between phases is strongly coupled to morphological and compositional membrane changes, and to be able to quickly interpret these changes is essential to the industrial process. The Gram staining technique is proposed as an efficient, low cost method to identify the physiological state of the bacteria culture and its connection with the fermentation stage. Using the Gram staining method, we demonstrate a strong correlation between bacterial growth and morphological changes of the cell wall that is useful to monitor early recognition of the metabolic stages of *C. acetobutylicum* fermentation.

### **Keywords**

*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824; ABE Fermentation; Gram Staining; Process Monitoring, Modified Gompertz Equation

### **1. Introduction**

*Clostridium* organisms are one of the foremost models in anaerobic fermentation processes. *C. acetobutylicum* ATCC 824 is an anaerobic bacteria known for its industrial ability to produce solvents and hydrogen (D. T. Jones & Woods, 1986). It has been extensively studied from the bioengineering point of view, for the reason that clostridial ABE (acetone-butanol-ethanol) fermentation is one of the most important industrial bioprocessing (Al-Hinai, Jones, & Papoutsakis, 2015).



A typical feature of the clostridial fermentation is its biphasic pattern. The first phase is the acidogenic phase, during which exponential growth occurs and acetic acid, butyric acid and hydrogen are the major products. Following the pH drop, there is the solventogenic phase, when the acids are re-assimilated and used in the production of acetone, butanol and ethanol. The solventogenic phase is strongly coupled to sporulation (D. T. Jones et al., 1982). Significant morphological and compositional membrane changes, such as a decrease of cell-wall thickness, occur along the changes in *C. acetobutylicum* metabolism. The shift from acidogenic to solventogenic phase is the consequence of a change in gene expression pattern and the factors triggering it are still not totally understood (S. W. Jones et al., 2008b). This microbial phenotypic heterogeneity is a major issue in the context of clostridial industrial fermentations and it can lead to difficulties in controlling the corresponding bioprocess (S. Y. Lee et al., 2008). Therefore the development of monitoring methods for early detecting these phase changes during fermentation is desirable and important to evaluate the effect of processing conditions in product formation.

Technologically significant methodologies intended to distinguish between acidogenesis and solventogenesis and important advances have already been achieved. A DNA microarray-based transcriptional analysis was used to relate the metabolic and morphological features to the transcriptional profile of the cell population elucidating genetic events associated with clostridial differentiation (S. W. Jones et al., 2008b). Transcriptional studies can be a powerful technique in genomics analysis, but are still heavily labor-intensive, time-consuming and expensive. A flow cytometry-based method for the detection of changes in membrane of *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 was developed (Linhova et al., 2010) where the two metabolic phases could be distinguished by a fluorescent technique. Nevertheless, it is known that *C. pasteurianum* NRRL B-598 does not follow the typical ABE fermentation pattern established for *C. acetobutylicum* ATCC 824, and that microbial flow cytometry is a complex and expensive technology that still requires consensus and broader acceptance (Fernandes et al., 2011).

The Gram staining technique is considered the foundation of all bacterial identification and taxonomic division. This multistep, sequential staining protocol separates bacteria based on their cell wall structure, and it is simpler and cheaper than the flow cytometry method (Moyes, Reynolds, & Breakwell, 2009). It was already reported that, as *Clostridium* cultures aged, their peptidoglycan layers became thinner, and that such event can make the cells more prone to exhibit Gram negativity (Beveridge, 1990).

In this work, we monitored changes in the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 physiological states during batch fermentation following bacterial growth, substrate consumption, product formation, and pH variation and correlated those changes to the bacteria Gram stain response. We modeled the process and devised a mathematical criterion to define fermentation stages aiming to achieve early recognition of the metabolic switch of *Clostridium* fermentations.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism Strain, Growth Conditions

*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 strain was obtained from André Tosello Tropical Research and Technology Foundation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in Reinforced Clostridial Medium (RCM) containing 15% glycerol for long-term storage. For microorganism reactivation, *C. acetobutylicum* work cultures were pre-cultured anaerobically at  $37.5^{\circ}\text{C}$  for 48 hours in RCM and maintained at  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Medium Composition

The growth optimized fermentation medium (Pan, Fan, Xing, Hou, & Zhang, 2008a) was prepared with the following composition:  $23.75\text{ g } \ell^{-1}$  glucose,  $3.0\text{ g } \ell^{-1}$  peptone,  $1.0\text{ g } \ell^{-1}$  yeast extract,  $0.5\text{ g } \ell^{-1}$  l-cysteine $\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.1\text{ g } \ell^{-1}$   $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.1\text{ g } \ell^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.1\text{ g } \ell^{-1}$ ; mineral salt solution,  $10\text{ mL } \ell^{-1}$  (containing  $0.01\text{ g L}^{-1}$   $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.05\text{ g } \ell^{-1}$   $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.01\text{ g } \ell^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $0.01\text{ g } \ell^{-1}$   $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.01\text{ g } \ell^{-1}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $0.2\text{ g } \ell^{-1}$   $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.01\text{ g } \ell^{-1}$   $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.001\text{ g L}^{-1}$   $\text{NiCl}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ); and vitamin solution,  $13.30\text{ mL L}^{-1}$  (containing  $0.01\text{ g } \ell^{-1}$  cobalamin,  $0.025\text{ g L}^{-1}$  vitamin C,  $0.025\text{ g } \ell^{-1}$  riboflavin,  $0.02\text{ g } \ell^{-1}$  citric acid,  $0.05\text{ g } \ell^{-1}$  pyridoxal,  $0.01\text{ g } \ell^{-1}$  folic acid,  $0.025$

g  $\ell^{-1}$  creatine). The contents were dissolved in 1  $\ell$  of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  buffering (final concentration 0.16 M, pH 6.5).

### 2.3. Batch Fermentation Setup

All experiments were carried out in 1  $\ell$  serum bottles with 750 mL medium. These bottles were flushed with nitrogen gas at 8  $\ell \text{ min}^{-1}$  for 10 min to remove oxygen and assure anaerobic environment. The bottles were incubated with 10% (v/v) of inoculum and operated in an orbital shaker with a constant rotational speed of 120 rpm and temperature of 37.5°C. The produced hydrogen gas was allowed to leave the headspace through a security vessel and then through a 1M NaOH solution to remove carbon dioxide (Maeda et al., 2008) and then into an inverted graduated cylinder which was used to measure the volume of gas, as a water-replace equipment. This fermentation was previously shown to enhance hydrogen production coupled with high bacterial growth by maintaining a low hydrogen headspace pressure and was modified from the work of Maeda, Sanchez-Torres *et al* (2008) (Maeda et al., 2008).

### 2.3. Analytical Methods

Cell growth was monitored by a spectrophotometer at 600 nm. The concentration of microorganisms was calculated by the Beer-Lambert law using the correlation coefficient equal to  $\epsilon=5.0 [\text{L g}^{-1}\text{cm}^{-1}]$  (J. K. McLaughlin, C. L. Meyer, & E. T. Papoutsakis, 1985). Glucose was determined enzymatically by the colorimetric method using Analisa Gold glucose oxidase kit. The volume of gas was measured by water displacement by connecting the headspace of the bioreactors to inverted glass cylinders filled with water. All gas volumes are reported at 1 atm and 37.5°C. Gram staining basic protocol was performed as previously described (Moyes et al., 2009) using fuchsin as counterstain. Cell morphology was observed under a light microscope at  $\times 1000$  magnification.

### 2.4. Kinetic Modeling of Batch Fermentations

The modified Gompertz equation was employed to describe the kinetics of the microbial growth (Mu, Yu, & Wang, 2007; Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & Vantriet, 1990); to model the substrate

degradation (Fan, Wang, Qian, & Gu, 2004; Mu et al., 2007) and to determine the cumulative hydrogen production (Lay, Lee, & Noike, 1999; Mu et al., 2007) by Equations (1), (2) and (3), as it follows:

$$X - X_0 = \Delta X_{max} \times \exp \left\{ - \exp \left[ \left( \frac{R_{max,X} \times e}{\Delta X_{max}} \right) \times (\lambda_X - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

where  $X$  is the biomass concentration ( $\text{g } \ell^{-1}$ );  $X_0$  is the biomass concentration ( $\text{g } \ell^{-1}$ );  $\Delta X_{max}$ , is the maximum net cell growth concentration ( $\text{g } \ell^{-1}$ );  $R_{max,X}$ , maximum cell growth rate ( $\text{g } \ell^{-1} \text{h}^{-1}$ );  $\lambda_X$  the lag-phase time (h), and  $t$  is the incubation time (h);

$$S_0 - S = S_{max} \times \exp \left\{ - \exp \left[ \left( \frac{R_{max,S} \times e}{S_{max}} \right) \times (\lambda_S - t) + 1 \right] \right\} \quad (2)$$

where  $S$  is the substrate concentration ( $\text{g } \ell^{-1}$ );  $S_0$ , the initial substrate concentration ( $\text{g } \ell^{-1}$ );  $S_{max}$ , the maximum substrate concentration ( $\text{g } \ell^{-1}$ );  $R_{max,S}$  is the maximum substrate consumption rate ( $\text{g } \ell^{-1} \text{h}^{-1}$ ),  $\lambda_S$  the lag-phase time (h), and  $t$  is the incubation time (h);

$$PH_2 = PH_{2,max} \times \exp \left\{ - \exp \left[ \left( \frac{R_{H_2,max} \times e}{PH_{2,max}} \right) \times (\lambda_P - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

where  $PH_2$  is the cumulative volume of hydrogen produced/volume of culture medium ( $\text{L H}_2 \text{ L}^{-1}$ ),  $R_{H_2,max}$  is the maximum hydrogen production rate ( $\ell \text{ H}_2 \ell^{-1} \text{ h}^{-1}$ ),  $\lambda_P$  is the lag-phase time (h),  $t$  is the incubation time (h),  $PH_{2,max}$  is the hydrogen production potential ( $\ell \text{ H}_2$ ).

Parameters of the Gompertz function were identified by means of the OriginPro (v8.51) software.

### **3. Results**

#### *3.1. Growth, Product Formation and Substrate Utilization*

In order to relate the metabolic and morphological characteristics of the *Clostridium acetobutylicum* cells in a typical batch culture to the fermentation profile important process parameters were determined. The main indicators of batch fermentations (concentration of products and substrate, growth curve and pH) are presented in Figure 1a and 1b. In addition, it also presents the modified Gompertz adjustment of experimental data by equations (1), (2) and (3), respectively. The estimated parameters of the equations (1-3) are shown in Table 1.

In order to follow the adaptations in membrane of *C. acetobutylicum*, during both acid and solvent production phases, during one complete fermentation cycle, six time-points were selected to evaluate morphologic changes and Gram stain response. They correspond to uppercase roman numerals I, II, III, IV, V and VI in Figure 1a and in Figure 2.

### **4. Discussion**

#### *4.1. Changes in Growth, Product Formation and Substrate Utilization*

All correlation coefficients of non-linear analysis by Eq (1), (2) and (3) were over 0.95, suggesting that cell growth, substrate consumption, and production of hydrogen profiles follow the same pattern and that the modified Gompertz equation was able to adequately describe the fermentation. The typical biphasic pattern was observed. There is an initial lag phase where the microorganism is adapting to the environment and these parameters suffer little increase. The pH profile presents a rapid fall after 13 hours, probably due to the production of acids, which is a classical feature of the acidogenic exponential growth phase. Afterwards, the pH stabilizes and the fitted curves reach the stationary stage, indicating the acidogenic metabolism switch to the solventogenic phase. At the end of the fermentation time, a slight increase in pH occurs, probably due to the re-assimilation of acids (Grupe & Gottschalk, 1992).

#### 4.2. Early Detection of Physiological Changes by Gram Staining

Morphological analysis was carried out by the classification method established to differentiate the stages of *Clostridium* form (I. Spath, R. Sillers, & E. T. Papoutsakis, 2003). Initially, microscopy results from the cultures revealed that, at the time course (I), the culture exhibit the typical vegetative cigar-shaped forms. Culture samples from time-points II, III and IV displayed an increased percentage of rounder and smaller clostridial form cells illustrating the transition between the bacillus shape and the spore shape. Latterly, at end fermentation stages, samples from time-points V and VI showed advanced differentiation with forespores and endospores already visible, and marks the initiation of spore formation, characterized by rounded cells, which is the expected response to the fall of the extracellular pH, one of the main factors linked to the initiation of the sporulation process.

Gram colorimetric characterization analysis was carried out by conventional stain classification method. Therefore, cells purple darkly stained are considered Gram positive and cells that were more lightly pink stained were considered Gram negative. At the beginning of fermentation (time-point I), the cells showed the typical purple-violet coloration of Gram positive response. Examining time-points II, III and IV Gram response we can see both Gram positive and Gram negative stained cells. An increasing number of cells stain Gram negative as a reflection of the decrease in peptidoglycan thickness. At the end of the fermentation (time-points V and VI), concurrent with the initiation of sporulation, all cells were stained with the characteristic reddish-pink Gram negative response. These results are in agreement with previous work (Beveridge, 1990), which found similar behavior in *Bacillus*, *Butyrivibrio* and *Clostridium* bacteria, concluding that they also became Gram negative as the culture aged by a separate set of events, including cell wall thinning.

A parallel can also be drawn between these findings and the changes observed during clostridial fermentation when cells were stained with Syto-9 (green) and PI (red), where acidogenic cells take on a predominantly red color and solventogenic cells stain green (S. W. Jones et al., 2008b). We understand that this effect reflected the adaptation of clostridial cell walls to the alterations of the surround-

ing environment and resulted in the change of Gram staining response (Bartholomew & Mittwer, 1952).

Even though it is known that the fermentation process follows a continuum path of changes, and that the traditional ABE fermentation is largely classified as a biphasic process, for research purposes we can benefit of categorizing these Gram variable staining responses into three phases: (1) the **acidogenic phase (G+)**, at the beginning of the exponential growth, that includes time-point I results. At this stage, hydrogen and acids are the main products and there were no stress conditions acting on the peptidoglycan wall, therefore the cells respond as Gram positive bacteria. Following the drop of medium acidity, the culture transitioned to (2) **the transitional phase (T)**, that here is represented by time-points II, III, and IV, where we can find both Gram negative and Gram positive stained cells; and (3) **the solventogenic phase (G-)**, revealed by time-points V and VI. When culture reaches its stationary phase, swollen, clostridial-form cells began to appear. By this third phase, the culture stains like a model Gram negative bacteria.

Phase labeling is a useful tool in helping identifying fermentation stages. The boundaries of these phases, on the other hand, are not that simple to define. These limits can be established based on cell morphology (I. Spath et al., 2003), optical properties (Schuster, van den Heuvel, Gutierrez, & Maddox, 1998), chemical composition of clostridial cells (Schuster, Goodacre, Gapes, & Young, 2001), anisotropy of electrical polarizability (Junne, Klein, Angersbach, & Goetz, 2008), and even voltage peaks difference when growing in a microbial fuel cell (Finch, Mackie, Sund, & Sumner, 2011). Jones, Paredes et al (2008) in their work acknowledge three main phases: exponential, transitional and stationary. The onset of the transitional phase is established where the peak of butyrate concentration coincided with the initiation of butanol production. In addition, a fine tuning adjustment that consider the result of clusters of temporal gene expression patterns re-categorizes the stationary phase in early, middle and late stationary phase (S. W. Jones et al., 2008b).

Here we suggest an objective approach to define the limits of the three proposed physiological phases. Plotting the second derivative of a typical Modified Gompertz equation curve produces a charac-

teristic curve (see Figure 3) which has distinct maximum and minimum points. The maximum value is here associated with the end of the acidogenic phase (G+) and with the onset of the transitional phase (T). This value can be used to define and calculate the duration of the acidogenic phase (G+). Additionally, the second derivative can define and measure the duration of the transitional phase (T) by determining the difference in time between the minimum and maximum points.

This approach non-arbitrarily defines the limits between the three proposed phases. Specifically, the second derivative plot suggests that the transitional phase (T) can be defined as the time interval between the points of maximum and minimum acceleration of changes of the main indicators of batch fermentations (i.e., growth, product formation and substrate utilization). However, the analysis of the hydrogen formation does not give an accurate description of this particular process. It was found that the production of this metabolite it's not linearly coupled with bacterial growth since it's progress occur subsequently in the fermentation cycle therefore it has an extended lag phase period (table 1) and it would give an later warning of physiological changes. On the other hand, monitoring the course of bacterial growth and subtract consumption and applying the second derivative procedure provides an effective three phase distinction, i.e. acidogenic phase (G+), transitional phase (T) and solventogenic phase (G-); allowing early prediction of physiological changes on the fermentation.

## **5. Conclusions**

Being able to quickly monitor and interpret changes in the bacteria culture profile is the key to maximize the performance of biotechnological processes. In the present study it was proposed a low-cost method based on the Gram staining microscopy and image analysis that allows early-warning and system monitoring of physiological state changes in *C. acetobutylicum* ATCC 824 batch fermentations. The Gram staining technique was proven to be useful in helping recognizing the early onset of the metabolic switch of the *C. acetobutylicum* fermentation. We demonstrated a correlation between fermentation data obtained during batch cultivations, (bacterial growth and substrate consumption) and morphological changes of



the cell wall of *Clostridium acetobutylicum*. We introduce the concept that a three phase division, recognizing a transitional, intermediary phase, better characterizes the metabolic switch than the traditional two phase division. The third phase was objectively defined by the second derivative of the kinetic growth model. This method was proved accurate in getting early information on the onset of the metabolic switch only when used with bacterial growth and substrate consumption. This approach has the potential to enhance the process monitoring capabilities and to fulfill the upcoming requirements for bioprocess development and operation. We assume that this simple low-cost method can help to gain more information on the physiological state of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during this complex fermentation process and enable more efficient tools for fermentation monitoring.

### ***Acknowledgements***

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil).

### FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Time course of growth, pH decrease, glucose uptake and hydrogen formation during anaerobic batch fermentation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 284 in RCM (37°C, 120 rpm); time (h); glucose uptake (S0-S) – (crosses, g L<sup>-1</sup>), cell growth (open circles, g L<sup>-1</sup>), hydrogen production (filled squares, ℓ H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>); pH profile (open squares). The fitted modified Gompertz models of equations (1), (2) and (3) are presented by black solid lines. Uppercase roman numerals point to the six time-points used to evaluate Gram response as they relate to physiological changes during fermentation and they correspond to those in Figure 2.

Figure 2. Physiological and morphological changes of the cell wall of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 determined by Gram stain. Uppercase roman numerals point to the six time-points used to evaluate Gram response as they relate to physiological changes during fermentation and they correspond to those in Figure 1.

Figure 3. Plot of the first and the second derivatives of the Modified Gompertz equations (second and third rows, 4-9) for the curves depicted in Figure 1 (first row, 1-3). Uppercase roman numerals point to the six time-points used to evaluate Gram response as they relate to physiological changes during fermentation and they correspond to those in Figure 1-2.

TABLE CAPTIONS

Table 1. Calculated results using the modified Gompertz equation for the kinetics of the microbial growth, substrate degradation and cumulative hydrogen production

TABLES

Table 1.

	<i>Parameter</i>	<i>Value</i>	<i>Unit</i>	<i>Std. deviation</i>
Equation 1.				
	$\Delta X_{max}$	0.255	g L <sup>-1</sup>	0.012
	$R_{max,X}$	0.022	g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.003
	$\lambda_X$	11.40	h	0.85
	R <sup>2</sup>	0.978	-	-
Equation 2.				
	$S_{max}$	0.223	g L <sup>-1</sup>	0.005
	$R_{max,S}$	0.023	g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.002
	$\lambda_S$	13.00	h	0.38
	R <sup>2</sup>	0.996	-	-
Equation 3.				
	$PH_{2max}$	1.27	LH <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	0.018
	$R_{max,H_2}$	0.189	LH <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.012
	$\lambda_P$	15.18	h	0.23
	R <sup>2</sup>	0.996	-	-

FIGURES

Figure 1.

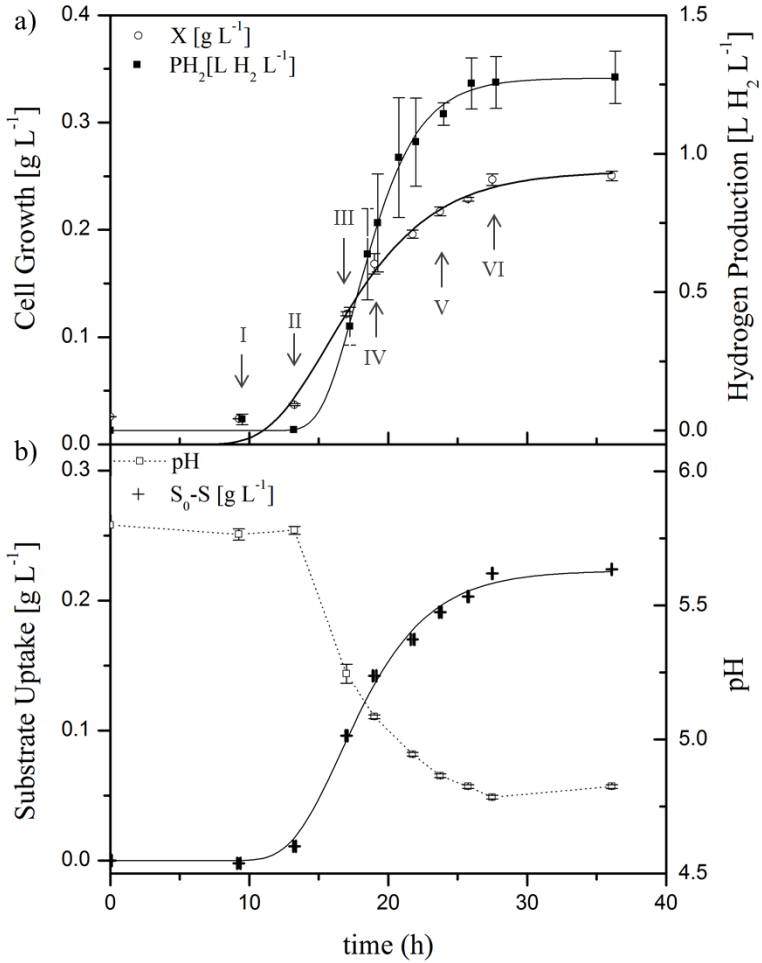


Figure 2.

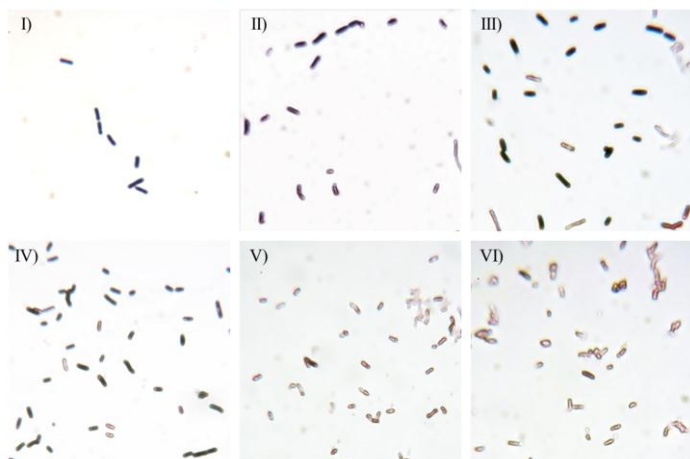
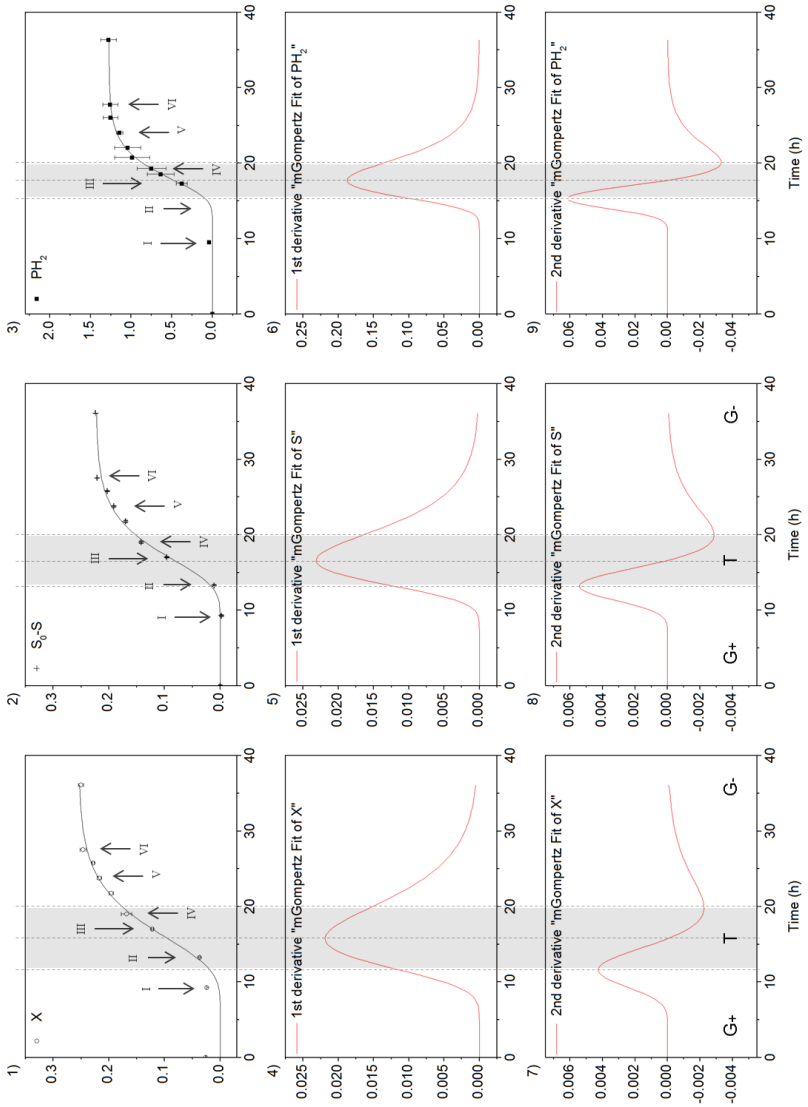


Figure 3.





## 9. APÊNDICE III

### 9.1. ANÁLISE DE GENÔMICA COMPARATIVA - JANELAS CONSERVADAS

#### Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X *Borrelia burgdorferi* ZS7 CP001205 - (Cons. Id 75%)

5774 (451565) to 5898 (451441) = 125bp at 75.2% exon  
 6267 (451072) to 6401 (450938) = 135bp at 75.6% exon  
 6824 (450517) to 7078 (450263) = 255bp at 73.7% exon  
 10154 (441737) to 10299 (441591) = 147bp at 78.9% intergenic  
 10315 (441575) to 11131 (440761) = 828bp at 76.2% intergenic  
 11161 (440731) to 11249 (440643) = 89bp at 78.7% intergenic  
 11418 (437583) to 11517 (437484) = 100bp at 76.0% intergenic  
 11558 (437445) to 11681 (437327) = 125bp at 73.6% intergenic  
 11801 (437161) to 12003 (436957) = 207bp at 79.2% intergenic  
 12047 (436913) to 12262 (436697) = 218bp at 75.7% intergenic  
 12406 (436554) to 12591 (436370) = 187bp at 77.5% intergenic  
 12671 (436288) to 12832 (436126) = 163bp at 74.2% intergenic  
 13032 (435926) to 13131 (435827) = 100bp at 78.0% intergenic  
 13141 (435817) to 13455 (435503) = 315bp at 80.0% intergenic  
 13646 (435321) to 14193 (434773) = 549bp at 82.0% intergenic  
 158552 (441990) to 158769 (441773) = 218bp at 77.1% intergenic  
 158780 (441737) to 158925 (441591) = 147bp at 78.9% intergenic  
 158941 (441575) to 159757 (440761) = 828bp at 76.1% intergenic  
 159787 (440731) to 159875 (440643) = 89bp at 78.7% intergenic  
 160044 (437583) to 160143 (437484) = 100bp at 76.0% intergenic  
 160184 (437445) to 160307 (437327) = 125bp at 73.6% intergenic  
 160427 (437161) to 160629 (436957) = 207bp at 79.2% intergenic  
 160673 (436913) to 160888 (436697) = 218bp at 75.7% intergenic  
 161032 (436554) to 161217 (436370) = 187bp at 77.5% intergenic  
 163690 (441990) to 163907 (441773) = 218bp at 77.1% intergenic  
 163918 (441737) to 164063 (441591) = 147bp at 78.9% intergenic  
 164079 (441575) to 164895 (440761) = 828bp at 76.2% intergenic  
 164925 (440731) to 165013 (440643) = 89bp at 78.7% intergenic  
 165182 (437583) to 165281 (437484) = 100bp at 77.0% intergenic  
 165322 (437445) to 165445 (437327) = 125bp at 73.6% intergenic  
 165565 (437161) to 165767 (436957) = 207bp at 79.2% intergenic  
 165811 (436913) to 166026 (436697) = 218bp at 75.7% intergenic  
 166170 (436554) to 166355 (436370) = 187bp at 77.5% intergenic  
 166435 (436288) to 166596 (436126) = 163bp at 74.8% intergenic  
 166796 (435926) to 166895 (435827) = 100bp at 78.0% intergenic  
 166905 (435817) to 167219 (435503) = 315bp at 80.0% intergenic  
 167410 (435321) to 167957 (434773) = 549bp at 82.0% intergenic  
 168829 (441990) to 169046 (441773) = 218bp at 77.1% intergenic  
 169057 (441737) to 169202 (441591) = 147bp at 78.9% intergenic  
 169218 (441575) to 170027 (440770) = 819bp at 76.6% intergenic  
 170074 (440731) to 170162 (440643) = 89bp at 78.7% intergenic  
 170330 (437583) to 170429 (437484) = 100bp at 76.0% intergenic  
 170470 (437445) to 170593 (437327) = 125bp at 73.6% intergenic  
 170713 (437161) to 170915 (436957) = 207bp at 79.2% intergenic  
 170959 (436913) to 171174 (436697) = 218bp at 75.7% intergenic

171318 (436554) to 171503 (436370) = 187bp at 77.5% intergenic  
 171583 (436288) to 171744 (436126) = 163bp at 74.8% intergenic  
 171944 (435926) to 172043 (435827) = 100bp at 78.0% intergenic  
 172053 (435817) to 172367 (435503) = 315bp at 80.0% intergenic  
 172558 (435321) to 173105 (434773) = 549bp at 82.0% intergenic  
 203139 (341938) to 203239 (342038) = 101bp at 75.2% exon  
 203352 (342151) to 203451 (342250) = 100bp at 75.0% exon  
 254905 (441990) to 255122 (441773) = 218bp at 77.1% intergenic  
 255133 (441737) to 255278 (441591) = 147bp at 78.9% intergenic  
 255294 (441575) to 256110 (440761) = 828bp at 76.2% intergenic  
 256140 (440731) to 256228 (440643) = 89bp at 78.7% intergenic  
 256397 (437583) to 256496 (437484) = 100bp at 76.0% intergenic  
 256537 (437445) to 256660 (437327) = 125bp at 73.6% intergenic  
 256780 (437161) to 256982 (436957) = 207bp at 79.2% intergenic  
 257026 (436913) to 257241 (436697) = 218bp at 75.7% intergenic  
 257385 (436554) to 257570 (436370) = 187bp at 77.5% intergenic  
 257650 (436288) to 257811 (436126) = 163bp at 74.8% intergenic  
 258011 (435926) to 258110 (435827) = 100bp at 78.0% intergenic  
 258120 (435817) to 258434 (435503) = 315bp at 80.0% intergenic  
 258625 (435321) to 259172 (434773) = 549bp at 82.0% intergenic  
 281192 (616498) to 281291 (616597) = 100bp at 78.0% exon  
 311108 (441990) to 311325 (441773) = 218bp at 77.1% intergenic  
 311336 (441737) to 311481 (441591) = 147bp at 78.9% intergenic  
 311497 (441575) to 312313 (440761) = 828bp at 76.2% intergenic  
 312343 (440731) to 312431 (440643) = 89bp at 78.7% intergenic  
 312600 (437583) to 312699 (437484) = 100bp at 76.0% intergenic  
 312740 (437445) to 312863 (437327) = 125bp at 73.6% intergenic  
 312983 (437161) to 313185 (436957) = 207bp at 79.2% intergenic  
 313229 (436913) to 313444 (436697) = 218bp at 75.7% intergenic  
 313588 (436554) to 313773 (436370) = 187bp at 77.5% intergenic  
 313853 (436288) to 314014 (436126) = 163bp at 74.8% intergenic  
 331259 (441990) to 331472 (441777) = 214bp at 77.1% intergenic  
 331487 (441737) to 331632 (441591) = 147bp at 78.9% intergenic  
 331648 (441575) to 332464 (440761) = 828bp at 76.2% intergenic  
 332494 (440731) to 332582 (440643) = 89bp at 78.7% intergenic  
 332751 (437583) to 332850 (437484) = 100bp at 76.0% intergenic  
 332891 (437445) to 333014 (437327) = 125bp at 73.6% intergenic  
 333134 (437161) to 333336 (436957) = 207bp at 79.2% intergenic  
 333380 (436913) to 333595 (436697) = 218bp at 75.7% intergenic  
 333739 (436554) to 333924 (436370) = 187bp at 77.5% intergenic  
 334004 (436288) to 334165 (436126) = 163bp at 74.8% intergenic  
 334365 (435926) to 334464 (435827) = 100bp at 78.0% intergenic  
 334474 (435817) to 334788 (435503) = 315bp at 80.3% intergenic  
 335441 (434859) to 335522 (434777) = 83bp at 81.9% intergenic  
 336397 (441990) to 336614 (441773) = 218bp at 77.1% intergenic  
 336625 (441737) to 336770 (441591) = 147bp at 78.9% intergenic  
 336786 (441575) to 337602 (440761) = 828bp at 76.2% intergenic  
 337632 (440731) to 337720 (440643) = 89bp at 78.7% intergenic  
 337889 (437583) to 337988 (437484) = 100bp at 76.0% intergenic  
 338029 (437445) to 338152 (437327) = 125bp at 73.6% intergenic  
 338272 (437161) to 338474 (436957) = 207bp at 79.2% intergenic  
 338527 (436903) to 338733 (436697) = 208bp at 76.0% intergenic  
 338877 (436554) to 339074 (436358) = 199bp at 75.4% intergenic  
 339142 (436288) to 339303 (436126) = 163bp at 74.8% intergenic  
 339503 (435926) to 339602 (435827) = 100bp at 78.0% intergenic  
 339612 (435817) to 339926 (435503) = 315bp at 80.0% intergenic  
 340117 (435321) to 340664 (434773) = 549bp at 82.0% intergenic  
 341536 (441990) to 341753 (441773) = 218bp at 77.1% intergenic  
 341764 (441737) to 341909 (441591) = 147bp at 78.9% intergenic  
 341925 (441575) to 342741 (440761) = 828bp at 76.2% intergenic



342771 (440731) to 342859 (440643) = 89bp at 78.7% intergenic  
 343027 (437583) to 343126 (437484) = 100bp at 76.0% intergenic  
 343167 (437445) to 343290 (437327) = 125bp at 73.6% intergenic  
 343410 (437161) to 343612 (436957) = 207bp at 79.2% intergenic  
 343656 (436913) to 343871 (436697) = 218bp at 75.7% intergenic  
 344015 (436554) to 344200 (436370) = 187bp at 77.5% intergenic  
 344280 (436288) to 344441 (436126) = 163bp at 74.2% intergenic  
 344641 (435926) to 344740 (435827) = 100bp at 78.0% intergenic  
 344750 (435817) to 345064 (435503) = 315bp at 80.0% intergenic  
 345255 (435321) to 345802 (434773) = 549bp at 82.0% intergenic  
 370603 (897688) to 370703 (897788) = 101bp at 76.2% exon  
 377538 (251305) to 377579 (251264) = 42bp at 78.6% exon  
 420660 (528867) to 420699 (528906) = 40bp at 80.0% exon  
 425216 (387276) to 425224 (387284) = 9bp at 77.8% exon  
 487214 (236251) to 487234 (236271) = 21bp at 76.2% exon  
 511705 (616490) to 511812 (616597) = 108bp at 75.9% exon  
 511713 (716417) to 511815 (716519) = 103bp at 75.7% exon  
 517209 (661317) to 517251 (661357) = 43bp at 76.7% exon  
 540532 (798184) to 540573 (798143) = 42bp at 76.2% exon  
 555310 (555175) to 555346 (555139) = 37bp at 83.8% exon  
 575438 (884500) to 575624 (884684) = 187bp at 74.9% exon  
 576322 (885384) to 576443 (885505) = 124bp at 75.0% exon  
 576745 (885807) to 576845 (885907) = 101bp at 75.2% exon  
 577348 (886436) to 577516 (886600) = 169bp at 74.6% exon  
 578737 (887842) to 578980 (888085) = 244bp at 72.1% exon  
 579511 (888616) to 579611 (888716) = 101bp at 75.2% exon  
 579900 (889005) to 580000 (889105) = 101bp at 75.2% exon  
 593597 (589644) to 593698 (589745) = 102bp at 75.5% exon  
 634062 (716422) to 634159 (716519) = 98bp at 78.6% exon  
 696398 (822409) to 696522 (822533) = 125bp at 75.2% exon  
 725876 (265909) to 725878 (265907) = 3bp at 100.0% exon  
 746302 (264752) to 746327 (264727) = 26bp at 76.9% exon  
 753439 (256151) to 753565 (256025) = 127bp at 72.4% exon  
 755251 (525188) to 755306 (525243) = 56bp at 75.0% exon  
 771531 (431828) to 771570 (431870) = 43bp at 76.7% exon  
 821652 (52973) to 821773 (52852) = 122bp at 74.6% exon  
 826657 (344713) to 826751 (344807) = 95bp at 77.9% exon  
 826942 (344998) to 827055 (345111) = 114bp at 76.3% exon  
 827121 (345188) to 827301 (345366) = 181bp at 77.3% exon  
 827330 (345395) to 827575 (345640) = 246bp at 77.2% exon  
 868870 (467245) to 868895 (467270) = 26bp at 76.9% exon  
 909926 (406434) to 909938 (406446) = 13bp at 76.9% exon  
 943369 (612896) to 943476 (613003) = 108bp at 76.9% exon  
 970473 (677018) to 970574 (677119) = 102bp at 75.5% exon  
 970746 (677291) to 970850 (677395) = 105bp at 74.3% exon  
 991879 (793124) to 991881 (793122) = 3bp at 100.0% exon  
 1042077 (718584) to 1042199 (718706) = 123bp at 75.6% exon  
 1042088 (616489) to 1042196 (616597) = 109bp at 78.0% exon  
 1042098 (716418) to 1042199 (716519) = 102bp at 76.5% exon  
 1105654 (441990) to 1105871 (441773) = 218bp at 77.1% intergenic  
 1105882 (441737) to 1106027 (441591) = 147bp at 78.9% intergenic  
 1106043 (441575) to 1106859 (440761) = 828bp at 76.2% intergenic  
 1106889 (440731) to 1106977 (440643) = 89bp at 78.7% intergenic  
 1107146 (437583) to 1107245 (437484) = 100bp at 76.0% intergenic  
 1107286 (437445) to 1107409 (437327) = 125bp at 73.6% intergenic  
 1107529 (437161) to 1107731 (436957) = 207bp at 79.2% intergenic  
 1107775 (436913) to 1107990 (436697) = 218bp at 75.7% intergenic  
 1108134 (436554) to 1108319 (436370) = 187bp at 77.5% intergenic  
 1108399 (436288) to 1108560 (436126) = 163bp at 74.8% intergenic  
 1108760 (435926) to 1108859 (435827) = 100bp at 78.0% intergenic

## APÉNDICE IV

---

1108869 (435817) to 1109183 (435503) = 315bp at 80.0% intergenic  
1109374 (435321) to 1109921 (434773) = 549bp at 82.0% intergenic  
1269405 (783667) to 1269455 (783713) = 51bp at 76.5% exon  
1309564 (791756) to 1309600 (791792) = 37bp at 81.1% exon  
1320481 (667646) to 1320485 (667642) = 5bp at 100.0% exon  
1324954 (646920) to 1324960 (646914) = 7bp at 85.7% exon  
1403650 (815271) to 1403786 (815409) = 139bp at 73.4% exon  
1420840 (85559) to 1421028 (85371) = 189bp at 73.5% exon  
142252 (84147) to 1422371 (84028) = 120bp at 75.8% exon  
1425548 (527192) to 1425666 (527074) = 119bp at 76.5% exon  
1425832 (526836) to 1426025 (526643) = 194bp at 75.8% exon  
1426031 (526639) to 1426405 (526266) = 377bp at 72.9% exon  
1426674 (525997) to 1426975 (525696) = 302bp at 74.2% exon  
1444118 (745378) to 1444303 (745563) = 186bp at 73.7% exon  
1444573 (745833) to 1444748 (746008) = 176bp at 73.3% exon  
1461630 (246168) to 1461746 (246282) = 117bp at 75.2% exon  
1461787 (246322) to 1461943 (246476) = 157bp at 74.5% exon  
1462437 (246967) to 1462536 (247066) = 100bp at 76.0% exon  
1462625 (247158) to 1462771 (247304) = 148bp at 78.4% exon  
1595625 (547790) to 1595626 (547789) = 2bp at 100.0% exon  
1664686 (317260) to 1664703 (317243) = 18bp at 83.3% exon  
1677101 (417194) to 1677129 (417222) = 29bp at 86.2% exon  
1701139 (673222) to 1701152 (673209) = 14bp at 85.7% exon  
1844959 (307575) to 1845083 (307451) = 125bp at 79.2% exon  
1857005 (222815) to 1857111 (222921) = 107bp at 76.6% exon  
1857201 (223011) to 1857372 (223182) = 172bp at 73.8% exon  
1891915 (645779) to 1892053 (645641) = 139bp at 74.8% exon  
1905878 (638414) to 1905891 (638427) = 14bp at 100.0% exon  
1910174 (634977) to 1910225 (634926) = 52bp at 75.0% exon  
1950989 (841685) to 1951119 (841815) = 131bp at 74.8% exon  
1955735 (844597) to 1955848 (844710) = 115bp at 75.7% exon  
1965408 (127077) to 1965541 (126944) = 135bp at 73.3% exon  
1965580 (126905) to 1965697 (126788) = 118bp at 75.4% exon  
1974946 (881592) to 1975054 (881484) = 111bp at 75.7% exon  
1988938 (837381) to 1989037 (837284) = 100bp at 75.0% exon  
1990973 (835372) to 1991071 (835274) = 99bp at 75.8% exon  
2080581 (557100) to 2080609 (557128) = 29bp at 89.7% exon  
2081527 (672739) to 2081564 (672776) = 38bp at 84.2% exon  
2225228 (239397) to 2225334 (239291) = 107bp at 75.7% exon  
2242770 (287589) to 2242870 (287689) = 101bp at 76.2% exon  
2306067 (288972) to 2306170 (289075) = 104bp at 77.9% exon  
2388171 (21824) to 2388286 (21939) = 116bp at 76.7% exon  
2510071 (775488) to 2510170 (775389) = 100bp at 76.0% exon  
2655059 (718725) to 2655195 (718589) = 137bp at 74.5% exon  
2750122 (635279) to 2750289 (635112) = 168bp at 74.4% exon  
2750295 (635106) to 2750629 (634772) = 337bp at 74.2% exon  
2827544 (685666) to 2827668 (685542) = 125bp at 72.8% exon  
2828116 (685097) to 2828220 (684993) = 105bp at 76.2% exon  
2828390 (684820) to 2828562 (684648) = 173bp at 74.6% exon  
2874389 (718723) to 2874518 (718594) = 130bp at 75.4% exon  
2887955 (457997) to 2887996 (458038) = 42bp at 78.6% exon  
2896317 (718682) to 2896415 (718584) = 99bp at 75.8% exon  
2932480 (616516) to 2932561 (616597) = 82bp at 78.0% exon  
2944505 (399442) to 2944547 (399486) = 45bp at 75.6% exon  
2951180 (716529) to 2951293 (716419) = 114bp at 74.6% exon  
2951196 (616597) to 2951298 (616495) = 103bp at 77.7% exon  
2978907 (154537) to 2979006 (154636) = 100bp at 75.0% exon  
2979273 (154903) to 2979403 (155033) = 131bp at 77.9% exon  
2990273 (386454) to 2990530 (386197) = 258bp at 74.4% exon  
3015568 (194484) to 3015694 (194358) = 127bp at 70.9% exon

3015743 (194309) to 3015891 (194161) = 149bp at 73.2% exon  
 3016136 (193916) to 3016279 (193773) = 144bp at 73.6% exon  
 3019845 (235145) to 3020036 (235336) = 192bp at 76.0% exon  
 3073925 (386826) to 3074031 (386932) = 107bp at 75.7% exon  
 3081884 (779440) to 3081990 (779546) = 107bp at 74.8% exon  
 3082315 (779871) to 3082476 (780032) = 162bp at 76.5% exon  
 3083000 (780553) to 3083198 (780748) = 199bp at 75.4% exon  
 3242712 (801201) to 3242815 (801098) = 104bp at 76.9% exon  
 3256733 (503697) to 3256851 (503579) = 119bp at 77.3% exon  
 3257458 (503068) to 3257560 (502966) = 103bp at 75.7% exon  
 3271138 (491486) to 3271370 (491254) = 233bp at 77.7% exon  
 3271394 (491227) to 3271493 (491128) = 100bp at 76.0% exon  
 3273240 (547468) to 3273416 (547644) = 177bp at 73.4% exon  
 3273269 (728093) to 3273436 (727926) = 168bp at 76.2% exon  
 3273758 (395942) to 3273862 (396046) = 105bp at 77.1% exon  
 3274489 (396512) to 3274733 (396756) = 245bp at 75.5% exon  
 3276475 (398722) to 3276731 (398978) = 257bp at 73.9% exon  
 3277438 (399634) to 3277601 (399797) = 164bp at 75.0% exon  
 3277699 (399895) to 3277880 (400076) = 182bp at 73.1% exon  
 3277935 (400131) to 3278159 (400355) = 225bp at 77.3% exon  
 3278457 (400650) to 3278774 (400967) = 318bp at 74.8% exon  
 3279181 (401182) to 3279405 (401406) = 225bp at 78.2% exon  
 3279652 (401653) to 3279761 (401762) = 110bp at 76.4% exon  
 3280864 (402868) to 3281102 (403106) = 239bp at 77.0% exon  
 3287347 (491486) to 3287579 (491254) = 233bp at 77.7% intergenic  
 3287603 (491227) to 3287702 (491128) = 100bp at 76.0% intergenic  
 3320666 (342151) to 3320776 (342261) = 111bp at 73.9% exon  
 3321595 (342997) to 3321731 (343133) = 138bp at 72.5% exon  
 3332979 (434777) to 3333522 (435321) = 545bp at 82.0% intergenic  
 3333713 (435503) to 3334027 (435817) = 315bp at 80.0% intergenic  
 3334037 (435827) to 3334136 (435926) = 100bp at 78.0% intergenic  
 3334336 (436126) to 3334497 (436288) = 163bp at 74.8% intergenic  
 3334565 (436358) to 3334762 (436554) = 199bp at 75.9% intergenic  
 3334893 (436684) to 3335121 (436913) = 231bp at 74.5% intergenic  
 3335165 (436957) to 3335370 (437164) = 210bp at 79.0% intergenic  
 3335488 (437328) to 3335607 (437442) = 121bp at 75.2% intergenic  
 3335651 (437484) to 3335750 (437583) = 100bp at 76.0% intergenic  
 3335946 (440670) to 3336007 (440731) = 62bp at 91.9% intergenic  
 3336037 (440761) to 3336853 (441575) = 828bp at 76.2% intergenic  
 3336869 (441591) to 3337014 (441737) = 147bp at 78.9% intergenic  
 3337025 (441773) to 3337242 (441990) = 218bp at 77.1% intergenic  
 3340711 (380615) to 3340905 (380808) = 195bp at 74.4% exon  
 3348717 (822674) to 3348982 (822409) = 266bp at 73.7% exon  
 3362812 (646962) to 3362913 (647063) = 102bp at 75.5% exon  
 3363754 (647904) to 3363884 (648034) = 131bp at 74.8% exon  
 3410664 (99534) to 3410798 (99400) = 135bp at 75.6% exon  
 3525219 (616598) to 3525325 (616492) = 107bp at 74.8% exon  
 3632757 (622333) to 3632794 (622368) = 38bp at 81.6% exon  
 3644570 (306411) to 3644628 (306353) = 59bp at 78.0% exon  
 3677166 (616597) to 3677273 (616487) = 111bp at 79.3% exon  
 3708003 (716516) to 3708122 (716397) = 120bp at 75.8% exon  
 3828879 (343091) to 3828977 (342993) = 100bp at 76.0% exon  
 3829839 (342250) to 3829962 (342127) = 124bp at 75.8% exon  
 3837739 (342248) to 3837914 (342073) = 176bp at 72.7% exon  
 3837956 (342031) to 3838067 (341920) = 112bp at 75.9% exon  
 3842913 (343124) to 3843016 (343021) = 104bp at 76.0% exon  
 3843903 (342258) to 3844084 (342077) = 182bp at 74.2% exon  
 3928639 (111835) to 3928656 (111852) = 18bp at 83.3% exon  
 3936186 (180188) to 3936298 (180300) = 113bp at 74.3% exon  
 3936409 (180411) to 3936521 (180523) = 113bp at 75.2% exon

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Borrelia burgdorferi* ZS7 CP001205 - (Cons. Id 85%)**

10166 (441725) to 10273 (441618) = 108bp at 86.1% intergenic  
 10381 (441509) to 10502 (441388) = 122bp at 84.4% intergenic  
 10536 (441361) to 10673 (441224) = 138bp at 84.1% intergenic  
 10703 (441193) to 10818 (441077) = 118bp at 81.4% intergenic  
 10831 (441064) to 10928 (440967) = 98bp at 85.7% intergenic  
 10986 (440908) to 11088 (440806) = 103bp at 85.4% intergenic  
 11814 (437148) to 11949 (437015) = 136bp at 87.5% intergenic  
 13230 (435728) to 13422 (435536) = 193bp at 86.5% intergenic  
 13824 (435143) to 14133 (434833) = 311bp at 84.9% intergenic  
 158612 (441930) to 158721 (441821) = 110bp at 84.5% intergenic  
 158792 (441725) to 158899 (441618) = 108bp at 86.1% intergenic  
 159007 (441509) to 159128 (441388) = 122bp at 84.4% intergenic  
 159162 (441361) to 159299 (441224) = 138bp at 84.1% intergenic  
 159329 (441193) to 159444 (441077) = 118bp at 81.4% intergenic  
 159457 (441064) to 159554 (440967) = 98bp at 85.7% intergenic  
 159612 (440908) to 159714 (440806) = 103bp at 85.4% intergenic  
 160440 (437148) to 160575 (437015) = 136bp at 87.5% intergenic  
 163750 (441930) to 163859 (441821) = 110bp at 84.5% intergenic  
 163930 (441725) to 164037 (441618) = 108bp at 86.1% intergenic  
 164145 (441509) to 164266 (441388) = 122bp at 84.4% intergenic  
 164300 (441361) to 164437 (441224) = 138bp at 84.1% intergenic  
 164467 (441193) to 164582 (441077) = 118bp at 81.4% intergenic  
 164595 (441064) to 164692 (440967) = 98bp at 85.7% intergenic  
 164750 (440908) to 164852 (440806) = 103bp at 85.4% intergenic  
 165578 (437148) to 165713 (437015) = 136bp at 87.5% intergenic  
 166994 (435728) to 167186 (435536) = 193bp at 86.5% intergenic  
 167588 (435143) to 167897 (434833) = 311bp at 84.9% intergenic  
 168889 (441930) to 168998 (441821) = 110bp at 84.5% intergenic  
 169069 (441725) to 169176 (441618) = 108bp at 86.1% intergenic  
 169284 (441509) to 169405 (441388) = 122bp at 84.4% intergenic  
 169439 (441361) to 169576 (441224) = 138bp at 84.1% intergenic  
 169606 (441193) to 169721 (441077) = 118bp at 81.4% intergenic  
 169734 (441064) to 169831 (440967) = 98bp at 85.7% intergenic  
 169889 (440908) to 169991 (440806) = 103bp at 85.4% intergenic  
 170726 (437148) to 170861 (437015) = 136bp at 87.5% intergenic  
 172142 (435728) to 172334 (435536) = 193bp at 86.5% intergenic  
 172736 (435143) to 173045 (434833) = 311bp at 84.9% intergenic  
 254965 (441930) to 255074 (441821) = 110bp at 84.5% intergenic  
 255145 (441725) to 255252 (441618) = 108bp at 86.1% intergenic  
 255360 (441509) to 255481 (441388) = 122bp at 84.4% intergenic  
 255515 (441361) to 255652 (441224) = 138bp at 84.1% intergenic  
 255682 (441193) to 255797 (441077) = 118bp at 81.4% intergenic  
 255810 (441064) to 255907 (440967) = 98bp at 85.7% intergenic  
 255965 (440908) to 256067 (440806) = 103bp at 85.4% intergenic  
 256793 (437148) to 256928 (437015) = 136bp at 87.5% intergenic  
 258209 (435728) to 258401 (435536) = 193bp at 86.5% intergenic  
 258803 (435143) to 259112 (434833) = 311bp at 84.9% intergenic  
 311168 (441930) to 311277 (441821) = 110bp at 84.5% intergenic  
 311348 (441725) to 311455 (441618) = 108bp at 86.1% intergenic  
 311563 (441509) to 311684 (441388) = 122bp at 84.4% intergenic  
 311718 (441361) to 311855 (441224) = 138bp at 84.1% intergenic  
 311885 (441193) to 312000 (441077) = 118bp at 81.4% intergenic  
 312013 (441064) to 312110 (440967) = 98bp at 85.7% intergenic  
 312268 (440908) to 312270 (440806) = 103bp at 85.4% intergenic  
 312996 (437148) to 313131 (437015) = 136bp at 87.5% intergenic

331319 (441930) to 331420 (441829) = 102bp at 85.3% intergenic  
 331499 (441725) to 331606 (441618) = 108bp at 86.1% intergenic  
 331714 (441509) to 331835 (441388) = 122bp at 84.4% intergenic  
 331869 (441361) to 332006 (441224) = 138bp at 84.1% intergenic  
 332036 (441193) to 332151 (441077) = 118bp at 81.4% intergenic  
 332164 (441064) to 332261 (440967) = 98bp at 85.7% intergenic  
 332319 (440908) to 332421 (440806) = 103bp at 85.4% intergenic  
 333147 (437148) to 333282 (437015) = 136bp at 87.5% intergenic  
 334551 (435740) to 334759 (435532) = 209bp at 86.6% intergenic  
 336457 (441930) to 336566 (441821) = 110bp at 84.5% intergenic  
 336637 (441725) to 336744 (441618) = 108bp at 86.1% intergenic  
 336852 (441509) to 336973 (441388) = 122bp at 84.4% intergenic  
 337007 (441361) to 337144 (441224) = 138bp at 84.1% intergenic  
 337174 (441193) to 337289 (441077) = 118bp at 81.4% intergenic  
 337302 (441064) to 337399 (440967) = 98bp at 85.7% intergenic  
 337457 (440908) to 337559 (440806) = 103bp at 85.4% intergenic  
 338285 (437148) to 338420 (437015) = 136bp at 87.5% intergenic  
 339701 (435728) to 339893 (435536) = 193bp at 86.5% intergenic  
 340295 (435143) to 340604 (434833) = 311bp at 84.9% intergenic  
 341596 (441930) to 341705 (441821) = 110bp at 84.5% intergenic  
 341776 (441725) to 341883 (441618) = 108bp at 86.1% intergenic  
 341991 (441509) to 342112 (441388) = 122bp at 84.4% intergenic  
 342146 (441361) to 342283 (441224) = 138bp at 84.1% intergenic  
 342313 (441193) to 342428 (441077) = 118bp at 81.4% intergenic  
 342441 (441064) to 342538 (440967) = 98bp at 85.7% intergenic  
 342596 (440908) to 342698 (440806) = 103bp at 85.4% intergenic  
 343423 (437148) to 343558 (437015) = 136bp at 87.5% intergenic  
 344839 (435728) to 345031 (435536) = 193bp at 86.5% intergenic  
 345433 (435143) to 345742 (434833) = 311bp at 84.9% intergenic  
 725876 (265909) to 725878 (265907) = 3bp at 100.0% exon  
 827136 (345201) to 827235 (345300) = 100bp at 85.0% exon  
 991879 (793124) to 991881 (793122) = 3bp at 100.0% exon  
 1105714 (441930) to 1105823 (441821) = 110bp at 84.5% intergenic  
 1105894 (441725) to 1106001 (441618) = 108bp at 86.1% intergenic  
 1106109 (441509) to 1106230 (441388) = 122bp at 84.4% intergenic  
 1106264 (441361) to 1106401 (441224) = 138bp at 84.1% intergenic  
 1106431 (441193) to 1106546 (441077) = 118bp at 81.4% intergenic  
 1106559 (441064) to 1106656 (440967) = 98bp at 85.7% intergenic  
 1106714 (440908) to 1106816 (440806) = 103bp at 85.4% intergenic  
 1107542 (437148) to 1107677 (437015) = 136bp at 87.5% intergenic  
 1108958 (435728) to 1109150 (435536) = 193bp at 86.5% intergenic  
 1109552 (435143) to 1109861 (434833) = 311bp at 84.9% intergenic  
 1320481 (667646) to 1320485 (667642) = 5bp at 100.0% exon  
 1324954 (646920) to 1324960 (646914) = 7bp at 85.7% exon  
 1595625 (547790) to 1595626 (547789) = 2bp at 100.0% exon  
 1677101 (417194) to 1677129 (417222) = 29bp at 86.2% exon  
 1701139 (673222) to 1701152 (673209) = 14bp at 85.7% exon  
 1905878 (638414) to 1905891 (638427) = 14bp at 100.0% exon  
 2080581 (557100) to 2080609 (557128) = 29bp at 89.7% exon  
 3279222 (401223) to 3279326 (401327) = 105bp at 85.7% exon  
 3333035 (434833) to 3333344 (435143) = 311bp at 84.9% intergenic  
 3333746 (435536) to 3333938 (435728) = 193bp at 86.5% intergenic  
 3335219 (437015) to 3335354 (437148) = 136bp at 87.5% intergenic  
 3336080 (440806) to 3336182 (440908) = 103bp at 85.4% intergenic  
 3336240 (440967) to 3336337 (441064) = 98bp at 85.7% intergenic  
 3336350 (441077) to 3336465 (441193) = 118bp at 81.4% intergenic  
 3336495 (441224) to 3336632 (441361) = 138bp at 84.1% intergenic  
 3336666 (441388) to 3336787 (441509) = 122bp at 84.4% intergenic  
 3336895 (441618) to 3337002 (441725) = 108bp at 86.1% intergenic  
 3337073 (441821) to 3337182 (441930) = 110bp at 84.5% intergenic

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Borrelia burgdorferi* ZS7 CP001205 - (Cons. Id 95%)**

13277 (435681) to 13403 (435555) = 127bp at 93.7% intergenic  
167041 (435681) to 167167 (435555) = 127bp at 93.7% intergenic  
172189 (435681) to 172315 (435555) = 127bp at 93.7% intergenic  
258256 (435681) to 258382 (435555) = 127bp at 93.7% intergenic  
334607 (435684) to 334736 (435555) = 130bp at 93.1% intergenic  
339748 (435681) to 339874 (435555) = 127bp at 93.7% intergenic  
344886 (435681) to 345012 (435555) = 127bp at 93.7% intergenic  
725876 (265909) to 725878 (265907) = 3bp at 100.0% exon  
991879 (793124) to 991881 (793122) = 3bp at 100.0% exon  
1109005 (435681) to 1109131 (435555) = 127bp at 93.7% intergenic  
1320481 (667646) to 1320485 (667642) = 5bp at 100.0% exon  
1595625 (547790) to 1595626 (547789) = 2bp at 100.0% exon  
1905878 (638414) to 1905891 (638427) = 14bp at 100.0% exon  
3333765 (435555) to 3333891 (435681) = 127bp at 93.7% intergenic

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Chlamydomonas pneumonia* AR39 AE002161 - (Cons. Id 75%)**

6099 (531785) to 6210 (531896) = 112bp at 75.9% exon  
7242 (533392) to 7354 (533504) = 113bp at 76.1% exon  
9946 (1070629) to 10154 (1070423) = 209bp at 76.6% intergenic  
10155 (1070395) to 11245 (1069306) = 1097bp at 77.5% intergenic  
11549 (1068948) to 11671 (1068827) = 123bp at 77.2% intergenic  
11791 (1068706) to 11947 (1068549) = 158bp at 81.0% intergenic  
12125 (1068356) to 12270 (1068212) = 146bp at 76.7% intergenic  
12406 (1068077) to 12587 (1067897) = 182bp at 74.2% intergenic  
12686 (1067796) to 12832 (1067647) = 150bp at 74.7% intergenic  
13028 (1067457) to 13143 (1067343) = 116bp at 78.4% intergenic  
13231 (1067229) to 13515 (1066943) = 287bp at 79.1% intergenic  
13599 (1066859) to 14163 (1066295) = 565bp at 81.2% intergenic  
158572 (1070629) to 158780 (1070423) = 209bp at 76.6% intergenic  
158781 (1070395) to 159871 (1069306) = 1097bp at 77.6% intergenic  
160175 (1068948) to 160297 (1068827) = 123bp at 77.2% intergenic  
160422 (1068701) to 160591 (1068531) = 171bp at 77.8% intergenic  
160751 (1068356) to 160896 (1068212) = 146bp at 76.7% intergenic  
161032 (1068077) to 161213 (1067897) = 182bp at 74.2% intergenic  
161354 (1067753) to 161458 (1067647) = 107bp at 74.8% intergenic  
161654 (1067457) to 161769 (1067343) = 116bp at 78.4% intergenic  
163710 (1070629) to 163901 (1070438) = 192bp at 77.6% intergenic  
164780 (1069535) to 165009 (1069306) = 235bp at 74.0% intergenic  
168849 (1070629) to 169057 (1070423) = 209bp at 76.6% intergenic  
169058 (1070395) to 170028 (1069425) = 973bp at 78.3% intergenic  
170038 (1069421) to 170158 (1069306) = 121bp at 72.7% intergenic  
170461 (1068948) to 170583 (1068827) = 123bp at 77.2% intergenic  
170703 (1068706) to 170859 (1068549) = 158bp at 81.0% intergenic  
171037 (1068356) to 171182 (1068212) = 146bp at 76.7% intergenic  
171318 (1068077) to 171499 (1067897) = 182bp at 74.2% intergenic  
171598 (1067796) to 171744 (1067647) = 150bp at 75.3% intergenic  
171940 (1067457) to 172055 (1067343) = 116bp at 78.4% intergenic  
256122 (1069403) to 256224 (1069306) = 103bp at 76.7% intergenic  
256528 (1068948) to 256650 (1068827) = 123bp at 77.2% intergenic  
256770 (1068706) to 256926 (1068549) = 158bp at 81.0% intergenic

257104 (1068356) to 257249 (1068212) = 146bp at 76.7% intergenic  
 257385 (1068077) to 257566 (1067897) = 182bp at 74.2% intergenic  
 257665 (1067796) to 257811 (1067647) = 150bp at 75.3% intergenic  
 258007 (1067457) to 258122 (1067343) = 116bp at 78.4% intergenic  
 258210 (1067229) to 258494 (1066943) = 287bp at 79.1% intergenic  
 258578 (1066859) to 259142 (1066295) = 565bp at 81.2% intergenic  
 311972 (1069762) to 312427 (1069306) = 462bp at 77.3% intergenic  
 312731 (1068948) to 312853 (1068827) = 123bp at 77.2% intergenic  
 312973 (1068706) to 313129 (1068549) = 158bp at 81.0% intergenic  
 313307 (1068356) to 313452 (1068212) = 146bp at 76.7% intergenic  
 313588 (1068077) to 313769 (1067897) = 182bp at 74.2% intergenic  
 337483 (1069539) to 337716 (1069306) = 239bp at 74.1% intergenic  
 338020 (1068948) to 338142 (1068827) = 123bp at 77.2% intergenic  
 338262 (1068706) to 338418 (1068549) = 158bp at 81.0% intergenic  
 338596 (1068356) to 338741 (1068212) = 146bp at 76.7% intergenic  
 338877 (1068077) to 339058 (1067897) = 182bp at 73.6% intergenic  
 339157 (1067796) to 339303 (1067647) = 150bp at 75.3% intergenic  
 339499 (1067457) to 339614 (1067343) = 116bp at 78.4% intergenic  
 339702 (1067229) to 339986 (1066943) = 287bp at 79.1% intergenic  
 340070 (1066859) to 340634 (1066295) = 565bp at 81.2% intergenic  
 341556 (1070629) to 341764 (1070423) = 209bp at 76.6% intergenic  
 341765 (1070395) to 342855 (1069306) = 1097bp at 77.5% intergenic  
 343158 (1068948) to 343280 (1068827) = 123bp at 77.2% intergenic  
 343400 (1068706) to 343556 (1068549) = 158bp at 81.0% intergenic  
 343734 (1068356) to 343879 (1068212) = 146bp at 76.7% intergenic  
 344015 (1068077) to 344196 (1067897) = 182bp at 74.2% intergenic  
 344337 (1067753) to 344441 (1067647) = 107bp at 74.8% intergenic  
 344641 (1067453) to 344752 (1067343) = 112bp at 78.6% intergenic  
 344840 (1067229) to 345124 (1066943) = 287bp at 79.1% intergenic  
 345208 (1066859) to 345772 (1066295) = 565bp at 81.2% intergenic  
 575446 (1162929) to 575622 (1163105) = 177bp at 74.6% exon  
 696326 (922170) to 696451 (922045) = 126bp at 76.2% exon  
 827414 (1165973) to 827514 (1166073) = 101bp at 76.2% exon  
 950091 (608163) to 950132 (608207) = 45bp at 80.0% exon  
 995642 (804691) to 995698 (804747) = 57bp at 75.4% exon  
 1098177 (662701) to 1098290 (662588) = 114bp at 76.3% exon  
 1099513 (661368) to 1099643 (661238) = 131bp at 73.3% exon  
 1105674 (1070629) to 1105882 (1070423) = 209bp at 76.6% intergenic  
 1105883 (1070395) to 1106973 (1069306) = 1097bp at 77.5% intergenic  
 1107277 (1068948) to 1107399 (1068827) = 123bp at 77.2% intergenic  
 1107519 (1068706) to 1107675 (1068549) = 158bp at 81.0% intergenic  
 1107853 (1068356) to 1107998 (1068212) = 146bp at 76.7% intergenic  
 1108134 (1068077) to 1108315 (1067897) = 182bp at 74.2% intergenic  
 1108414 (1067796) to 1108560 (1067647) = 150bp at 75.3% intergenic  
 1108756 (1067457) to 1108871 (1067343) = 116bp at 78.4% intergenic  
 1108959 (1067229) to 1109243 (1066943) = 287bp at 79.1% intergenic  
 1109327 (1066859) to 1109891 (1066295) = 565bp at 81.2% intergenic  
 1426055 (256766) to 1426170 (256651) = 116bp at 74.1% exon  
 1426176 (256645) to 1426285 (256536) = 110bp at 74.5% exon  
 1595625 (205960) to 1595626 (205961) = 2bp at 100.0% exon  
 1965879 (1212563) to 1965982 (1212666) = 104bp at 76.0% exon  
 2482767 (998205) to 2482797 (998175) = 31bp at 83.9% exon  
 2750326 (1112564) to 2750462 (1112428) = 137bp at 75.9% exon  
 2827796 (673019) to 2827891 (672924) = 96bp at 77.1% exon  
 2828358 (672454) to 2828513 (672299) = 156bp at 73.1% exon  
 3015731 (695040) to 3015880 (695189) = 150bp at 74.0% exon  
 3019864 (141362) to 3020026 (141200) = 164bp at 76.2% exon  
 3027129 (568892) to 3027267 (569030) = 139bp at 76.3% exon  
 3085866 (799790) to 3085898 (799758) = 33bp at 81.8% exon  
 3265427 (115533) to 3265539 (115421) = 113bp at 73.5% exon

3273210 (206303) to 3273553 (205960) = 344bp at 74.7% exon  
 3273758 (205890) to 3273868 (205780) = 112bp at 74.1% exon  
 3276058 (740341) to 3276151 (740434) = 94bp at 77.7% exon  
 3276460 (740746) to 3276594 (740880) = 135bp at 76.3% exon  
 3277723 (742021) to 3277973 (742271) = 251bp at 73.3% exon  
 3278536 (742837) to 3278756 (743057) = 221bp at 76.9% exon  
 3279196 (743301) to 3279393 (743498) = 198bp at 76.3% exon  
 3280531 (745005) to 3280633 (745107) = 103bp at 75.7% exon  
 3284346 (748282) to 3284480 (748416) = 135bp at 75.6% exon  
 3286674 (750409) to 3286774 (750511) = 103bp at 76.7% intergenic  
 3286999 (750731) to 3287101 (750833) = 103bp at 75.7% intergenic  
 3287341 (751067) to 3287543 (751269) = 203bp at 75.4% intergenic  
 3333005 (1066295) to 3333569 (1066859) = 565bp at 81.2% intergenic  
 3333653 (1066943) to 3333937 (1067229) = 287bp at 79.1% intergenic  
 3334025 (1067343) to 3334140 (1067457) = 116bp at 78.4% intergenic  
 3334336 (1067647) to 3334482 (1067796) = 150bp at 75.3% intergenic  
 3334581 (1067897) to 3334762 (1068077) = 182bp at 74.2% intergenic  
 3334898 (1068212) to 3335043 (1068356) = 146bp at 76.7% intergenic  
 3335203 (1068531) to 3335377 (1068706) = 176bp at 77.3% intergenic  
 3335497 (1068827) to 3335619 (1068948) = 123bp at 77.2% intergenic  
 3335932 (1069315) to 3337013 (1070395) = 1088bp at 77.8% intergenic  
 3337014 (1070423) to 3337222 (1070629) = 209bp at 76.6% intergenic  
 3348717 (921833) to 3348910 (922026) = 194bp at 75.3% exon  
 3830270 (76449) to 3830321 (76500) = 52bp at 78.8% exon

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Chlamydophila pneumoniae* AR39 AE002161 - (Cons. Id 85%)**

10539 (1070011) to 10687 (1069865) = 149bp at 81.9% intergenic  
 10711 (1069841) to 10919 (1069632) = 210bp at 87.1% intergenic  
 10971 (1069580) to 11098 (1069452) = 129bp at 86.0% intergenic  
 13272 (1067187) to 13441 (1067017) = 171bp at 84.8% intergenic  
 13812 (1066646) to 14086 (1066372) = 275bp at 86.9% intergenic  
 159165 (1070011) to 159313 (1069865) = 149bp at 81.9% intergenic  
 159337 (1069841) to 159545 (1069632) = 210bp at 87.1% intergenic  
 159597 (1069580) to 159724 (1069452) = 129bp at 86.0% intergenic  
 169442 (1070011) to 169590 (1069865) = 149bp at 81.9% intergenic  
 169614 (1069841) to 169822 (1069632) = 210bp at 87.1% intergenic  
 169874 (1069580) to 170001 (1069452) = 129bp at 86.0% intergenic  
 258251 (1067187) to 258420 (1067017) = 171bp at 84.8% intergenic  
 258791 (1066646) to 259065 (1066372) = 275bp at 86.9% intergenic  
 311994 (1069740) to 312113 (1069620) = 121bp at 83.5% intergenic  
 312153 (1069580) to 312280 (1069452) = 129bp at 86.0% intergenic  
 339743 (1067187) to 339912 (1067017) = 171bp at 84.8% intergenic  
 340283 (1066646) to 340557 (1066372) = 275bp at 86.9% intergenic  
 342149 (1070011) to 342297 (1069865) = 149bp at 81.9% intergenic  
 342321 (1069841) to 342529 (1069632) = 210bp at 87.1% intergenic  
 342581 (1069580) to 342708 (1069452) = 129bp at 86.0% intergenic  
 344881 (1067187) to 345050 (1067017) = 171bp at 84.8% intergenic  
 345421 (1066646) to 345695 (1066372) = 275bp at 86.9% intergenic  
 1106267 (1070011) to 1106415 (1069865) = 149bp at 81.9% intergenic  
 1106439 (1069841) to 1106647 (1069632) = 210bp at 87.1% intergenic  
 1106699 (1069580) to 1106826 (1069452) = 129bp at 86.0% intergenic  
 1109000 (1067187) to 1109169 (1067017) = 171bp at 84.8% intergenic  
 1109540 (1066646) to 1109814 (1066372) = 275bp at 86.9% intergenic  
 1595625 (205960) to 1595626 (205961) = 2bp at 100.0% exon



3333082 (1066372) to 3333356 (1066646) = 275bp at 86.9% intergenic  
 3333727 (1067017) to 3333896 (1067187) = 171bp at 84.8% intergenic  
 3336070 (1069452) to 3336197 (1069580) = 129bp at 86.0% intergenic  
 3336237 (1069620) to 3336457 (1069841) = 222bp at 85.6% intergenic  
 3336481 (1069865) to 3336629 (1070011) = 149bp at 81.9% intergenic

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Chlamydomonas reinhardtii* ATCC 30204 AE001437 - (Cons. Id 95%)**

1595625 (205960) to 1595626 (205961) = 2bp at 100.0% exon

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Ehrlichia chaffeensis* str. Arkansas CP000236 - (Cons. Id 75%)**

6839 (880966) to 6948 (880857) = 110bp at 73.6% exon  
 7248 (880557) to 7356 (880449) = 109bp at 76.1% exon  
 10539 (942901) to 10956 (942480) = 435bp at 77.2% intergenic  
 10970 (942466) to 11217 (942219) = 248bp at 79.8% intergenic  
 11809 (210039) to 11961 (210191) = 153bp at 83.7% intergenic  
 12027 (210292) to 12277 (210537) = 251bp at 74.5% intergenic  
 12404 (210667) to 12572 (210840) = 175bp at 75.4% intergenic  
 12725 (210997) to 12825 (211098) = 102bp at 78.4% intergenic  
 13032 (211200) to 13144 (211312) = 113bp at 77.0% intergenic  
 13151 (211331) to 13452 (211623) = 302bp at 76.8% intergenic  
 13611 (211782) to 13687 (211859) = 78bp at 82.1% intergenic  
 13724 (211897) to 14194 (212368) = 472bp at 80.5% intergenic  
 158329 (943728) to 158412 (943652) = 84bp at 82.1% intergenic  
 158534 (943526) to 159134 (942927) = 601bp at 80.9% intergenic  
 160045 (209696) to 160150 (209802) = 107bp at 75.7% intergenic  
 160176 (209826) to 160284 (209934) = 110bp at 78.2% intergenic  
 160435 (210039) to 160587 (210191) = 153bp at 83.7% intergenic  
 160653 (210292) to 160903 (210537) = 251bp at 74.5% intergenic  
 161030 (210667) to 161198 (210840) = 175bp at 75.4% intergenic  
 161351 (210997) to 161452 (211099) = 103bp at 77.7% intergenic  
 161658 (211200) to 161770 (211312) = 113bp at 77.0% intergenic  
 161777 (211331) to 162078 (211623) = 302bp at 76.8% intergenic  
 162237 (211782) to 162313 (211859) = 78bp at 82.1% intergenic  
 162350 (211897) to 162820 (212368) = 472bp at 80.5% intergenic  
 164485 (942717) to 164720 (942480) = 238bp at 81.1% intergenic  
 164734 (942466) to 164981 (942219) = 248bp at 79.8% intergenic  
 165189 (209702) to 165288 (209802) = 101bp at 75.2% intergenic  
 165314 (209826) to 165422 (209934) = 110bp at 78.2% intergenic  
 165573 (210039) to 165725 (210191) = 153bp at 83.7% intergenic  
 165791 (210292) to 166041 (210537) = 251bp at 74.5% intergenic  
 166168 (210667) to 166336 (210840) = 175bp at 75.4% intergenic  
 166489 (210997) to 166596 (211105) = 109bp at 77.1% intergenic  
 166796 (211200) to 166908 (211312) = 113bp at 77.0% intergenic  
 166915 (211331) to 167216 (211623) = 302bp at 76.8% intergenic  
 167375 (211782) to 167451 (211859) = 78bp at 82.1% intergenic  
 167488 (211897) to 167958 (212368) = 472bp at 80.5% intergenic  
 168811 (943526) to 169859 (942480) = 1066bp at 78.0% intergenic  
 169873 (942466) to 170130 (942219) = 258bp at 77.1% intergenic  
 170331 (209696) to 170436 (209802) = 107bp at 75.7% intergenic

170462 (209826) to 170570 (209934) = 110bp at 78.2% intergenic  
 170721 (210039) to 170873 (210191) = 153bp at 83.7% intergenic  
 170946 (210299) to 171189 (210537) = 244bp at 73.8% intergenic  
 171316 (210667) to 171484 (210840) = 175bp at 75.4% intergenic  
 171637 (210997) to 171744 (211105) = 109bp at 77.1% intergenic  
 171944 (211200) to 172056 (211312) = 113bp at 77.0% intergenic  
 172063 (211331) to 172364 (211623) = 302bp at 76.8% intergenic  
 172523 (211782) to 172599 (211859) = 78bp at 82.1% intergenic  
 172636 (211897) to 173106 (212368) = 472bp at 80.5% intergenic  
 256398 (209696) to 256503 (209802) = 107bp at 75.7% intergenic  
 256529 (209826) to 256637 (209934) = 110bp at 78.2% intergenic  
 256788 (210039) to 256940 (210191) = 153bp at 83.7% intergenic  
 257006 (210292) to 257256 (210537) = 251bp at 74.5% intergenic  
 257383 (210667) to 257551 (210840) = 175bp at 75.4% intergenic  
 257704 (210997) to 257811 (211105) = 109bp at 77.1% intergenic  
 258011 (211200) to 258123 (211312) = 113bp at 77.0% intergenic  
 258130 (211331) to 258431 (211623) = 302bp at 76.8% intergenic  
 258590 (211782) to 258666 (211859) = 78bp at 82.1% intergenic  
 258703 (211897) to 259173 (212368) = 472bp at 80.5% intergenic  
 312601 (209696) to 312706 (209802) = 107bp at 75.7% intergenic  
 312732 (209826) to 312840 (209934) = 110bp at 78.2% intergenic  
 312991 (210039) to 313143 (210191) = 153bp at 83.7% intergenic  
 313191 (210274) to 313453 (210532) = 263bp at 76.0% intergenic  
 313586 (210667) to 313754 (210840) = 175bp at 75.4% intergenic  
 313907 (210997) to 314014 (211105) = 109bp at 77.1% intergenic  
 314214 (211200) to 314326 (211312) = 113bp at 77.0% intergenic  
 314333 (211331) to 314634 (211623) = 302bp at 76.8% intergenic  
 314793 (211782) to 314869 (211859) = 78bp at 82.1% intergenic  
 314906 (211897) to 315376 (212368) = 472bp at 80.5% intergenic  
 332054 (942717) to 332550 (942219) = 499bp at 79.4% intergenic  
 337192 (942717) to 337427 (942480) = 238bp at 81.1% intergenic  
 337441 (942466) to 337688 (942219) = 248bp at 79.8% intergenic  
 337890 (209696) to 337995 (209802) = 107bp at 75.7% intergenic  
 338021 (209826) to 338129 (209934) = 110bp at 78.2% intergenic  
 338280 (210039) to 338432 (210191) = 153bp at 83.7% intergenic  
 338498 (210292) to 338748 (210537) = 251bp at 74.5% intergenic  
 338875 (210667) to 339046 (210843) = 178bp at 74.7% intergenic  
 339196 (210997) to 339303 (211105) = 109bp at 77.1% intergenic  
 339503 (211200) to 339615 (211312) = 113bp at 77.0% intergenic  
 339622 (211331) to 339923 (211623) = 302bp at 76.8% intergenic  
 340082 (211782) to 340158 (211859) = 78bp at 82.1% intergenic  
 340195 (211897) to 340665 (212368) = 472bp at 80.5% intergenic  
 342331 (942717) to 342827 (942219) = 499bp at 79.4% intergenic  
 343618 (210274) to 343880 (210532) = 263bp at 76.0% intergenic  
 344013 (210667) to 344181 (210840) = 175bp at 75.4% intergenic  
 344334 (210997) to 344441 (211105) = 109bp at 77.1% intergenic  
 344641 (211200) to 344753 (211312) = 113bp at 77.0% intergenic  
 344760 (211331) to 345061 (211623) = 302bp at 76.8% intergenic  
 345220 (211782) to 345296 (211859) = 78bp at 82.1% intergenic  
 345333 (211897) to 345803 (212368) = 472bp at 80.5% intergenic  
 470147 (249080) to 470184 (249116) = 38bp at 84.2% exon  
 517229 (574894) to 517254 (574921) = 28bp at 75.0% exon  
 541998 (448976) to 542093 (449074) = 100bp at 75.0% exon  
 578868 (801198) to 578968 (801298) = 101bp at 77.2% exon  
 579444 (801771) to 579559 (801886) = 116bp at 74.1% exon  
 579747 (802074) to 579848 (802175) = 102bp at 75.5% exon  
 593625 (947845) to 593724 (947746) = 100bp at 75.0% exon  
 684036 (505289) to 684066 (505259) = 31bp at 87.1% exon  
 696330 (533607) to 696369 (533568) = 40bp at 82.5% exon  
 747039 (833789) to 747074 (833824) = 36bp at 75.0% exon

825653 (508348) to 825767 (508234) = 115bp at 76.5% exon  
826739 (547329) to 826861 (547207) = 123bp at 75.6% exon  
1035009 (359263) to 1035175 (359094) = 170bp at 75.3% exon  
1083181 (442378) to 1083274 (442471) = 94bp at 77.7% exon  
1098168 (357759) to 1098319 (357910) = 152bp at 73.0% exon  
1098694 (358285) to 1098862 (358453) = 169bp at 74.6% exon  
1099519 (359095) to 1099733 (359309) = 215bp at 73.5% exon  
1105636 (943526) to 1106684 (942480) = 1066bp at 78.0% intergenic  
1106698 (942466) to 1106945 (942219) = 248bp at 79.8% intergenic  
1107147 (209696) to 1107252 (209802) = 107bp at 75.7% intergenic  
1107278 (209826) to 1107386 (209934) = 110bp at 78.2% intergenic  
1107537 (210039) to 1107689 (210191) = 153bp at 83.7% intergenic  
1107755 (210292) to 1108005 (210537) = 251bp at 74.5% intergenic  
1108132 (210667) to 1108300 (210840) = 175bp at 75.4% intergenic  
1108453 (210997) to 1108560 (211105) = 109bp at 77.1% intergenic  
1108760 (211200) to 1108872 (211312) = 113bp at 77.0% intergenic  
1108879 (211331) to 1109180 (211623) = 302bp at 76.8% intergenic  
1109339 (211782) to 1109415 (211859) = 78bp at 82.1% intergenic  
1109452 (211897) to 1109922 (212368) = 472bp at 80.5% intergenic  
1122597 (958321) to 1122696 (958420) = 100bp at 75.0% exon  
1425557 (448541) to 1425669 (448653) = 113bp at 74.3% exon  
1425878 (448919) to 1426161 (449202) = 284bp at 74.3% exon  
1426656 (449697) to 1426771 (449812) = 116bp at 74.1% exon  
1426832 (449873) to 1426974 (450015) = 143bp at 72.0% exon  
1427560 (21861) to 1427711 (22012) = 152bp at 72.4% exon  
1444150 (767457) to 1444319 (767626) = 170bp at 74.1% exon  
1444633 (767943) to 1444731 (768040) = 99bp at 75.8% exon  
1584077 (635881) to 1584117 (635921) = 41bp at 78.0% exon  
1595624 (702992) to 1595626 (702990) = 3bp at 100.0% exon  
1616314 (875575) to 1616339 (875605) = 31bp at 77.4% exon  
1619479 (824977) to 1619516 (824942) = 38bp at 78.9% exon  
1767885 (626363) to 1768002 (626245) = 120bp at 75.0% exon  
1768599 (880548) to 1768721 (880426) = 123bp at 74.8% exon  
1833427 (702830) to 1833655 (702602) = 229bp at 72.9% exon  
1856997 (421715) to 1857155 (421876) = 162bp at 73.5% exon  
1884700 (55871) to 1884812 (55983) = 113bp at 75.2% exon  
1885440 (56599) to 1885539 (56698) = 100bp at 75.0% exon  
1937327 (515110) to 1937450 (515233) = 124bp at 74.2% exon  
1951057 (570235) to 1951267 (570445) = 211bp at 74.9% exon  
1953830 (739117) to 1953929 (739018) = 100bp at 75.0% exon  
1965351 (1133433) to 1965467 (1133317) = 117bp at 76.1% exon  
1965513 (1133271) to 1965611 (1133173) = 99bp at 75.8% exon  
1965875 (1132909) to 1966025 (1132759) = 151bp at 74.2% exon  
1974984 (574050) to 1975105 (574171) = 122bp at 74.6% exon  
1975583 (574643) to 1975697 (574757) = 115bp at 75.7% exon  
2368528 (298740) to 2368647 (298621) = 120bp at 75.8% exon  
2369158 (298107) to 2369307 (297958) = 151bp at 72.8% exon  
2372840 (323724) to 2372985 (323869) = 146bp at 75.3% exon  
2387969 (308380) to 2388073 (308484) = 105bp at 75.2% exon  
2479374 (497814) to 2479410 (497781) = 37bp at 81.1% exon  
2506022 (541563) to 2506023 (541562) = 2bp at 100.0% exon  
2745525 (925529) to 2745635 (925639) = 113bp at 74.3% exon  
2750011 (928046) to 2750289 (928324) = 279bp at 75.3% exon  
2750303 (928338) to 2750474 (928509) = 172bp at 73.8% exon  
2750494 (928529) to 2750627 (928656) = 134bp at 71.6% exon  
2751406 (929006) to 2751531 (929131) = 126bp at 75.4% exon  
2757562 (372142) to 2757680 (372260) = 119bp at 74.8% exon  
2758146 (372726) to 2758245 (372825) = 100bp at 75.0% exon  
2779117 (396721) to 2779228 (396614) = 112bp at 74.1% intergenic  
2779490 (396709) to 2779590 (396606) = 104bp at 76.9% intergenic

2822156 (110449) to 2822255 (110350) = 100bp at 75.0% exon  
 2823609 (213504) to 2823723 (213618) = 115bp at 75.7% exon  
 2823769 (213664) to 2823903 (213798) = 135bp at 74.1% exon  
 2976945 (715830) to 2977045 (715730) = 101bp at 75.2% exon  
 2979715 (1169869) to 2979814 (1169770) = 100bp at 75.0% exon  
 2979957 (1169626) to 2980141 (1169443) = 185bp at 76.2% exon  
 2999426 (584383) to 2999609 (584200) = 184bp at 73.4% exon  
 2999642 (584167) to 3000050 (583756) = 412bp at 75.2% exon  
 3000061 (583724) to 3000309 (583476) = 249bp at 75.9% exon  
 3002028 (121880) to 3002158 (121750) = 131bp at 75.6% exon  
 3002199 (121709) to 3002311 (121597) = 113bp at 77.9% exon  
 3015879 (602826) to 3016029 (602676) = 151bp at 74.2% exon  
 3016123 (602582) to 3016220 (602485) = 98bp at 75.5% exon  
 3019911 (191432) to 3020011 (191332) = 101bp at 75.2% exon  
 3019911 (1018814) to 3020011 (1018914) = 101bp at 75.2% exon  
 3025824 (160443) to 3025918 (160543) = 101bp at 75.2% exon  
 3027117 (161730) to 3027247 (161860) = 131bp at 74.0% exon  
 3171778 (541596) to 3171819 (541638) = 43bp at 79.1% exon  
 3186384 (540649) to 3186532 (540797) = 149bp at 78.5% exon  
 3265819 (401972) to 3265979 (401812) = 161bp at 75.2% exon  
 3270466 (397773) to 3270560 (397679) = 95bp at 77.9% exon  
 3270754 (397488) to 3270882 (397360) = 129bp at 74.4% exon  
 3270754 (983714) to 3270882 (983842) = 129bp at 74.4% exon  
 3271059 (397183) to 3271380 (396865) = 322bp at 78.0% exon  
 3271059 (984019) to 3271380 (984337) = 322bp at 78.0% exon  
 3271381 (396852) to 3271475 (396758) = 95bp at 82.1% exon  
 3272136 (985080) to 3272240 (985184) = 105bp at 76.2% exon  
 3272288 (985232) to 3272417 (985361) = 130bp at 73.1% exon  
 3273156 (986106) to 3273562 (986512) = 407bp at 75.2% exon  
 3277744 (974985) to 3277880 (975121) = 137bp at 76.6% exon  
 3279142 (976204) to 3279400 (976462) = 259bp at 78.8% exon  
 3279664 (976885) to 3279764 (976985) = 101bp at 75.2% exon  
 3280924 (978472) to 3281132 (978680) = 209bp at 75.6% exon  
 3281220 (978768) to 3281336 (978887) = 122bp at 73.8% exon  
 3286675 (983429) to 3286769 (983523) = 95bp at 77.9% intergenic  
 3286963 (983714) to 3287091 (983842) = 129bp at 74.4% intergenic  
 3287268 (984019) to 3287589 (984337) = 322bp at 78.0% intergenic  
 3328019 (359266) to 3328176 (359109) = 158bp at 75.3% exon  
 3332973 (212370) to 3333444 (211897) = 474bp at 80.2% intergenic  
 3333472 (211868) to 3333557 (211782) = 87bp at 79.3% intergenic  
 3333716 (211623) to 3334018 (211330) = 304bp at 76.3% intergenic  
 3334024 (211312) to 3334136 (211200) = 113bp at 77.0% intergenic  
 3334342 (211099) to 3334443 (210997) = 103bp at 77.7% intergenic  
 3334596 (210840) to 3334764 (210667) = 175bp at 75.4% intergenic  
 3334891 (210537) to 3335141 (210292) = 251bp at 74.5% intergenic  
 3335220 (210178) to 3335367 (210031) = 148bp at 84.5% intergenic  
 3335515 (209928) to 3335626 (209816) = 114bp at 77.2% intergenic  
 3335644 (209802) to 3335749 (209696) = 107bp at 75.7% intergenic  
 3335952 (942220) to 3336195 (942463) = 244bp at 79.9% intergenic  
 3336212 (942480) to 3337260 (943526) = 1066bp at 78.0% intergenic  
 3348726 (1122475) to 3349045 (1122156) = 320bp at 74.1% exon  
 3920228 (428882) to 3920329 (428781) = 102bp at 75.5% exon

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Ehrlichia chaffeensis* str. Arkansas CP000236 - (Cons. Id 85%)**

10528 (942912) to 10673 (942767) = 146bp at 84.9% intergenic  
10691 (942748) to 10840 (942596) = 154bp at 81.2% intergenic  
11826 (210056) to 11961 (210191) = 136bp at 83.8% intergenic  
13293 (211464) to 13422 (211593) = 130bp at 86.2% intergenic  
13770 (211943) to 14032 (212205) = 263bp at 84.4% intergenic  
158584 (943477) to 158774 (943287) = 191bp at 84.3% intergenic  
158776 (943285) to 158877 (943184) = 102bp at 85.3% intergenic  
159000 (943061) to 159129 (942932) = 130bp at 86.2% intergenic  
160452 (210056) to 160587 (210191) = 136bp at 83.8% intergenic  
161919 (211464) to 162048 (211593) = 130bp at 86.2% intergenic  
162396 (211943) to 162658 (212205) = 263bp at 84.4% intergenic  
164485 (942717) to 164602 (942598) = 120bp at 86.7% intergenic  
165590 (210056) to 165725 (210191) = 136bp at 83.8% intergenic  
167057 (211464) to 167186 (211593) = 130bp at 86.2% intergenic  
167534 (211943) to 167796 (212205) = 263bp at 84.4% intergenic  
168861 (943477) to 169051 (943287) = 191bp at 84.3% intergenic  
169053 (943285) to 169154 (943184) = 102bp at 85.3% intergenic  
169277 (943061) to 169406 (942932) = 130bp at 86.2% intergenic  
169431 (942912) to 169576 (942767) = 146bp at 84.9% intergenic  
169594 (942748) to 169743 (942596) = 154bp at 81.2% intergenic  
170738 (210056) to 170873 (210191) = 136bp at 83.8% intergenic  
172205 (211464) to 172334 (211593) = 130bp at 86.2% intergenic  
172682 (211943) to 172944 (212205) = 263bp at 84.4% intergenic  
256805 (210056) to 256940 (210191) = 136bp at 83.8% intergenic  
258272 (211464) to 258401 (211593) = 130bp at 86.2% intergenic  
258749 (211943) to 259011 (212205) = 263bp at 84.4% intergenic  
313008 (210056) to 313143 (210191) = 136bp at 83.8% intergenic  
314475 (211464) to 314604 (211593) = 130bp at 86.2% intergenic  
314952 (211943) to 315214 (212205) = 263bp at 84.4% intergenic  
332054 (942717) to 332171 (942598) = 120bp at 86.7% intergenic  
337192 (942717) to 337309 (942598) = 120bp at 86.7% intergenic  
338297 (210056) to 338432 (210191) = 136bp at 83.8% intergenic  
339764 (211464) to 339893 (211593) = 130bp at 86.2% intergenic  
340241 (211943) to 340503 (212205) = 263bp at 84.4% intergenic  
342331 (942717) to 342448 (942598) = 120bp at 86.7% intergenic  
344902 (211464) to 345031 (211593) = 130bp at 86.2% intergenic  
345379 (211943) to 345641 (212205) = 263bp at 84.4% intergenic  
684036 (505289) to 684066 (505259) = 31bp at 87.1% exon  
1105686 (943477) to 1105876 (943287) = 191bp at 84.3% intergenic  
1105878 (943285) to 1105979 (943184) = 102bp at 85.3% intergenic  
1106102 (943061) to 1106231 (942932) = 130bp at 86.2% intergenic  
1106256 (942912) to 1106401 (942767) = 146bp at 84.9% intergenic  
1106419 (942748) to 1106568 (942596) = 154bp at 81.2% intergenic  
1107554 (210056) to 1107689 (210191) = 136bp at 83.8% intergenic  
1109021 (211464) to 1109150 (211593) = 130bp at 86.2% intergenic  
1109498 (211943) to 1109760 (212205) = 263bp at 84.4% intergenic  
1595624 (702992) to 1595626 (702990) = 3bp at 100.0% exon  
2506022 (541563) to 2506023 (541562) = 2bp at 100.0% exon  
3271186 (397056) to 3271286 (396956) = 101bp at 85.1% exon  
3271186 (984146) to 3271286 (984246) = 101bp at 85.1% exon  
3279205 (976267) to 3279305 (976367) = 101bp at 87.1% exon  
3287395 (984146) to 3287495 (984246) = 101bp at 85.1% intergenic  
3333136 (212205) to 3333398 (211943) = 263bp at 84.4% intergenic  
3333746 (211593) to 3333875 (211464) = 130bp at 86.2% intergenic  
3335207 (210191) to 3335342 (210056) = 136bp at 83.8% intergenic  
3336328 (942596) to 3336478 (942749) = 155bp at 81.3% intergenic  
3336495 (942767) to 3336640 (942912) = 146bp at 84.9% intergenic  
3336665 (942932) to 3336794 (943061) = 130bp at 86.2% intergenic  
3336917 (943184) to 3337018 (943285) = 102bp at 85.3% intergenic  
3337020 (943287) to 3337210 (943477) = 191bp at 84.3% intergenic

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Ehrlichia chaffeensis* str. Arkansas CP000236 - (Cons. Id 95%)**

1595624 (702992) to 1595626 (702990) = 3bp at 100.0% exon  
2506022 (541563) to 2506023 (541562) = 2bp at 100.0% exon

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Listeria monocytogenes* 08-5578 CP001602 - (Cons. Id 75%)**

818 (3031953) to 960 (3031811) = 143bp at 73.4% exon  
1058 (3031713) to 1278 (3031493) = 221bp at 73.3% exon  
1631 (3031140) to 1731 (3031040) = 101bp at 75.2% exon  
5114 (3026301) to 5245 (3026170) = 132bp at 74.2% exon  
6290 (3025119) to 6400 (3025009) = 111bp at 77.5% exon  
7220 (3024117) to 7357 (3023980) = 138bp at 74.6% exon  
9926 (2557701) to 10154 (2557472) = 230bp at 83.0% intergenic  
10155 (2557447) to 10715 (2556888) = 567bp at 83.1% intergenic  
10666 (1817291) to 11224 (1816733) = 566bp at 83.4% intergenic  
10666 (1971209) to 11224 (1970651) = 566bp at 83.6% intergenic  
11398 (1816492) to 11524 (1816366) = 127bp at 77.2% intergenic  
11398 (1970410) to 11524 (1970284) = 127bp at 77.2% intergenic  
11579 (1816309) to 11714 (1816172) = 138bp at 84.8% intergenic  
11579 (1970227) to 11714 (1970090) = 138bp at 84.8% intergenic  
11787 (1816091) to 12613 (1815268) = 832bp at 78.5% intergenic  
11787 (1970009) to 12613 (1969186) = 832bp at 78.5% intergenic  
12675 (1815201) to 12875 (1815002) = 201bp at 75.1% intergenic  
12675 (1969119) to 12875 (1968920) = 201bp at 75.1% intergenic  
12954 (1814924) to 13531 (1814333) = 592bp at 80.7% intergenic  
12954 (1968842) to 13531 (1968251) = 592bp at 80.7% intergenic  
13598 (1814266) to 14255 (1813609) = 661bp at 86.7% intergenic  
13598 (1968184) to 14255 (1967527) = 661bp at 86.7% intergenic  
14401 (1967376) to 14496 (1967282) = 96bp at 76.0% intergenic  
109861 (1661148) to 109971 (1661038) = 111bp at 75.7% exon  
122848 (922483) to 122960 (922595) = 113bp at 75.2% exon  
123324 (922949) to 123423 (923048) = 100bp at 75.0% exon  
123638 (923263) to 123961 (923586) = 324bp at 75.0% exon  
136014 (157378) to 136136 (157510) = 138bp at 71.0% intergenic  
139068 (165003) to 139168 (165103) = 101bp at 77.2% exon  
158324 (1972211) to 158402 (1972141) = 79bp at 86.1% intergenic  
158530 (1971998) to 158758 (1971766) = 233bp at 82.0% intergenic  
158799 (1971702) to 159885 (1970624) = 1098bp at 83.3% intergenic  
160024 (1970410) to 160150 (1970284) = 127bp at 77.2% intergenic  
160205 (1970227) to 160340 (1970090) = 138bp at 85.5% intergenic  
160421 (1970001) to 161239 (1969186) = 824bp at 78.8% intergenic  
161301 (1969119) to 161501 (1968920) = 201bp at 75.1% intergenic  
161580 (1968842) to 162157 (1968251) = 592bp at 80.7% intergenic  
162224 (1968184) to 162881 (1967527) = 661bp at 86.7% intergenic  
163668 (1971998) to 163896 (1971766) = 233bp at 82.0% intergenic  
163937 (1971702) to 165023 (1970624) = 1098bp at 83.4% intergenic  
165162 (1970410) to 165288 (1970284) = 127bp at 76.4% intergenic  
165343 (1970227) to 165478 (1970090) = 138bp at 85.5% intergenic  
165551 (1970009) to 166377 (1969186) = 832bp at 78.5% intergenic

166439 (1969119) to 166639 (1968920) = 201bp at 75.6% intergenic  
 166718 (1968842) to 167295 (1968251) = 592bp at 80.7% intergenic  
 167362 (1968184) to 168019 (1967527) = 661bp at 86.7% intergenic  
 168807 (1818082) to 169057 (1817827) = 256bp at 79.3% intergenic  
 169058 (1817802) to 170137 (1816733) = 1087bp at 83.6% intergenic  
 170310 (1816492) to 170436 (1816366) = 127bp at 77.2% intergenic  
 170491 (1816309) to 170626 (1816172) = 138bp at 84.8% intergenic  
 170699 (1816091) to 171525 (1815268) = 832bp at 78.4% intergenic  
 171587 (1815201) to 171787 (1815002) = 201bp at 75.6% intergenic  
 171866 (1814924) to 172443 (1814333) = 592bp at 80.7% intergenic  
 172510 (1814266) to 173167 (1813609) = 661bp at 86.7% intergenic  
 181566 (795655) to 181721 (795810) = 156bp at 74.4% exon  
 220713 (1006067) to 220871 (1006221) = 159bp at 74.2% exon  
 246603 (1976324) to 246807 (1976528) = 205bp at 77.1% exon  
 246854 (1976575) to 246973 (1976694) = 120bp at 74.2% exon  
 249472 (1933049) to 249567 (1932954) = 96bp at 76.0% exon  
 249648 (1932870) to 249651 (1932867) = 4bp at 100.0% exon  
 255681 (2556901) to 256203 (2556378) = 525bp at 85.9% intergenic  
 256377 (2555887) to 256503 (2555761) = 127bp at 77.2% intergenic  
 256563 (2555699) to 256693 (2555567) = 133bp at 85.7% intergenic  
 256777 (2555475) to 257592 (2554663) = 821bp at 78.9% intergenic  
 257654 (2554596) to 257854 (2554397) = 201bp at 75.6% intergenic  
 257933 (2554319) to 258510 (2553728) = 592bp at 80.7% intergenic  
 258577 (2553661) to 259234 (2553004) = 661bp at 86.7% intergenic  
 259380 (2552854) to 259475 (2552760) = 96bp at 76.0% intergenic  
 259648 (2333238) to 259653 (2333243) = 6bp at 83.3% exon  
 333543 (1969588) to 333946 (1969186) = 408bp at 80.1% intergenic  
 334008 (1969119) to 334208 (1968920) = 201bp at 75.6% intergenic  
 334287 (1968842) to 334864 (1968251) = 592bp at 80.9% intergenic  
 338956 (1815393) to 339077 (1815275) = 123bp at 82.1% intergenic  
 339146 (1815201) to 339346 (1815002) = 201bp at 75.6% intergenic  
 339425 (1814924) to 340002 (1814333) = 592bp at 80.7% intergenic  
 340069 (1814266) to 340726 (1813609) = 661bp at 86.7% intergenic  
 344094 (1815393) to 344215 (1815275) = 123bp at 82.9% intergenic  
 344287 (1815198) to 344484 (1815002) = 198bp at 75.3% intergenic  
 344563 (1814924) to 345140 (1814333) = 592bp at 80.7% intergenic  
 345207 (1814266) to 345864 (1813609) = 661bp at 86.7% intergenic  
 346199 (2551621) to 346319 (2551509) = 121bp at 81.8% intergenic  
 356568 (2865776) to 356691 (2865653) = 124bp at 75.8% exon  
 356780 (2865564) to 356922 (2865422) = 143bp at 73.4% exon  
 375194 (2830485) to 375337 (2830342) = 144bp at 73.6% exon  
 375883 (2690276) to 375987 (2690172) = 105bp at 75.2% exon  
 441463 (2529699) to 441575 (2529587) = 113bp at 75.2% exon  
 553116 (575285) to 553433 (575602) = 318bp at 75.5% exon  
 553665 (575834) to 553801 (575970) = 137bp at 74.5% exon  
 567455 (962535) to 567601 (962681) = 147bp at 73.5% exon  
 575461 (2680211) to 575667 (2680005) = 207bp at 74.9% exon  
 577308 (2678380) to 577498 (2678190) = 191bp at 74.9% exon  
 578724 (2676970) to 578837 (2676857) = 114bp at 77.2% exon  
 578863 (2676831) to 578988 (2676706) = 126bp at 74.6% exon  
 579282 (2676412) to 579388 (2676306) = 107bp at 74.8% exon  
 579417 (2676277) to 579640 (2676054) = 224bp at 75.9% exon  
 579660 (2676034) to 579760 (2675934) = 101bp at 75.2% exon  
 597927 (1679531) to 598026 (1679432) = 100bp at 75.0% exon  
 598097 (1679361) to 598266 (1679192) = 170bp at 72.4% exon  
 618978 (448665) to 619157 (448485) = 181bp at 74.0% exon  
 619554 (448088) to 619685 (447957) = 132bp at 78.0% exon  
 620131 (447520) to 620276 (447375) = 146bp at 74.0% exon  
 620605 (447046) to 620732 (446919) = 128bp at 71.9% exon  
 732630 (1054024) to 732838 (1054232) = 209bp at 75.6% exon

## APÊNDICE IV

---

787950 (1620014) to 788067 (1619897) = 118bp at 75.4% exon  
812247 (1484230) to 812349 (1484332) = 103bp at 75.7% exon  
812595 (1484578) to 812687 (1484670) = 93bp at 76.3% exon  
821278 (2645233) to 821405 (2645106) = 128bp at 72.7% exon  
821416 (2645095) to 822053 (2644455) = 642bp at 75.1% exon  
822078 (2644430) to 822224 (2644284) = 147bp at 76.9% exon  
822935 (2643566) to 823038 (2643463) = 104bp at 75.0% exon  
823287 (2643223) to 823380 (2643130) = 94bp at 76.6% exon  
826688 (2640145) to 826878 (2639955) = 191bp at 76.4% exon  
827360 (2639467) to 827469 (2639358) = 110bp at 76.4% exon  
829120 (2634746) to 829222 (2634644) = 103bp at 76.7% exon  
855217 (602662) to 855395 (602841) = 182bp at 73.6% exon  
855872 (603317) to 856094 (603539) = 223bp at 76.2% exon  
862632 (306998) to 862721 (307093) = 96bp at 76.0% exon  
862846 (307269) to 863025 (307448) = 180bp at 73.9% exon  
884031 (906877) to 884246 (907092) = 216bp at 75.5% exon  
1009365 (923303) to 1009465 (923403) = 101bp at 75.2% exon  
1009663 (923601) to 1009666 (923604) = 4bp at 100.0% exon  
1035060 (1063459) to 1035159 (1063558) = 100bp at 77.0% exon  
1077998 (609215) to 1078109 (609104) = 112bp at 75.0% exon  
1079292 (607942) to 1079398 (607836) = 107bp at 74.8% exon  
1081521 (605760) to 1081623 (605658) = 103bp at 75.7% exon  
1098168 (2413776) to 1098304 (2413640) = 137bp at 73.0% exon  
1098414 (2413530) to 1098640 (2413304) = 227bp at 76.2% exon  
1099386 (2412552) to 1099805 (2412133) = 421bp at 74.1% exon  
1105437 (1972206) to 1105507 (1972138) = 71bp at 93.0% intergenic  
1105655 (1971971) to 1105876 (1971750) = 222bp at 83.8% intergenic  
1105901 (1971702) to 1106987 (1970624) = 1098bp at 83.4% intergenic  
1107126 (1970410) to 1107252 (1970284) = 127bp at 77.2% intergenic  
1107307 (1970227) to 1107442 (1970090) = 138bp at 84.8% intergenic  
1107515 (1970009) to 1108341 (1969186) = 832bp at 78.5% intergenic  
1108403 (1969119) to 1108603 (1968920) = 201bp at 75.6% intergenic  
1108682 (1968842) to 1109259 (1968251) = 592bp at 80.7% intergenic  
1109326 (1968184) to 1109983 (1967527) = 661bp at 86.7% intergenic  
1128674 (1505725) to 1128850 (1505901) = 177bp at 74.6% exon  
1186071 (1679257) to 1186175 (1679361) = 105bp at 75.2% exon  
1250881 (99492) to 1251083 (99290) = 203bp at 75.4% exon  
1268265 (1672802) to 1268409 (1672658) = 145bp at 76.6% exon  
1382188 (1652921) to 1382286 (1652823) = 99bp at 75.8% exon  
1382448 (1652661) to 1382545 (1652564) = 98bp at 76.5% exon  
1420609 (1582656) to 1420708 (1582557) = 100bp at 75.0% exon  
1420824 (1582444) to 1420975 (1582293) = 152bp at 75.7% exon  
1422241 (1581027) to 1422388 (1580880) = 148bp at 76.4% exon  
1425852 (1575852) to 1426116 (1575588) = 265bp at 76.2% exon  
1426130 (1575574) to 1426274 (1575430) = 145bp at 77.9% exon  
1426499 (1575205) to 1426684 (1575020) = 186bp at 74.7% exon  
1444048 (1556181) to 1444310 (1555919) = 263bp at 77.9% exon  
1444381 (1555848) to 1444505 (1555724) = 125bp at 71.2% exon  
1450559 (1547760) to 1450594 (1547798) = 39bp at 79.5% exon  
1462155 (1644379) to 1462255 (1644279) = 101bp at 75.2% exon  
1490220 (123239) to 1490403 (123422) = 184bp at 73.9% exon  
1492197 (207978) to 1492304 (208085) = 108bp at 75.9% exon  
1492228 (1402162) to 1492325 (1402259) = 98bp at 75.5% exon  
1517719 (1255083) to 1517722 (1255086) = 4bp at 100.0% exon  
1518081 (1255445) to 1518249 (1255613) = 169bp at 75.1% exon  
1537439 (1957723) to 1537537 (1957625) = 99bp at 76.8% exon  
1539495 (1955699) to 1539611 (1955583) = 117bp at 76.9% exon  
1540073 (1955103) to 1540194 (1954982) = 124bp at 75.0% exon  
1548673 (87601) to 1548836 (87764) = 164bp at 72.0% exon  
1548720 (3010806) to 1548863 (3010666) = 144bp at 73.6% exon



1549186 (88126) to 1549290 (88230) = 105bp at 80.0% exon  
 1549801 (88741) to 1549915 (88855) = 115bp at 78.3% exon  
 1551308 (3003524) to 1551407 (3003425) = 100bp at 75.0% exon  
 1551595 (3003231) to 1551729 (3003097) = 135bp at 73.3% exon  
 1551892 (3002934) to 1552008 (3002818) = 117bp at 74.4% exon  
 1552070 (3002756) to 1552342 (3002484) = 273bp at 75.5% exon  
 1552405 (3002421) to 1552529 (3002297) = 125bp at 78.4% exon  
 1553573 (3010653) to 1553672 (3010554) = 100bp at 76.0% exon  
 1554237 (3009989) to 1554401 (3009825) = 165bp at 76.4% exon  
 1554492 (3009737) to 1554589 (3009640) = 98bp at 75.5% exon  
 1613712 (2249664) to 1613834 (2249786) = 123bp at 74.8% exon  
 1689276 (2188110) to 1689382 (2188004) = 107bp at 74.8% exon  
 1689636 (2187750) to 1689817 (2187569) = 182bp at 73.6% exon  
 1690134 (2186053) to 1690369 (2185818) = 236bp at 75.8% exon  
 1690383 (2185804) to 1690832 (2185355) = 450bp at 76.7% exon  
 1716136 (897549) to 1716237 (897448) = 102bp at 75.5% exon  
 1729019 (1516188) to 1729161 (1516330) = 143bp at 77.6% exon  
 1732637 (2107913) to 1732736 (2107814) = 100bp at 75.0% exon  
 1733111 (2107433) to 1733223 (2107321) = 113bp at 77.9% exon  
 1740366 (2107913) to 1740465 (2107814) = 100bp at 75.0% exon  
 1740840 (2107433) to 1740952 (2107321) = 113bp at 77.9% exon  
 1804339 (1462890) to 1804439 (1462990) = 102bp at 76.5% exon  
 1814760 (1618175) to 1814771 (1618164) = 12bp at 75.0% exon  
 1821214 (1920686) to 1821325 (1920575) = 112bp at 75.9% exon  
 1833649 (1130355) to 1833749 (1130455) = 101bp at 76.2% exon  
 1844887 (2230649) to 1845074 (2230462) = 188bp at 75.5% exon  
 1845231 (2230305) to 1845331 (2230205) = 101bp at 77.2% exon  
 1850611 (2690281) to 1850710 (2690182) = 100bp at 76.0% exon  
 1857008 (2683842) to 1857111 (2683738) = 105bp at 75.2% exon  
 1857275 (2684368) to 1857389 (2684254) = 115bp at 76.5% exon  
 1875914 (1990918) to 1875955 (1990959) = 42bp at 78.6% exon  
 1936973 (1374080) to 1937135 (1374242) = 163bp at 73.6% exon  
 1937318 (1778182) to 1937496 (1778004) = 179bp at 78.2% exon  
 1937860 (1777643) to 1937989 (1777514) = 130bp at 76.2% exon  
 1939444 (1408915) to 1939598 (1409069) = 155bp at 75.5% exon  
 1941118 (1410691) to 1941239 (1410812) = 123bp at 74.0% exon  
 1945202 (1412239) to 1945308 (1412345) = 107bp at 75.7% exon  
 1951063 (1423685) to 1951208 (1423830) = 146bp at 74.7% exon  
 1957639 (1429782) to 1957747 (1429890) = 109bp at 75.2% exon  
 1961803 (1480217) to 1961901 (1480315) = 99bp at 75.8% exon  
 1962005 (1721414) to 1962105 (1721314) = 101bp at 79.2% exon  
 1965429 (1494666) to 1965688 (1494925) = 260bp at 73.5% exon  
 1965729 (1494966) to 1965830 (1495067) = 102bp at 75.5% exon  
 1967253 (1496583) to 1967353 (1496683) = 101bp at 75.2% exon  
 1967506 (1496836) to 1967605 (1496935) = 100bp at 75.0% exon  
 1967760 (1497090) to 1967870 (1497200) = 111bp at 76.6% exon  
 1984050 (1395144) to 1984195 (1394999) = 149bp at 72.5% exon  
 1984465 (1394729) to 1984621 (1394573) = 157bp at 74.5% exon  
 2179614 (1457631) to 2179717 (1457528) = 104bp at 76.0% exon  
 2208047 (2038468) to 2208157 (2038578) = 111bp at 74.8% exon  
 2225057 (80489) to 2225160 (80592) = 104bp at 74.0% exon  
 2225189 (80621) to 2225289 (80721) = 101bp at 76.2% exon  
 2229796 (881837) to 2229896 (881737) = 101bp at 75.2% exon  
 2308785 (763896) to 2308909 (763772) = 125bp at 76.8% exon  
 2319600 (894921) to 2319704 (894817) = 105bp at 76.2% exon  
 2319720 (894798) to 2319836 (894685) = 117bp at 75.2% exon  
 2320243 (894275) to 2320358 (894160) = 116bp at 77.6% exon  
 2322259 (892256) to 2322422 (892093) = 164bp at 73.8% exon  
 2322448 (892067) to 2322602 (891913) = 155bp at 76.8% exon  
 2322630 (891885) to 2322776 (891739) = 147bp at 75.5% exon

## APÉNDICE IV

---

2345254 (1146408) to 2345378 (1146532) = 125bp at 75.2% exon  
2368709 (2728988) to 2368830 (2729109) = 122bp at 75.4% exon  
2369146 (2729425) to 2369319 (2729598) = 174bp at 73.0% exon  
2377378 (1627613) to 2377565 (1627800) = 188bp at 73.9% exon  
2385924 (1636195) to 2386034 (1636305) = 111bp at 75.7% exon  
2387967 (1638244) to 2388080 (1638360) = 118bp at 72.0% exon  
2440016 (1153547) to 2440135 (1153428) = 120bp at 79.2% exon  
2440807 (1152246) to 2440935 (1152118) = 129bp at 75.2% exon  
2441309 (1151744) to 2441424 (1151629) = 116bp at 79.3% exon  
2509525 (1657818) to 2509659 (1657952) = 135bp at 72.6% exon  
2509934 (1658230) to 2510171 (1658467) = 238bp at 75.2% exon  
2512373 (854729) to 2512495 (854607) = 123bp at 74.8% exon  
2515520 (851585) to 2515709 (851396) = 191bp at 75.4% exon  
2593142 (2062106) to 2593257 (2062221) = 116bp at 75.0% exon  
2606419 (891749) to 2606526 (891857) = 109bp at 75.2% exon  
2607638 (892969) to 2607786 (893117) = 149bp at 73.8% exon  
2608832 (894169) to 2608951 (894288) = 120bp at 77.5% exon  
2609239 (894579) to 2609589 (894926) = 352bp at 76.4% exon  
2750030 (1361527) to 2750522 (1361035) = 493bp at 75.9% exon  
2750662 (1360895) to 2750768 (1360789) = 107bp at 77.6% exon  
2773803 (1137919) to 2773911 (1137811) = 109bp at 77.1% exon  
2774535 (1137187) to 2774707 (1137015) = 174bp at 73.6% exon  
2775497 (1136210) to 2775601 (1136106) = 105bp at 76.2% exon  
2779564 (1812907) to 2779741 (1813082) = 179bp at 82.7% intergenic  
2780336 (1812910) to 2780582 (1813153) = 248bp at 79.0% intergenic  
2801423 (2559862) to 2801523 (2559962) = 101bp at 75.2% exon  
2805113 (2319348) to 2805232 (2319467) = 120bp at 75.8% exon  
2805572 (2319804) to 2805732 (2319964) = 161bp at 76.4% exon  
2805835 (2320064) to 2805945 (2320174) = 111bp at 74.8% exon  
2808769 (104258) to 2808878 (104367) = 110bp at 75.5% exon  
2809504 (104993) to 2809656 (105145) = 153bp at 75.8% exon  
2822342 (1166731) to 2822464 (1166609) = 123bp at 74.8% exon  
2823403 (103854) to 2823507 (103750) = 105bp at 75.2% exon  
2823602 (103655) to 2823726 (103531) = 125bp at 76.0% exon  
2823769 (103488) to 2823864 (103393) = 96bp at 76.0% exon  
2824486 (102765) to 2824587 (102664) = 102bp at 75.5% exon  
2827460 (2265257) to 2827664 (2265461) = 205bp at 80.5% exon  
2827864 (2265661) to 2827968 (2265765) = 105bp at 75.2% exon  
2827981 (2265778) to 2828196 (2265993) = 216bp at 75.0% exon  
2828371 (2266168) to 2828631 (2266428) = 261bp at 78.2% exon  
2842175 (1229066) to 2842393 (1228848) = 219bp at 74.4% exon  
2842749 (1228492) to 2842849 (1228392) = 101bp at 75.2% exon  
2904371 (614208) to 2904467 (614304) = 97bp at 76.3% exon  
2979234 (2701624) to 2979466 (2701856) = 233bp at 74.2% exon  
2979795 (2702185) to 2979908 (2702300) = 116bp at 74.1% exon  
2979998 (2702388) to 2980141 (2702531) = 144bp at 74.3% exon  
2990271 (1785930) to 2990388 (1786047) = 118bp at 74.6% exon  
2990885 (1786553) to 2991050 (1786718) = 166bp at 74.7% exon  
2991087 (1786755) to 2991219 (1786887) = 133bp at 77.4% exon  
2991634 (1813246) to 2991751 (1813353) = 118bp at 79.7% intergenic  
2999810 (2719635) to 3000304 (2720132) = 498bp at 76.5% exon  
2999848 (2927889) to 2999957 (2927998) = 110bp at 74.5% exon  
3000178 (2928219) to 3000292 (2928333) = 116bp at 74.1% exon  
3002055 (2930061) to 3002159 (2930165) = 105bp at 75.2% exon  
3002468 (2722386) to 3002571 (2722489) = 104bp at 76.9% exon  
3012129 (2727663) to 3012255 (2727789) = 127bp at 78.0% exon  
3019886 (2739650) to 3020023 (2739787) = 138bp at 77.5% exon  
3027147 (2752319) to 3027349 (2752521) = 203bp at 76.8% exon  
3079915 (107513) to 3080018 (107410) = 104bp at 75.0% exon  
3081310 (106151) to 3081441 (106020) = 132bp at 74.2% exon

3082256 (1531283) to 3082731 (1531758) = 476bp at 74.4% exon  
 3082880 (1531907) to 3082979 (1532006) = 100bp at 75.0% exon  
 3113724 (1944214) to 3113842 (1944332) = 119bp at 73.1% exon  
 3128616 (2852795) to 3128794 (2852973) = 179bp at 74.9% exon  
 3128891 (2853070) to 3129010 (2853189) = 120bp at 75.8% exon  
 3153173 (2067892) to 3153276 (2067789) = 105bp at 75.2% exon  
 3213823 (2727091) to 3213997 (2727265) = 176bp at 72.7% exon  
 3252741 (234687) to 3252744 (234684) = 4bp at 100.0% exon  
 3256694 (248589) to 3256827 (248456) = 134bp at 75.4% exon  
 3257447 (247950) to 3257560 (247837) = 114bp at 81.6% exon  
 3261740 (244144) to 3261898 (243986) = 159bp at 73.6% exon  
 3263210 (242646) to 3263310 (242546) = 101bp at 75.2% exon  
 3266847 (238959) to 3266983 (238823) = 137bp at 72.3% exon  
 3267221 (238566) to 3267342 (238445) = 122bp at 74.6% exon  
 3269890 (235946) to 3269990 (235846) = 101bp at 76.2% exon  
 3270445 (215745) to 3270632 (215558) = 189bp at 75.1% exon  
 3270673 (215517) to 3270902 (215288) = 230bp at 74.8% exon  
 3271125 (215071) to 3271346 (214850) = 222bp at 77.0% exon  
 3271362 (214834) to 3271493 (214703) = 132bp at 76.5% exon  
 3271547 (214552) to 3271684 (214415) = 138bp at 74.6% exon  
 3272214 (213879) to 3272392 (213701) = 179bp at 74.9% exon  
 3273222 (212871) to 3273565 (212528) = 344bp at 75.0% exon  
 3273758 (212441) to 3273870 (212329) = 113bp at 74.3% exon  
 3274470 (211887) to 3274617 (211740) = 148bp at 74.3% exon  
 3275401 (306190) to 3275528 (306063) = 128bp at 75.8% exon  
 3275983 (305605) to 3276146 (305442) = 164bp at 75.0% exon  
 3276457 (305131) to 3276598 (304990) = 142bp at 73.9% exon  
 3277356 (304160) to 3277640 (303880) = 285bp at 75.4% exon  
 3277655 (303861) to 3277886 (303630) = 232bp at 75.9% exon  
 3278442 (303077) to 3278756 (302763) = 315bp at 76.8% exon  
 3279160 (302342) to 3279425 (302077) = 266bp at 78.9% exon  
 3279604 (301898) to 3279776 (301726) = 173bp at 73.4% exon  
 3280039 (301463) to 3280193 (301309) = 155bp at 74.8% exon  
 3280519 (300962) to 3280658 (300823) = 140bp at 75.0% exon  
 3281059 (300422) to 3281159 (300322) = 101bp at 75.2% exon  
 3282139 (299408) to 3282305 (299242) = 167bp at 74.3% exon  
 3282991 (287990) to 3283161 (287820) = 171bp at 78.4% exon  
 3284283 (286630) to 3284499 (286417) = 217bp at 77.4% exon  
 3284518 (286398) to 3284642 (286274) = 125bp at 75.2% exon  
 3285093 (285827) to 3285246 (285674) = 154bp at 77.9% exon  
 3286654 (215745) to 3286841 (215558) = 189bp at 75.1% intergenic  
 3286882 (215517) to 3287111 (215288) = 230bp at 74.8% intergenic  
 3287334 (215071) to 3287555 (214850) = 222bp at 77.0% intergenic  
 3287571 (214834) to 3287724 (214679) = 156bp at 74.4% intergenic  
 3293804 (1742000) to 3293921 (1742117) = 118bp at 75.4% exon  
 3314061 (280270) to 3314171 (280160) = 111bp at 74.8% exon  
 3323094 (276235) to 3323204 (276125) = 111bp at 74.8% exon  
 3327956 (273158) to 3328173 (272941) = 218bp at 77.1% exon  
 3327956 (2412185) to 3328310 (2412539) = 355bp at 74.9% exon  
 3328891 (2413315) to 3329063 (2413487) = 173bp at 76.3% exon  
 3328931 (272183) to 3329076 (272038) = 146bp at 72.6% exon  
 3332586 (2552674) to 3332726 (2552814) = 142bp at 76.8% intergenic  
 3332913 (1813609) to 3333570 (1814266) = 661bp at 86.7% intergenic  
 3332913 (1967527) to 3333570 (1968184) = 661bp at 86.7% intergenic  
 3332913 (2553004) to 3333570 (2553661) = 661bp at 86.7% intergenic  
 3333637 (1814333) to 3334214 (1814924) = 592bp at 80.7% intergenic  
 3333637 (1968251) to 3334214 (1968842) = 592bp at 80.7% intergenic  
 3333637 (2553728) to 3334214 (2554319) = 592bp at 80.7% intergenic  
 3334293 (1815002) to 3334493 (1815201) = 202bp at 76.2% intergenic  
 3334293 (1968920) to 3334493 (1969119) = 202bp at 76.2% intergenic

3334293 (2554397) to 3334493 (2554596) = 202bp at 76.2% intergenic  
 3334562 (2554670) to 3335367 (2555472) = 811bp at 79.3% intergenic  
 3334562 (1815275) to 3335373 (1816083) = 817bp at 78.9% intergenic  
 3334562 (1969193) to 3335373 (1970001) = 817bp at 79.1% intergenic  
 3335052 (266654) to 3335367 (266340) = 317bp at 80.1% intergenic  
 3335454 (266245) to 3335589 (266108) = 138bp at 85.5% intergenic  
 3335454 (1816172) to 3335589 (1816309) = 138bp at 85.5% intergenic  
 3335454 (1970090) to 3335589 (1970227) = 138bp at 85.5% intergenic  
 3335454 (2555567) to 3335589 (2555704) = 138bp at 85.5% intergenic  
 3335644 (266051) to 3335770 (265925) = 127bp at 77.2% intergenic  
 3335644 (1816366) to 3335770 (1816492) = 127bp at 77.2% intergenic  
 3335644 (1970284) to 3335770 (1970410) = 127bp at 77.2% intergenic  
 3335644 (2555761) to 3335770 (2555887) = 127bp at 77.2% intergenic  
 3335909 (265461) to 3336097 (265280) = 193bp at 79.3% intergenic  
 3335909 (1970624) to 3336995 (1971702) = 1098bp at 83.4% intergenic  
 3335909 (1816706) to 3337013 (1817802) = 1116bp at 83.1% intergenic  
 3335909 (2556351) to 3337013 (2557447) = 1116bp at 83.1% intergenic  
 3337014 (1817827) to 3337264 (1818082) = 256bp at 79.3% intergenic  
 3337036 (1971766) to 3337264 (1971998) = 233bp at 82.0% intergenic  
 3337392 (1818225) to 3337488 (1818324) = 103bp at 75.7% intergenic  
 3337392 (1972141) to 3337488 (1972240) = 103bp at 75.7% intergenic  
 3345510 (2800127) to 3345608 (2800225) = 99bp at 75.8% exon  
 3346797 (2070156) to 3346896 (2070255) = 100bp at 75.0% exon  
 3347201 (2070560) to 3347391 (2070750) = 191bp at 73.8% exon  
 3348713 (2801679) to 3349069 (2802035) = 357bp at 74.8% exon  
 3355137 (2805345) to 3355239 (2805450) = 106bp at 76.4% exon  
 3363721 (2809666) to 3363842 (2809787) = 122bp at 73.8% exon  
 3373091 (2828853) to 3373199 (2828961) = 109bp at 76.1% exon  
 3387150 (329267) to 3387400 (329517) = 251bp at 74.1% exon  
 3404336 (432281) to 3404490 (432435) = 155bp at 74.2% exon  
 3406378 (1353436) to 3406537 (1353277) = 160bp at 73.1% exon  
 3407040 (1352774) to 3407140 (1352674) = 101bp at 75.2% exon  
 3407184 (1352630) to 3407350 (1352464) = 167bp at 74.3% exon  
 3439852 (652919) to 3440039 (652732) = 188bp at 75.0% exon  
 3440133 (652638) to 3440239 (652532) = 107bp at 76.6% exon  
 3442139 (650929) to 3442281 (650784) = 146bp at 76.7% exon  
 3451132 (2595651) to 3451231 (2595552) = 100bp at 75.0% exon  
 3498629 (2458617) to 3498813 (2458801) = 185bp at 75.1% exon  
 3498639 (2529764) to 3498774 (2529629) = 136bp at 72.8% exon  
 3515486 (1072714) to 3515590 (1072817) = 105bp at 75.2% exon  
 3555286 (718628) to 3555413 (718501) = 128bp at 73.4% exon  
 3555826 (718088) to 3555953 (717961) = 128bp at 75.8% exon  
 3634677 (1419819) to 3634813 (1419685) = 138bp at 72.5% exon  
 3635217 (1419293) to 3635327 (1419183) = 111bp at 75.7% exon  
 3635811 (1418696) to 3635924 (1418583) = 114bp at 74.6% exon  
 3649827 (863540) to 3649928 (863641) = 102bp at 75.5% intergenic  
 3650419 (864156) to 3650609 (864346) = 191bp at 74.9% intergenic  
 3771073 (1451262) to 3771170 (1451165) = 98bp at 75.5% exon  
 3773566 (2407082) to 3773681 (2407197) = 116bp at 75.0% exon  
 3796389 (2969492) to 3796510 (2969613) = 122bp at 74.6% exon  
 3821354 (2458855) to 3821592 (2458617) = 239bp at 75.7% exon  
 3828843 (2397812) to 3828987 (2397956) = 145bp at 72.4% exon  
 3829808 (2398834) to 3829965 (2398991) = 158bp at 74.1% exon  
 3836939 (2398018) to 3837038 (2398117) = 100bp at 76.0% exon  
 3843290 (2398198) to 3843388 (2398296) = 99bp at 78.8% exon  
 3843973 (2398927) to 3844078 (2399032) = 106bp at 75.5% exon  
 3882893 (187983) to 3883014 (187862) = 122bp at 76.2% exon  
 3938070 (49638) to 3938167 (49541) = 98bp at 75.5% exon

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Listeria monocytogenes* 08-5578 CP001602 - (Cons. Id 85%)**

9926 (2557701) to 10132 (2557495) = 207bp at 86.5% intergenic  
 10155 (2557447) to 10303 (2557299) = 149bp at 85.9% intergenic  
 10338 (2557264) to 10680 (2556922) = 344bp at 86.0% intergenic  
 10702 (1817256) to 10953 (1817006) = 252bp at 86.5% intergenic  
 10702 (1971174) to 10953 (1970924) = 252bp at 86.5% intergenic  
 10960 (1816999) to 11224 (1816733) = 267bp at 86.9% intergenic  
 10960 (1970917) to 11224 (1970651) = 267bp at 86.9% intergenic  
 11555 (1816333) to 11692 (1816194) = 140bp at 87.1% intergenic  
 11555 (1970251) to 11692 (1970112) = 140bp at 87.1% intergenic  
 11801 (1816077) to 11959 (1815919) = 159bp at 85.5% intergenic  
 11801 (1969995) to 11959 (1969837) = 159bp at 85.5% intergenic  
 12340 (1815537) to 12588 (1815291) = 250bp at 84.8% intergenic  
 12340 (1969455) to 12588 (1969209) = 250bp at 84.8% intergenic  
 12725 (1815151) to 12832 (1815044) = 108bp at 86.1% intergenic  
 12725 (1969069) to 12832 (1968962) = 108bp at 86.1% intergenic  
 13029 (1814848) to 13148 (1814728) = 121bp at 87.6% intergenic  
 13029 (1968766) to 13148 (1968646) = 121bp at 87.6% intergenic  
 13156 (1814708) to 13440 (1814424) = 285bp at 87.4% intergenic  
 13156 (1968626) to 13440 (1968342) = 285bp at 87.4% intergenic  
 13629 (1814236) to 14224 (1813641) = 596bp at 89.6% intergenic  
 13629 (1968154) to 14224 (1967559) = 596bp at 89.6% intergenic  
 158544 (1971980) to 158758 (1971766) = 215bp at 85.6% intergenic  
 158781 (1971720) to 158929 (1971572) = 149bp at 85.9% intergenic  
 158964 (1971537) to 159554 (1970949) = 597bp at 84.6% intergenic  
 159586 (1970917) to 159850 (1970651) = 267bp at 86.9% intergenic  
 160181 (1970251) to 160318 (1970112) = 140bp at 87.1% intergenic  
 160427 (1969995) to 160585 (1969837) = 159bp at 85.5% intergenic  
 160966 (1969455) to 161214 (1969209) = 250bp at 84.8% intergenic  
 161351 (1969069) to 161458 (1968962) = 108bp at 86.1% intergenic  
 161655 (1968766) to 161774 (1968646) = 121bp at 87.6% intergenic  
 161782 (1968626) to 162066 (1968342) = 285bp at 87.4% intergenic  
 162255 (1968154) to 162850 (1967559) = 596bp at 89.6% intergenic  
 163682 (1971980) to 163896 (1971766) = 215bp at 85.6% intergenic  
 163919 (1971720) to 164067 (1971572) = 149bp at 85.9% intergenic  
 164102 (1971537) to 164717 (1970924) = 622bp at 83.9% intergenic  
 164724 (1970917) to 164988 (1970651) = 267bp at 86.9% intergenic  
 165319 (1970251) to 165456 (1970112) = 140bp at 87.1% intergenic  
 165565 (1969995) to 165723 (1969837) = 159bp at 85.5% intergenic  
 166104 (1969455) to 166352 (1969209) = 250bp at 84.8% intergenic  
 166489 (1969069) to 166596 (1968962) = 108bp at 87.0% intergenic  
 166793 (1968766) to 166912 (1968646) = 121bp at 87.6% intergenic  
 166920 (1968626) to 167204 (1968342) = 285bp at 87.4% intergenic  
 167393 (1968154) to 167988 (1967559) = 596bp at 89.6% intergenic  
 168821 (1818064) to 169035 (1817850) = 215bp at 85.6% intergenic  
 169058 (1817802) to 169206 (1817654) = 149bp at 85.9% intergenic  
 169241 (1817619) to 169577 (1817283) = 338bp at 86.7% intergenic  
 169605 (1817256) to 169856 (1817006) = 252bp at 86.5% intergenic  
 169863 (1816999) to 170028 (1816833) = 167bp at 86.2% intergenic  
 170041 (1816829) to 170137 (1816733) = 97bp at 88.7% intergenic  
 170467 (1816333) to 170604 (1816194) = 140bp at 87.1% intergenic  
 170713 (1816077) to 170871 (1815919) = 159bp at 85.5% intergenic  
 171252 (1815537) to 171500 (1815291) = 250bp at 84.8% intergenic  
 171637 (1815151) to 171744 (1815044) = 108bp at 87.0% intergenic  
 171941 (1814848) to 172060 (1814728) = 121bp at 87.6% intergenic  
 172068 (1814708) to 172352 (1814424) = 285bp at 87.4% intergenic

172541 (1814236) to 173136 (1813641) = 596bp at 89.6% intergenic  
 249648 (1932870) to 249651 (1932867) = 4bp at 100.0% exon  
 255681 (2556901) to 255932 (2556651) = 252bp at 86.1% intergenic  
 255939 (2556644) to 256203 (2556378) = 267bp at 86.5% intergenic  
 256534 (2555728) to 256671 (2555589) = 140bp at 87.1% intergenic  
 256780 (2555472) to 256938 (2555314) = 159bp at 85.5% intergenic  
 257319 (2554932) to 257567 (2554686) = 250bp at 84.8% intergenic  
 257704 (2554546) to 257811 (2554439) = 108bp at 87.0% intergenic  
 258008 (2554243) to 258127 (2554123) = 121bp at 87.6% intergenic  
 258135 (2554103) to 258419 (2553819) = 285bp at 87.4% intergenic  
 258608 (2553631) to 259203 (2553036) = 596bp at 89.6% intergenic  
 333673 (1969455) to 333921 (1969209) = 250bp at 84.8% intergenic  
 334058 (1969069) to 334165 (1968962) = 108bp at 87.0% intergenic  
 334362 (1968766) to 334481 (1968646) = 121bp at 87.6% intergenic  
 334489 (1968626) to 334773 (1968342) = 285bp at 87.7% intergenic  
 339196 (1815151) to 339303 (1815044) = 108bp at 87.0% intergenic  
 339500 (1814848) to 339619 (1814728) = 121bp at 87.6% intergenic  
 339627 (1814708) to 339911 (1814424) = 285bp at 87.4% intergenic  
 340100 (1814236) to 340695 (1813641) = 596bp at 89.6% intergenic  
 344094 (1815393) to 344197 (1815291) = 105bp at 85.7% intergenic  
 344334 (1815151) to 344441 (1815044) = 108bp at 86.1% intergenic  
 344638 (1814848) to 344757 (1814728) = 121bp at 87.6% intergenic  
 344765 (1814708) to 345049 (1814424) = 285bp at 87.4% intergenic  
 345238 (1814236) to 345833 (1813641) = 596bp at 89.6% intergenic  
 1009663 (923601) to 1009666 (923604) = 4bp at 100.0% exon  
 1098459 (2413485) to 1098568 (2413376) = 110bp at 85.5% exon  
 1105655 (1971971) to 1105860 (1971766) = 206bp at 86.4% intergenic  
 1105883 (1971720) to 1106031 (1971572) = 149bp at 85.9% intergenic  
 1106066 (1971537) to 1106681 (1970924) = 622bp at 83.9% intergenic  
 1106688 (1970917) to 1106952 (1970651) = 267bp at 86.9% intergenic  
 1107283 (1970251) to 1107420 (1970112) = 140bp at 87.1% intergenic  
 1107529 (1969995) to 1107687 (1969837) = 159bp at 85.5% intergenic  
 1108068 (1969455) to 1108316 (1969209) = 250bp at 84.8% intergenic  
 1108453 (1969069) to 1108560 (1968962) = 108bp at 87.0% intergenic  
 1108757 (1968766) to 1108876 (1968646) = 121bp at 87.6% intergenic  
 1108884 (1968626) to 1109168 (1968342) = 285bp at 87.4% intergenic  
 1109357 (1968154) to 1109952 (1967559) = 596bp at 89.6% intergenic  
 1517719 (1255083) to 1517722 (1255086) = 4bp at 100.0% exon  
 1690467 (2185720) to 1690606 (2185581) = 140bp at 84.3% exon  
 2827541 (2265338) to 2827671 (2265468) = 131bp at 84.0% exon  
 3000137 (2719965) to 3000252 (2720080) = 116bp at 82.8% exon  
 3252741 (234687) to 3252744 (234684) = 4bp at 100.0% exon  
 3279235 (302267) to 3279362 (302140) = 128bp at 82.8% exon  
 3284379 (286534) to 3284481 (286432) = 103bp at 85.4% exon  
 3332944 (1813641) to 3333539 (1814236) = 596bp at 89.6% intergenic  
 3332944 (1967559) to 3333539 (1968154) = 596bp at 89.6% intergenic  
 3332944 (2553036) to 3333539 (2553631) = 596bp at 89.6% intergenic  
 3333728 (1814424) to 3334012 (1814708) = 285bp at 87.4% intergenic  
 3333728 (1968342) to 3334012 (1968626) = 285bp at 87.4% intergenic  
 3333728 (2553819) to 3334012 (2554103) = 285bp at 87.4% intergenic  
 3334020 (1814728) to 3334139 (1814848) = 121bp at 87.6% intergenic  
 3334020 (1968646) to 3334139 (1968766) = 121bp at 87.6% intergenic  
 3334020 (2554123) to 3334139 (2554243) = 121bp at 87.6% intergenic  
 3334332 (1815042) to 3334443 (1815151) = 112bp at 85.7% intergenic  
 3334332 (1968960) to 3334443 (1969069) = 112bp at 85.7% intergenic  
 3334332 (2554437) to 3334443 (2554546) = 112bp at 85.7% intergenic  
 3334580 (1815291) to 3334828 (1815537) = 250bp at 84.8% intergenic  
 3334580 (1969209) to 3334828 (1969455) = 250bp at 84.8% intergenic  
 3334580 (2554686) to 3334828 (2554932) = 250bp at 84.8% intergenic  
 3335209 (266498) to 3335367 (266340) = 159bp at 85.5% intergenic

3335209 (1815919) to 3335367 (1816077) = 159bp at 85.5% intergenic  
 3335209 (1969837) to 3335367 (1969995) = 159bp at 85.5% intergenic  
 3335209 (2555314) to 3335367 (2555472) = 159bp at 85.5% intergenic  
 3335476 (266223) to 3335614 (266083) = 141bp at 87.2% intergenic  
 3335476 (1816194) to 3335614 (1816334) = 141bp at 87.2% intergenic  
 3335476 (1970112) to 3335614 (1970252) = 141bp at 87.2% intergenic  
 3335476 (2555589) to 3335614 (2555729) = 141bp at 87.2% intergenic  
 3335944 (265434) to 3336097 (265280) = 155bp at 87.1% intergenic  
 3335944 (1816733) to 3336208 (1816999) = 267bp at 86.9% intergenic  
 3335944 (1970651) to 3336208 (1970917) = 267bp at 86.9% intergenic  
 3335944 (2556378) to 3336208 (2556644) = 267bp at 86.5% intergenic  
 3336215 (1817006) to 3336466 (1817256) = 252bp at 86.5% intergenic  
 3336215 (1970924) to 3336830 (1971537) = 622bp at 83.9% intergenic  
 3336215 (2556651) to 3336830 (2557264) = 622bp at 83.9% intergenic  
 3336494 (1817283) to 3336830 (1817619) = 338bp at 86.7% intergenic  
 3336865 (1817654) to 3337013 (1817802) = 149bp at 85.9% intergenic  
 3336865 (1971572) to 3337013 (1971720) = 149bp at 85.9% intergenic  
 3336865 (2557299) to 3337013 (2557447) = 149bp at 85.9% intergenic  
 3337036 (1817850) to 3337250 (1818064) = 215bp at 85.6% intergenic  
 3337036 (1971766) to 3337250 (1971980) = 215bp at 85.6% intergenic

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Listeria monocytogenes* 08-5578 CP001602 - (Cons. Id 95%)**

11573 (1816315) to 11684 (1816203) = 113bp at 92.9% intergenic  
 11573 (1970233) to 11684 (1970121) = 113bp at 92.9% intergenic  
 13277 (1814587) to 13403 (1814461) = 127bp at 93.7% intergenic  
 13277 (1968505) to 13403 (1968379) = 127bp at 93.7% intergenic  
 13813 (1814052) to 14103 (1813762) = 291bp at 96.6% intergenic  
 13813 (1967970) to 14103 (1967680) = 291bp at 96.6% intergenic  
 160199 (1970233) to 160310 (1970121) = 113bp at 92.9% intergenic  
 161903 (1968505) to 162029 (1968379) = 127bp at 93.7% intergenic  
 162439 (1967970) to 162729 (1967680) = 291bp at 96.6% intergenic  
 165337 (1970233) to 165448 (1970121) = 113bp at 92.9% intergenic  
 167041 (1968505) to 167167 (1968379) = 127bp at 93.7% intergenic  
 167577 (1967970) to 167867 (1967680) = 291bp at 96.6% intergenic  
 170485 (1816315) to 170596 (1816203) = 113bp at 92.9% intergenic  
 172189 (1814587) to 172315 (1814461) = 127bp at 93.7% intergenic  
 172725 (1814052) to 173015 (1813762) = 291bp at 96.6% intergenic  
 249648 (1932870) to 249651 (1932867) = 4bp at 100.0% exon  
 256552 (2555710) to 256663 (2555598) = 113bp at 92.9% intergenic  
 258256 (2553982) to 258382 (2553856) = 127bp at 93.7% intergenic  
 258792 (2553447) to 259082 (2553157) = 291bp at 96.6% intergenic  
 334610 (1968505) to 334736 (1968379) = 127bp at 93.7% intergenic  
 339748 (1814587) to 339874 (1814461) = 127bp at 93.7% intergenic  
 340284 (1814052) to 340574 (1813762) = 291bp at 96.6% intergenic  
 344886 (1814587) to 345012 (1814461) = 127bp at 93.7% intergenic  
 345422 (1814052) to 345712 (1813762) = 291bp at 96.6% intergenic  
 1009663 (923601) to 1009666 (923604) = 4bp at 100.0% exon  
 1107301 (1970233) to 1107412 (1970121) = 113bp at 92.9% intergenic  
 1109005 (1968505) to 1109131 (1968379) = 127bp at 93.7% intergenic  
 1109541 (1967970) to 1109831 (1967680) = 291bp at 96.6% intergenic  
 1517719 (1255083) to 1517722 (1255086) = 4bp at 100.0% exon  
 3252741 (234687) to 3252744 (234684) = 4bp at 100.0% exon  
 3333065 (1813762) to 3333355 (1814052) = 291bp at 96.6% intergenic  
 3333065 (1967680) to 3333355 (1967970) = 291bp at 96.6% intergenic  
 3333065 (2553157) to 3333355 (2553447) = 291bp at 96.6% intergenic

3333765 (1814461) to 3333891 (1814587) = 127bp at 93.7% intergenic  
3333765 (1968379) to 3333891 (1968505) = 127bp at 93.7% intergenic  
3333765 (2553856) to 3333891 (2553982) = 127bp at 93.7% intergenic  
3335484 (266214) to 3335595 (266102) = 113bp at 92.9% intergenic  
3335484 (1816203) to 3335595 (1816315) = 113bp at 92.9% intergenic  
3335484 (1970121) to 3335595 (1970233) = 113bp at 92.9% intergenic  
3335484 (2555598) to 3335595 (2555710) = 113bp at 92.9% intergenic  
3333765 (435555) to 3333891 (435681) = 127bp at 93.7% intergenic

### **Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 AE000516 - (Cons. Id 75%)**

10155 (1471857) to 10299 (1472001) = 145bp at 76.6% intergenic  
10317 (1472019) to 11244 (1472950) = 940bp at 79.4% intergenic  
11410 (1473211) to 11524 (1473326) = 116bp at 79.3% intergenic  
11831 (1473687) to 11966 (1473822) = 136bp at 78.7% intergenic  
12085 (1473980) to 12276 (1474172) = 194bp at 76.3% intergenic  
12339 (1474235) to 12592 (1474488) = 256bp at 77.3% intergenic  
12673 (1474574) to 12832 (1474734) = 161bp at 79.5% intergenic  
13030 (1475030) to 13142 (1475142) = 113bp at 77.9% intergenic  
13153 (1475181) to 13534 (1475565) = 386bp at 77.5% intergenic  
13575 (1475606) to 14195 (1476226) = 621bp at 82.4% intergenic  
158346 (1471398) to 158450 (1471510) = 113bp at 84.1% intergenic  
158533 (1471592) to 158777 (1471836) = 245bp at 80.8% intergenic  
158781 (1471857) to 158925 (1472001) = 145bp at 76.6% intergenic  
158943 (1472019) to 159870 (1472950) = 940bp at 79.3% intergenic  
160036 (1473211) to 160150 (1473326) = 116bp at 79.3% intergenic  
160457 (1473687) to 160592 (1473822) = 136bp at 78.7% intergenic  
160711 (1473980) to 160902 (1474172) = 194bp at 76.3% intergenic  
160965 (1474235) to 161218 (1474488) = 256bp at 77.3% intergenic  
161299 (1474574) to 161458 (1474734) = 161bp at 79.5% intergenic  
161656 (1475030) to 161768 (1475142) = 113bp at 77.9% intergenic  
161779 (1475181) to 162160 (1475565) = 386bp at 77.5% intergenic  
162201 (1475606) to 162821 (1476226) = 621bp at 82.4% intergenic  
163483 (1471397) to 163588 (1471510) = 114bp at 84.2% intergenic  
163671 (1471592) to 163915 (1471836) = 245bp at 80.8% intergenic  
163919 (1471857) to 164063 (1472001) = 145bp at 76.6% intergenic  
164081 (1472019) to 165008 (1472950) = 940bp at 79.4% intergenic  
165174 (1473211) to 165288 (1473326) = 116bp at 78.4% intergenic  
165595 (1473687) to 165732 (1473824) = 138bp at 78.3% intergenic  
165849 (1473980) to 166040 (1474172) = 194bp at 76.3% intergenic  
166103 (1474235) to 166356 (1474488) = 256bp at 77.3% intergenic  
166437 (1474574) to 166596 (1474734) = 161bp at 80.1% intergenic  
166794 (1475030) to 166906 (1475142) = 113bp at 77.9% intergenic  
166917 (1475181) to 167298 (1475565) = 386bp at 77.5% intergenic  
167339 (1475606) to 167959 (1476226) = 621bp at 82.4% intergenic  
168810 (1471592) to 169054 (1471836) = 245bp at 80.8% intergenic  
169058 (1471857) to 169202 (1472001) = 145bp at 76.6% intergenic  
169220 (1472019) to 170157 (1472950) = 950bp at 78.7% intergenic  
170322 (1473211) to 170436 (1473326) = 116bp at 79.3% intergenic  
170743 (1473687) to 170878 (1473822) = 136bp at 78.7% intergenic  
170997 (1473980) to 171188 (1474172) = 194bp at 76.3% intergenic  
171251 (1474235) to 171504 (1474488) = 256bp at 77.3% intergenic  
171585 (1474574) to 171744 (1474734) = 161bp at 80.1% intergenic  
171942 (1475030) to 172054 (1475142) = 113bp at 77.9% intergenic  
172065 (1475181) to 172446 (1475565) = 386bp at 77.5% intergenic



172487 (1475606) to 173107 (1476226) = 621bp at 82.4% intergenic  
256810 (1473687) to 256945 (1473822) = 136bp at 78.7% intergenic  
257064 (1473980) to 257255 (1474172) = 194bp at 76.3% intergenic  
257318 (1474235) to 257571 (1474488) = 256bp at 77.3% intergenic  
257652 (1474574) to 257811 (1474734) = 161bp at 80.1% intergenic  
258009 (1475030) to 258121 (1475142) = 113bp at 77.9% intergenic  
258132 (1475181) to 258513 (1475565) = 386bp at 77.5% intergenic  
258554 (1475606) to 259174 (1476226) = 621bp at 82.4% intergenic  
311089 (1471592) to 311333 (1471836) = 245bp at 80.8% intergenic  
311337 (1471857) to 311481 (1472001) = 145bp at 76.6% intergenic  
311499 (1472019) to 312426 (1472950) = 940bp at 79.4% intergenic  
312592 (1473211) to 312706 (1473326) = 116bp at 79.3% intergenic  
313013 (1473687) to 313148 (1473822) = 136bp at 78.7% intergenic  
313267 (1473980) to 313458 (1474172) = 194bp at 76.3% intergenic  
313521 (1474235) to 313774 (1474488) = 256bp at 77.3% intergenic  
313855 (1474574) to 314014 (1474734) = 161bp at 80.1% intergenic  
314212 (1475030) to 314324 (1475142) = 113bp at 77.9% intergenic  
314335 (1475181) to 314716 (1475565) = 386bp at 77.5% intergenic  
314757 (1475606) to 315377 (1476226) = 621bp at 82.4% intergenic  
331240 (1471592) to 331484 (1471836) = 245bp at 80.4% intergenic  
331488 (1471857) to 331632 (1472001) = 145bp at 76.6% intergenic  
331650 (1472019) to 332577 (1472950) = 940bp at 79.4% intergenic  
332743 (1473211) to 332857 (1473326) = 116bp at 79.3% intergenic  
333164 (1473687) to 333299 (1473822) = 136bp at 78.7% intergenic  
333418 (1473980) to 333609 (1474172) = 194bp at 76.3% intergenic  
333672 (1474235) to 333925 (1474488) = 256bp at 77.3% intergenic  
334006 (1474574) to 334165 (1474734) = 161bp at 80.1% intergenic  
334363 (1475030) to 334475 (1475142) = 113bp at 77.9% intergenic  
334486 (1475181) to 334867 (1475565) = 386bp at 76.7% intergenic  
334908 (1475606) to 335528 (1476226) = 621bp at 82.4% intergenic  
336378 (1471592) to 336622 (1471836) = 245bp at 80.8% intergenic  
336626 (1471857) to 336770 (1472001) = 145bp at 76.6% intergenic  
336788 (1472019) to 337715 (1472950) = 940bp at 79.4% intergenic  
337881 (1473211) to 337995 (1473326) = 116bp at 77.6% intergenic  
338302 (1473687) to 338437 (1473822) = 136bp at 78.7% intergenic  
338556 (1473980) to 338747 (1474172) = 194bp at 76.3% intergenic  
338810 (1474235) to 339063 (1474488) = 256bp at 77.0% intergenic  
339144 (1474574) to 339303 (1474734) = 161bp at 80.1% intergenic  
339501 (1475030) to 339613 (1475142) = 113bp at 77.9% intergenic  
339624 (1475181) to 340005 (1475565) = 386bp at 77.5% intergenic  
340046 (1475606) to 340666 (1476226) = 621bp at 82.4% intergenic  
341517 (1471592) to 341761 (1471836) = 245bp at 80.8% intergenic  
341765 (1471857) to 341909 (1472001) = 145bp at 76.6% intergenic  
341927 (1472019) to 342854 (1472950) = 940bp at 79.4% intergenic  
343019 (1473211) to 343133 (1473326) = 116bp at 78.4% intergenic  
343440 (1473687) to 343575 (1473822) = 136bp at 78.7% intergenic  
343694 (1473980) to 343885 (1474172) = 194bp at 76.3% intergenic  
343948 (1474235) to 344201 (1474488) = 256bp at 77.3% intergenic  
344282 (1474574) to 344441 (1474734) = 161bp at 80.1% intergenic  
344639 (1475030) to 344751 (1475142) = 113bp at 77.9% intergenic  
344762 (1475181) to 345143 (1475565) = 386bp at 77.5% intergenic  
345184 (1475606) to 345804 (1476226) = 621bp at 82.4% intergenic  
1105447 (1471397) to 1105552 (1471510) = 114bp at 84.2% intergenic  
1105635 (1471592) to 1105879 (1471836) = 245bp at 80.8% intergenic  
1105883 (1471857) to 1106027 (1472001) = 145bp at 76.6% intergenic  
1106045 (1472019) to 1106972 (1472950) = 940bp at 79.4% intergenic  
1107138 (1473211) to 1107252 (1473326) = 116bp at 79.3% intergenic  
1107559 (1473687) to 1107694 (1473822) = 136bp at 78.7% intergenic  
1107813 (1473980) to 1108004 (1474172) = 194bp at 76.3% intergenic  
1108067 (1474235) to 1108320 (1474488) = 256bp at 77.3% intergenic

1108401 (1474574) to 1108560 (1474734) = 161bp at 80.1% intergenic  
 1108758 (1475030) to 1108870 (1475142) = 113bp at 77.9% intergenic  
 1108881 (1475181) to 1109262 (1475565) = 386bp at 77.5% intergenic  
 1109303 (1475606) to 1109923 (1476226) = 621bp at 82.4% intergenic  
 2779477 (2762471) to 2779563 (2762385) = 87bp at 79.3% intergenic  
 3280554 (763620) to 3280676 (763496) = 125bp at 74.4% exon  
 3332973 (1476226) to 3333593 (1475606) = 621bp at 82.4% intergenic  
 3333634 (1475565) to 3334015 (1475181) = 386bp at 77.5% intergenic  
 3334030 (1475138) to 3334138 (1475030) = 109bp at 78.9% intergenic  
 3334336 (1474734) to 3334495 (1474574) = 161bp at 80.1% intergenic  
 3334576 (1474488) to 3334829 (1474235) = 256bp at 77.3% intergenic  
 3334892 (1474172) to 3335083 (1473980) = 194bp at 76.3% intergenic  
 3335200 (1473824) to 3335337 (1473687) = 138bp at 78.3% intergenic  
 3335644 (1473326) to 3335758 (1473211) = 116bp at 79.3% intergenic  
 3335931 (1472940) to 3336851 (1472019) = 929bp at 79.9% intergenic  
 3336869 (1472001) to 3337013 (1471857) = 145bp at 76.6% intergenic  
 3337017 (1471836) to 3337261 (1471592) = 245bp at 80.8% intergenic  
 3337344 (1471510) to 3337450 (1471396) = 115bp at 84.3% intergenic  
 3348897 (4044259) to 3349000 (4044362) = 104bp at 75.0% exon

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 AE000516 - (Cons. Id 85%)**

10370 (1472072) to 10508 (1472210) = 139bp at 87.1% intergenic  
 10529 (1472232) to 10687 (1472390) = 159bp at 84.3% intergenic  
 10694 (1472395) to 10953 (1472655) = 262bp at 80.5% intergenic  
 10993 (1472696) to 11124 (1472828) = 133bp at 84.2% intergenic  
 11853 (1473709) to 11952 (1473808) = 100bp at 85.0% intergenic  
 12476 (1474372) to 12575 (1474471) = 101bp at 85.1% intergenic  
 13268 (1475296) to 13424 (1475456) = 161bp at 82.0% intergenic  
 13771 (1475802) to 14093 (1476124) = 323bp at 88.9% intergenic  
 158572 (1471631) to 158763 (1471822) = 192bp at 86.5% intergenic  
 158996 (1472072) to 159134 (1472210) = 139bp at 87.1% intergenic  
 159155 (1472232) to 159313 (1472390) = 159bp at 84.3% intergenic  
 159320 (1472395) to 159574 (1472650) = 257bp at 80.5% intergenic  
 159619 (1472696) to 159750 (1472828) = 133bp at 84.2% intergenic  
 160479 (1473709) to 160578 (1473808) = 100bp at 85.0% intergenic  
 161102 (1474372) to 161201 (1474471) = 101bp at 85.1% intergenic  
 161894 (1475296) to 162050 (1475456) = 161bp at 82.0% intergenic  
 162397 (1475802) to 162719 (1476124) = 323bp at 88.9% intergenic  
 163710 (1471631) to 163901 (1471822) = 192bp at 86.5% intergenic  
 164134 (1472072) to 164272 (1472210) = 139bp at 87.1% intergenic  
 164293 (1472232) to 164451 (1472390) = 159bp at 84.3% intergenic  
 164458 (1472395) to 164717 (1472655) = 262bp at 80.5% intergenic  
 164757 (1472696) to 164888 (1472828) = 133bp at 84.2% intergenic  
 165617 (1473709) to 165716 (1473808) = 100bp at 85.0% intergenic  
 166240 (1474372) to 166339 (1474471) = 101bp at 85.1% intergenic  
 167032 (1475296) to 167188 (1475456) = 161bp at 82.0% intergenic  
 167535 (1475802) to 167857 (1476124) = 323bp at 88.9% intergenic  
 168849 (1471631) to 169040 (1471822) = 192bp at 86.5% intergenic  
 169273 (1472072) to 169411 (1472210) = 139bp at 87.1% intergenic  
 169432 (1472232) to 169590 (1472390) = 159bp at 84.3% intergenic  
 169597 (1472395) to 169856 (1472655) = 262bp at 80.5% intergenic  
 169896 (1472696) to 170015 (1472816) = 121bp at 86.0% intergenic  
 170765 (1473709) to 170864 (1473808) = 100bp at 85.0% intergenic  
 171388 (1474372) to 171487 (1474471) = 101bp at 85.1% intergenic

172180 (1475296) to 172336 (1475456) = 161bp at 82.0% intergenic  
 172683 (1475802) to 173005 (1476124) = 323bp at 88.9% intergenic  
 256832 (1473709) to 256931 (1473808) = 100bp at 85.0% intergenic  
 257455 (1474372) to 257554 (1474471) = 101bp at 85.1% intergenic  
 258247 (1475296) to 258403 (1475456) = 161bp at 82.0% intergenic  
 258750 (1475802) to 259072 (1476124) = 323bp at 88.9% intergenic  
 311128 (1471631) to 311319 (1471822) = 192bp at 86.5% intergenic  
 311552 (1472072) to 311690 (1472210) = 139bp at 87.1% intergenic  
 311711 (1472232) to 311869 (1472390) = 159bp at 84.3% intergenic  
 311876 (1472395) to 312135 (1472655) = 262bp at 80.5% intergenic  
 312175 (1472696) to 312306 (1472828) = 133bp at 84.2% intergenic  
 313035 (1473709) to 313134 (1473808) = 100bp at 85.0% intergenic  
 313658 (1474372) to 313757 (1474471) = 101bp at 85.1% intergenic  
 314450 (1475296) to 314606 (1475456) = 161bp at 82.0% intergenic  
 314953 (1475802) to 315275 (1476124) = 323bp at 88.9% intergenic  
 331279 (1471631) to 331473 (1471825) = 195bp at 85.6% intergenic  
 331703 (1472072) to 331841 (1472210) = 139bp at 87.1% intergenic  
 331862 (1472232) to 332020 (1472390) = 159bp at 84.3% intergenic  
 332027 (1472395) to 332286 (1472655) = 262bp at 80.5% intergenic  
 332326 (1472696) to 332457 (1472828) = 133bp at 84.2% intergenic  
 333186 (1473709) to 333285 (1473808) = 100bp at 85.0% intergenic  
 333809 (1474372) to 333908 (1474471) = 101bp at 85.1% intergenic  
 334624 (1475323) to 334757 (1475456) = 134bp at 86.6% intergenic  
 335104 (1475802) to 335426 (1476124) = 323bp at 88.9% intergenic  
 336417 (1471631) to 336608 (1471822) = 192bp at 86.5% intergenic  
 336841 (1472072) to 336979 (1472210) = 139bp at 87.1% intergenic  
 337000 (1472232) to 337158 (1472390) = 159bp at 84.3% intergenic  
 337165 (1472395) to 337424 (1472655) = 262bp at 80.5% intergenic  
 337464 (1472696) to 337595 (1472828) = 133bp at 84.2% intergenic  
 338324 (1473709) to 338423 (1473808) = 100bp at 85.0% intergenic  
 339739 (1475296) to 339895 (1475456) = 161bp at 82.0% intergenic  
 340242 (1475802) to 340564 (1476124) = 323bp at 88.9% intergenic  
 341556 (1471631) to 341747 (1471822) = 192bp at 86.5% intergenic  
 341980 (1472072) to 342118 (1472210) = 139bp at 87.1% intergenic  
 342139 (1472232) to 342297 (1472390) = 159bp at 84.3% intergenic  
 342304 (1472395) to 342563 (1472655) = 262bp at 80.5% intergenic  
 342603 (1472696) to 342734 (1472828) = 133bp at 84.2% intergenic  
 343462 (1473709) to 343561 (1473808) = 100bp at 85.0% intergenic  
 344085 (1474372) to 344184 (1474471) = 101bp at 85.1% intergenic  
 344877 (1475296) to 345033 (1475456) = 161bp at 82.0% intergenic  
 345380 (1475802) to 345702 (1476124) = 323bp at 88.9% intergenic  
 1105674 (1471631) to 1105865 (1471822) = 192bp at 86.5% intergenic  
 1106098 (1472072) to 1106236 (1472210) = 139bp at 87.1% intergenic  
 1106257 (1472232) to 1106415 (1472390) = 159bp at 84.3% intergenic  
 1106422 (1472395) to 1106681 (1472655) = 262bp at 80.5% intergenic  
 1106721 (1472696) to 1106852 (1472828) = 133bp at 84.2% intergenic  
 1107581 (1473709) to 1107680 (1473808) = 100bp at 85.0% intergenic  
 1108204 (1474372) to 1108303 (1474471) = 101bp at 85.1% intergenic  
 1108996 (1475296) to 1109152 (1475456) = 161bp at 82.0% intergenic  
 1109499 (1475802) to 1109821 (1476124) = 323bp at 88.9% intergenic  
 3333075 (1476124) to 3333397 (1475802) = 323bp at 88.9% intergenic  
 3333744 (1475456) to 3333896 (1475302) = 155bp at 83.2% intergenic  
 3334593 (1474471) to 3334692 (1474372) = 101bp at 85.1% intergenic  
 3335216 (1473808) to 3335315 (1473709) = 100bp at 85.0% intergenic  
 3336044 (1472828) to 3336175 (1472696) = 133bp at 84.2% intergenic  
 3336215 (1472655) to 3336474 (1472395) = 262bp at 80.5% intergenic  
 3336481 (1472390) to 3336642 (1472229) = 162bp at 84.0% intergenic  
 3336650 (1472217) to 3336798 (1472072) = 149bp at 84.6% intergenic  
 3337031 (1471822) to 3337222 (1471631) = 192bp at 86.5% intergenic

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 AE000516 - (Cons. Id 95%)**

13869 (1475900) to 14028 (1476059) = 160bp at 95.0% intergenic  
 162495 (1475900) to 162654 (1476059) = 160bp at 95.0% intergenic  
 167633 (1475900) to 167792 (1476059) = 160bp at 95.0% intergenic  
 172781 (1475900) to 172940 (1476059) = 160bp at 95.0% intergenic  
 258848 (1475900) to 259007 (1476059) = 160bp at 95.0% intergenic  
 315051 (1475900) to 315210 (1476059) = 160bp at 95.0% intergenic  
 335202 (1475900) to 335361 (1476059) = 160bp at 95.0% intergenic  
 340340 (1475900) to 340499 (1476059) = 160bp at 95.0% intergenic  
 345478 (1475900) to 345637 (1476059) = 160bp at 95.0% intergenic  
 1109597 (1475900) to 1109756 (1476059) = 160bp at 95.0% intergenic  
 3333140 (1476059) to 3333299 (1475900) = 160bp at 95.0% intergenic

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Treponema pallidum* SS14 CP000805 - (Cons. Id 75%)**

10154 (231766) to 11239 (232854) = 1097bp at 76.8% intergenic  
 11420 (233149) to 11545 (233275) = 127bp at 73.2% intergenic  
 11573 (233304) to 11671 (233402) = 100bp at 75.0% intergenic  
 11795 (233544) to 12121 (233873) = 332bp at 76.2% intergenic  
 12337 (234088) to 12600 (234351) = 266bp at 73.7% intergenic  
 12675 (234431) to 12832 (234590) = 160bp at 74.4% intergenic  
 13032 (234794) to 13135 (234897) = 104bp at 77.9% intergenic  
 13153 (234920) to 13449 (235219) = 300bp at 78.3% intergenic  
 13598 (235368) to 14214 (235988) = 626bp at 80.8% intergenic  
 158544 (231505) to 158763 (231724) = 220bp at 80.9% intergenic  
 158780 (231766) to 159865 (232854) = 1097bp at 76.9% intergenic  
 160046 (233149) to 160171 (233275) = 127bp at 73.2% intergenic  
 160199 (233304) to 160297 (233402) = 100bp at 75.0% intergenic  
 160421 (233544) to 160747 (233873) = 332bp at 76.2% intergenic  
 160963 (234088) to 161226 (234351) = 266bp at 73.7% intergenic  
 161301 (234431) to 161458 (234590) = 160bp at 74.4% intergenic  
 161658 (234794) to 161761 (234897) = 104bp at 77.9% intergenic  
 161779 (234920) to 162075 (235219) = 300bp at 78.3% intergenic  
 162224 (235368) to 162840 (235988) = 626bp at 80.8% intergenic  
 163682 (231505) to 163901 (231724) = 220bp at 80.9% intergenic  
 163682 (279939) to 163901 (280158) = 220bp at 80.9% intergenic  
 163918 (231766) to 165003 (232854) = 1097bp at 76.8% intergenic  
 163918 (280200) to 165003 (281288) = 1097bp at 76.8% intergenic  
 165184 (233149) to 165309 (233275) = 127bp at 73.2% intergenic  
 165184 (281593) to 165309 (281719) = 127bp at 73.2% intergenic  
 165337 (233304) to 165435 (233402) = 100bp at 75.0% intergenic  
 165337 (281748) to 165435 (281846) = 100bp at 75.0% intergenic  
 165559 (233544) to 165885 (233873) = 332bp at 76.2% intergenic  
 165559 (281988) to 165885 (282317) = 332bp at 76.2% intergenic  
 166101 (234088) to 166364 (234351) = 266bp at 73.7% intergenic  
 166101 (282532) to 166364 (282795) = 266bp at 73.7% intergenic  
 166439 (234431) to 166596 (234590) = 160bp at 75.0% intergenic  
 166439 (282875) to 166596 (283034) = 160bp at 75.0% intergenic  
 166796 (234794) to 166899 (234897) = 104bp at 77.9% intergenic  
 166796 (283238) to 166899 (283341) = 104bp at 77.9% intergenic  
 166917 (234920) to 167213 (235219) = 300bp at 78.3% intergenic  
 166917 (283364) to 167213 (283663) = 300bp at 78.3% intergenic

167362 (235368) to 167978 (235988) = 626bp at 80.8% intergenic  
167362 (283812) to 167978 (284432) = 626bp at 80.8% intergenic  
168821 (231505) to 169040 (231724) = 220bp at 80.9% intergenic  
169057 (231766) to 170032 (232743) = 986bp at 77.2% intergenic  
170065 (232766) to 170135 (232836) = 71bp at 87.3% intergenic  
170332 (233149) to 170457 (233275) = 127bp at 73.2% intergenic  
170485 (233304) to 170583 (233402) = 100bp at 75.0% intergenic  
170707 (233544) to 171033 (233873) = 332bp at 76.2% intergenic  
171249 (234088) to 171512 (234351) = 266bp at 73.7% intergenic  
171587 (234431) to 171744 (234590) = 160bp at 75.0% intergenic  
171944 (234794) to 172047 (234897) = 104bp at 77.9% intergenic  
172065 (234920) to 172361 (235219) = 300bp at 78.3% intergenic  
172510 (235368) to 173126 (235988) = 626bp at 80.8% intergenic  
254897 (279939) to 255116 (280158) = 220bp at 80.9% intergenic  
255133 (280200) to 256218 (281288) = 1097bp at 76.8% intergenic  
256399 (281593) to 256524 (281719) = 127bp at 73.2% intergenic  
256552 (281748) to 256650 (281846) = 100bp at 75.0% intergenic  
256774 (281988) to 257100 (282317) = 332bp at 76.2% intergenic  
257316 (282532) to 257579 (282795) = 266bp at 73.7% intergenic  
257654 (282875) to 257811 (283034) = 160bp at 75.0% intergenic  
258011 (283238) to 258114 (283341) = 104bp at 77.9% intergenic  
258132 (283364) to 258428 (283663) = 300bp at 78.3% intergenic  
258577 (283812) to 259193 (284432) = 626bp at 80.8% intergenic  
311100 (231505) to 311319 (231724) = 220bp at 80.9% intergenic  
311336 (231766) to 312421 (232854) = 1097bp at 76.8% intergenic  
312602 (233149) to 312727 (233275) = 127bp at 73.2% intergenic  
312755 (233304) to 312853 (233402) = 100bp at 75.0% intergenic  
312977 (233544) to 313303 (233873) = 332bp at 76.2% intergenic  
313519 (234088) to 313782 (234351) = 266bp at 73.7% intergenic  
313857 (234431) to 314014 (234590) = 160bp at 75.0% intergenic  
314214 (234794) to 314317 (234897) = 104bp at 77.9% intergenic  
314335 (234920) to 314631 (235219) = 300bp at 78.3% intergenic  
314780 (235368) to 315396 (235988) = 626bp at 80.8% intergenic  
331251 (279939) to 331472 (280160) = 222bp at 80.2% intergenic  
331487 (280200) to 332572 (281288) = 1097bp at 76.8% intergenic  
332753 (281593) to 332878 (281719) = 127bp at 73.2% intergenic  
332906 (281748) to 333004 (281846) = 100bp at 75.0% intergenic  
333128 (281988) to 333355 (282214) = 229bp at 76.9% intergenic  
333348 (233763) to 333454 (233873) = 111bp at 76.6% intergenic  
333348 (282207) to 333454 (282317) = 111bp at 76.6% intergenic  
333670 (234088) to 333933 (234351) = 266bp at 73.7% intergenic  
334008 (234431) to 334113 (234538) = 108bp at 75.9% intergenic  
338266 (233544) to 338582 (233862) = 321bp at 75.7% intergenic  
338808 (234088) to 339062 (234341) = 256bp at 74.2% intergenic  
339146 (234431) to 339303 (234590) = 160bp at 75.0% intergenic  
339503 (234794) to 339606 (234897) = 104bp at 77.9% intergenic  
339624 (234920) to 339920 (235219) = 300bp at 78.3% intergenic  
340069 (235368) to 340685 (235988) = 626bp at 80.8% intergenic  
341528 (279939) to 341747 (280158) = 220bp at 80.9% intergenic  
341764 (280200) to 342832 (281270) = 1079bp at 77.2% intergenic  
343029 (281593) to 343154 (281719) = 127bp at 73.2% intergenic  
343182 (281748) to 343280 (281846) = 100bp at 75.0% intergenic  
343404 (281988) to 343730 (282317) = 332bp at 76.2% intergenic  
343946 (282532) to 344209 (282795) = 266bp at 73.7% intergenic  
344284 (282875) to 344441 (283034) = 160bp at 74.4% intergenic  
344641 (283238) to 344744 (283341) = 104bp at 77.9% intergenic  
344762 (283364) to 345058 (283663) = 300bp at 78.3% intergenic  
345207 (283812) to 345823 (284432) = 626bp at 80.8% intergenic  
577362 (552002) to 577461 (552101) = 100bp at 75.0% exon  
1098189 (77987) to 1098334 (77842) = 146bp at 71.9% exon

1105646 (231505) to 1105865 (231724) = 220bp at 80.9% intergenic  
 1105882 (231766) to 1106967 (232854) = 1097bp at 76.8% intergenic  
 1107148 (233149) to 1107273 (233275) = 127bp at 73.2% intergenic  
 1107301 (233304) to 1107399 (233402) = 100bp at 75.0% intergenic  
 1107523 (233544) to 1107849 (233873) = 332bp at 76.2% intergenic  
 1108065 (234088) to 1108328 (234351) = 266bp at 73.7% intergenic  
 1108403 (234431) to 1108560 (234590) = 160bp at 75.0% intergenic  
 1108760 (234794) to 1108863 (234897) = 104bp at 77.9% intergenic  
 1108881 (234920) to 1109177 (235219) = 300bp at 78.3% intergenic  
 1109326 (235368) to 1109942 (235988) = 626bp at 80.8% intergenic  
 1422234 (546752) to 1422358 (546628) = 125bp at 72.8% exon  
 1426040 (220485) to 1426163 (220611) = 127bp at 75.6% exon  
 1975725 (870426) to 1975843 (870308) = 119bp at 75.6% exon  
 2240024 (784498) to 2240122 (784596) = 100bp at 75.0% exon  
 2242774 (787376) to 2242877 (787479) = 104bp at 75.0% exon  
 2750308 (544981) to 2750405 (544884) = 98bp at 75.5% exon  
 2828432 (38578) to 2828538 (38472) = 107bp at 74.8% exon  
 3019877 (268034) to 3020026 (267885) = 150bp at 75.3% exon  
 3083078 (909859) to 3083197 (909740) = 120bp at 75.0% exon  
 3279268 (250054) to 3279374 (249948) = 107bp at 74.8% exon  
 3327954 (76415) to 3328101 (76562) = 148bp at 72.3% exon  
 3332954 (235988) to 3333570 (235368) = 626bp at 80.8% intergenic  
 3332954 (284432) to 3333570 (283812) = 626bp at 80.8% intergenic  
 3333719 (235219) to 3334015 (234920) = 300bp at 78.3% intergenic  
 3333719 (283663) to 3334015 (283364) = 300bp at 78.3% intergenic  
 3334033 (234897) to 3334136 (234794) = 104bp at 77.9% intergenic  
 3334033 (283341) to 3334136 (283238) = 104bp at 77.9% intergenic  
 3334336 (234590) to 3334493 (234431) = 160bp at 75.0% intergenic  
 3334336 (283034) to 3334493 (282875) = 160bp at 75.0% intergenic  
 3334568 (234351) to 3334831 (234088) = 266bp at 73.7% intergenic  
 3334568 (282795) to 3334831 (282532) = 266bp at 73.7% intergenic  
 3335047 (233873) to 3335373 (233544) = 332bp at 76.2% intergenic  
 3335047 (282317) to 3335373 (281988) = 332bp at 76.2% intergenic  
 3335497 (233402) to 3335595 (233304) = 100bp at 75.0% intergenic  
 3335497 (281846) to 3335595 (281748) = 100bp at 75.0% intergenic  
 3335626 (233273) to 3335748 (233149) = 125bp at 72.8% intergenic  
 3335626 (281717) to 3335748 (281593) = 125bp at 72.8% intergenic  
 3335929 (232854) to 3337014 (231766) = 1097bp at 76.8% intergenic  
 3335929 (281288) to 3337014 (280200) = 1097bp at 76.8% intergenic  
 3337031 (231724) to 3337250 (231505) = 220bp at 80.9% intergenic  
 3337031 (280158) to 3337250 (279939) = 220bp at 80.9% intergenic  
 3430633 (62297) to 3430838 (62502) = 206bp at 75.2% exon  
 3430936 (62600) to 3431039 (62703) = 104bp at 75.0% exon  
 3450969 (666116) to 3451068 (666215) = 100bp at 75.0% exon

**Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X  
*Treponema pallidum* SS14 CP000805 - (Cons. Id 85%)**

10397 (232010) to 10496 (232109) = 100bp at 85.0% intergenic  
 10540 (232149) to 10674 (232283) = 135bp at 85.2% intergenic  
 10822 (232433) to 10919 (232530) = 98bp at 85.7% intergenic  
 10986 (232598) to 11089 (232701) = 104bp at 85.6% intergenic  
 11853 (233602) to 11949 (233699) = 98bp at 87.8% intergenic  
 13286 (235055) to 13421 (235191) = 137bp at 89.1% intergenic  
 13812 (235582) to 14194 (235965) = 384bp at 86.5% intergenic  
 158559 (231520) to 158715 (231676) = 157bp at 84.7% intergenic

159023 (232010) to 159122 (232109) = 100bp at 85.0% intergenic  
 159166 (232149) to 159300 (232283) = 135bp at 85.2% intergenic  
 159448 (232433) to 159545 (232530) = 98bp at 85.7% intergenic  
 159612 (232598) to 159715 (232701) = 104bp at 85.6% intergenic  
 160479 (233602) to 160575 (233699) = 98bp at 87.8% intergenic  
 161912 (235055) to 162047 (235191) = 137bp at 89.1% intergenic  
 162438 (235582) to 162820 (235965) = 384bp at 86.5% intergenic  
 163697 (231520) to 163853 (231676) = 157bp at 84.7% intergenic  
 163697 (279954) to 163853 (280110) = 157bp at 84.7% intergenic  
 164161 (232010) to 164260 (232109) = 100bp at 85.0% intergenic  
 164161 (280444) to 164260 (280543) = 100bp at 85.0% intergenic  
 164304 (232149) to 164438 (232283) = 135bp at 85.2% intergenic  
 164304 (280583) to 164438 (280717) = 135bp at 85.2% intergenic  
 164586 (232433) to 164683 (232530) = 98bp at 85.7% intergenic  
 164586 (280867) to 164683 (280964) = 98bp at 85.7% intergenic  
 164750 (232598) to 164853 (232701) = 104bp at 85.6% intergenic  
 164750 (281032) to 164853 (281135) = 104bp at 85.6% intergenic  
 165617 (233602) to 165713 (233699) = 98bp at 87.8% intergenic  
 165617 (282046) to 165713 (282143) = 98bp at 87.8% intergenic  
 167050 (235055) to 167185 (235191) = 137bp at 89.1% intergenic  
 167050 (283499) to 167185 (283635) = 137bp at 89.1% intergenic  
 167576 (235582) to 167958 (235965) = 384bp at 86.5% intergenic  
 167576 (284026) to 167958 (284409) = 384bp at 86.5% intergenic  
 168836 (231520) to 168992 (231676) = 157bp at 84.7% intergenic  
 169300 (232010) to 169399 (232109) = 100bp at 85.0% intergenic  
 169443 (232149) to 169577 (232283) = 135bp at 85.2% intergenic  
 169725 (232433) to 169822 (232530) = 98bp at 85.7% intergenic  
 169889 (232598) to 169992 (232701) = 104bp at 85.6% intergenic  
 170765 (233602) to 170861 (233699) = 98bp at 87.8% intergenic  
 172198 (235055) to 172333 (235191) = 137bp at 89.1% intergenic  
 172724 (235582) to 173106 (235965) = 384bp at 86.5% intergenic  
 254912 (279954) to 255068 (280110) = 157bp at 84.7% intergenic  
 255376 (280444) to 255475 (280543) = 100bp at 85.0% intergenic  
 255519 (280583) to 255653 (280717) = 135bp at 85.2% intergenic  
 255801 (280867) to 255898 (280964) = 98bp at 85.7% intergenic  
 255965 (281032) to 256068 (281135) = 104bp at 85.6% intergenic  
 256832 (282046) to 256928 (282143) = 98bp at 87.8% intergenic  
 258265 (283499) to 258400 (283635) = 137bp at 89.1% intergenic  
 258791 (284026) to 259173 (284409) = 384bp at 86.5% intergenic  
 311115 (231520) to 311271 (231676) = 157bp at 84.7% intergenic  
 311579 (232010) to 311678 (232109) = 100bp at 85.0% intergenic  
 311722 (232149) to 311856 (232283) = 135bp at 85.2% intergenic  
 312004 (232433) to 312101 (232530) = 98bp at 85.7% intergenic  
 312168 (232598) to 312271 (232701) = 104bp at 85.6% intergenic  
 313035 (233602) to 313131 (233699) = 98bp at 87.8% intergenic  
 314468 (235055) to 314603 (235191) = 137bp at 89.1% intergenic  
 314994 (235582) to 315376 (235965) = 384bp at 86.5% intergenic  
 331266 (279954) to 331420 (280108) = 155bp at 84.5% intergenic  
 331730 (280444) to 331829 (280543) = 100bp at 85.0% intergenic  
 331873 (280583) to 332007 (280717) = 135bp at 85.2% intergenic  
 332155 (280867) to 332252 (280964) = 98bp at 85.7% intergenic  
 332319 (281032) to 332422 (281135) = 104bp at 85.6% intergenic  
 333186 (282046) to 333282 (282143) = 98bp at 87.8% intergenic  
 338324 (233602) to 338420 (233699) = 98bp at 87.8% intergenic  
 339757 (235055) to 339892 (235191) = 137bp at 89.1% intergenic  
 340283 (235582) to 340665 (235965) = 384bp at 86.5% intergenic  
 341543 (279954) to 341699 (280110) = 157bp at 84.7% intergenic  
 342007 (280444) to 342106 (280543) = 100bp at 85.0% intergenic  
 342150 (280583) to 342284 (280717) = 135bp at 85.2% intergenic  
 342432 (280867) to 342529 (280964) = 98bp at 85.7% intergenic

342596 (281032) to 342699 (281135) = 104bp at 85.6% intergenic  
343462 (282046) to 343558 (282143) = 98bp at 87.8% intergenic  
344895 (283499) to 345030 (283635) = 137bp at 89.1% intergenic  
345421 (284026) to 345803 (284409) = 384bp at 86.5% intergenic  
1105661 (231520) to 1105817 (231676) = 157bp at 84.7% intergenic  
1106125 (232010) to 1106224 (232109) = 100bp at 85.0% intergenic  
1106268 (232149) to 1106402 (232283) = 135bp at 85.2% intergenic  
1106550 (232433) to 1106647 (232530) = 98bp at 85.7% intergenic  
1106714 (232598) to 1106817 (232701) = 104bp at 85.6% intergenic  
1107581 (233602) to 1107677 (233699) = 98bp at 87.8% intergenic  
1109014 (235055) to 1109149 (235191) = 137bp at 89.1% intergenic  
1109540 (235582) to 1109922 (235965) = 384bp at 86.5% intergenic  
3332974 (235965) to 3333356 (235582) = 384bp at 86.5% intergenic  
3332974 (284409) to 3333356 (284026) = 384bp at 86.5% intergenic  
3333747 (235191) to 3333882 (235055) = 137bp at 89.1% intergenic  
3333747 (283635) to 3333882 (283499) = 137bp at 89.1% intergenic  
3335219 (233699) to 3335315 (233602) = 98bp at 87.8% intergenic  
3335219 (282143) to 3335315 (282046) = 98bp at 87.8% intergenic  
3336079 (232701) to 3336182 (232598) = 104bp at 85.6% intergenic  
3336079 (281135) to 3336182 (281032) = 104bp at 85.6% intergenic  
3336249 (232530) to 3336346 (232433) = 98bp at 85.7% intergenic  
3336249 (280964) to 3336346 (280867) = 98bp at 85.7% intergenic  
3336494 (232283) to 3336628 (232149) = 135bp at 85.2% intergenic  
3336494 (280717) to 3336628 (280583) = 135bp at 85.2% intergenic  
3336672 (232109) to 3336771 (232010) = 100bp at 85.0% intergenic  
3336672 (280543) to 3336771 (280444) = 100bp at 85.0% intergenic  
3337079 (231676) to 3337235 (231520) = 157bp at 84.7% intergenic  
3337079 (280110) to 3337235 (279954) = 157bp at 84.7% intergenic

### **Conserved Windows - *C. acetobutylicum* ATCC 824 AE001437 X *Treponema pallidum* SS14 CP000805 - (Cons. Id 95%)**

13286 (235055) to 13400 (235170) = 116bp at 94.0% intergenic  
161912 (235055) to 162026 (235170) = 116bp at 94.0% intergenic  
167050 (235055) to 167164 (235170) = 116bp at 94.0% intergenic  
167050 (283499) to 167164 (283614) = 116bp at 94.0% intergenic  
172198 (235055) to 172312 (235170) = 116bp at 94.0% intergenic  
258265 (283499) to 258379 (283614) = 116bp at 94.0% intergenic  
314468 (235055) to 314582 (235170) = 116bp at 94.0% intergenic  
339757 (235055) to 339871 (235170) = 116bp at 94.0% intergenic  
344895 (283499) to 345009 (283614) = 116bp at 94.0% intergenic  
1109014 (235055) to 1109128 (235170) = 116bp at 94.0% intergenic  
3333768 (235170) to 3333882 (235055) = 116bp at 94.0% intergenic  
3333768 (283614) to 3333882 (283499) = 116bp at 94.0% intergenic  
3333765 (435555) to 3333891 (435681) = 127bp at 93.7% intergenic



## 10. APÊNDICE IV

### 10.1. ANÁLISE DE ENGENHARIA METABÓLICA – RESTRIÇÕES DO MODELO EM ESCALA GENÔMICA

---

%%%

OBJECTIVE FUNCTION

%%%

maxZ

BIOMASS

%%%

UPPER AND LOWER BOUNDS

%%%

MAX % UPPER BOUNDS

%%%

R001 = 8.72		R026 = 1000
R002 = 0		R027 = 0
R003 = 0		R028 = 1000
R004 = 0		R029 = 1000
R005 = 0		R030 = 0
R006 = 0		R031 = 0
R007 = 0		R032 = 0
R008 = 0		R033 = 0
R009 = 0		R034 = 0
R010 = 0		R035 = 0
R011 = 0		R036 = 0
R012 = 0		R037 = 0
R013 = 0		R038 = 0
R014 = -10		R039 = 0
R015 = -1		R040 = 0
R016 = 1000		R041 = 0
R017 = 0		R042 = 0
R018 = 0		R043 = 0
R019 = 0		R044 = 0
R020 = 0		R045 = 0
R021 = 0		R046 = 0
R022 = 1000		R047 = 0
R023 = 1000		R048 = 0
R024 = 0		R049 = 0
R025 = 0		R050 = 0

# APÊNDICE IV

---

R051	=	1000	R111	=	1000
R052	=	0	R112	=	0
R053	=	1000	R113	=	1000
R054	=	0	R114	=	5
R055	=	1000	R115	=	0
R056	=	0	R116	=	1000
R057	=	1000	R117	=	1000
R058	=	0	R118	=	1000
R059	=	0	R119	=	100
R060	=	0	R120	=	0
R061	=	1000	R121	=	0
R062	=	0	R122	=	0
R063	=	1000	R123	=	1000
R064	=	1000	R124	=	0
R065	=	1000	R125	=	1000
R066	=	1000	R126	=	1000
R067	=	1000	R127	=	1000
R068	=	1000	R128	=	1000
R069	=	1000	R129	=	1000
R070	=	0	R130	=	1
R071	=	0	R131	=	1000
R072	=	0	R132	=	1000
R073	=	1000	R133	=	1000
R074	=	0	R134	=	0
R075	=	1000	R135	=	0
R076	=	1000	R136	=	0
R077	=	1000	R137	=	1000
R078	=	1000	R138	=	1000
R079	=	1000	R139	=	0
R080	=	1000	R140	=	1000
R081	=	1000	R141	=	1000
R082	=	100	R142	=	1000
R083	=	100	R143	=	1000
R084	=	1000	R144	=	1000
R085	=	1000	R145	=	1000
R086	=	1000	R146	=	1000
R087	=	1000	R147	=	1000
R088	=	1000	R148	=	10
R089	=	1000	R149	=	1000
R090	=	0	R150	=	1000
R091	=	0	R151	=	1000
R092	=	1000	R152	=	1000
R093	=	1000	R153	=	1000
R094	=	1000	R154	=	0
R095	=	0	R155	=	1000
R096	=	0	R156	=	1000
R097	=	0	R157	=	1000
R098	=	0	R158	=	1000
R099	=	0	R159	=	1000
R100	=	0	R160	=	0
R101	=	50	R161	=	0
R102	=	0	R162	=	0
R103	=	100	R163	=	1000
R104	=	1000	R164	=	1
R105	=	1000	R165	=	0
R106	=	0	R166	=	0
R107	=	1000	R167	=	1000
R108	=	0	R168	=	1
R109	=	0	R169	=	1
R110	=	50	R170	=	1

R171	=	0	R231	=	0.1
R172	=	0	R232	=	1
R173	=	0	R233	=	1
R174	=	0	R234	=	1000
R175	=	0	R235	=	1000
R176	=	0	R236	=	0
R177	=	0	R237	=	0
R178	=	0	R238	=	0
R179	=	0	R239	=	0
R180	=	1000	R240	=	0
R181	=	0	R241	=	0
R182	=	1000	R242	=	1000
R183	=	1000	R243	=	1000
R184	=	0	R244	=	0
R185	=	0	R245	=	1
R186	=	1000	R246	=	1000
R187	=	0	R247	=	1000
R188	=	50	R248	=	1000
R189	=	0	R249	=	1000
R190	=	10	R250	=	1
R191	=	0	R251	=	1000
R192	=	100	R252	=	1000
R193	=	0	R253	=	1000
R194	=	0.1	R254	=	1000
R195	=	1000	R255	=	1000
R196	=	1000	R256	=	1000
R197	=	0	R257	=	0
R198	=	10	R258	=	1000
R199	=	0	R259	=	1000
R200	=	1000	R260	=	1000
R201	=	1000	R261	=	1000
R202	=	1000	R262	=	1000
R203	=	1000	R263	=	0
R204	=	20	R264	=	1000
R205	=	1000	R265	=	1000
R206	=	10	R266	=	0
R207	=	1000	R267	=	0
R208	=	1000	R268	=	1000
R209	=	1000	R269	=	1000
R210	=	1000	R270	=	1000
R211	=	0	R271	=	1000
R212	=	0.3	R272	=	1000
R213	=	0	R273	=	1000
R214	=	1000	R274	=	1000
R215	=	1	R275	=	0
R216	=	1000	R276	=	1000
R217	=	1000	R277	=	1000
R218	=	0	R278	=	1000
R219	=	1000	R279	=	1000
R220	=	1000	R280	=	1000
R221	=	1000	R281	=	0
R222	=	5	R282	=	1000
R223	=	1000	R283	=	1000
R224	=	0	R284	=	1000
R225	=	0	R285	=	0
R226	=	0	R286	=	1000
R227	=	0	R287	=	1000
R228	=	1000	R288	=	1000
R229	=	0	R289	=	1
R230	=	0	R290	=	1000

# APÊNDICE IV

---

R291	=	1000	R351	=	0.1
R292	=	1000	R352	=	0
R293	=	1000	R353	=	0.1
R294	=	1000	R354	=	0.1
R295	=	1000	R355	=	0
R296	=	1000	R356	=	0.1
R297	=	1000	R357	=	0
R298	=	0	R358	=	0.1
R299	=	1000	R359	=	0.1
R300	=	1000	R360	=	0
R301	=	0	R361	=	0.1
R302	=	0	R362	=	0
R303	=	0	R363	=	0
R304	=	1000	R364	=	0
R305	=	1000	R365	=	0
R306	=	1000	R366	=	1000
R307	=	1000	R367	=	0.1
R308	=	1000	R368	=	0
R309	=	0	R369	=	0.1
R310	=	10	R370	=	0.1
R311	=	0.1	R371	=	0
R312	=	1	R372	=	0
R313	=	0.1	R373	=	0
R314	=	0.1	R374	=	1
R315	=	0.1	R375	=	0
R316	=	0.1	R376	=	0
R317	=	0.1	R377	=	1000
R318	=	1	R378	=	1
R319	=	0.1	R379	=	0
R320	=	10	R380	=	0
R321	=	10	R381	=	1000
R322	=	0.1	R382	=	0
R323	=	0.1	R383	=	0
R324	=	0.1	R384	=	1000
R325	=	0	R385	=	1000
R326	=	0.1	R386	=	1000
R327	=	0.1	R387	=	0
R328	=	0.1	R388	=	1000
R329	=	0.1	R389	=	0
R330	=	0.1	R390	=	0
R331	=	0.1	R391	=	0
R332	=	0.1	R392	=	1000
R333	=	0.1	R393	=	1000
R334	=	0.1	R394	=	0
R335	=	0.1	R395	=	0
R336	=	0	R396	=	0
R337	=	0	R397	=	0
R338	=	10	R398	=	0
R339	=	0	R399	=	0
R340	=	0.1	R400	=	0
R341	=	0.1	R401	=	1000
R342	=	0.1	R402	=	1000
R343	=	0	R403	=	1000
R344	=	0.1	R404	=	0
R345	=	0	R405	=	1000
R346	=	0	R406	=	0
R347	=	0	R407	=	1000
R348	=	0	R408	=	1000
R349	=	10	R409	=	1000
R350	=	1000	R410	=	0

R411	=	0	R457	=	1
R412	=	0	R458	=	1000
R413	=	1000	R459	=	0
R414	=	1	R460	=	0
R415	=	0	R461	=	0
R416	=	1000	R462	=	0
R417	=	0	R463	=	0
R418	=	1	R464	=	0
R419	=	0	R465	=	0
R420	=	1000	R466	=	0
R421	=	1	R467	=	0
R422	=	0	R468	=	0
R423	=	1	R469	=	0
R424	=	1	R470	=	0
R425	=	1	R471	=	0
R426	=	1	R472	=	0
R427	=	0	R473	=	0
R428	=	0	R474	=	0
R429	=	0	R475	=	0
R430	=	0	R476	=	0
R431	=	1000	R477	=	0
R432	=	1000	R478	=	0
R433	=	1000	R479	=	0
R434	=	0	R480	=	0
R435	=	1000	R481	=	0
R436	=	1000	R482	=	0
R437	=	1000	R483	=	0
R438	=	0	R484	=	0
R439	=	0	R485	=	0
R440	=	5	R486	=	0
R441	=	1000	R487	=	0
R442	=	1000	R488	=	0
R443	=	1000	R489	=	0
R444	=	1000	R490	=	0
R445	=	1000	R491	=	0
R446	=	1000	R492	=	0
R447	=	1000	R493	=	0
R448	=	1000	R494	=	1000
R449	=	0	R495	=	1000
R450	=	1000	R496	=	1000
R451	=	1	R497	=	1000
R452	=	0	R498	=	1000
R453	=	1	R499	=	1000
R454	=	1	R500	=	1000
R455	=	1	R501	=	1000
R456	=	1	R502	=	1000

# APÊNDICE IV

---

## MIN % LOWER BOUNDS

%%%

R001 = 8.72		R048 = 0
R002 = 0		R049 = 0
R003 = 0		R050 = 0
R004 = 0		R051 = -1000
R005 = 0		R052 = 0
R006 = 0		R053 = -1000
R007 = 0		R054 = 0
R008 = 0		R055 = -1000
R001 = -1000		R056 = 0
R002 = -1000		R057 = -1000
R003 = -1000		R058 = 0
R004 = -1000		R059 = 0
R005 = -1000		R060 = 0
R006 = -1000		R061 = -1000
R007 = 0		R062 = 0
R008 = -1000		R063 = -1000
R009 = 0		R064 = -1000
R010 = 0		R065 = -1000
R011 = 0		R066 = -1000
R012 = 0		R067 = -1000
R013 = 0		R068 = -1000
R014 = 10		R069 = -1000
R015 = 1		R070 = 0
R016 = -1000		R071 = 0
R017 = 0		R072 = 0
R018 = 0		R073 = -1000
R019 = 0		R074 = 0
R020 = 0		R075 = -1000
R021 = 0		R076 = -1000
R022 = -1000		R077 = -1000
R023 = -1000		R078 = -1000
R024 = 0		R079 = -1000
R025 = 0		R080 = -1000
R026 = -1000		R081 = -1000
R027 = 0		R082 = -100
R028 = -1000		R083 = -100
R029 = -1000		R084 = -1000
R030 = 0		R085 = -1000
R031 = 0		R086 = -1000
R032 = 0		R087 = -1000
R033 = 0		R088 = -1000
R034 = 0		R089 = -1000
R035 = 0		R090 = 0
R036 = 0		R091 = 0
R037 = 0		R092 = -1000
R038 = 0		R093 = -1000
R039 = 0		R094 = -1000
R040 = 0		R095 = 0
R041 = 0		R096 = 0
R042 = 0		R097 = 0
R043 = 0		R098 = 0
R044 = 0		R099 = 0
R045 = 0		R100 = 0
R046 = 0		R101 = -50
R047 = 0		R102 = 0

R103	=	-100	R163	=	-1000
R104	=	-1000	R164	=	-1
R105	=	-1000	R165	=	0
R106	=	0	R166	=	0
R107	=	-1000	R167	=	-1000
R108	=	0	R168	=	-1
R109	=	0	R169	=	-1
R110	=	-50	R170	=	-1
R111	=	-1000	R171	=	0
R112	=	0	R172	=	0
R113	=	-1000	R173	=	0
R114	=	-5	R174	=	0
R115	=	0	R175	=	0
R116	=	-1000	R176	=	0
R117	=	-1000	R177	=	0
R118	=	-1000	R178	=	0
R119	=	-100	R179	=	0
R120	=	0	R180	=	-1000
R121	=	0	R181	=	0
R122	=	0	R182	=	-1000
R123	=	-1000	R183	=	-1000
R124	=	0	R184	=	0
R125	=	-1000	R185	=	0
R126	=	-1000	R186	=	-1000
R127	=	-1000	R187	=	0
R128	=	-1000	R188	=	-50
R129	=	-1000	R189	=	0
R130	=	-1	R190	=	-10
R131	=	-1000	R191	=	0
R132	=	-1000	R192	=	-100
R133	=	-1000	R193	=	0
R134	=	0	R194	=	-0.1
R135	=	0	R195	=	-1000
R136	=	0	R196	=	-1000
R137	=	-1000	R197	=	0
R138	=	-1000	R198	=	-10
R139	=	0	R199	=	0
R140	=	-1000	R200	=	-1000
R141	=	-1000	R201	=	-1000
R142	=	-1000	R202	=	-1000
R143	=	-1000	R203	=	-1000
R144	=	-1000	R204	=	-20
R145	=	-1000	R205	=	-1000
R146	=	-1000	R206	=	-10
R147	=	-1000	R207	=	-1000
R148	=	-10	R208	=	-1000
R149	=	-1000	R209	=	-1000
R150	=	-1000	R210	=	-1000
R151	=	-1000	R211	=	0
R152	=	-1000	R212	=	-0.3
R153	=	-1000	R213	=	0
R154	=	0	R214	=	-1000
R155	=	-1000	R215	=	-1
R156	=	-1000	R216	=	-1000
R157	=	-1000	R217	=	-1000
R158	=	-1000	R218	=	0
R159	=	-1000	R219	=	-1000
R160	=	0	R220	=	-1000
R161	=	0	R221	=	-1000
R162	=	0	R222	=	-5

# APÊNDICE III

---

R223	=	-1000	R283	=	-1000
R224	=	0	R284	=	-1000
R225	=	0	R285	=	0
R226	=	0	R286	=	-1000
R227	=	0	R287	=	-1000
R228	=	-1000	R288	=	-1000
R229	=	0	R289	=	-1
R230	=	0	R290	=	-1000
R231	=	-0.1	R291	=	-1000
R232	=	-1	R292	=	-1000
R233	=	-1	R293	=	-1000
R234	=	-1000	R294	=	-1000
R235	=	-1000	R295	=	-1000
R236	=	0	R296	=	-1000
R237	=	0	R297	=	-1000
R238	=	0	R298	=	0
R239	=	0	R299	=	-1000
R240	=	0	R300	=	-1000
R241	=	0	R301	=	0
R242	=	-1000	R302	=	0
R243	=	-1000	R303	=	0
R244	=	0	R304	=	-1000
R245	=	-1	R305	=	-1000
R246	=	-1000	R306	=	-1000
R247	=	-1000	R307	=	-1000
R248	=	-1000	R308	=	-1000
R249	=	-1000	R309	=	0
R250	=	-1	R310	=	-10
R251	=	-1000	R311	=	-0.1
R252	=	-1000	R312	=	-1
R253	=	-1000	R313	=	-0.1
R254	=	-1000	R314	=	-0.1
R255	=	-1000	R315	=	-0.1
R256	=	-1000	R316	=	-0.1
R257	=	0	R317	=	-0.1
R258	=	-1000	R318	=	-1
R259	=	-1000	R319	=	-0.1
R260	=	-1000	R320	=	-10
R261	=	-1000	R321	=	-10
R262	=	-1000	R322	=	-0.1
R263	=	0	R323	=	-0.1
R264	=	-1000	R324	=	-0.1
R265	=	-1000	R325	=	0
R266	=	0	R326	=	-0.1
R267	=	0	R327	=	-0.1
R268	=	-1000	R328	=	-0.1
R269	=	-1000	R329	=	-0.1
R270	=	-1000	R330	=	-0.1
R271	=	-1000	R331	=	-0.1
R272	=	-1000	R332	=	-0.1
R273	=	-1000	R333	=	-0.1
R274	=	-1000	R334	=	-0.1
R275	=	0	R335	=	-0.1
R276	=	-1000	R336	=	0
R277	=	-1000	R337	=	0
R278	=	-1000	R338	=	-10
R279	=	-1000	R339	=	0
R280	=	-1000	R340	=	-0.1
R281	=	0	R341	=	-0.1
R282	=	-1000	R342	=	-0.1



R343	=	0	R403	=	-1000
R344	=	-0.1	R404	=	0
R345	=	0	R405	=	-1000
R346	=	0	R406	=	0
R347	=	0	R407	=	-1000
R348	=	0	R408	=	-1000
R349	=	-10	R409	=	-1000
R350	=	-1000	R410	=	0
R351	=	-0.1	R411	=	0
R352	=	0	R412	=	0
R353	=	-0.1	R413	=	-1000
R354	=	-0.1	R414	=	-1
R355	=	0	R415	=	0
R356	=	-0.1	R416	=	-1000
R357	=	0	R417	=	0
R358	=	-0.1	R418	=	-1
R359	=	-0.1	R419	=	0
R360	=	0	R420	=	-1000
R361	=	-0.1	R421	=	-1
R362	=	0	R422	=	0
R363	=	0	R423	=	-1
R364	=	0	R424	=	-1
R365	=	0	R425	=	-1
R366	=	-1000	R426	=	-1
R367	=	-0.1	R427	=	0
R368	=	0	R428	=	0
R369	=	-0.1	R429	=	0
R370	=	-0.1	R430	=	0
R371	=	0	R431	=	-1000
R372	=	0	R432	=	-1000
R373	=	0	R433	=	-1000
R374	=	-1	R434	=	0
R375	=	0	R435	=	-1000
R376	=	0	R436	=	-1000
R377	=	-1000	R437	=	-1000
R378	=	-1	R438	=	0
R379	=	0	R439	=	0
R380	=	0	R440	=	-5
R381	=	-1000	R441	=	-1000
R382	=	0	R442	=	-1000
R383	=	0	R443	=	-1000
R384	=	-1000	R444	=	-1000
R385	=	-1000	R445	=	-1000
R386	=	-1000	R446	=	-1000
R387	=	0	R447	=	-1000
R388	=	-1000	R448	=	-1000
R389	=	0	R449	=	0
R390	=	0	R450	=	-1000
R391	=	0	R451	=	-1
R392	=	-1000	R452	=	0
R393	=	-1000	R453	=	-1
R394	=	0	R454	=	-1
R395	=	0	R455	=	-1
R396	=	0	R456	=	-1
R397	=	0	R457	=	-1
R398	=	0	R458	=	-1000
R399	=	0	R459	=	0
R400	=	0	R460	=	0
R401	=	-1000	R461	=	0
R402	=	-1000	R462	=	0

# APÊNDICE III

---

R463	=	0	R483	=	0
R464	=	0	R484	=	0
R465	=	0	R485	=	0
R466	=	0	R486	=	0
R467	=	0	R487	=	0
R468	=	0	R488	=	0
R469	=	0	R489	=	0
R470	=	0	R490	=	0
R471	=	0	R491	=	0
R472	=	0	R492	=	0
R473	=	0	R493	=	0
R474	=	0	R494	=	-1000
R475	=	0	R495	=	-1000
R476	=	0	R496	=	-1000
R477	=	0	R497	=	-1000
R478	=	0	R498	=	-1000
R479	=	0	R499	=	-1000
R480	=	0	R500	=	-1000
R481	=	0	R501	=	-1000
R482	=	0	R502	=	-1000

%%%