

THANDARA GARCIA RAVELLI

**SELEÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE PHA SINTASES PARA A
CONSTRUÇÃO DE RECOMBINANTES EM *Burkholderia*
sacchari E *Pseudomonas sp* E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
POLIHIDROXIALCANOATOS COM DIFERENTES COMPOSIÇÕES
MONOMERICAS**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Luiziana Ferreira da Silva

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
2014

RESUMO

RAVELLI, T. G. Seleção de genes codificadores de PHA sintases para a construção de recombinantes em *Burkholderia sacchari* e *Pseudomonas sp* e avaliação da produção de polihidroxialcanoatos com diferentes composições monoméricas. 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2014.

Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por diversas bactérias a partir de fontes renováveis que despertam grande interesse industrial por serem termoplásticos biodegradáveis e biocompatíveis. A variabilidade da composição monomérica de PHA determina suas propriedades mecânicas e permite seu uso em diversas aplicações. Os PHA podem ser formados por monômeros de cadeia curta (PHAsCL) ou média (PHAMCL), ou ainda, formar copolímeros (PHAsCL-co-PHAMCL) que têm propriedades intermediárias. Três aspectos são determinantes para a produção de PHA: a fonte de carbono, as vias metabólicas bacterianas e a enzima PHA sintase. A enzima PHA sintase catalisa a polimerização de moléculas de R-hidroxiacil-CoA formando o biopolímero, sendo, assim, a enzima chave na biossíntese de PHA. São conhecidos quatro tipos de PHA sintases, de acordo com a especificidade pelo substrato e pela composição de peptídeos. Muitos estudos têm sido desenvolvidos buscando diferentes composições do polímero. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi à busca por genes codificadores desta enzima, construção e avaliação de recombinantes portando tais genes para buscar materiais com novas propriedades e aplicações. Inicialmente buscou-se novos genes de PHA sintase a partir de 390 clones de uma biblioteca metagenômica previamente detectados por PCR como positivos para algum tipo de PHA sintase. Posteriormente, duas novas fontes de PHA sintase foram buscadas: genes codificadores de PHA sintase III de *Thiocapsa pfennigii* e *Allochromatium vinosum*. Dos 390 clones, apenas 2 mostraram resultado positivo para PHA sintase de classe II através de reação de PCR e de sequenciamento, apresentando similaridade com genes conhecidos. Pelo fato de que as PHA sintases do tipo II já terem sido amplamente estudadas, ao contrário daquelas do tipo III, mais promissoras para este trabalho, genes codificadores foram buscados para testar sua inserção em hospedeiros capazes de acumular altas concentrações de PHA, mas afetados na sua PHA sintase nativa (*Pseudomonas putida* e *Burkholderia sacchari*), avaliando-se o tipo de PHA produzido. Assim, recombinantes de *Pseudomonas sp* e *B. sacchari* foram construídos pela introdução de genes de *T. pfennigii* (*phaEC_{Tp}*) e de *C. vinosum* (*phaEC_{Cv}*) clonados em pBBR1-MCS2. A produção de PHA pelos recombinantes obtidos foi avaliada qualitativamente por testes de coloração com Sudan Black B, indicaram resultados positivos apenas em *Burkholderia sacchari* abrigando o gene de *C. vinosum* sendo que para *Pseudomonas putida* abrigando *phaEC_{Cv}* e *phaEC_{Tp}* e *Burkholderia sacchari* *phaEC_{Tp}* o resultado foi negativo. Quantitativamente, a produção de PHA foi avaliada com ensaios em frascos agitados, empregando-se glicose e ácidos graxos contendo de 3 a 9 carbonos. A expressão dos genes *phaEC_{Cv}* em *B. sacchari* PHA⁻ foi bem sucedida, uma vez que os mesmos foram capazes de reestabelecer a produção de PHA na mutante. Utilizando glicose, tanto a linhagem selvagem como o recombinante de *Burkholderia sacchari* produziram um PHA composto de monômeros de 3-hidroxibutirato (3HB). A partir de hexanoato e glicose obteve-se um copolímero no qual foi possível aumentar a fração de 3HHx de 0,30 mol% na linhagem selvagem para 1,85 mol%, na linhagem mutante. *Pseudomonas putida* abrigando *phaEC_{Cv}* produziu um PHA no qual foi observado um aumento na fração de 3HHx de 0 para 9,11 mol% quando glicose foi fornecida como fonte de carbono. Essas linhagens poderão ser empregadas na produção de PHA com composição variada,

controlando-se a incorporação de frações 3HHx o que deve refletir nas suas propriedades, ampliando suas possibilidades de aplicação.

Palavras-chave: PHA. Metagenômica. Pseudomonas. Burkholderia. PHA sintase.

ABSTRACT

RAVELLI, T. G. *Selection of PHA synthases coding genes for the construction of recombinant Burkholderia sacchari and Pseudomonas sp and evaluation of polyhydroxyalkanoate production with different monomer compositions.* 2014. 107 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2014.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyesters accumulated by several bacteria from renewable sources that arouse great industrial interest because they are biodegradable and biocompatible thermoplastic. The variability of the PHA monomer composition determines its mechanical properties and allows their use in many applications. The PHAs may be formed by short-chain monomers (PHAsCL) or medium (PHAMCL), or even form polymers (PHAsCL co-PHAMCL) having intermediate properties. Three aspects are crucial for the production of PHA: the carbon source, the bacterial metabolic pathways and the PHA synthase enzyme. The PHA synthase catalyzes the polymerization of R-hydroxyacyl-CoA molecules forming biopolymer, and thus, the key enzyme in the biosynthesis of PHA. Four types of PHA synthases are known according to their substrate specificity and the peptide composition. Many studies have been undertaken to different compositions of the polymer. Thus, the aim of this paper was to search for genes encoding this enzyme, recombinant construction and assessment carrying such genes to find materials with new properties and applications. Initially we searched for new PHA synthase genes from 390 clones of a metagenomic library by PCR as previously detected positive for any type of PHA synthase. Later, two new sources of PHA synthase were sought: genes encoding PHA synthase III *Thiocapsa pfennigii* and *Allochromatium vinosum*. Out of 390 clones, only 2 showed positive for PHA synthase class II by PCR and sequencing reaction, showing similarity to known genes. Because of the fact that the type II PHA synthases has already been widely studied, unlike those of the type III, most promising for this work, coding genes were sought to test their integration in host able to accumulate high concentrations of PHA, but affected in its native PHA synthase (*Pseudomonas putida* and *Burkholderia sacchari*), evaluating the type of PHA produced. Thus, recombinant *Pseudomonas sp* and *B. sacchari* were built by the introduction of *T. pfennigii* genes (*phaEC_{Tp}*) and *C. vinosum* (*phaEC_{Cv}*) cloned into pBBR1-MCS2. The PHA production by recombinant obtained was qualitatively assessed by staining tests with Sudan Black B, indicated positive results only in *Burkholderia sacchari* harboring the gene *C. vinosum* being that *Pseudomonas putida* for housing *phaEC_{Cv}* and *phaEC_{Tp}* and *Burkholderia sacchari* *phaEC_{Tp}* the result was negative. Quantitatively, PHA production was assessed in shake flask tests, using glucose and fatty acids containing from 3 to 9 carbons. The expression of genes in *B. sacchari* *phaEC_{Cv}* PHA was successful, since they were able to restore the production of PHA in the mutant. Using glucose, both the wild type strain and the recombinant *Burkholderia sacchari* produced a PHA composed of monomers of 3-hydroxybutyrate (3HB). From hexanoate and glucose gave a copolymer in which the 3HHx was increased fraction of 0.30 mol% in the wild type strain to 1.85 mol% in the mutant strain. *Pseudomonas putida* harboring *phaEC_{Cv}* produced a PHA in which there was an increase in 3HHx fraction from 0

to 9.11 mol% when glucose was supplied as a carbon source. These lines can be used to produce PHA with varied composition, controlling the incorporation of 3HHx fractions which should reflect on their properties, expanding its application possibilities.

Keywords: PHA. Metagenomics. *Pseudomonas*. *Burkholderia*. PHA synthase.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os plásticos têm grande influência na sociedade moderna e estão presentes na vida das pessoas com diversas aplicações, sendo uma delas a substituição de matérias-primas convencionais como metais, vidros, papéis e madeira. Há também sua aplicação na manufatura de embalagens e outros produtos por causa de sua praticidade e descartabilidade rápida. Entre os diversos polímeros de uso na sociedade atual, os plásticos sintéticos têm sido os mais utilizados (PEREIRA, 2002, 2007).

No entanto, devido a sua lenta degradabilidade e ao descarte volumoso dos plásticos sintéticos é cada vez maior a preocupação com os impactos ambientais e as consequências à saúde e à vida na Terra. Uma vasta gama de alternativas biodegradáveis têm sido propostas para substituir os plásticos convencionais (SILVA et al., 2007).

Dentre os substitutos em desenvolvimento encontram-se os polímeros de amido modificado (combinado com polipropileno, polietileno, poliestireno, etc.), poli-ε-caprolactona (PCL), copoliésteres de acetato de celulose, álcool polivinílico (PVOH) e polihidroxialcanoatos – PHA (PEREIRA, 2002; PRADELLA, 2006).

Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por diversas bactérias a partir de fontes renováveis que despertam grande interesse industrial por serem termoplásticos, biodegradáveis e biocompatíveis. A variabilidade da composição monomérica de PHA determina suas propriedades mecânicas e permite seu uso em diversas aplicações. Os PHA podem ser formados por monômeros de cadeia curta (PHAscl) ou média (PHAmcl), ou ainda, formar copolímeros (PHAscl-PHAmcl) que têm propriedades intermediárias (ANDERSON; DAWES, 1990; GOMEZ, 2000b; STEINBÜCHEL, 1993).

A PHA sintase é a enzima chave para a biossíntese de PHA, sendo responsável pela catálise da polimerização das moléculas R-hidroxiacil-CoA formando o biopolímero. Entretanto sua especificidade e limitações metabólicas dos organismos produtores restringem a composição monomérica do PHA produzido e consequentemente das suas propriedades e aplicações (REHM, 2003).

A expressão de genes codificadores de PHA sintase em hospedeiros heterólogos tem levado à produção de PHA com novas propriedades (BOCANEGRA et al., 2013; SCHONEBAUM; STEINBUCHEL, 1996; VALENTIN et al., 1994). Nesse aspecto, é importante estudar as bibliotecas metagenômicas que além de fornecerem dados importantes sobre as características populacionais microbianas (RODRIGO et al., 2006) são também uma importante fonte de novos genes, principalmente provenientes de organismos não cultiváveis (ATLAS; BARTHA, 1997; GILLESPIE et al., 2002; LEFEVRE et al., 2008). Além disso, também é possível buscar organismos produtores de PHA como fonte de genes para expressão heteróloga.

Neste contexto, esse trabalho buscará diferentes genes para a expressão heteróloga em organismos produtores já conhecidos e avaliará se novos genes ou PHA com diferentes propriedades podem ser encontrados.

CONCLUSÕES

- A biblioteca metagenômica, apesar de constituir uma rica fonte de novos genes, possui diversas limitações. Entre elas, estão as técnicas de detecção dos genes que necessitam de rigorosa padronização e verificação previa da eficiência, bem como o fato de que muitas vezes os genes mesmo quando detectados, não estão necessariamente clonados com sua estrutura integral em razão da técnica de montagem da biblioteca.

Entre os recombinantes obtidos nesse trabalho observou-se que:

- Os genes *phaEC* de *Thiocapsa pffenigii* não foram capazes de restaurar a capacidade de produzir PHA nos mutantes de *B. sacchari* e *Pseudomonas sp* afetados no gene codificador de sua PHA sintase nativa

- O recombinante de *B. sacchari* abrigando os genes *phaEC* de *Allochromatium vinosum* quando submetido as fonte de carbono glicose e hexanoato produziu um polímero com conteúdo de 3HV inferior ao da linhagem

- *B.sacchari* portando os genes *phaEC* de *Allochromatium vinosum*, na presença de ácido hexanoico, gerou um polímero contendo uma fração de 3HHx três vezes maior do que aquela observada no polímero produzido pela a linhagem selvagem.

- O recombinante de *Pseudomonas sp* abrigando o gene *phaEC* de *Allochromatium vinosum*, quando alimentado por glicose como fonte de carbono aumentou a capacidade da linhagem LFM 461 de incorporar monômeros 3HHx em relação a linhagem selvagem 046

Essas linhagens poderão ser empregadas na produção de PHA com composição variada, controlando-se a incorporação de frações 3HHx o que deve refletir nas suas propriedades, ampliando suas possibilidades de aplicação

REFERÊNCIAS¹

- ABE, H. et al. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 16, n. 3, p. 115-119, 1994. ISSN 0141-8130.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990. ISSN 0146-0749.
- ANEJA, P. et al. Heterologous complementation of the exopolysaccharide synthesis and carbon utilization phenotypes of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 polyhydroxyalkanoate synthesis mutants. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 239, n. 2, p. 277-283, 2004. ISSN 0378-1097.
- ANTONIO, R. V.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolymers in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 182, n. 1, p. 111-117, Jan. 2000. ISSN 0378-1097.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**: fundamentals and applications. 4th ed. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings Pub. Co., 1997.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- BOCANEGRA, J. K. et al. Influence of pH on the molecular weight of Poly-3-hydroxybutyric acid (P3HB) produced by recombinant *escherichia coli*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, May. 2013. ISSN 1559-0291.
- BONFIELD, J. K.; STADEN, R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. **DNA Seq.**, v. 6, n. 2, p. 109-117, 1996. ISSN 1042-5179.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 7, p. 2647-253, Jul. 1997. ISSN 0099-2240.
- BRAMER, C. O. et al. Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, pt. 5, p. 1709-1713, Sep. 2001. ISSN 1466-5026

¹De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 200

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolymers from renewable resources: physiological and engineering aspects. **J. Biotechnol.**, v. 65, n. 2-3, p. 127-161, Oct. 1998. ISSN 0168-1656.

BUENO NETO, C. L. et al. **Processo para produzir polihidroxialcanoatos a partir de açúcares extraídos da cana-de-açúcar**. 1991.

BUFFONI, E. **Avaliação da Composição de Polímeros Biodegradáveis Produzidos por Burkholderia sacchari a partir de Diferentes Substratos**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, USP, 2006.

CHEEMA, S. et al. Exploiting metagenomic diversity for novel polyhydroxyalkanoate synthases: production of a terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate) with a recombinant *Pseudomonas putida* strain. **Bioresour. Technol.**, v. 103, n. 1, p. 322-328, Jan. 2012. ISSN 1873-2976.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, n. 8, p. 2434-2446, Aug. 2009. ISSN 1460-4744.

DIMITROV, M. R. **Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxialcanoato**. 2009. (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FILIPOV, M. C. S. **Obtenção e caracterização de mutantes de burkholderia sp. ipt101 deficientes na síntese ou no reconsumo de poli-3-hidroxitubirato - um plástico biodegradável**. 2000. 154 f. (Mestrado) - Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan /IPT, Universidade São Paulo, São Paulo, 2000.

GALINDO ROZO, Y. P. **Bioprospecção de genes relacionados à biossíntese de polímeros biodegradáveis a partir de uma biblioteca metagenômica de solo de mata atlântica**. 2011. 119 f. (Mestrado) - Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GILLESPIE, D. E. et al. Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 9, p. 4301-4306, 2002. ISSN 0099-2240.

GODOY, F. A. et al. Poly-beta-hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 36, n. 5, p. 315-320, 2003. ISSN 0266-8254.

GOMES, R. S. **Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica**. 2009. (Doutorado) - Instituto de Biotecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

GOMEZ, J. G. C. **Produção por *Pseudomonas sp* de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência, modificação**

da composição e obtenção de mutantes. 2000a. (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000a.

GOMEZ, J. G. C. **Produção por Pseudomonas sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos:** avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes. 2000. (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2000b.

GOMEZ, J. G. C. et al. Evaluation of soil Gram-negative bacteria as regards polyhydroxyalkanoic acids yields from carbohydrates and propionic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 45, p. 785-789, 1996.

GUILLARD, R. R.; RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana Hustedt, and Detonula confervacea (cleve) Gran. **Can. J. Microbiol.**, v. 8, p. 229-239, 1962. ISSN 0008-4166.

GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.** New York: Plenum Press, 1962. 26-60 p.

HAI, T.; HEIN, S.; STEINBÜCHEL, A. Multiple evidence for widespread and general occurrence of type-III PHA synthases in cyanobacteria and molecular characterization of the PHA synthases from two thermophilic cyanobacteria: Chlorogloeopsis fritschii PCC 6912 and Synechococcus sp. strain MA19. **Microbiology**, v. 147, pt. 11, p. 3047-3060, 2001. ISSN 1350-0872.

HAI, T. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in sulfate-reducing bacteria and identification of a class III PHA synthase (PhaEC) in Desulfococcus multivorans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 8, p. 4440-4448, 2004. ISSN 0099-2240.

HOLMES, P. A. Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Phys. Technology.**, v. 16, p. 32-36, 1985.

HUISMAN, G. W. et al. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 8, p. 1949-1954, 1989. ISSN 0099-2240.

HYAKUTAKE, M. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by class IV PHA synthases employing Ralstonia eutropha PHB(-)4 as host strain. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 75, n. 8, p. 1615-1657, 2011. ISSN 1347-6947.

KIDWELL, J.; VALENTIN, H. E.; DENNIS, D. Regulated expression of the Alcaligenes eutrophus pha biosynthesis genes in Escherichia coli. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 1391-1398, 1995. ISSN 0099-2240.

KOVACH, M. E. et al. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **Biotechniques**, v. 16, n. 5, p. 800-802, 1994. ISSN 0736-6205.

LANGENBACH, S.; REHM, B. H.; STEINBÜCHEL, A. Functional expression of the PHA synthase gene phaC1 from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 150, n. 2, p. 303-309, 1997. ISSN 0378-1097.

LEE, I. Y. et al. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly(β -hydroxybutyrate-*co*- β -hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. **J. Ferm. Bioeng.**, v. 81, p. 255-258, 1996.

LEFEVRE, F. et al. Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. **Res Microbiol.**, v. 159, n. 3, p. 153-161, 2008. ISSN 0923-2508.

LIEBERGESELL, M.; HUSTCDC, E.; TIMM, A.; STEINBUCHEL, A.; FULLER, R. C.; LENZ, R. W.; AMP, SCHLEGEL. Formation of poly(3-hydroxyalkanoic acids) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria. [Archives of Microbiology](#), v. 155, p.415-421 1991.

LIEBERGESELL, M.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 292-300, 1993.

LIEBERGESELL, M.; RAHALKAR, S.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Allochromatium vinosum* enzyme. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, n. 2, p. 186-194, 2000. ISSN 0175-7598.

LIEBERGESELL M, S. A. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatiurn vinosum* strain D. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, p. 135-150, 1992.

LIEBERGESELL, M. et al. Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Allochromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. **Eur. J. Biochem.**, v. 226, n. 1, p. 71-80, 1994. ISSN 0014-2956.

LOPES, M. S. et al. Role of CcpA in polyhydroxybutyrate biosynthesis in a newly isolated *Bacillus* sp. MA3.3. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, n. 2, p. 63-69, 2011. ISSN 1660-2412.

LOPES, M. S. G. **Produção de plásticos Biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2009. 131 f. (Doutorado) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

LOPES, M. S. G. et al. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. **World Journal Microb. Biotech.**, v. 25, p. 1751-1756, 2009.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 6, p. 510-516, Jun 2005. ISSN 1740-1526.

LORENZ, P. et al. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, n. 6, p. 572-577, Dec. 2002. ISSN 0958-1669.

LÍCIO, D. C. P. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase**. 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2011.

M, S.; N, A.; A., S. Ecological and physiological studies on purple sulphur bacteria (Chromatiaceae) at aswan high dam lake. **American-Eurasian Journal Agriculture & Environmental Science.**, v. 4, p. 462-467, 2008.

MASSINI, K. C. **Bioprospecção de compostos bioativos em uma biblioteca metagenômica**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2004.

MATSUDA, T. S. **Isolamento de bactérias produtoras de Polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

MENDONÇA, T. et al. Exploring the potential of Burkholderia sacchari to produce polyhydroxyalkanoates. **Applied Microbiology**, Submetido.

MENDONÇA, T. T. **Isolamento de bactérias produtoras de Polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado). Microbiologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

MENDONÇA, T. T. et al. Exploring the potential of Burkholderia sacchari to produce polyhydroxyalkanoates. **J. Appl. Microbiol.**, v. 116, n. 4, p. 815-829, Apr. 2014. ISSN 1365-2672.

MIYAKE, M. et al. Control of poly-beta-hydroxybutyrate synthase mediated by acetyl phosphate in cyanobacteria. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 16, p. 5009-5013, Aug. 1997. ISSN 0021-9193.

NODA, I. et al. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 580-586, 2005 Mar-Apr 2005. ISSN 1525-7797.

PANDEY, G. et al. Extracting the hidden features in saline osmotic tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* from DNA microarray data using the self-organizing map: biosynthesis of amino acids. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 75, n. 2, p. 415-426, May 2007. ISSN 0175-7598.

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. ISSN 1525-7797.

PARK, S. J. et al. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, n. 6, p. 1196-1206, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1873-1899.

PEREIRA, E. M. Clonagem de genes do ciclo de 2-metilcitrato e avaliação de estratégias para a obtenção de mutantes prp de *Burkholderia sacchari*, produtora de plástico biodegradável. 2002. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2002.

PEREIRA, E.M. Avaliação da influência de genes do catabolismo de propionato sobre a síntese de copolímero biodegradável em *Burkholderia sacchari* e outras bactérias. 2007. Tese (Doutorado) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2007.

PEREIRA, E. M. Diversidade bacteriana de um latos solo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica. 2003. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2003.

POLI, A. et al. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. **Archaea**, v. 2011, p. 693-695, 2011. ISSN 1472-3654.

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório técnico no. 84396-205. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência Tecnologia e Inovação, 2006. Disponível em: <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf> Acesso em: 24 set. 2014.

QUILLAGUAMÁN, J. et al. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. **Appl. Microbiol.Biotechnol.**, v. 85, n. 6, p. 1687-1696, Feb 2010. ISSN 1432-0614.

REES, H. C. et al. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles**, v. 7, n. 5, p. 415-421, Oct 2003. ISSN 1431-0651.

REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem. J.**, v. 376, pt. 1, p. 15-33, Nov 2003. ISSN 1470-8728.

REHM, B. H.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, n. 1-3, p. 3-19, 1999 Jun-Jul 1999. ISSN 0141-8130.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass-ester hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

RODRIGO, M. P. et al. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 439-447, 2006.

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

SCHALLMEY, M. et al. Harvesting of novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase encoding genes from a soil metagenome library using phenotypic screening. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 321, n. 2, p. 150-156, Aug. 2011. ISSN 1574-6968.

SCHLEGEL HG, L. R., KRAUSS I. The isolations of mutants not accumulating poly- β -hydroxybutyric acid. **Arch. Microbiol.**, v. 71, p. 283-294, 1970.

SHAMALA, T. R. et al. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, n. 3, p. 369-374, 2003. ISSN 1364-5072.

SHEU, D. S.; WANG, Y. T.; LEE, C. Y. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. **Microbiology**, v. 146, pt. 8, p. 2019-2025, Aug. 2000. ISSN 1350-0872.

SILVA, L. et al. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of recovered cells. **Rev. Microbiol.**, v. 23, n. 2, p. 117-122, 1992.

SILVA, L. F. et al. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Quím. Nova**. v. 30, p. 1732-1743, 2007.

SILVA, L.F. et al. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, n. 6, p. 245-254, Jul 2004. ISSN 1367-5435.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. **A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering**: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

SIMON-COLIN, C. et al. A novel mcl PHA-producing bacterium, *Pseudomonas guezennaei* sp. nov., isolated from a 'kopara' mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. **J Appl. Microbiol.**, v. 104, n. 2, p. 581-586, Feb. 2008. ISSN 1365-2672.

SLATER, S. et al. Multiple beta-ketothiolases mediate poly(beta-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 8, p. 1979-1987, Apr. 1998. ISSN 0021-9193.

SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R. D. Rapid genetic characterization of poly(hydroxyalkanoate) synthase and its applications. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 532-7, 2005. ISSN 1525-7797.

SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, n. 6, p. 690-694, Jun. 2000. ISSN 0175-7598.

SOLAIMAN, D. K. Y. Polymerase-chain-reaction-based detection of individual polyhydroxyalkanoate synthase *phaC1* and *phaC2* genes. **Biotech. Lett.**, v. 24, p. 245-250, 2002.

SPIEKERMANN, P. et al. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch. Microbiol.**, v. 171, n. 2, p. 73-80, Jan. 1999. ISSN 0302-8933.

STEINBUCHEL, A.; VALENTIN, H. E. DIVERSITY OF BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOIC ACIDS. **Fems. Microbiology. Letters**, v. 128, n. 3, p. 219-228, May 1995. ISSN 0378-1097.

STEINBÜCHEL, A. **Polyhydroxyalkanoic acids**. Novel materials from biological sources. Macmillan, 1991.

STEINBÜCHEL, A.; HEIN, S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 71, p. 81-123, 2001. ISSN 0724-6145.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

TARONCHER-OLDENBURG, G.; NISHINA, K.; STEPHANOPOULOS, G. Identification and analysis of the polyhydroxyalkanoate-specific beta-ketothiolase and acetoacetyl coenzyme A reductase genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 10, p. 4440-4448, Oct. 2000. ISSN 0099-2240.

TIPPMANN, H.-F. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 82-87, 2004.

TORSVIK, V. et al. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **J. Biotechnol.**, v. 64, n. 1, p. 53-62, Sep. 1998. ISSN 0168-1656.

VALENTIN, H. E. et al. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as anew constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria., **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, n. 5, p. 710-716, 1994.

VALENTIN, H. E.; SCHONEBAUM, A.; STEINBUCHEL, A. Identification of 5-hydroxyhexanoic acid,4-hydroxyheptanoic acid and 4-hydroxyoctanoic acid as new

constituents of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 46, p. 261-267, 1996.

WILD, J.; HRADECNA, Z.; SZYBALSKI, W. Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vectors and genomic clones. **Genome Res.**, v. 12, n. 9, p. 1434-1444, Sep. 2002. ISSN 1088-9051.

ZHENG, L. Z. et al. Molecular cloning and functional analysis of (R)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein:coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 252, n. 2, p. 299-307, Nov. 2005. ISSN 0378-1097.