AMANDA BILLIA FLORA

**DETECÇÃO E CLONAGEM DE GENES DE BIOSÍNTESE DE 1,3-
PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL EM *Klebsiella pneumoniae*
GLC29**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-
se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na
Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP
(BDTD)

São Paulo
2015

RESUMO

FLORA, A. B. **Detecção e clonagem de genes de biossíntese de 1,3-propanodiol a partir de glicerol em *Klebsiella pneumoniae* GLC29**. 2015. 196 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O biodiesel é produzido pela transesterificação dos óleos vegetais e, neste processo é gerado o glicerol como subproduto. O glicerol produzido pode ser utilizado como fonte de carbono em processos fermentativos, como o da produção de 1,3-propanodiol. O 1,3-propanodiol é uma molécula com alto valor econômico, e é aplicada na indústria como constituinte de solventes, lubrificantes e produção de policondensados tal como PTT (politrimetileno teraftalato), que pode ser reciclado. Muitos microrganismos conseguem consumir o glicerol transformando-o em 1,3-propanodiol, entre eles *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Clostridium*. Os genes que codificam as enzimas da via de produção de 1,3-propanodiol a partir do glicerol estão frequentemente organizados no agrupamento *dha*. O estudo de tais genes é necessário para aumentar e aperfeiçoar a produção do diol. O presente trabalho teve sucesso na caracterização dos genes relacionados à produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* (GLC29), detectando-os com sucesso, por técnica de PCR. Foi selecionado um clone de uma biblioteca genômica de *Klebsiella pneumoniae* GLC29 com base em PCR para detecção de genes do agrupamento *dha*, entretanto, esse clone abrigava genes da degradação de 1,2-propanodiol (agrupamento *pdu*), representando um falso positivo. A partir de PCR foi clonado o inserto *dha* e construído um plasmídeo abrigando os genes de síntese de 1,3-propanodiol. Outras alterações metabólicas foram realizadas na cepa que abriga o plasmídeo de produção, segundo resultado de estudo de modos elementares de funcionamento do metabolismo. Houve um aumento significativo de produção em cultivos em biorreator com controle de oxigênio dissolvido no meio de cultura.

Palavras-chave: 1,3-propanodiol. Glicerol. *Klebsiella pneumoniae*. Análise de fluxos metabólicos. Biodiesel. Biologia molecular.

ABSTRACT

FLORA, A. B. **Detection and cloning of 1,3-propanediol biosynthesis genes from glycerol in *Klebsiella pneumoniae* GLC29.** 2015. 196 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Biodiesel is produced by transesterification of vegetable oils and in this process glycerol is generated as a byproduct. The glycerol produced can be used as carbon source in fermentation processes such as the production of 1,3-propanediol. The 1,3-propanediol is a molecule with high economic value, and is applied in industry as a constituent of solvents, lubricants and polycondensates of production as PTT (polytrimethylene terephthalate), which can be recycled. Many microbes can consume the glycerol transforming it into 1,3-propanediol, including *Klebsiella*, *Clostridium* and *Citrobacter*. The genes encoding the enzymes of the 1,3-propanediol production pathway from glycerol are often organized in *dha* cluster. The study of such genes is required to increase and improve the diol production. This work succeeded in characterizing the genes related to the production of 1,3-propanediol from glycerol by a strain of *Klebsiella pneumoniae* (GLC29) by detecting them successfully by PCR technique. A clone was selected from a genomic library of *Klebsiella pneumoniae* GLC29 based on PCR for detection of the *dha* gene cluster, however, this clone harbored genes degradation of 1,2-propanediol (*pdu* cluster), representing a false positive. By PCR amplification, a insert including the *dha* genes was cloned a plasmid. Other metabolic alterations were performed in the strain harboring the production plasmid, according to the results of a study of the metabolism elementary modes. There was a significant increase of production in bioreactor cultures with oxygen control dissolved in the culture medium.

Keywords: 1,3-propanediol. Glycerol. *Klebsiella pneumoniae*. Metabolic flux analysis. Biodiesel. Molecular biology.

INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis são, atualmente, a fonte energética mais utilizada no mundo, tanto para atender aos transportes quanto para o funcionamento das indústrias. Com o aparecimento de mudanças climáticas, níveis de poluição altos, aumento da quantidade de lixo acumulado e o esgotamento de fontes energéticas não-renováveis, as pesquisas para o descobrimento e utilização de energias renováveis vêm crescendo.

O biodiesel, proveniente dos óleos vegetais, teve a sua produção intensificada nos últimos anos, pois atende a uma demanda cada vez maior por combustíveis não-fósseis. Ele consiste em uma fonte energética biodegradável, e que reduz consideravelmente a emissão de poluentes e toxinas para o meio ambiente, sendo uma opção para a substituição do diesel convencional. Durante a produção deste composto é realizada uma reação chamada transesterificação, que consiste na separação dos compostos que formam o triglicerídeo; separam-se as cadeias de carbono (ácidos graxos) do glicerol. As cadeias de carbono são destinadas à utilização energética e o glicerol é descartado como sub-produto do processo, e consiste cerca de 10% do montante final do que foi produzido.

O glicerol, proveniente do biodiesel, tornou-se um material competitivo em relação aos açúcares na produção de compostos químicos de interesse, isso porque ele pode ser utilizado como fonte de carbono para processos biotecnológicos, diminuindo custos. Uma forma de se empregar o glicerol é como fonte de carbono de cultivos microbiológicos, como a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO).

O 1,3-propanodiol é um composto orgânico da família dos dióis que pode ser aplicado para a produção de muitos químicos. Ele pode compor monômeros para a síntese de poliéteres, poliuretanos e poliésteres, como é o caso PTT (politrimetileno tereftalato). Também utilizado nas indústrias de cosméticos, têxtil e farmacêutica. Ele pode trazer propriedades específicas para solventes, resinas e também para produção de biocidas.

O 1,3-propanodiol pode ser produzido por métodos químicos e também biológicos. Ele é um dos compostos proveniente da fermentação do glicerol realizada por microrganismos. Dentre os microrganismos que fazem naturalmente este processo podemos citar principalmente cepas de *Clostridium*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* e *Enterobacter*.

Dentro da célula microbiana, o 1,3-PDO é utilizado como uma fonte de regeneração de coenzima NAD, proveniente da via oxidativa de produção energética. A síntese deste composto permite à célula atingir um equilíbrio redox.

Duas enzimas compõem a via metabólica de produção de 1,3-PDO. São elas: a glicerol desidratase, que desidrata o glicerol em 3-hidroxiopropanalaldeído e a 1,3-propanodiol desidrogenase (ou 1,3-propanodiol oxidorreductase), que oxida o 3-hidroxiopropanalaldeído em 1,3-propanodiol, com a utilização de um NADH. Os genes relacionados a essa via estão em um agrupamento chamado *dha*.

O estudo e a utilização de técnicas de biologia molecular para a produção do 1,3-propanodiol têm como objetivo aumentar a produção e melhorar as cepas que realizam essa conversão.

O primeiro ponto do processo que pode ser melhorado é a escolha de uma cepa receptora dos genes que melhor se adapta a um processo industrial. A *Escherichia coli* é uma boa alternativa, pois é extensamente estudada, tem o seu genoma sequenciado e têm-se descritas muitas técnicas de engenharia genética envolvendo vetores e genes especificamente desenvolvidos para isso.

Outro ponto que pode ser desenvolvido é a alteração das vias metabólicas da *E.coli* hospedeira para favorecer a produção do 1,3-PDO usando técnicas de biologia molecular.

CONCLUSÕES

A expressão do agrupamento *dha* de *Klebsiella pneumoniae* GLC29 em linhagens de *E. coli* conduz a produção de 1,3-propanodiol.

Observou-se um aumento na produção de 1,3-propanodiol pela cepa mutante desenvolvida neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, n. 215, p. 403-410, 1990.
- ANAND, P.; SAXENA, R. K. A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. **New biotechnology**, 2011.
- ASHOK, S. et al. Development of recombinant *Klebsiella 28neumonia* $\Delta dhaT$ strain for the co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. **Applied Microbiology Biotechnology**, n.90, p.1253-1265, 2011.
- BÄCHLER, C. et al. *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. **The European Molecular Biology Organization Journal**, n.24, p.283-293, 2005.
- BARBIRATO, F. et al. 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**, n. 7, p. 281-289, 1998.
- BARBIRATO, F. et al. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. **Applied Microbiology Biotechnology**, n. 43, p.786-793, 1995.
- BARBIRATO, F.; BORIES, A. Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions. **Research Microbiology**, n.148, p. 475-484, 1997.
- BIEBL, H. et al. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 52, p. 289-297, 1999.
- BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n. 27, p. 18-26, 2001.
- BIEBL, H.; MARTEN, S. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol: use of cosubstrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 44, p. 15-19, 1995.
- BIELB, H. et al. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated *Clostridia*. **Applied Microbiology Biotechnology**, n.36, p.542-547, 1992.
- BIRNBOIM, H. C. e DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**, n.6, p. 1513–1523, 1979.
- BOBIK, T. A. et al. The propanediol utilization (pdu) operon of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B₁₂-dependent 1,2-propanediol degradation. **Journal of Bacteriology**, n. 19, v. 181, p. 5967-5975, 1999.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2003.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, N.72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Decreto 76.593 de 14 de novembro de 1975. Dispõe sobre a criação do programa Próálcool. **Diário Oficial da União** de 14 de novembro de 1975.

BRASIL. Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. **Diário Oficial da União** de 14 de janeiro de 2005.

BULLOCK, W. O.; FERNANDEZ, J. M.; SHORT, J. M. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. **BioTechniques**, n. 4, v. 5, p. 376-378, 1987.

CÁRDENAS, D. P. Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium sp.* Mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de 29neumonia. **Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.**, v. 35, n. 1, p. 120-137, 2006.

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Applied Microbiology Biotechnology**, n. 91, p. 101-112, 2011.

CHEN, Z.; LIU, H.; LIU, D. Metabolic pathway analysis of 1,3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumonia* by 29neumonia29on29g an endogenous NADPH-dependent alcohol dehydrogenase. **Biochemical Engineering Journal**, n.54, p.151-157, 2011.

CHENG, K-K. et al. 1,3-propanediol production by *Klebsiella 29neumonia* under different aeration strategies. **Biotechnology Letters**, n. 26, p. 911-915, 2004.

CHEREPANOV, P. P.; W WACKERNAGEL, W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Fip-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. **Gene**, n. 158, p. 9-14, 1995.

CHOTANI, G. The commercial production of chemicals using pathway engineering. **Biochimical Biophysics Acta**, n.1543, p. 434–55, 2000.

DABROWSKI, S. et al. 1,3-propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes of *dha* operon from *Clostridium butyricum* 2CR371.5 **Acta Biochim Polon**, n. 59, p. 357 – 361, 2012.

DANIEL, R.; BOENIGK, R.; GOTTSCHALK, G. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. **Journal of Bacteriology**, n.177, p.2151-2156, 1995.

DARBON, E. et al. Glycerol transport and phosphoenolpyruvate-dependent enzyme I- and Hpr-catalyzed phosphorylation of glycerol kinase in *Thermus flavus*. **Microbiology**, v. 145, p. 3205-3212, 1999.

DATSENKO, K. A.; WANNER B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6640-6645, 2000.

DEAN, A. M. e KOSHLAND, D. E. Kinetic mechanism of *Escherichia coli* Isocitrate dehydrogenase. **Biochemistry**, n.32, p. 9302-9309, 1993.

DECKWER, W.-D. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 16, p. 143-149, 1995.

FORAGE, R. G.; LIN, E. C. C. *dha* systems mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCBI 418. **Journal of Bacteriology**, n. 151, p. 591-599, 1982.

FOUTS, D. E. et al.; Complete Genome Sequence of the N₂-Fixing Broad Host Range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and Virulence Predictions Verified in Mice. **PLOS Genetics**, p. 1-18, v. 4, ed. 7, 2008.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M. et al. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol; physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DGI(Pspd5). **Applied Environmental Microbiology**, n. 72, p. 96-101, 2006.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n. 31, p. 442-446, 2004.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n. 32, p. 391-396, 2005.

GRANT, S. G. et al. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Vol. 87, p. 4645-4649, 1990.

HARTLEP, M. et al., Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 60, p. 60-66, 2002.

HELLER, K. B.; LIN, E. C. C.; WILSON, T.H. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 144, n.1, p. 274-278, 1980.

HEUER, H et al. Analysis of actinomycete communities by specific 30S rRNA detection of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p. 3233-3241, 1997.

HIEMATH, A.; KANNABIRAN, M.; RANGASWAMY, V. 1,3-propanediol production from crude glycerol from jatropha biodiesel process. **New Biotechnology**, v.28, n.1, p. 19-23, 2011.

HUANG, H.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.98, n.100, p.687-698, 2002.

IMADA, K. et al. Structure and quantum chemical analysis of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase: hydride transfer and co-factor specificity. **Proteins Structural Functional Bioinformatic.**, n. 70, p. 63-71, 2008

KOVACH, M. E. Et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, n. 166, p. 175-176, 1995.

LAKSHMANAN, M. et al. Cofactor modification analysis: a computational framework to identify cofactor specificity engineering targets for strain improvement. **J. Bioinform. Comput. Biol.**, n. 11, p. 1343006-1 – 1343006-19, 2013.

LANE, A. N. Solution conformation and dynamics of the octadeoxy-nucleotide d(CACTAGTG)₂: A multinuclear n.m.r. relaxation study. **Carbohydrate Research**, v. 221, p. 123-144, 1991.

LAPORTE, D. C. The Isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: regulation and enzymology. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 51, p. 14-18, 1993.

LARKIN, M. A. et al.; Clustal W and Clustal X version 2.0 **Bioinformatics**, n. 23, p. 2947-2948, 2007.

LIN, R. et al. Enhancement of 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* with fumarate addition. **Biotechnol Lett**, n. 27, p. 1755-1759, 2005

LINHART, C. e SHAMIR, R. The degenerate primer design problem: theory and applications. **Journal of computational biology**, v.12, n.4, p.431-456, 2005.

LOWRY, O. H. et al. The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in *Escherichia coli*. **The Journal of biological chemistry**, n. 246, p. 6511-6521, 1971.

LUERS, F. et al. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurium*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. **Microbiology Letters**, n.154, p.337-345, 1997.

MA, Z. et al. Expression of *dha* operon required for 1,3-PD formation in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Microbiol**, n. 60, p. 191-198, 2010.

MA, Z. et al. Production of 1,3-propanediol from glycerol by engineered *Escherichia coli* using a novel coexpression vector. **Afr J Biotechnol**, n. 8, p. 5500-5505, 2009.

MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. Enzymatic evidence for an involvement of pyruvate dehydrogenase in the anaerobic glycerol metabolism of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Biotechnology**, n. 56, p. 135-142, 1997a.

MENZEL, K.; ZENG, A.-P.; DECKWER, W.-D. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella 32neumonia*. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 20, p. 82-86, 1997b.

MU, Y. et al. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella 32neumonia* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnology Letters**, n.28, p. 1755-1759, 2006.

NAKAMURA, C. E.; WHITED, G. M. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. **Current Opinion in Biotechnology**, n.14, p.454-459, 2003.

NORRANDER, J.; KEMPE, T.; MESSING, J. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. **Gene**, n. 26, p. 101-106, 1983.

OLAVARRIA, K. **Impacto metabólico de la producción de NADH en la vía de las pentosas en *Escherichia coli***, 2012. 104 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular Celular e Neurociência) – Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago de Chile, 2012.

OLAVARRIA, K., VALDES, D. e CABRERA, R. The ccofactor preference of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* – modeling the physiological production of reduced cofactors. **FEBS Journal**, n. 279, p. 2296-2309, 2012.

OLD, R. M. e PRIMROSE S. B.; Principles of gene manipulation An introduction to genetic engineering. **Blackwell Science**, ed. 5, p. 183, cap. 10, 1994.

PAKRASI, H. B. Genetic analysis of the form and function of photosystem I and photosystem II. **Annu. Rev. Gen.**, n. 29, p. 755-776, 1995.

PETITDEMANGE, E. et al. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, n.15, p.498-502, 1995.

PFEIFFER, T. et al. Metatool: for studying metabolic networks. **Bioinformatics**, v.15, n.3, p.251-257, 1999.

PRZYSTALOWSKA, H. et al. 1,3-propanediol production by new recombinant *Escherichia coli* containing genes from pathogenic bacteria. **Microbiological research**, n. 171, p. 1-7, 2015.

PRZYSTALOWSKA, H.; LIPÍŃSKI, D.; SLOMSKI, R. Biotechnological conversion of glycerol from biofuels to 1,3-propanediol using *Escherichia coli*. **Acta Biochimica Polonica**, n. 1, p. 23-34, 2015.

QI, X. H. et al. Construction of a novel recombinant *Escherichia coli* strain capable of producing 1,3-propanediol. **Adv Mat Res**, n. 396-398, p. 2499-2502, 2011.

RAO, Z. et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* that produces 1,3-propanediol from D-glucose. **Journal of Applied Microbiology**, n. 105, p. 1768-1776, 2008.

RAYNAULD, C. et al. Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 100, p. 5010-5015, 2003.

REHMAN, A. et al. Growth and 1,3-propanediol production on pre-treated sunflower oil bio-diesel raw glycerol using a strict anaerobe *Clostridium butyricum*. **Current Research Bacteriology**, n.1, v.1, p.7-16, 2008.

ROCHA, R. C. S. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, n. 24, p. 427-431, 2008.

SAINT-AMANS, S. Et al. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. **Journal of Bacteriology**, n. 183, p. 1748-1754, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, ed.2, **New York: Cold Spring Harbor Lab. Press**, 1989

SAUER, U. et al. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, n.279, p. 6613-6619, 2004.

SAXENA, R. K. Et al. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, n. 27, p. 895-913, 2009.

SEIFERT, C. et al. Identification and expression of the genes and 33neumonia33on and characterization of the genes products involved in reactivation of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. **European Journal of Biochemistry**, n.268, p.2369-2378, 2001.

SEYFRIED, M.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. Cloning, sequencing and over expression of the genes encoding 33neumoni B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. **Journal of Bacteriology**, n.178, p.5793-5796, 1996.

SILVA, G. P. **Bioconversão do glicerol em 1,3-propanodiol pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* GLC29**. 2010. 139 f. Tese (Doutorado em Microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, n. 27, p. 30-39, 2009.

SKRALY, F. A.; LYTLE, B. L.; CAMERON, D. C. Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.1, p.98-105, 1998.

SOLANO, J. D. M. et al. Análisis bioinformático y predicción de genes em secuencias genómicas de *Clostridium* sp. IBUN22A. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. VIII, n. 1, p. 57-64, 2006.

STEPHANOPOULOS, N. G.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. **Metabolic engineering principles and methodologies**. San Diego: Academic Press, 1998. 725 p.

SUN, J. et al. Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. **Biotechnology Progress**, n.19, p. 263-272, 2003.

TANG, X. et al. Microbial Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1628-1634, 2009.

TONG, I.; LIAO, H. H.; CAMERON, D. C. 1,3-propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae dha* regulon. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 12, p. 3541-3546, 1991.

TRINH, C.T.; WLASCHIN, A.; SRIENC, F. Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway tool for characterizing cellular metabolism. **Applied Microbiology Biotechnology**, n. 81, p. 813-826, 2009.

VELKOV, T et al. An improved method for the purification of rat liver-type fatty acid binding protein from *Escherichia coli*. **Protein expression and purification** , n. 44, p. 23-31, 2005.

WANG, F. et al. Heterologous expression and characterization of recombinant glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli*. **Biotechnology Journal**, n.2, p. 736-742, 2007.

WANG, Y.; TENG, H.; XIU, Z. Effect of aeration strategy on the metabolic flux of *Klebsiella pneumoniae* producing 1,3-propanediol in continuous cultures at different glycerol concentrations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, n.38, p.705-715, 2011.

XU, X. L. et al. Recombinant glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li: induction optimization, purification and characterization. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n.2, p. 162-167, 2011.

ZHANG, X. et al. Construction of a novel recombinant *Escherichia coli* strain capable of producing 1,3-propanediol and optimization of fermentation parameters by statistical design. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n. 22,p. 945-952, 2006.

ZHENG, P. et al. Overexpression of genes of the *dha* regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochemistry**, n. 41, p. 2160-2169, 2006.

ZHU, G. P.; GOLDING, G. B.; DEAN, A. M. The selective cause of an ancient adaptation. **Science**, n. 307, p. 1279-1282, 2005.

ZHU, M. M.; LAWMAN, P. D.; CAMERON, D. C. Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate. **Biotechnology Progress**, n.18, p.694-699, 2002.

ZHU, M. M.; SKRALY, F. A.; CAMERON, D. C. Accumulation of methylglyoxal in anaerobically grown *Escherichia coli* and its detoxification by expression of the *Pseudomonas putida* glyoxalase I gene. **Metab Eng**, n. 3, p. 218-225, 2001.

ZHUGE, B. et al. Expression of 1,3-propanediol oxidoreductase and its isoenzyme in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 87, p. 2177-2184, 2010.