CESAR GUZMAN MORENO WILBER

**Produção de Polihidroxialcanoatos (PHA) por
Halomonas sp. HG01**

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

Guzmán MCW. Produção de Polihidroxialcanoatos (PHA) por *Halomonas* sp. HG01. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Polihidroxialcanoatos (PHA) são polímeros com propriedades termoplásticas ou elastoméricas, sintetizados por uma ampla variedade de microrganismos. *Halomonas* sp. HG01, uma bactéria halófila isolada de uma lagoa salina no Peru, foi avaliada para determinar o seu potencial para a produção de PHA, utilizando diferentes fontes de carbono. *Halomonas* sp. HG01 foi capaz de utilizar eficientemente sacarose, glicose e frutose como fontes de carbono. Entretanto, não foi capaz de utilizar glicerol, xilose e lactose. Os maiores valores de concentração celular e teor de PHA foram obtidos com glicose (4,77 g/l e 86%, respectivamente). Desempenho semelhante foi obtido com sacarose o desempenho foi similar. 3-Hidroxibutirato (3HB) foi o único monômero detectado a partir de carboidratos. Co-substratos precursores de outros monômeros foram avaliados com o objetivo de determinar a especificidade da PHA sintase de *Halomonas* sp. HG01. Monômeros de 3-hidroxivalerato (3HV) foram incorporadas ao polímero quando os ácidos propiônico ou valérico foram supridos, atingindo-se eficiências próximas ao valor máximo, quando ácido valérico foi utilizado como precursor. 4-Hidroxibutirato (4HB) também foi incorporado pela PHA sintase de *Halomonas* sp. HG01, embora com baixa eficiência. Engenharia evolutiva foi realizada em *Halomonas* sp. HG01 para aumentar a eficiência de consumo de xilose e glicerol, obtendo-se aumentos superiores a 20 e 15 vezes na velocidade específica de crescimento, respetivamente. Cultivos em biorreator foram realizados permitindo atingir produtividades volumétricas de produção de P3HB de 0,13; 0,07 e 0,06 g/L.h, respectivamente, quando glicose, xilose e glicerol foram supridas como fonte de carbono. Aumentos na densidade celular dos cultivos deverão permitir que maiores produtividades sejam atingidas.

Palavras-chave: Polihidroxialcanoatos. *Halomonas*. Engenharia evolutiva.

ABSTRACT

Guzmán MCW. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by *Halomonas* sp. HG01. [Masters thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polymers presenting thermoplastic or elastomeric properties synthesized by several micro-organisms. *Halomonas* sp. HG01, a halophilic bacteria isolated from a saline lake in Peru, was evaluated in order to determine its potential for PHA production using different carbon sources. *Halomonas* sp. HG01 was able to use efficiently sucrose, glucose and fructose as carbon sources. However, it was unable to use glycerol, xylose and lactose. The higher value of cellular concentration and PHA content were obtained using glucose (4.77 g/L and 86%, respectively). Similar performance was obtained with sucrose. 3-hydroxybutyrate was the only monomer detected from carbohydrates. Co-substrates were used as precursors of other monomers in order to evaluate the specificity of the PHA synthase from *Halomonas* sp. HG01. 3-Hydroxyvalerate (3HV) monomers were inserted into the polymer when propionic or valeric acids were supplied. 4-Hydroxybutyrate (4HB) was also inserted by the PHA synthase from *Halomonas* sp. HG01, though with low efficiency. Evolutive engineering experiments allowed to obtain clones presenting increased specific growth rates in xylose or glycerol (20 or 15 times increase, respectively). Bioreactors cultures were carried out and volumetric productivities of 0.13, 0.07 and 0.06 g/L.h were reached using glucose, xylose and glycerol, respectively. Increase in cell densities will probably allow reaching higher volumetric productivities.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates. *Halomonas*. Evolutive engineering.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, muitos produtos feitos de plásticos sintéticos são amplamente utilizados como bens de consumo; tornando-os produtos essenciais do cotidiano humano (5–8). No entanto, devido a suas propriedades recalcitrantes, políticas de descarte inadequadas e crescimento exponencial da população humana, grandes quantidades desses materiais vem sendo acumulado em nosso planeta, tornando-se um sério problema, que afeta não só o ambiente como também a sobrevivência de inúmeras espécies (4,9–11). Assim, faz-se necessário a busca por materiais alternativos que minimizem o impacto causado por plásticos sintéticos.

Polihidroxicanoatos (PHA) são polímeros sintetizados intracelularmente por uma grande variedade de Bacteria e Archaea como reserva de carbono e energia (12,13). São biocompatíveis e possuem propriedades biodegradáveis e termoplásticas, podendo ser produzidos a partir de substratos renováveis (14). Isto tornou o PHA um produto industrialmente atrativo, com potencial para tornar-se um possível substituto dos plásticos de origem petroquímica. PHA são poliésteres alifáticos produzidos sob duas condições nutricionais. A primeira condição, que inclui a *Cupriavidus necator* (antigamente *Ralstonia eutropha*), *Pseudomonas putida* e *P. aeruginosa*, requer a limitação de um nutriente essencial e excesso de fonte de carbono para a síntese eficiente do polímero. A segunda condição, que inclui a *Alcaligenes latus* (atualmente, *Azohydromonas lata*), *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli* recombinante e *Halomonas* TD01, não requer a limitação de um nutriente para a síntese do polímero, sendo este acumulado durante o crescimento microbiano (15–17).

Os PHA podem ser subdivididos em três grupos de acordo com o número de átomos de carbono presentes em seus monômeros: PHA de cadeia curta (monômeros com 3-5 átomos de carbono), PHA de cadeia média (monômeros com 6-16 átomos de carbono) e PHA de cadeia longa (monômeros com mais de 16 átomos de carbono). A estrutura química do polímero vai depender da especificidade da enzima envolvida na síntese do polímero (PHA sintase) e a fonte de carbono fornecida na cultura (18). Até o momento são conhecidos mais de 150 monômeros detectados como constituintes de PHA (7). O poli-3-hidroxibutirato (P3HB) é o mais comumente encontrado em

microrganismos e o PHA mais amplamente estudado. P3HB é um homopolímero rígido e quebradiço, apresentando limitações para aplicação industrial. Já o poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (P3HB-co-3HV) é um polímero mais resistente e maleável quando comparado ao P3HB, sendo um material mais atraente para a indústria (19,20).

P3HB é sintetizado a partir de acetil-CoA pela ação sequencial de três enzimas: β -cetotiolase (codificado pelo gene *phaA*), acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente (codificada pelo gene *phaB*) e PHA sintase (codificada pelo gene *phaC*) (21). PHA sintase catalisa a inserção de monômeros à cadeia polimérica, é a enzima chave para a síntese de PHA e ela pode ser classificada em quatro grupos, dependendo da composição de suas unidades estruturais e de sua especificidade pelo substrato (18). PHA sintase classe I, III e IV estão presentes em *Cupriavidus necator*, *Allochromatium vinosum*, *Bacillus cereus*, *B. megaterium* e *Haloferax mediterranei*, e são responsáveis pela síntese de polímeros com monômeros de 3 a 5 átomos de carbono (*short chain length*, PHA_{scl}). PHA sintases da classe II, presentes em bactérias do gênero *Pseudomonas*, estão envolvidas na síntese de polímeros com monômeros de 6 a 14 átomos de carbono (*medium chain length*, PHA_{mcl}) (9,22).

Há uma grande variedade de microrganismos capazes de produzir PHA (11). Porém, apenas um reduzido número deles é considerado bom produtor de PHA (*Cupriavidus necator*, *Azohydromonas lata*, *Azotobacter vinelandii* e *E. coli* recombinante) (4,16). *Cupriavidus necator* é uma das bactérias mais estudadas, uma vez que é capaz de produzir naturalmente cerca de 80% da massa seca celular como polímero, quando cresce em excesso de glicose, além de ser capaz de utilizar ácidos graxos, triglicerídeos e outros substratos para a produção do polímero (23,24).

PHA são produzidos em escala industrial pela empresa Metabolix (EUA), sob o nome comercial de Mirel, utilizando-se uma linhagem de *Escherichia coli* recombinante (25). Embora o PHA venha sendo obtido industrialmente em alguns países, sua produção a escala industrial se depara com muitos problemas devido ao alto custo de produção. Três principais itens compõem o custo de produção de PHA: investimento na planta de produção, que deve ser recuperado com a venda do produto, os nutrientes supridos no cultivo, principalmente a matéria-prima utilizada como fonte de carbono e a

extração e purificação do produto (26). A obtenção de PHA poderia ser mais eficiente e econômica otimizando-se a produção e extração do bioproduto, bem como utilizando-se substratos de baixo custo e desenvolvendo-se linhagens mais eficientes. (27).

Uma alternativa seria a utilização de microrganismos halófilos (Bacteria ou Archaea), capazes de crescer a altas concentrações de sal (12,28,29). Esta propriedade poderia reduzir os custos de produção, uma vez que, a altas concentrações de sal, a probabilidade de contaminação por outros microrganismos não-halófilos torna-se baixa, gerando uma economia energética no processo de esterilização. Outra vantagem seria no processo extração-purificação, pois as células podem ser lisadas por choque osmótico pelo tratamento com água deficiente em sal, liberando o biopolímero presente na célula e, conseqüentemente, reduzindo os custos da recuperação do produto (27). Estudos anteriores mostraram que *Haloferax mediterranei* pode reduzir o custo de produção de PHA em até 30% em comparação com os custos de produção gerados usando uma linhagem de *E. coli* recombinante (25,27). Estes resultados demonstram o grande potencial dos microrganismos halófilos como produtores de PHA.

Halomonas sp. HG01 é uma bactéria halófila, aeróbia e Gram negativa isolada de uma lagoa salina no Peru. *Halomonas* sp. HG01 foi cultivada em meios de cultura contendo 100 g de NaCl e atingiu até 85% da massa seca celular em P3HB usando glicose como fonte única de carbono (30). Considerando o grande potencial para produção de PHA que bactérias do gênero *Halomonas* apresentam, este trabalho tem por objetivo avaliar o crescimento e produção de PHA por *Halomonas* sp. HG01, utilizando diferentes meios de cultivo e fontes de carbono variadas.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter as seguintes conclusões:

- O meio mineral foi o meio de cultivo que promoveu o melhor crescimento e maior produção de polihidroxialcanoatos (PHA).
- Glicose, frutose e sacarose foram fontes de carbono eficientemente utilizadas por *Halomonas* sp. HG01.
- Xilose, lactose e glicerol não foram fontes de carbono utilizadas por *Halomonas* sp. HG01.
- A partir de carboidratos, *Halomonas* sp. HG01 produz um homopolímero contendo apenas monômeros de 3-hidroxibutirato.
- Monômeros de 3-hidroxivalerato foram incorporados ao PHA, quando os ácido propiônico ou valérico foram supridos como precursores. A conversão de ácido valérico em 3HV atingiu eficiência próxima ao valor máximo teórico.
- A formação do copolímero poli-3hidroxibutirato-co-4hidroxibutirato (P3HB-co-4HB) foi possível quando o ácido 4-hidroxibutírico foi suprido como precursor..
- Foram obtidas linhagens evoluídas (*Halomonas* sp. HG02 e *Halomonas* sp. HG03) para o consumo de xilose e glicerol, respectivamente.

REFERÊNCIAS¹

1. Rehm BHA. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: A platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Current Issues in Molecular Biology*. 2007. p. 41–62.
2. Meng DC, Shen R, Yao H, Chen JC, Wu Q, Chen GQ. Engineering the diversity of polyesters. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;29:24–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.02.013>
3. Akaraonye E, Keshavarz T, Roy I. Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. *J Chem Technol Biotechnol*. 2010;85(6):732–43.
4. Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioeng* [Internet]. The Society for Biotechnology, Japan; 2010;110(6):621–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>
5. Heinrich D, Madkour MH, Al-Ghamdi M a, Shabbaj II, Steinbüchel A. Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express* [Internet]. 2012;2:59. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3564783&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Lee GN, Na J. Future of microbial polyesters. *Microb Cell Fact* [Internet]. Microbial Cell Factories; 2013;12(1):54. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3680211&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. Andreessen B, Taylor N, Steinbuchel a. Poly(3-Hydroxypropionate): a Promising Alternative to Fossil Fuel-Based Materials. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2014;80(21):6574–82. Available from: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02361-14>
8. Jain R, Tiwari A. Biosynthesis of planet friendly bioplastics using renewable carbon source. *J Environ Heal Sci Eng* [Internet]. 2015;13(1):1–5. Available from: <http://www.ijehse.com/content/13/1/11>
9. Luengo JM, García B, Sandoval A, Naharro G, Olivera ER. Bioplastics from microorganisms. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6:251–60.

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

10. Wei YH, Chen WC, Wu HS, Janarthanan OM. Biodegradable and biocompatible biomaterial, polyhydroxybutyrate, produced by an Indigenous *Vibrio* sp. BM-1 isolated from marine environment. *Mar Drugs*. 2011;9(4):615–24.
11. Leong YK, Show PL, Ooi CW, Ling TC, Lan JCW. Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;180(2014):52–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.020>
12. Lillo JG, Rodriguez-Valera F. Effects of Culture Conditions on Poly(beta-Hydroxybutyric Acid) Production by *Haloferax mediterranei*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1990;56(8):2517–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Bhuwal AK, Singh G, Aggarwal NK, Goyal V, Yadav A. Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. *Int J Biomater*. 2013;2013.
14. Ibrahim MHA, Steinbüchel A. *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. *J Appl Microbiol*. 2010;108:214–25.
15. Wang F, Lee SY, Wang F. Poly (3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation . Poly (3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Ba. 1997;63(9):3703–6.
16. Quillaguamán J, Doan-Van T, Guzmán H, Guzmán D, Martín J, Everest A, et al. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;78:227–32.
17. Tan D, Xue YS, Aibaidula G, Chen GQ. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;102(17):8130–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.068>
18. Hyakutake M, Saito Y, Tomizawa S, Mizuno K, Tsuge T. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthesis by Class IV PHA Synthases Employing *Ralstonia eutropha* PHB(-)4 as Host Strain. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011;75(8):1615–7.
19. Luzier WD. Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(3):839–42.
20. Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu CU, Aiba S. Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009. p. 3722–42.

21. Rehm BH a. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J.* 2003;376(Pt 1):15–33.
22. Song.et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production Using Waste Vegetable Oil by. 2008;18:1408–15.
23. Obruca S, Snajdar O, Svoboda Z, Marova I. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;29(12):2417–28.
24. Passanha P, Kedia G, Dinsdale RM, Guwy AJ, Esteves SR. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresour Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;163:287–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.068>
25. Quillaguamán J, Guzmán H, Van-Thuoc D, Hatti-Kaul R. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: Current potential and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;85(6):1687–96.
26. Silva LF, Gomez JGC, Oliveira MS, Torres BB. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. *J Biotechnol.* 2000;76(2-3):165–74.
27. Cai L, Tan D, Aibaidula G, Dong X, Chen J-C, Tian W, et al. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. *Microbial Cell Factories.* 2011. p. 88.
28. Fernandez-Castillo R, Rodriguez-Valera F, Gonzalez-Ramos J, Ruiz-Berraquero F. Accumulation of Poly (β -Hydroxybutyrate) by *Halobacteria*. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51(1):214–6.
29. Kawata Y, Aiba S. Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010;74(1):175–7.
30. Guzmán CW., Hurtado A-Z. Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de *Solanum tuberosum* L. 2011;
31. Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates : bioplastics with a green agenda. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;13(3):321–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>
32. Wang Y, Yin J, Chen GQ. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;30:59–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.001>

33. Li S, Cai L, Wu L, Zeng G, Chen J, Wu Q, et al. Microbial Synthesis of Functional Homo - , Random, and Block Polyhydroxyalkanoates by β - Oxidation Deleted *Pseudomonas entomophila*. 2014;
34. Poli A, Donato P Di, Abbamondi GR, Nicolaus B. Synthesis , Production , and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. 2011;2011.
35. Laycock B, Halley P, Pratt S, Werker A, Lant P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Prog Polym Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;39(2):397–442. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.06.008>
36. Madison LL, Huisman GW. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. 1999;63(1):21–53.
37. Verlinden RAJ, Hill DJ, Kenward MA, Williams CD, Radecka I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. 2007;102:1437–49.
38. Huisman GW, de Leeuw O, Eggink G, Witholt B. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(8):1949–54.
39. Qi Q, Rehm BHA. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: Molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology*. 2001;147:3353–8.
40. Escapa IF, del Cerro C, García JL, Prieto M a. The role of GlpR repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol. *Environ Microbiol*. 2013;15:93–110.
41. Kessler B, Witholt B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J Biotechnol*. 2001;86(2):97–104.
42. Pötter M, Steinbüchel A. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules*. 2005;6(2):552–60.
43. Lu J, Tappel RC, Nomura CT. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polym Rev*. 2009;49(3):226–48.
44. Masood F, Yasin T, Hameed A. Polyhydroxyalkanoates - what are the uses? Current challenges and perspectives. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2014;8551:1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24963700>

45. Pederson EN, Mcchalicher CWJ, Srienc F. Bacterial Synthesis of PHA Block Copolymers. 2006;1904–11.
46. Tripathi L, Wu L, Chen J, Chen G. Synthesis of Diblock copolymer poly-3-hydroxybutyrate - block -poly-3-hydroxyhexanoate [PHB- b -PHHx] by a β - oxidation weakened *Pseudomonas putida* KT2442. Microb Cell Fact [Internet]. Microbial Cell Factories; 2012;11(1):1. Available from: Microbial Cell Factories
47. Yang YH, Brigham CJ, Budde CF, Boccazzi P, Willis LB, Hassan MA, et al. Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;87(6):2037–45.
48. Berezina N. Novel approach for productivity enhancement of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Cupriavidus necator* DSM 545. N Biotechnol [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;30(2):192–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.002>
49. Chee J, Yoga S, Lau N, Ling S, Abed RMM. Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics. 2010;1395–404.
50. Chen G. www.rsc.org/csr | Chemical Society Reviews A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. 2009;(Table 2).
51. Ahn WS, Park SJ, Lee SY, Ahn WOOSUK, Park SIJ a E. Production of Poly (3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey Solution Production of Poly (3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated. Appl Environ Microbiol. 2000;66(8):3624–7.
52. Chen CW, Don TM, Yen HF. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. Process Biochem. 2006;41:2289–96.
53. Yu-Tzu H, Chen P, Semblante GU, You S. Detection of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria from Domestic Wastewater Treatment Plant Using Highly Sensitive PCR Primers This study. 2012;22:1141–7.
54. Oren A. Bioenergetic Aspects of Halophilism WHY CERTAIN PHYSIOLOGICAL GROUPS OF MICROORGANISMS ARE ABSENT IN. Society. 1999;63(2):334–48.
55. Roohi A, Ahmed I, Iqbal M, Jamil M. Preliminary isolation and characterization of halotolerant and halophilic bacteria from salt mines of Karak, Pakistan. Pakistan J Bot. 2012;44(March):365–70.

56. Oren A. Halophilic microbial communities and their environments. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;33(Figure 1):119–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166915000245>
57. González-Hernández JC, Peña A. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2002. p. 137–56.
58. Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*. 2008;4:2.
59. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(2):504–44.
60. Oren A. Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Frontiers in Microbiology*. 2013. p. 1–6.
61. Vreeland RH, Litchfield CD, Martin EL, Elliot E. *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *Int J Syst Bacteriol*. 1980;30(2):485–95.
62. Mormile MR, Romine MF, Garcia MT, Ventosa a, Bailey TJ, Peyton BM. *Halomonas campisalis* sp. nov., a denitrifying, moderately haloalkaliphilic bacterium. *Syst Appl Microbiol* [Internet]. Urban & Fischer Verlag; 1999;22(4):551–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80008-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80008-3)
63. Quillaguamán J, Hatti-Kaul R, Mattiasson B, Alvarez MT, Delgado O. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:721–5.
64. Quillaguamán J, Hashim S, Bento F, Mattiasson B, Hatti-Kaul R. Poly(beta-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. *J Appl Microbiol*. 2005;99(1):151–7.
65. Van-Thuoc D, Quillaguamán J, Mamo G, Mattiasson B. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *J Appl Microbiol*. 2008;104:420–8.
66. Kulkarni SO, Kanekar PP, Nilegaonkar SS, Sarnaik SS, Jog JP. Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. *Bioresour Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;101(24):9765–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.089>

67. Yue H, Ling C, Yang T, Chen X, Chen Y, Deng H, et al. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2014;7(1):108. Available from: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/108>
68. Yin J, Chen J, Wu Q, Chen G. Halophiles , coming stars for industrial biotechnology ☆. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.008>
69. Koller M, Hesse P, Bona R, Kutschera C, Atlić A, Braunegg G. Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. *Macromol Biosci*. 2007;7(2):218–26.
70. Sauer T, Galinski E a. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng*. 1998;57(3):306–13.
71. Grant CL, Pramer D. Minor element composition of yeast extract. *J Bacteriol*. 1962;84:869–70.
72. Sreekanth M., Vijayendra, S V., Joshi G., Shamala T. Effect of carbon and nitrogen sources on simultaneous production of α -amylase and green food packaging polymer by *Bacillus* sp . CFR 67. *J food sci Technol*. 2013;50(April):404–8.
73. Quillaguamán J, Muñoz M, Mattiasson B, Hatti-Kaul R. Optimizing conditions for poly(β -hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;74(5):981–6.
74. Nunes JK, Maier JC, Rossi P, Dallmann PR, Silveira MHD, Ancuti M a., et al. Suplementação de extrato de levedura na dieta de poedeiras: Qualidade de ovos. *Arch Zootec*. 2010;59(227):369–77.
75. Valappil SP, Rai R, Bucke C, Roy I. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *J Appl Microbiol*. 2008;104(6):1624–35.
76. Borah B, Thakur PS, Nigam JN. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *J Appl Microbiol*. 2002;92(4):776–83.
77. Beaulieu M, Beaulieu Y, Melinard J, Pandian S, Goulet J. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(1):165–9.
78. Arun A, Arthi R, Shanmugabalaji V, Eyini M. Microbial production of poly- b -hydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments.

Bioresour Technol [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;100(7):2320–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.037>

79. Grothe E, Moo-young M, Chisti Y. Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyrate) microbial thermoplastic. *Enzym Microb Technol*. 1999;25:132–41.
80. Yamane T. Yield of Poly-0(-)-3-Hydroxybutyrate from Various Carbon Sources: A Theoretical Study. 1993;41:165–70.
81. Gomez JGC, Rodrigues MFA, Alli RCP, Torres BB, Bueno Netto CL, Oliveira MS, et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996;45:785–91.
82. Lopes MSG, Rocha RCS, Zanotto SP, Gomez JGC, Silva LF Da. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009;25(10):1751–6.
83. Centeno-Leija S, Huerta-Beristain G, Giles-Gómez M, Bolivar F, Gosset G, Martinez A. Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2014;105(4):687–96.
84. Park SJ, Jang Y-A, Noh W, Oh YH, Lee H, David Y, et al. Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose. *Biotechnol Bioeng [Internet]*. 2015;112(3):638–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.25469>
85. Pradella JGDC, Taciro MK, Mateus AYP. High-cell-density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor. *Bioresour Technol*. 2010;101(21):8355–60.
86. Rojo F. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: Optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(5):658–84.
87. Simon-Colin C, Raguénès G, Cozien J, Guezennec JG. *Halomonas profundus* sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *J Appl Microbiol*. 2008;104(5):1425–32.
88. Yin J, Fu X, Wu Q, Chen J, Chen G. Development of an enhanced chromosomal expression system based on porin synthesis operon for halophile *Halomonas* sp. 2014;8987–97.

89. Catzin J, Vargas I, Moguel F, Ramirez E. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium , *Halomonas nitroreducens* , isolated from hypersaline ponds. 2014;
90. Loo CY, Sudesh K. Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*. *Int J Biol Macromol*. 2007;40(5):466–71.
91. Gomez JGC, Rodrigues MF a, Alli RCP, Torres BB, Bueno Netto CL, Oliveira MS, et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996;45(6):785–91.
92. Doi Y, Tamaki A, Kunioka M, Soga K. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1988;28(4-5):330–4.
93. Lindenkamp N, Volodina E, Steinbüchel A. Genetically modified strains of *Ralstonia eutropha* H16 with β - ketothiolase gene deletions for production of copolyesters with defined 3-hydroxyvaleric acid contents. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(15):5375–83.
94. Fu XZ, Tan D, Aibaidula G, Wu Q, Chen JC, Chen GQ. Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals. *Metab Eng* [Internet]. Elsevier; 2014;23:78–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2014.02.006>
95. Brämer C. ., Silva LF, Gomez JG. ., Priefert H, Steinbuchel A. Identification of the 2-Methylcitrate Pathway Involved in the Catabolism of Propionate in the Polyhydroxyalkanoate- Producing Strain. *Microbiology*. 2002;68(1):271–9.
96. Doi Y, Kunioka M, Nakamura Y, Soga K. Nuclear magnetic resonance studies on unusual bacterial copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate. *Macromolecules*. 1988;21:2722–7.
97. Mendonça TT, Gomez JGC, Buffoni E, Sánchez Rodríguez RJ, Schripsema J, Lopes MSG, et al. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol*. 2014;116:815–29.
98. Valentin HE, Zwingmann G, Schonebaum A, Steinbuchel A. Metabolic pathway for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. 1995;60:43–60.
99. Elena SF, Lenski RE. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet*. 2003;4(6):457–69.

100. Da Silva GP, Mack M, Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;27(1):30–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>
101. Silva LF, Taciro MK, Raicher G, Piccoli RAM, Mendonça TT, Lopes MSG, et al. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2014;71:2–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043132>
102. Silva LF, Taciro MK, Michelin Ramos ME, Carter JM, Pradella JGC, Gomez JGC. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2004;31(6):245–54.
103. Zhang Y, Lin Z, Liu Q, Li Y, Wang Z, Ma H, et al. Engineering of Serine-Deamination pathway, Entner-Doudoroff pathway and pyruvate dehydrogenase complex to improve poly(3-hydroxybutyrate) production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2014;13(1):1–11. Available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/172>
104. Rodríguez-Contreras A, Koller M, Miranda-de Sousa Dias M, Calafell-Monfort M, Braunegg G, Marqués-Calvo MS. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. *Biochem Eng J* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;94:50–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X1400312X>
105. Chee JY, Tan Y, Samian MR, Sudesh K. Isolation and Characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) Capable of Producing Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Triglycerides, Fatty Acids and Glycerols. *J Polym Environ*. 2010;18(4):584–92.
106. Fukui T, Mukoyama M, Orita I, Nakamura S. Enhancement of glycerol utilization ability of *Ralstonia eutropha* H16 for production of polyhydroxyalkanoates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;75:59–68.
107. Justyna M, Wilke A, Przybyłek G, Ciesielski S. Mcl-PHAs produced by *Pseudomonas* sp. GI01 using fed-batch cultivation with waste rapeseed oil as carbon source. *J Microbiol Biotechnol*. 2011;22:371–7.
108. Jarmander J, Belotserkovsky J, Sjöberg G, Guevara-Martínez M, Pérez-Zabaleta M, Quillaguamán J, et al. Cultivation strategies for production of (R)-3-hydroxybutyric acid from simultaneous consumption of glucose, xylose and arabinose by *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* [Internet]. ???; 2015;14(1):1–12. Available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/14/1/51>

109. Poblete-Castro I, Rodriguez AL, Chi Lam CM, Kessler W. Improved production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in glucose-based fed-batch cultivations of metabolically engineered *Pseudomonas putida* strains. *J Microbiol Biotechnol*. 2014;24(1):59–69.
110. Le Meur S, Zinn M, Egli T, Thöny-Meyer L, Ren Q. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT2440 [Internet]. *BMC Biotechnology*. BMC Biotechnology; 2012. p. 53. Available from: BMC Biotechnology
111. Cesário MT, Raposo RS, de Almeida MCMD, van Keulen F, Ferreira BS, da Fonseca MMR. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *N Biotechnol*. 2014;31(1):104–13.
112. Cavaleiro JMBT, de Almeida MCMD, Grandfils C, da Fonseca MMR. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochem*. 2009;44(5):509–15.
113. Tanadchangsaeng N, Yu J. Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: Gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(11):2808–18.