

ROSMARY REBAZA PEÑAFIEL

**Produção de poli-3-hidroxi-butirato por linhagens de *E. coli* com gliceraldeído
3-fosfato desidrogenase apresentando alteração na especificidade por
coenzimas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2019

RESUMO

Rebaza Peñafiel R. **Produção de poli-3-hidroxitirato por linhagens de *E. coli* com gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase apresentando alteração na especificidade por coenzimas**. 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Versão Original.

Poli-3-hidroxitirato (P(3HB)) é um polímero da família dos polihidroxicanoatos (PHA) produzido por bactérias e que despertam interesse industrial por serem termoplásticos biodegradáveis e biocompatíveis. A síntese de P(3HB) requer intermediários metabólicos (NADPH e acetil-CoA), que também são necessários para o crescimento celular. P(3HB) pode ser produzido por linhagens recombinantes de *Escherichia coli* associado ao crescimento celular e sua síntese pode ser melhorada com o aumento da oferta de NADPH. Neste trabalho, foi avaliado o impacto sobre a produção de P(3HB) do uso de linhagens recombinantes de *E. coli* expressando gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) apresentando capacidade de suprir maior quantidade de NADPH. A substituição total da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase NAD⁺ dependente por uma NADP⁺ dependente levou à maior crescimento e menor produção de P(3HB). Nos cultivos em biorreator a linhagem mutante (TUD15) produziu menos P(3HB) do que a linhagem selvagem (MG1655), indicando que o grande aumento do suprimento de NADPH pode contribuir no crescimento celular, mas não são relevantes para aumentar a produção de P(3HB). A substituição parcial da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase NAD-GAP por NADP-GANP aumentou expressivamente a capacidade de acúmulo de P(3HB), que atingiu 50% da massa seca celular em agitador rotativo. Nos cultivos em biorreator, ficou clara a maior capacidade de crescimento e de acúmulo de P(3HB) com a expressão simultânea das duas enzimas. Em conjunto, os resultados sugerem que um balanço adequado de acetil-CoA, NADPH e ATP é necessário para se atingir crescimento e produção de P(3HB) eficientes em *E. coli*. Os dados obtidos neste trabalho devem contribuir na busca de modelos metabólicos que melhor representem *E. coli* e permitirão identificar condições mais apropriadas para o crescimento celular e a produção de P(3HB).

Palavras-chave: *E. coli*, Poli-3-hidroxitirato, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

ABSTRACT

Rebaza Peñafiel R. **Production of poly-3-hydroxybutyrate by *E. coli* strains with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase showing change in coenzyme specificity** .2019 .89 f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019. Original Version.

Poly-3-hydroxybutyrate (P(3HB)) is a polymer from the family of polyhydroxyalkanoates (PHA) produced by bacteria which has an industrial interest since it is a biodegradable and biocompatible thermoplastic. Synthesis of P(3HB) requires metabolic intermediates (NADPH and acetyl-CoA), which are also required for cell growth. P(3HB) can be produced by recombinant *Escherichia coli* strains with associated cell growth and its synthesis can be improved by increasing NADPH supply. In this study, was evaluated the impact on the production of P(3HB) using a recombinant *E.coli* strains expressing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) presenting capacity to supply larger amounts of NADPH. A total substitution of dependent NAD⁺ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by a dependent NADP⁺ led to higher growth and lower P(3HB) production. In bioreactor cultures the mutant strain (TUD15) produced less P(3HB) than the wild strain (MG1655), indicating that the large increase in NADPH supply may contribute to cell growth but are not relevant to increase production. P(3HB). A partial replacement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase NAD-GAP for NADP-GANP significantly increased the accumulation capacity of P(3HB), which reached 50% of the cell dry mass on shake flask cultures. In bioreactor cultures showed a higher growth and accumulation capacity of P(3HB) with a simultaneous expression of the two enzymes. Together, the results suggest that an appropriate balance of acetyl-CoA, NADPH and ATP is required to achieve efficient growth and production of P(3HB) in recombinant *E. coli* strains. The data obtained in this work should contribute to the search for metabolic models that best represent *E. coli* and will allow to identify more appropriate conditions for cell growth and P(3HB) production.

Keywords: *E.coli*, Poly-3-hydroxybutyrate, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

INTRODUÇÃO

Poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)) é um polímero da família dos polihidroxi-álcanoatos. Estes polímeros são produzidos por bactérias de diferentes gêneros na forma de grânulos intracelulares. Para bactérias, o P(3HB) representa uma reserva de carbono, energia e equivalentes redutores. P(3HB) e outros PHA despertam grande interesse industrial, pois apresentam propriedades termoplásticas semelhantes ao polipropileno.

Tão logo os genes de biossíntese de P(3HB) de *Ralstonia eutropha* foram clonados, sua expressão em *E. coli* demonstrou que era possível estabelecer a biossíntese heteróloga desses polímeros. Diferentes trabalhos seguiram e muitos estudos têm demonstrado a possibilidade de se estabelecer processos industriais de produção de P(3HB) utilizando linhagens recombinantes de *E. coli*. Diferentes trabalhos têm relatado que a produção de P(3HB) em *E. coli* ocorre apenas associada ao crescimento celular, além disso, a produção tem sido aumentada com o uso de mutantes que apresentam aumento do suprimento de NADPH, sugerindo deficiência do suprimento dessa coenzima em *E. coli*.

Em estudos realizados em colaboração entre os laboratórios da Technical University of Delf e da Universidade de São Paulo foram construídas linhagens de *E. coli* (Olavarria, dados não publicados) apresentando modificações na especificidade por coenzimas da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Uma linhagem de *E. coli*, chamada USP62, foi desenvolvida capaz de transitar reversivelmente da sua atividade gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase NAD⁺ dependente (NAD-GAP) nativa para a atividade de uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase não fosforilante e NADP⁺ dependente (NADP-GANP) heteróloga de *S. mutans*. Também foi construída a linhagem TUD15 que possui NAD-GANP em substituição a NAD-GAP e a linhagem TUD-30 que apresenta, além da alteração de TUD-15, a deleção do gene *zwf*, que codifica a glicose 6-fosfato desidrogenase.

Medidas de atividade enzimática revelaram que a transição de NAD-GAP para NADP-GANP na linhagem USP62 acontecia apenas parcialmente. Mesmo

assim resolvemos avaliar neste trabalho o impacto destas mudanças na especificidade das enzimas por coenzimas na produção de P(3HB).

CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi avaliado o impacto das linhagens recombinantes de *E. coli* expressando de forma heteróloga os genes de produção de P(3HB) de *R. eutropha* e com o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) apresentando alteração na especificidade por coenzimas NADPH e NADH.

A transferência do plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo os genes *phaCAB* de *R. eutropha* de biossíntese de P(3HB) nas linhagens de *E. coli* recombinantes denominadas USP62, TUD-15, TUD-30, assim como as linhagens controle USP-20 e MG1655 foi realizado com sucesso, uma vez que todas as linhagens se tornaram capazes de acumular P(3HB).

Os experimentos com as linhagens de *E. coli* construídas, apresentando substituição do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase com alteração na especificidade por coenzimas NADH por NADPH (TUD15 e TUD30), mostraram maior capacidade de crescimento em agitador rotativo, entretanto, produziu menos P(3HB) que a linhagem controle (MG1655). Cultivos em biorreator revelaram uma menor velocidade de crescimento da linhagem TUD15 em relação à linhagem controle, e do mesmo modo se observou o acúmulo de P(3HB) pela linhagem controle MG1655 e pelo mutante TUD15 não associada ao crescimento, entretanto, representando menos que 2% da massa seca celular. Sob limitação de oxigênio o acúmulo de P(3HB) foi mais expressivo, mas ainda representando um valor muito pequeno (<10% da massa seca celular). Novamente, o maior acúmulo foi observado para a linhagem selvagem em relação ao mutante TUD15. Estes resultados indicam que o grande aumento do suprimento de NADPH pode contribuir no crescimento celular, mas não são relevantes para aumentar a produção de P(3HB) associada ou não ao crescimento celular.

Também foram avaliados os impactos no crescimento e na produção de P(3HB) pelas modificações realizadas na linhagem USP62. Nos cultivos em agitador rotativo, a linhagem USP62 apresentou capacidade de crescimento maior em relação à linhagem parental (USP20) e a substituição parcial da gliceraldeído-3-

fosfato desidrogenase NAD-GAP por NADP-GANP aumentou expressivamente a capacidade de acúmulo de P(3HB), que atingiu 50% da massa seca celular. Cultivos em biorreator, demonstraram maior capacidade de crescimento na linhagem USP62. Embora tanto USP20 como USP62 foram capazes de acumular P(3HB) não associado ao crescimento celular, a quantidade produzida por USP62 foi maior. Concluindo, estes resultados sugerem que um pequeno aumento na oferta de NADPH é metabolicamente favorável ao crescimento de *E. coli*, bem como à produção de P(3HB).

Foi observada uma produção maior de lactato sob limitação do fornecimento de oxigênio e nas linhagens apresentando gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase NAD-dependente, compatível com a produção desse composto como um mecanismo de re-oxidação de NADH.

A produção de acetato foi maior em linhagens com gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase NADP-dependente e não fosforilante. Acetato pode ter sido produzido para compensar a diminuição de produção de ATP por fosforilação no nível do substrato, embora não possa ser descartado que acetato é produzido por um mecanismo de regulação em *E. coli* nessa condição. Se a primeira hipótese for verdadeira, aumento no suprimento de oxigênio pode diminuir a produção de acetato e aumentar a produção de P(3HB). Se a segunda hipótese for verdadeira, a delação da via principal de produção de acetato (*ackA-pta*) poderia redirecionar o acetil-CoA para a produção de P(3HB).

Em conjunto, os resultados sugerem que um balanço adequado de acetil-CoA, NADPH e ATP é necessário para atingir produção eficiente de P(3HB) em *E. coli*. Além disso, *E. coli* apresenta regulação específica para o fornecimento desses compostos sob diferentes condições de cultivo (não limitadas ou limitadas em nutrientes, com ou sem oxigênio). Os dados obtidos neste trabalho devem contribuir na busca de modelos metabólicos que melhor representem *E. coli* em diferentes condições. Este modelo pode ser usado para indicar *in silico* condições mais apropriadas para o crescimento celular e a produção de P(3HB).

REFERÊNCIAS¹

- AHN, W. S. et al. Production of Poly (3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey Solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3624–3627, 2000.
- ALBUQUERQUE, P. B. S.; MALAFAIA, C. B. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. PartA, p. 615–625, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026>>.
- ALDOR, I. S.; KEASLING, J. D. Process design for microbial plastic factories: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 475–483, 2003.
- ALMEIDA LIMA, U.; et al. **Biotecnologia industrial - vol. 3: processos fermentativos e enzimáticos**. [s.l.] Blucher, 2002.
- ANDERSON E.A.; DAWES, A. J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol**, v. 54, p. 450–472, 1990.
- ATLI, A.; KOLLER, M.; SCHERZER, D. Continuous production of poly ([R] -3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. p. 295–304, 2011.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology: Preface**. [s.l.: s.n.]
- BASTIAN, S. et al. Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 3, p. 345–352, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2011.02.004>>.
- BHATIA, S. K. an. et al. Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered *Escherichia coli*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 8, p. 1479–1484, 2015.
- BOCANEGRA, J. K. Produção de Poli-hidroxiálcanoatos por Linhagens Recombinantes de *Escherichia coli*. **universidade de sao paulo**, 2012.
- BRESAN, S. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–13, 2016.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246–250, 1987.
- CENTENO-LEIJA, S. et al. Metabolic and transcriptional response of *Escherichia coli* with a NADP +-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 913–924, 2013.

¹ De acordo com Estilo ABNTNBR 14724

CENTENO-LEIJA, S. et al. Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 4, p. 687–696, 2014.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621–632, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>>.

CHAVARRÍA, M. et al. The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida*KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 1772–1785, 2013.

CHEN, G.-Q.; JIANG, X.-R.; GUO, Y. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA). **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 236–242, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405805X16300448>>.

CHOI, J. II; LEE, S. Y.; HAN, K. Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4897–4903, 1998.

CHOI, J.; LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 335–342, 1997.

CHOI, J. et al. Cloning of the *Alcaligenes latus* Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Genes and Use of These Genes for Enhanced Production of Poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli* Cloning of the *Alcaligenes latus* Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Genes and Use of T. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4897–4903, 1998.

CHOI, J.; LEE, S. Y. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4363–4368, 1999.

DAVID, Y. et al. Biosynthesis of 2-Hydroxyacid-Containing Polyhydroxyalkanoates by Employing butyryl-CoA Transferases in Metabolically Engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 11, p. 1–33, 2017.

DENNIS, D. et al. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**, v. 64, n. 2–3, p. 177–186, 1998.

DEY, P.; RANGARAJAN, V. Improved fed-batch production of high-purity PHB (poly-3 hydroxy butyrate) by *Cupriavidus necator* (MTCC 1472) from sucrose-based cheap substrates under response surface- optimized conditions. **3 Biotech**, v. 7, n. 5, p. 1–14, 2017.

ELAIN, A. et al. Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. **Industrial Crops and Products**, v. 80, n. 1526, p. 289–290, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.052>>.

EUROPEAN BIOPLASTICS. Frequently Asked Questions on Bioplastics. **European bioplastics**, p. 4–26, 2019. Disponível em: <https://docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP_FAQ_on_bioplastics.pdf>.

FIGUEIREDO, T. V. B. et al. Production and characterization of polyhydroxyalkanoates obtained by fermentation of crude glycerin from biodiesel. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1111–1117, 2014. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20140183>>.

FLAMHOLZ, A. et al. Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 24, p. 10039–10044, 2013.

FRANCHETTI MARTINS, S. M.; MARCONATO, J. C. POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS – UMA SOLUÇÃO PARCIAL PARA DIMINUIR A QUANTIDADE DOS RESÍDUOS PLÁSTICOS. v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006.

GÓMEZ CARDOZO, J. R. et al. Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, 2016.

GOMEZ, J. G. C. et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 6, p. 785–791, 1996.

HOKAMURA, A. et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant *Escherichia coli* from glucose. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 3, p. 305–310, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.022>>.

HOLM, A. K. et al. Metabolic and transcriptional response to cofactor perturbations in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 23, p. 17498–17506, 2010.

HONG, P. H. et al. Effect of NADH kinase on poly-3-hydroxybutyrate production by recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 122, n. 6, p. 685–688, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.06.005>>.

HOPEWELL, J.; DVORAK, R.; KOSIOR, E. Plastics recycling: Challenges and opportunities. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2115–2126, 2009.

HUA, Q. et al. Responses of the Central Metabolism in *Escherichia coli* to Phosphoglucose Isomerase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Knockouts. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7053–7067, 2003.

IENCZAK, J. L. et al. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production in Repeated fed-Batch with Cell Recycle Using a Medium with low Carbon Source Concentration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 408–417, 2016.

KAWAI, S. et al. Molecular characterization of *escherichia coli* NAD kinase. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 15, p. 4359–4365, 2001.

KIM, H. S. et al. Recombinant *Ralstonia eutropha* engineered to utilize xylose and its use for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from sunflower stalk hydrolysate

solution. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2016.

KLINGNER, A. et al. Large-scale ¹³C flux profiling reveals conservation of the Entner-Doudoroff pathway as a glycolytic strategy among marine bacteria that use glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 7, p. 2408–2422, 2015.

LEE, H. C.; et al. Thymidine production by overexpressing NAD⁺ kinase in an *Escherichia coli* recombinant strain. p. 1929–1936, 2009.

LEE, S. Y. et al. Comparison of recombinant *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) and morphological changes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 1337–1347, 1994.

LEE, S. Y. High cell density culture of *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 98–105, 1996.

LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: Genetic and fermentation studies. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. SUPPL. 1, p. 207–215, 1995.

LEE, S. Y.; MIDDELBERG, A. P. J.; LEE, Y. K. Poly (3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 10, p. 1033–1035, 1997.

LEE, W. H. et al. Engineering of NADPH regenerators in *Escherichia coli* for enhanced biotransformation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 7, p. 2761–2772, 2013.

LI, Z. J. et al. Overexpression of NAD kinase in recombinant *Escherichia coli* harboring the phbCAB operon improves poly(3-hydroxybutyrate) production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 939–947, 2009.

LIM, S.-J. et al. Amplification of the NADPH-Related Genes *zwf* and *gnd* for the Oddball Biosynthesis of PHB in an *E. coli* Transformant Harboring a Cloned phbCAB Operon. v. 93, n. 6, p. 543–549, 2002.

LIN, Z. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for poly(3-hydroxybutyrate) production via threonine bypass. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2015.

LOZANO SAKALOUSKAS, G. C. EFEITO DE LonA NOS PROCESSOS DE SÍNTESE E MOBILIZAÇÃO DE POLI-3- HIDROXIBUTIRATO. 2019. 1 2019.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 21–53, 1999.

MARTÍNEZ, I. et al. Replacing *Escherichia coli* NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 352–359, 2008.

OJUMU, T.; YU, J.; SOLOMON, B. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **Afric. J. Biotechnol**, v. 3, p. 18–24, 2004.

OLAVARRIA, K. et al. Quantifying NAD(P)H production in the upper Entner–

- Doudoroff pathway from *Pseudomonas putida* KT2440. **FEBS Open Bio**, v. 5, p. 908–915, 2015.
- OSMAN, Y.; ABD ELRAZAK, A.; KHATER, W. Microbial biopolymer production by Microbacterium WA81 in batch fermentation . **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 250–262, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbas.2016.05.001>>.
- PARK, S. J. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 1, p. 248–254, 2001.
- PEÑA, C. et al. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 278–293, 2014.
- PEOPLES, O. P.; SINSKEY, a J. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 26, p. 15298–15303, 1989.
- PRADELLA, J. G. da C.; TACIRO, M. K.; MATEUS, A. Y. P. High-cell-density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8355–8360, 2010.
- PRIETO, M. A. From oil to bioplastics, a dream come true? **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 2, p. 289–290, 2007.
- RAMSAY, B. et al. Production of Poly-(β -Hydroxybutyric-Co- β -Hydroxyvaleric) Acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2093–2098, 1990.
- RAMSAY, B. et al. HIGH CELL DENSITY STRATEGY FOR POLY (3-HYDROXYBUTYRATE) PRODUCTION BY *Cupriavidus necator*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 28, n. 04, p. 585–596, 2011.
- RIIS, V.; MAI, W. determined PHB after extraction with chloroform directly in the resulting solution by infrared spectroscopy. Interfering lipids are determined separately after chromatographic separation from the PHB. **Braunegg**. v. 445, p. 285–289, 1988.
- ROMANO, A. H.; CONWAY, T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. **Research in Microbiology**, v. 147, n. 6–7, p. 448–455, 1996.
- RYU, H. W. et al. Production of Poly (3-hydroxybutyrate) by High Cell Density Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Phosphate Limitation. n. 1987, 1997.
- SAIKA, A. et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) by recombinant *Escherichia coli* expressing leucine metabolism-related enzymes derived from *Clostridium difficile*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 6, p. 670–675, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.006>>.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 2, n. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press manual, 1989.

SANCHEZ, A. M. et al. Effect of Overexpression of a Soluble Pyridine Nucleotide Transhydrogenase (UdhA) on the Production of Poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. p. 420–425, 2006.

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**, v. 279, p. 6613- 6619., 2004a.

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**, v. 279, n. 8, p. 6613–6619, 2004b.

SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, a; SCHLEGEL, H. G. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 12, p. 5837–5847, 1988.

SHANG, L.; JIANG, M.; CHANG, H. N. Poly (3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. p. 1415–1419, 2003.

SHI, A. et al. Activating transhydrogenase and NAD kinase in combination for improving isobutanol production. **Metabolic Engineering**, v. 16, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2012.11.008>>.

SIMON-COLIN, C. et al. Development of a three-steps derivatization assay for the localization of double bond in monounsaturated monomers of poly-beta-hydroxyalkanoates by GC-MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 900, p. 64–70, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.032>>.

SLATER, S. C.; VOIGE, W. H.; DENNIS, D. E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 10, p. 4431–4436, 1988. Disponível em: <<http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/jb.170.10.4431-4436.1988>>.

SOLAIMAN, D. K. Y. et al. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 783–789, 2006.

SRIRANGAN, K. et al. Engineering of *Escherichia coli* for direct and modulated biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer using unrelated carbon sources. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep36470>>.

STEINBÜCHEL, A. ; DEBZI, E.; MARCHESSAULT, H. R. ; TIMM, A. Synthesis and production of poly (3-hidroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 39, p. 443–449, 1993.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219–228, 1995.

STEINBÜCHEL A. Production of rubber-like polymers by microorganisms. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, p. 261–270, 2003.

SUN, Z. et al. Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440.

Applied Microbiology and Biotechnology, v. 74, n. 1, p. 69–77, 2007.

VICKERS, C. E.; KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; KRÖMER, J. O. Examining the feasibility of bulk commodity production in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 4, p. 585–596, 2012.

WANG, F.; LEE, S. Y. High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. **Biotechnology and bioengineering**, v. 58, n. 2–3, p. 325–8, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10191411>>.

WANG, Q.; LIU, X.; QI, Q. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose with elevated 3-hydroxyvalerate fraction via combined citramalate and threonine pathway in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 9, p. 3923–3931, 2014.

WOO SUK AHN; SI JAE PARK; SANG YUP LEE. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3624–3627, 2000.

ZHENG, Y. et al. Engineering *Escherichia coli* for poly-(3-hydroxybutyrate) production guided by genome-scale metabolic network analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106, n. March, p. 60–66, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.07.003>>.