

GABRIELA CAZONATO LOZANO SAKALOUSKAS

**EFEITO DE LonA NOS PROCESSOS DE SÍNTESE E MOBILIZAÇÃO DE POLI-3-
HIDROXIBUTIRATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão original

São Paulo

2018

RESUMO

LOZANO-SAKALAUŠKAS, G. C. **Efeito de LonA nos processos de síntese e mobilização de poli-3-hidroxi-butirato**. 2018. 133 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Polihidroxi-álcanoatos (PHA) são poliésteres armazenados intracelularmente em diversas bactérias. Estes são sintetizados principalmente em condições de excesso de fonte de carbono e limitação de nutrientes essenciais, e degradados pela mobilização dos grânulos quando há escassez de carbono e/ou energia. O PHA mais conhecido é o poli-3-hidroxi-butirato (P3HB). Sabe-se que a síntese de PHA depende principalmente das PHA sintases (PhaC), enquanto a mobilização ocorre pela ação das PHA despolimerases intracelulares (sendo PhaZa1 a de maior destaque). Um estudo anterior com linhagens recombinantes de *Escherichia coli* capazes de acumular P3HB demonstrou que a expressão simultânea dos genes *lonA* e *phaZa1*, de *Ralstonia eutropha*, resulta em altas taxas de mobilização do polímero previamente acumulado. Porém, não se observa mobilização expressiva quando um ou outro gene encontra-se isolado na célula. Surpreendentemente, a presença de LonA isoladamente na cepa recombinante de *E. coli* leva a um aumento significativo no acúmulo de P3HB intracelular, sugerindo que LonA desempenhe papel também na síntese do polímero. O presente trabalho avaliou o teor de P3HB em diferentes linhagens de *E. coli* (XL1-Blue, LS5218 e MG1655), capazes de acumular este polímero por meio de dois diferentes plasmídeos (pSK⁻::*phaCAB* e pJM9131), com e sem a presença do gene *lonA*, clonado no vetor pBBR1MCS-5. Nos cultivos realizados em agitador rotativo, todas as cepas analisadas apresentaram significativo aumento das taxas de P3HB acumulados quando há expressão de *lonA*. A cepa recombinante de *E. coli* XL1-Blue abrigando o plasmídeo pJM9131 se mostrou mais eficiente no acúmulo do biopolímero quando *lonA* era expresso, atingindo mais de 65% da MSC, sendo esta cepa eleita para cultivos em biorreator. Os resultados dos cultivos em biorreatores indicam que a presença de LonA leve a uma alteração geral no metabolismo celular, favorecendo não apenas o acúmulo de P3HB, mas também o crescimento celular. Deste modo, LonA parece ter um efeito pleotrópico neste processo. Paralelamente a este trabalho, foram construídas linhagens de *E. coli* capazes de acumular P3HB, abrigando o gene *phaP1*, que codifica a PHAsina mais abundante na célula, e outra combinando os genes *phaP1* e *phaZa1*. PHAsinas são proteínas que estão associadas à superfície dos grânulos de PHA, conferindo maior estabilidade aos mesmos. Alguns autores demonstram que a coexpressão de PHAsinas e PHA despolimerases intracelulares influencia na capacidade da célula de degradar o polímero intracelular. Desta forma, este trabalho buscou comparar o efeito de LonA e de PhaP1 no processo de mobilização de P3HB, através de cultivos *in vivo* e da tiólise dos grânulos *in vitro*. Os dados apresentados mostram que, embora ambas as proteínas avaliadas sejam importantes ativadores da mobilização em linhagens de *E. coli*, o efeito decorrente da presença de LonA é mais expressivo, sugerindo que essa enzima seja essencial para que a degradação ocorra. Os ensaios *in vitro* apontam ainda que LonA não seja uma proteína associada ao grânulo. Foi realizada a expressão e purificação das proteínas recombinantes LonA, PhaC e PhaZa1, individuais ou combinadas (LonA+PhaC e LonA+PhaZa1), em fusão com um peptídeo composto por múltiplos resíduos de histidina. Entretanto, não foi possível demonstrar uma interação direta pela copurificação de LonA com PhaC ou com PhaZa1. Todos os genes clonados neste trabalho foram obtidos a partir do genoma de *R. eutropha*.

Palavras-chave: Poli-3-hidroxi-butirato. Síntese e mobilização de P3HB. Proteína LonA. *Ralstonia eutropha*. *Escherichia coli* recombinantes. Purificação de proteínas.

ABSTRACT

LOZANO-SAKALOUSKAS, G. C. **Effect of LonA on synthesis and mobilization of poly-3-hydroxybutyrate processes.** 2018. 133 p. PhD thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polymers stored intracellularly in several bacteria strains. PHA are synthesized mainly under conditions of carbon source excess and limitation of essential nutrients, and degraded by the granules mobilization when in carbon and/or energy starvation. The best known PHA is the poly-3-hydroxybutyrate (P3HB). It is known that the PHA synthesis depends mainly on PHA synthases (PhaC), while the mobilization occurs through the intracellular PHA depolymerase action (PhaZa1 being the most prominent). An earlier study using recombinant *E. coli* strains able to accumulating P3HB, shown that the simultaneous expression of lonA and phaZa1 genes, from *Ralstonia eutropha*, results in high rates of polymer mobilization. However, no significant mobilization was observed when only one gene was expressed in the cell. Surprisingly, the LonA presence singly in recombinant *E. coli* strain cause a significant increase in P3HB accumulation, suggesting that LonA also plays a role in polymer synthesis. This work evaluated the P3HB rates in different *E. coli* strains (XL1-Blue, LS5218 and MG1655), able to accumulate this polymer by two different plasmids (pSK::phaCAB and pJM9131), with and without the lonA gene, cloned in pBBR1MCS-5 vector. In shake flasks cultures, all analyzed strains showed a significant increase in P3HB accumulation rates when lonA was expressed. The recombinant *E. coli* strain XL1-Blue, harboring pJM9131 plasmid, was shown to be more efficient in biopolymer accumulation with LonA presence, reaching more than 65% of DWC. This strain was selected to bioreactor assays. The results of cultures in bioreactors indicate that LonA presence cause a generalized alteration in cellular metabolism, favoring not only P3HB accumulation, but also the cellular growth. In this way, LonA appears to have a pleotropic effect in this process. Parallel to this work, *E. coli* strains able to accumulate P3HB, harboring the phaP1 gene, that encodes the most abundant PHAsin in the cell, and another combining phaP1 and phaZa1 genes, were constructed. PHAsins are protein that are associated with the surface of PHA granules, conferring more stability to them. Some authors demonstrated that the coexpression of PHAsins and intracellular PHA depolymerase influences the ability of cell degradation. Thus, this work aimed TO compare the LonA and PhaP1 effect in P3HB mobilization, through in vivo assay and in vitro granule thiolysis. The presented results show that, although both proteins evaluated are important activators of the mobilization in *E. coli* strains, the LonA effect is more expressive, suggesting that this enzyme is essential for the granules degradation to occur. In vitro assays indicate, that LonA is not a granules-associated protein. The expression and purification were accomplished in the recombinant proteins LonA, PhaC and PhaZa1, alone or combine (LonA+PhaC and LonA+PhaZa1), in fusion with peptide of multiple histidine residues. However, it was not possible to demonstrate a direct interaction by the co-purification of LonA and PhaC or PhaZa1. All genes cloned in this work was obtained from *R. eutropha* genome.

Keywords: Poly-3-hydroxybutyrate. P3HB synthesis and mobilization. LonA protein. *Ralstonia eutropha*. *Escherichia coli* recombinant strain. Protein purification.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O uso de embalagens descartáveis se tornou crescente nas últimas décadas estando presente na maioria dos produtos consumidos pela sociedade, e os plásticos ainda lideram os materiais de eleição para tal uso. De forma geral, estes plásticos são oriundos de polímeros sintéticos que, além de terem origem petroquímica, são degradados lentamente na natureza, implicando em diversos problemas ambientais. A substituição destes produtos derivados de petróleo por outros de origem biológica tem se mostrado uma boa alternativa. Uma abordagem promissora é utilização dos polihidroxialcanoatos (PHA), uma família de poliésteres sintetizados e armazenados intracelularmente na forma de grânulos, em diversas bactérias, atuando como reserva de carbono e energia para esses micro-organismos.

Tecnicamente, os PHA poderiam substituir parcialmente os plásticos petroquímicos. No entanto, a sua produção em larga escala ainda não é competitiva quando comparada aos plásticos tradicionais, embora algumas aplicações específicas possam ser justificadas, como em biomedicina. Desta forma, o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem melhorias nesse processo, poderia ter um forte impacto no custo industrial da produção de PHA.

Os PHA são sintetizados e degradados naturalmente por diversos micro-organismos, e a bactéria *Ralstonia eutropha* é um organismo modelo para os estudos destes polímeros. Uma ampla variedade de PHA pode ser produzida, sendo sua composição fortemente influenciada pelas vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras, pelo substrato fornecido na fase acúmulo e pelo tipo de enzima PHA sintase (PhaC) presente no organismo produtor. Dentre os muitos polímeros possíveis, o P3HB (poli-3-hidroxi-butarato) é o PHA mais amplamente estudado, apresentando monômeros de quatro carbonos.

Os micro-organismos produtores de PHA são dotados também de uma maquinaria de despolimerização, que permite a mobilização do polímero. A mobilização consiste na degradação do polímero previamente acumulado, em situações de deficiência ou ausência de fonte exógena de carbono e/ou energia. Alguns estudos sugerem que o metabolismo de PHA é um processo cíclico, no qual as PHA sintases e PHA despolimerases intracelulares (i-PHA despolimerases) atuam simultaneamente. Entretanto, as taxas de polimerização costumam ser cerca de 10 vezes mais elevadas que as taxas de despolimerização intracelular sob condições de acúmulo de polímero.

Dentre os diferentes metabolismos de síntese de PHA, a rota de biossíntese de P3HB em *R. eutropha* é a melhor caracterizada. Neste processo, os genes *phaA*, *phaB* e *phaC* codificam as enzimas envolvidas na síntese do biopolímero a partir de acetil-CoA e, assim como

em diversas outras bactérias como *Azohydromonas lata* e *Burkholderia sacchari*, estes genes encontram-se organizados no *operon phaCAB*. Já no processo de mobilização, a degradação se inicia pela ação das i-P3HB despolimerases, codificadas pelos genes *phaZ*, que hidrolisam o polímero formando monômeros e/ou oligômeros de ácido R-3-hidroxi-butírico (3HB). O processo conta ainda com as oligômero hidrolases (PhaY), que clivam os oligômeros formados, em monômeros de 3HB. Embora no genoma de *R. eutropha* exista pelo menos nove genes anotados como codificadores de enzimas relacionadas à mobilização de P3HB (sendo que sete codificariam i-P3HB despolimerases e dois oligômero hidrolases), apenas o gene *phaZa1* teve seu papel efetivamente caracterizado.

Uma das estratégias desenvolvidas para maximizar a produção de P3HB, e para esclarecer o papel das proteínas envolvidas no metabolismo do polímero, é a clonagem dos genes de interesse em linhagens recombinantes de *Escherichia coli*. Por não ser um produtor natural de PHA, linhagens de *E. coli* recombinantes são fortes candidatas para produção industrial desses biopolímeros, principalmente devido a ausência de mecanismos naturais de mobilização, o que possibilita ignorar um sistema de regulação natural em torno do metabolismo de PHA. Embora diversos estudos estejam descritos na literatura, a produção de P3HB em *E. coli* representa ainda um desafio interessante, uma vez que diferentes aspectos podem influenciar e modular a capacidade celular de sintetizar este polímero. Há muito para ser esclarecido, principalmente no que diz respeito a cultivos em biorreatores para o entendimento do metabolismo celular, a fim de alcançar taxas de acúmulo de P3HB mais eficientes.

Além dos genes cujos produtos estão sabidamente envolvidos no metabolismo de P3HB, estudos anteriores em nosso laboratório apontaram o envolvimento do produto do gene *lonA* tanto nos processos de síntese como de mobilização deste bioplástico. A proteína LonA, anotada como uma protease ATP dependente, teve seu papel relacionado a diversos processos nos diferentes organismos, como divisão celular, biossíntese flagelar, síntese da cápsula, tolerância a acidez, mobilidade, formação de biofilme, regulação da resposta SOS no reparo de DNA, virulência, adaptação a escassez nutricional, regulação do sistema *Quorum Sensing* (QS), regulação produção de ramnolipídeos, entre outros. Entretanto, mesmo sendo uma proteína amplamente estudada, LonA nunca havia sido apontada até então em outros trabalhos relacionados ao metabolismo de PHA.

Em nossos estudos anteriores, avaliamos a mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando os genes de acúmulo (*phaCAB*) e de mobilização de P3HB (*phaZa1* e *lonA*) de *R. eutropha*. Neste trabalho, foi possível observar que quando *phaZa1* e

lonA estavam presentes simultaneamente, as taxas de mobilização superaram 50% do polímero previamente acumulado, embora não tenha havido mobilização efetiva quando apenas um destes genes estava presente. Inesperadamente, o mesmo trabalho demonstrou que a presença do gene *lonA*, sem simultânea expressão de *phaZa1*, levou a um aumento expressivo das taxas de acúmulo de P3HB pela linhagem recombinante de *E. coli*, podendo atingir mais de 70% de sua massa seca celular, em cultivos em frascos agitados, utilizando glicose como fonte de carbono. Nossos resultados prévios, nos sugerem a existência de uma interação entre LonA e as proteínas envolvidas no acúmulo e na degradação intracelular de P3HB, possivelmente PhaC (P3HB sintase) e PhaZa1 (i-P3HB despolimerase), respectivamente. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo o estudo de LonA, tanto no processo de síntese quanto de mobilização de P3HB, através de cultivos de linhagens recombinantes de *Escherichia coli*, visando o melhor entendimento desta proteína no metabolismo deste biopolímero.

CONCLUSÃO

As conclusões deste trabalho estão apresentadas a seguir.

As linhagens de *Escherichia coli* avaliadas neste trabalho (XL1-Blue, LS5218 e MG1655) tiveram sua capacidade de síntese de P3HB aumentada quando o gene *lonA* está presente, em comparação com as respectivas cepas controle que não expressam esse gene, sustentando a hipótese de que LonA é requerido para atingir maiores taxas de produção desse biopolímero nas mesmas. Contudo, esta protease parece ter um efeito pleotrópico neste metabolismo, favorecendo de forma indireta o acúmulo de P3HB.

Dentre as cepas de *E. coli* avaliadas em cultivos em agitadores rotativos, as linhagens XL1-Blue e MG1655 foram as que apresentaram maiores teores de acúmulo de P3HB intracelular, entretanto o papel de LonA na síntese do biopolímero se mostrou mais evidente na linhagem XL1-Blue, quando comparado a linhagem controle.

Os primeiros experimentos com a linhagem de *E. coli* XL1-Blue em biorreatores demonstraram que esta cepa apresenta dificuldades em crescer em meio mínimo, sendo necessário a adição de extrato de levedura ao cultivo. Além disso, é preciso adicionar cloreto de sódio ao meio de cultura, para que o crescimento celular seja efetivamente observado.

Os testes em agitadores rotativos sugerem que a concentração de 4,0 g/L de NaCl ao meio de cultura é a que melhor favorece a formação de biomassa, bem como o acúmulo de P3HB, nas células de *E. coli* XL1-Blue.

A expressão de LonA na linhagem de *E. coli* XL1-Blue pJM9131 ocasiona um atraso no crescimento celular desta cepa nas primeiras horas do cultivo, quando comparado à formação de biomassa da cepa controle, tanto em cultivos em agitadores rotativos, como em biorreatores. Entretanto, após 20 horas de cultivo em biorreatores, este cenário se inverte e a linhagem com a presença de LonA aumenta sua produção celular em relação à linhagem controle. Estes dados indicam que LonA leva a uma alteração no metabolismo geral da célula, de modo a favorecer tanto a síntese de P3HB, como a formação de biomassa celular, em relação à linhagem controle.

As cepas avaliadas de *E. coli* XL1-Blue em biorreatores produzem altas concentrações de ácido acético até cerca de 38 horas de cultivos, o que dever ser um inibidor para o crescimento celular. Contudo, nas fases finais de cultivo, quando a concentração de glicose se torna limitante no meio, este subproduto passa ser consumido pela célula, atuando como fonte de carbono alternativa para as células.

A análise dos percentuais de carbonos recuperados na formação dos respectivos produtos metabólicos, sugere que a presença de LonA faça com que mais carbono seja desviado

para a produção de P3HB e formação de biomassa celular, do que para a respiração, demonstrando clara alteração na distribuição de fluxos metabólicos quando esse gene é expresso, em relação ao controle. Estes dados sustentam a hipótese de que LonA desempenha um papel pleotrópico na síntese deste biopolímero.

A expressão isolada da i-P3HB despolimerase PhaZa1, de *R. eutropha*, em linhagens recombinantes de *E. coli* não resulta em mobilização expressiva de P3HB. Entretanto as taxas de mobilização de P3HB nestes recombinantes passam a ser evidentes quando há coexpressão de PhaZa1 e LonA ou PhaZa1 e PhaP1, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*. Entretanto, a concomitante expressão de LonA e PhaZa1 resulta em taxas de mobilização de P3HB até 3 vezes maiores que a degradação do polímero na presença de PhaP1 e PhaZa1, em cultivos em agitador agitado.

A tiólise dos grânulos purificados de nP3HB, com conseqüente formação de 3HB-CoA, confirma que a degradação de P3HB ocorre na presença concomitante de PhaP1 e PhaZa1 ou LonA e PhaZa1, sendo mais expressivas neste último caso.

Embora seja evidente que LonA desempenhe um papel chave para que a mobilização de P3HB em *E. coli* recombinante ocorra, está proteína parece não estar associada ao grânulo, uma vez que a tiólise dos grânulos só pode ser detectada quando foi adicionado à mistura extrato celular contendo LonA, e não quando havia apenas os grânulos purificados.

Não há uma ligação direta entre as proteínas LonA e PhaC ou LonA e PhaZa1, pelo menos não estável o suficiente para serem copurificadas por cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular.

REFERÊNCIAS

- ABE, T.; KOBAYASHI, T.; SAITO, T. Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.*, v. 187, p. 6982-6990, 2005.
- ABE, H.; DOI, Y.; FUKUSHIMA, T.; EYA, H. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 16, n. 3, p. 115–119, 1994.
- ADAYA, L.; GUZMÁN, J.; MORENO, S.; MILLÁN, M.; CARLOS, P.; GUADELUPE, E.; SEGURA, D. Characterization of the PHB depolymerase Avin03910, the main responsible for PHB mobilization in *Azotobacter vinelandii*. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOPOLYMERS 2013, 2013. Lisboa. Book os Abstract. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia- Universidade Nova de Lisboa, 2013, 161 f.
- ADAYA, L.; MILLÁN, M.; PENA, C.; JENDROSSEK, D.; ESPÍN, G.; TINOCO-VALÊNCIA, R.; GUZMÁN, J.; PFEIFER, D.; SEGURA, D. Inactivation of intracelular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniforme high molecular mass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 102, p. 2693-2707, 2018.
- AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 85, p. 732-743, 2010.
- ALDOR, L.; KEASLING, J. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 14, p. 475-483, 2003.
- AL-SALEM, S. M.; ANTELAVA, A.; CONSTANTINOU, A.; MANOS, G.; DUTTA, A. A review on thermal and catalytic pyrolysis of plastic solid waste (PSW). *J. of Environm. Mannag*, v. 197, p; 177-198, 2017.
- ALEXANDRINO, P. M. R.; MENDONÇA, T. T.; GUAMÁN-BAUTISTA, L. P.; CHERIX, J.; LOZANO-SAKALOUSKAS, G. C.; et al. Draft Genome Sequence of the Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacterium *Burkholderia sacchari* LMG 19450 Isolated from Brazilian Sugarcane Plantation Soil. *Genome Announcem.* v. 3, p. 13-15, 2015.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, v. 54, p. 450-472, 1990.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D. D.; SEIDMAM, J. G.; SMITH, J.; STRUHL, K. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- AZAMI, N. A.; WIRJON, I. A.; KANUSAMY, S.; TEH, A. H.; ABDULLAH, A. A. A. Enhanced degradations of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by newly isolated *Burkholdeia cepacian* DP1 with high depolymerase activity. *Biotech.*, v. 7, n. 1, p. 75-85, 2017.
- BACHMANN, B.; SEEBACH, D. Investigaytion of the enzymatic cleavage of olig(3-hydroxybutanoates) containing two to eight HB units. A model for the stereoselectivity of PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Macromolec.*, v. 32, p. 1777-1784, 1999.

BHATIA, S. K.; SHIM, Y. H.; JEON, J. M.; BRIGHAM, C. J.; KIM, Y. H.; KIM, H. J.; SEO, H. M.; LEE, J. H.; KIM, J. H.; YI, D. H.; LEE, Y. K.; LEE, Y. H. Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered *Escherichia coli*. *Bioproc. Biosyst Eng.*, v. 38, n. 8, p. 1479-1484, 2015.

BOCANEGRA-RODRIGUEZ, J. K. *Produção de polihidroxialcanoatos por linhagens recombinantes de Escherichia coli*. 202 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BOCANEGRA, J. K.; PADRELLA, J. G. C.; SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; GOMEZ, J. G. C. Influence of pH on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid (P3HB) produced by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 170, p-1336–1347, 2013.

BOTOS, I.; MELNIKOV, E. E.; CHERRY, S.; TROPEA, J. E.; KHALATOVA, A. G.; RASULOVA, F.; DAUTER, Z.; MAURIZI, M. R.; ROTANOVA, T. V.; WLODAWER, A.; GUSTCHINA, A. The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and Ser-Lys dyad in the active site. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 8140-8148, 2004.

BOYANDIN, A. N.; PRUDNIKOVA, S. V.; KARPOV, V. A.; IVONIN V. N.; ĐÔ, N. L.; NGUYÊN, T. H.; GITENLSON, II. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *Int. Biodet. Biodegrad.*, v. 83, p. 77-84, 2012.

BRÄMER, C.O.; SILVA, L.F., GOMEZ, J.G.C.; VANDAMME, P.; STEINBÜCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate- accumulating bacterium isolated from soil of a sugar cane plantation in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 1709- 1713, 2001.

BRANDL, H.; BACHOFEN, R.; MAUER, J.; WINTERMANTEL, E. Degradation and application of polyhydroxyalkanoates. *Can. J. Microbiol.*, v. 14, p. 143-153, 1995. Suppl. 1.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, v. 41, p. 77-93, 1990.

BREIDENSTEIN, E. B. M.; BAINS, M.; HANCOCK, R. E. W. Involvement of the Lon protease in the SOS response triggered by ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v. 56, n. 6, p. 2879, 2887, 2012.

BREIDENSTEIN, E. B. M.; JANOT, L.; STREHMEL, J.; FERNANDEZ, L.; TAYLOR, P. K.; KUKAVICA-IBRULJ, I.; GELLATLY, S. L.; LEVESQUE, R. C.; OVERHAGE, J.; HANCOCK, R. E. W. The Lon protease is essential for full virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS One*, v. 7, n.11, p. 1-9, 2012.

BRESSAN, S.; SZNAJDER, A.; WALDERMAR, H.; FORCHHAMMER, K.; PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scient. Repor.*, v.6, n. 26612, 2016.

BRIESE, B. H.; JENDROSSEK, D.; SCHLEGEL, H. G. Degradations of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage sludge. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 117, p. 107-111, 1994.

BRIGHAM, C. J.; REIMER, E. N.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Examination of PHB depolymerases in *Ralstonia eutropha*: Further elucidation of the roles of enzymes in PHB homeostasis. *AMB Express*, v. 2, p. 26-38, 2012.

BULLOCK, W. O.; FERNANDEZ, J. M.; SHORT, J. M. XL1 Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with a beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, v. 5, p. 276-278, 1987.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2009.

CAI, L.; WANG, J.; PENG, J.; WU, Z.; TAN, X. Observation of the degradation of three types of plastic pellets exposed to UV irradiation in three different environments. *Sci. of the Tot. Environm.* v. 628–629, p. 740–747, 2018.

CASTELLANOS, N. A. M. *Avaliação do sistema de mobilização de poli-3-hidroxibutirato em Burkholderia sacchari*. 112 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHARETTE, M. F.; HENDERSON, G. W.; MARKOVITZ, A. ATP hydrolysis-dependent protease activity of the *lon (capR)* protein of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 78, n. 8, p. 4728-4732, 1981.

CHEN, Q.; WANG, Q.; WEI, G.; LIANG, Q.; QI, Q. Production in *Escherichia coli* of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) with differing monomer composition from unrelated carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 77, n. 14, p. 4886-4893, 2011.

CHOI, J.; LEE, S.; HAN, K. Cloning of *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use these genes for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 4897-4903, 1998.

CHOUMAN, K. *Produção de polímeros biodegradáveis por Escherichia coli recombinante a partir de açúcares do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar*. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

CHOWDHURY, A. A. Poly-beta-hydroxybuttersäure abbauende Bakterien und Exoenzym. *Arch. Mikrobiol.*, v. 47, p. 167-200, 1963.

CHUNG, C. H.; GOLDBERG, A. L. The product of the *lon (capR)* gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Biochem.*, v. 78, p. 4931-4935, 1981.

CHUNG, H.; YANG, J. E.; HA, J. Y.; CHAE, T. U.; SHIN, J. H.; GUSTAVSSON, M.; LEE, S. Y. Bio-based production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganisms. *Curr. Opin. in Biotech.*, v. 36, p. 73–84, 2015.

CLARET, L.; HUGHES, C. Rapid turnover of FlhD and FlhC, the flagellar regulon transcriptional activator proteins, during *Proteus swarming*. *J. Bacteriol.*, v. 182, p. 833-836, 2000.

COHN, M. T.; INGMER, H.; MULHOLLAND, F.; JORGENSEN, K.; WELLS, J. M.; BRONDSTED, L. Contribution of conserved ATP-dependent proteases of *Campylobacter jejuni* to stress tolerance and virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73, p. 7803-7813, 2007.

COX, M. K. The effect of material parameters on the properties and biodegradation of "BIOPOL". In: VERT, M.; FEIJEN, J.; ALBERTSSON, A.; SCOTT, G.; CHIPELLINI, E. (Ed.). *Biodegradable polymers and plastic*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1992. p. 95-100.

DELAFIELD, F. D.; DOUDOROFF, M.; PALLERONI, N. J.; LUSTY, C. J.; CONTOPOULOS, R. Decomposition of poly- β -hydroxybutyrate by pseudomonads. *J. Bacteriol.*, v. 90, p. 1455-1466, 1965.

DOI, Y.; SEGAWA, A.; KAWAGUCHI, Y.; KUNIOKA, M. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 55, p. 165-169, 1990.

DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, S.; HIRAMITSU, M.; YOSHIDA, Y.; KIMURA, H. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 103, p. 103-108, 1992.

EGGERS, J.; STEINBÜCHEL, A. Impact of *Ralstonia eutropha*'s poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) depolymerases and phasins on PHB storage in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environm. Microbiol.* v. 80, n. 24, p. 7702-7709, 2014.

ELHADI, D.; LV, L.; JIANG, X. R.; WU, H.; CHEN, G. Q. CRISPRi engineering *E. coli* for morphology diversification. *Metabol. Eng.*, v. 38, p. 358-369, 2016.

ERIKSEN, M.; LEBRETON, L. C.; CARSON, H. S.; THIEL, M.; MOORE, C. J.; BORERRO J. C.; GALGANI, F.; RYAN, P. G.; REISSER, J. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS One* 9, 111913, 2014.

EUGENIO, L. I.; GARCIA, P.; LUENGO, J. M.; SANZ, J. M.; ROMAN, J. S. GARCIA, J. L. Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442. Characterization of a paradigmatic enzyme. *J. Biol. Chemis.*, v. 7, p. 4951-4962, 2007.

FRIEHS, K. Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v. 86, p. 47-82, 2004.

FÜCHTENBUSCH, B.; FABRITIUS, D.; STEINBÜCHEL, A. Incorporation of 2-methyl-3-hydroxybutyric acid into polyhydroxyalkanoic acids by axenic cultures in defined media. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 138, p. 153-160, 1996.

FÜCHTENBUSCH, B.; FABRITIUS, D.; WÄLTERMANN, M.; STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of novel copolyesters containing 3-hydroxypivalic acid by *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126 and related bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 159, p. 85-92, 1998.

GANESH, M.; SENTHAMARAI, A.; SHANMIGHAPRIYA, S.; NATARAJASEENIVASAN, K. Effective production of low crystallinity Poly(3-

hydroxybutyrate) by recombinant *E. coli* strain JM109 using crude glycerol as sole carbon source. *Bioresour. Technol.*, v. 192, p. 677-681, 2015.

GANGOITI, J.; SANTOS, M.; PRIETO, M. A.; MATA, I.; SERRA, J. L.; LLAMA, M. J. Characterization of a Novel Subgroup of Extracellular Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerases from Actinobacteria. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 78, n. 20, p. 7229-7237, 2012.

GEBAUER, B.; JENDROSSEK, D. Assay of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, p. 6094-6100, 2006.

GEWERT, B.; PLASSMANN, M. M.; MACLEOD, M. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ. Sci.: Processes Impacts* v. 17, p. 1513–1521, 2015.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made *Sci. Adv.* v. 3, n. 7, p. 700-782, 2017.

GOLDBERG, A. L. The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.* v. 203, p. 9–23, 1992.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de poliésteres bacterianos. In: *Biotecnologia Industrial*, v. 3. Processos fermentativos e enzimáticos. Lima, Aquarone, Borzani e Schmidell (Ed.) *Editora Edgar Blücher Ltda.* SP, 2001.

GOMEZ, J. G. C.; MÉNDEZ, B. S.; NIKEL, P. I.; PETTINARI, M. J.; PRIETO, M. A.; SILVA, L. F. Making Green Polymers Even Greener: Towards Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates from Agroindustrial By-products. In: Petre, M. (Org.). *Adv. in Appl. Biotech.*. InTech Open Access Publisher, v. 1. p. 41–62, 2012.

GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLUI, R. C. P.; TORRES, B. B.; BUENO NETTO, C. L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 45, p. 785-791, 1996.

GONDA, K. E.; JENDROSSEK, D.; MOLITORIS, H. P. Fungal degradation of thermoplastic polymers under simulated deep sea conditions. *Hydrobiol.*, v. 426, p. 73–183, 2000.

GOTTESMAN, S. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 19, p. 564-587, 2003.

GUYER, M.S.; R.E. REED, T.; STEITZ, K.B. Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, v. 45, p. 135-140, 1981.

HAN, J. S.; SON, Y. J.; CHANG, C. S.; KIM, M. N. Purification and properties of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase produced by *Penicillium pinophilum*. *J. Microbiol.* v. 36, p. 67–73, 1998.

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; JENDROSSEK, D. Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.*, v. 182, p. 5916-5918, 2000.

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; FOCARETE, M. L.; SCANDOLA, M.; ADAMUS, G.; KOWALCZUK, M.; JENDROSSEK, D. A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short-chain-length hydroxyalkanoic acids. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 36215-36224, 2001.

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; KIMMIG, P.; JENDROSSEK, D. The “intracellular” poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerase. *J. Bacteriol.*, v. 186, p. 7243-7253, 2004.

HENLOCK, M.; zu CASTELL-RÜDENHAUSEN, M.; WAHLSTRÖM, M.; KJAER, B.; MILIOS, L.; VEA, E.; WATSON, D.; HANSSSEN, O. J.; FRANE, A.; STENMARK, A.; TEKIR, H. Economic Policy Instruments for Plastic Waste – A review with Nordic perspectives. Nordic Council of Ministers, *Tema. Nord.* p. 569, 2014.

HEUVELING, J.; POSSLING, A.; HENGGE, R. A role for Lon protease in the control of the acid resistance genes of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, v. 69, p. 534-547, 2008.

HIROE, A.; HYAKUTAKE, M.; THOMSON, N.M.; SIVANIAH, E.; TSUGE, T. Endogenous ethanol affects biopolyester molecular weight in recombinant *Escherichia coli*. *ACS Chem. Biol.*, v. 8, n. 11, p. 2568-2576, 2013.

HO, W.; WEGEN, R.; CHOI, J.; LEE, S.; MIDDELBERG, A. Metabolic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 9, p. 593-603, 1999.

HOROWITZ, D. M.; SANDERS, K. M. Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate preparation, characterization and biological implications. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 116, p. 2695-2702, 1994.

IENCZAK, J. L.; ARAGÃO, G. M. F. Biotechnologically Produced Biodegradable Polyesters. In *Handbook of Biodegradable Polymers: Isolation, Synthesis, Characterization and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 2011.

IVLEVA, N. P.; WIESHEU, A. C.; NIESSNER R. Microplastic in aquatic ecosystems. *Angew. Chem. Int. Ed.* v. 56, n. 7, p. 1720-1739, 2017.

IYER, L. M.; LEIPE, D. D.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.*, v. 146, p. 11–31, 2004.

JAMBECK, J.; GEYER, R.; WILCOX, C.; SIEGLER, T. R.; PERRYMAN, M.; ANDRADY, A. L.; NARAYAN, R.; LAW, K. L. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* v. 347, p. 768–771, 2015.

JENDROSSEK, D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 74, p. 1186-1196, 2007.

JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (Carbonosomes). *J. Bacteriol.*, v. 191, n. 10, p. 3195-3202, 2009.

JENDROSSEK, D.; FRISSE, A.; BEHREND, A.; ANDERMANN, M.; KRATZIN H. D.; STANISLAWSKI, T.; SCHLEGEL, H. G. Biochemical and molecular characterization of the

Pseudomonas lemoignei polyhydroxyalkanoate depolymerase system. *J. Bacteriol.*, v. 177, n. 3, p. 596-607, 1995.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 56, p. 403-432, 2002.

JENDROSSEK, D.; HERMAWAN, S.; SUDEBI, B.; PAPAGEORGIOU, A. C. Biochemical analysis and structure determination of *Paucimonas lemoignei* poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZ7 mutants reveal the PHB binding site and details of substrate–enzyme interactions. *Molec. Microbiol.*, 2013.

JENDROSSEK, D.; KNOBE, I.; HABIBIAN, R. B.; STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purifications of a novel PHA depolymerase from *Comamonas* sp. *J. Environ. Polym. Degrad.*, v. 1, p. 53-63, 1993.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 46, p. 451-463, 1996.

JIAHN, H. L.; CHIAO, I. K.; YA, Y. H.; YU, C. L.; YEN, C. L.; CHEN, Y. Y.; WAN, L. W.; WEI, H. C.; YEN, C. L.; LI, H. L.; CHUNG, I. C.; SHIH, H. W. A Lon-Like protease with no ATP-powered unfolding activity. *PLOS One*, v. 7, n. 7, p. 1-13, 2012.

JIAN, J. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates by *Escherichia coli* mutants with defected mixed acid fermentation pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 87, n. 6, p. 2247-2256, 2010.

JOSSEK, R.; REICHEL, R.; STEINBÜCHEL, A. *In vitro* biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) by using purified poly(hydroxyalkanoic acid) synthase of *Chromatium vinosum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 49, p. 258–266, 1998.

KARIMOVA, G. ULLMANN, A.; LADANT, D. A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, v. 328, p. 59-73, 2000.

KAWAGUCHI, Y.; DOI, Y. Kinetics and mechanism of synthesis and degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *Macromol.*, v. 25, p. 2324-2329, 1992.

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.

KIM, J.; KIM Y. J.; CHOI, S. Y.; LEE, S. Y.; KIM K. J. Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnology Journal*, v. 1600648, p. 1–23, 2016a.

KIM, Y.J.; CHOI, S. Y.; KIM, J.; JIN, K. S.; LEE, S. Y.; KIM, K. J. Structure and function of the N-terminal domain of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase, and the proposed structure and mechanisms of the whole enzyme. *Biotechnology Journal*, v. 1600649, p. 1–23, 2016b.

KNOLL, M.; HAMM, M. T.; WAGNER, F.; MARTINEZ, V.; PLEISS, J. The PHA depolymerase engineering database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. *BMC Bioinform.*, v. 10, p. 89, 2009.

KOBAYASHI, T.; SAITO, T. Catalytic triad of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 96, n. 5, p. 487-492, 2003.

KOBAYASHI, T.; SHIRAKI, M.; ABE, T.; SUGIYAMA, A.; SAITO, T. Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase. *J. Bacteriol.*, v. 185, p. 3485-3490, 2003.

KOBAYASHI, T.; UCHINO, K.; ABE, T.; YAMAZAKI, Y.; SAITO, T. Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.*, v. 187, p. 5129-5135, 2005.

KOVACH, M. E.; PHILLIPS, W.; ELZER, P. H.; ROOP, R. M.; PETERSON, K. M. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotech.*, v. 16, p. 800-802, 1995.

KURODA, A.; NOMURA, K.; OHTOMO, R.; KATO, J.; IKEDA, T.; TAKIGUCHI, N.; OHTAKE, H.; KORNBERG, A. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science*, v. 293, p. 705-708, 2001.

LAN, L.; DENG, X.; XIAO, Y.; ZHOU, J. M.; TANG, X. Mutation of Lon protease differentially affects the expression of *Pseudomonas syringae* type III secretion system genes in rich and minimal media and reduces pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v. 20, p. 682-696, 2007.

LAU, N. S.; CHEE, J. Y.; TSUGE, T.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of a novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer produced by *Burkholderia* sp. USM (JCM15050), *Bioresour. Technol.*, v.101 ,p. 7916-7923, 2010.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.*, v. 14, p. 98-105, 1996.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 49, p. 1-14, 1996b.

LEE, S. Y.; LEE, Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of enantiomerically pure (R)-(-)-hydroxycarboxylic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, p. 3421-3426, 2003.

LEE, M. C.; LIU, H.; YANH, C. H.; HSIAO, L. J.; WU, T. M.; LI, S. Y. Co-expression of ORFCma with PHB depolymerase (PhaZCma) in *Escherichia coli* induces efficient whole-cell biodegradation of polyesters. *Biotechnol. J.*, v. 13, n. 4, 2018.

LEE, S. Y.; YIM, K. S.; CHANG, H.N.; CHANG, Y. K. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* v.32, n. 2, p. 203-211, 1994.

LI J.; LIU, H.; CHEN, P. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Resea.* v. 137, p. 362-374, 2018.

LI, D.; LV, L.; CHEN, G.Q. Controlling microbial PHB synthesis via CRISPRi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 101, n. 14, p. 5861-5867, 2017.

LI, T.; YE, J.; SHEN, R.; ZONG, Y.; ZHAO, X.; LOU, C.; CHEN, G.Q. Semirational Approach for Ultrahigh Poly(3-hydroxybutyrate) Accumulation in *Escherichia coli* by Combining One-Step Library Construction and High-Throughput Screening. *ACS Synth. Biol.*, 2016.

LI, R.; ZHANG, H.; QI, Q. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresou. Technol.*, v. 98, p. 2313-2320, 2007.

LIU, S.; STEINBÜCHEL, A. A novel genetically engineered pathway for synthesis of poly (hydroxyalkanoic acids) in *Escherichia coli*. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 66, p. 739-743, 2000.

LIU, Y.; DE SCHRYVER, P.; VAN DELSEN, B.; MAIGNIEN, L.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P.; DEFOIRDT, T. PHB-degrading bacteria isolated from the gastrointestinal tract of aquatic animals as protective actors against luminescent vibriosis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 74, p. 196-204, 2010.

LÓPEZ, N. I.; PETTINARI, M. J.; NÍKEL, P. I.; MÉNDEZ, B. S. Polyhydroxyalkanoates: Much More than Biodegradable Plastics. *Appl. Microbiol.*, v. 93, p.73-106, 2015.

LOZANO, G. C. Avaliação do papel de genes envolvidos na mobilização de poli-3-hidroxibutirato em linhagens recombinantes de *Escherichia coli*. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, G. N.; OLIVEIRA, E. R. Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 6, p. 251-260, 2003.

MA, H. K.; LIU, M. M. ; LI, S. Y.; WU, Q.; CHENA, J. C.; CHEN, G. Q. Application of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis regulatory protein PhaR as a bio-surfactant and bactericidal agent. *J. Biotechnol.*, v. 166, p. 34– 41, 2013.

MAEHARA, A. Y.; DOI, T.; NISHIYAMA, Y.; TAKAGI, S.; UEDA, H.; NAKANO; YAMANE, T. PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acid-producing bacteria, is a DNA- binding protein and represses *Paracoccus denitrificans phaP* expression *in vitro*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 200, p. 9–15, 2001.

MAEHARA, A.; TAGUCHI, S.; NISHIYAMA, T.; YAMANE, T.; DOI, Y. A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. *J. Bacteriol.*, v. 184, p. 3992–4002, 2002.

MAHISHI, L.; TRIPATHI, G.; RAWAL, S. Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harboring *Streptomyces aureofaciens* PHB synthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources. *Microbiol. Res.*, v. 158, p. 19-27, 2003.

MARR, A. K.; OVERHAGE, J.; BAINS, M.; HANCOCK, R. E. The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. *Microbiol.*, v. 153, p. 474-482, 2007.

MARTÍNEZ, V.; PEÑA, F.; GARCÍA-HIDALGO, J.; MATA, I.; GARCÍA, J. L.; PRIETO, M. A. Identification and biochemical evidence of a medium-chain-length

polyhydroxyalkanoate depolymerase in the *Bdellovibrio bacteriovorus* predatory hydrolytic arsenal. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, n. 17, p. 6017-6026, 2012.

MARTÍNEZ-GARCÍA, E.; APARICIO, T.; DE LORENZO, V., NIKEL, P. I. New transposon tools tailored for metabolic engineering of gram-negative microbial cell factories. *Front. Bioeng. Biotechnol.* v. 2, p-46, 2014.

MATSUMOTO, K.; TANAKA, Y.; WATANABE, T.; MOTOHASHI, R.; IKEDA, K.; TOBITANI, K.; YAO, M.; TANAKA, I.; TAGUCHI, S. Directed evolution and structural analysis of NADPH-dependent Acetoacetyl Coenzyme A (Acetoacetyl-CoA) reductase from *Ralstonia eutropha* reveals two mutations responsible for enhanced kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 79, n. 19, p. 6134-6139, 2013.

MAURIZI, M. R.; LI, C. C. AAA proteins: In search of a common molecular basis. International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins. *Embo. Rep.*, v. 2, p. 980-985, 2001.

MAYER, F. Structural aspects of poly- β -hydroxybutyrate granules. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 103, p. 265-268, 1992.

MELDEREN, L. V.; AERTSEN, A. Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis. *Res. Microbiol.*, v. 160, p. 645-651, 2009.

MENDONÇA, T. T.; GOMEZ, J. G. C.; BUFFONI, E.; SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, R. J.; SCHRIPSEMA J.; LOPES, M. S., SILVA, L. F. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, v. 116, p. 815-829, 2013.

MERGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C.; WOUTERS, A.; SWINGS, J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, p. 3233-3238, 1993.

MERRICK, J. M.; DOUDOROFF, M. Depolymerization of poly- β -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.*, v. 88, p. 60-71, 1964.

MERRICK, J. M.; LUNDGREN, D. G.; PFISTER, R. M. Morphological changes in poly- β -hydroxybutyrate granules associated with decreased susceptibility to enzymatic hydrolysis. *J. Bacteriol.*, v. 89, p. 234-239, 1965.

MERRICK, J. M.; STEGER, R.; DOMBROSKI, D. Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 25, p. 129-134, 1999.

MIZUSAWA, S.; GOTTESMAN, S. Protein degradation in *Escherichia coli*: the *lon* gene controls the stability of Sula protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 80, p. 358-362, 1983.

MOORE, C. J. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environ. Res.* v. 108, p. 131-139, 2008.

NEUWALD, A. F.; ARAVIND, L.; SPOUGE, J. L.; KOONIN, E. V. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.*, v. 9. p. 27-43, 1999.

NOMURA, C.T.; TAGUCHI, S. PHA synthase engineering toward superbio-catalysts for custom-made biopolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 73, p. 969–979, 2007.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 15293-15297, 1989.

PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha*. *Microbiol.* V.157, p. 2795-2807, 2011.

PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Development of a transferable bimolecular fluorescence complementation system for the investigation of interactions between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins in Gram-negative bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 79, p. 2989-2999, 2013.

PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. PhaM is the physiological activator of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 80, p. 555-563, 2014.

PFEIFFER, D.; WAHL, A.; JENDROSSEK, D. Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Molec. Microbiol.*, v. 82, n. 4, p. 936-951, 2011.

PIEMOLINI, L. *Modelagem estrutural de PHA sintase de Chromobacterium violaceum para estudos de mutação sítio-dirigida*. 91 f, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

PLASTIC EUROPE, 2017. Plastics – the Facts 2016. An analysis of European plastics production, demand and waste data. *PlasticsEurope – Association of Plastics Manufacturers*. Brussels, 2017.

PLASTICS RECYCLES EUROPE, 2016. 20 years later & the way forward. Making more from plastics waste. *Plastics Recyclers Europe*. Brussels, 2016.

PLASTIVIDA, 2012. Disponível em: http://www.plastivida.org.br/images/temas/Apresentacao_IRMP_2012.pdf Acessado em: 08 de maio de 2018

POHLMANN, A.; FRICKE, F.; REINECKE, F.; KUSIAN, B.; LIESEGANG, H.; CRAMM, R.; EITINGER, T.; EWERING, C.; POTTER, M.; SCHWARTZ, E.; STRITTMATTER, A.; VOSS, I.; GOTTSCHALAK, G.; STEINBÜCHEL, A. FRIEDRICH, B; BOWIEN, B. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.*, v. 24, p. 1257-1262, 2006.

PÖTTER, M.; MADKOUR, M. H.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha*. *Microbiol.*, v. 148, p. 2413-2426, 2002.

PÖTTER, M.; MULLER, H.; REINECK, F.; WIECZOREK, R.; FRICKE, F.; BOWIEN, B.; FRIEDRICH, B.; STEINBÜCHEL, A. The complex structure of polyhydroxybutyrate

(PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiol. v.*, 150, p.2301-2311, 2004.

PÖTTER, M.; MULLER, H.; STEINBÜCHEL, A. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiol.*, v. 151, p. 825-833, 2005.

PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated Proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolec.*, v. 6, p. 552-560, 2005.

PRIETO, M. A.; EUGENIO, L. I.; ESCAPA, V. M.; GALÁN, B.; GARCIA, J. L. The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerise for the metabolic balance. *Environ. Microbiol.*, v. 12, n. 1, p. 207-221, 2010.

Qi, Q.; Rehm, B. H.; Steinbüchel, A. Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene phaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 157, p. 155–162, 1997.

REHM, B. H. A. Polyester synthase: natural catalysts for plastic. *J. Biochem.*, v. 376, p. 15-33, 2003.

REHM, B. H. A. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoates granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Curr. Issues Mol. Biol.*, v. 9, p. 41-62, 2007.

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

REHM, B.; STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases: the key enzymes of PHA synthesis. **Biopolymers Online**, v. 1, p. 173–180, 2005.

REINECKE, A.; STEINBÜCHEL, A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *J. Mol. Microbiol. and Biotechnol.*, v. 16, p. 91-108, 2009.

REN, Q.; ROO, G.; WITHOLT, B.; ZINN, M.; THÖNY-MEYER, L. Influence of growth stage on activities of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymerase and PHA depolymerase in *Pseudomonas putida* U. *BMC Microbiol.*, v. 10, p. 254, 2010.

RIETHDORF, S.; VOLKER, U.; GERTH, U.; WINKLER, A.; ENGELMANN, S.; HECKER, M. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* lon gene. *J. Bacteriol.*, v.176, p. 6518-6527, 1994.

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

ROBERTSON, G. T.; KOVACH, M. E.; ALLEN, C. A.; FICHT, T. A.; ROOP 2nd, R. M. The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice. *Mol. Microbiol.*, v. 35, p. 577-588, 2000.

RODRIGUES, M. F. A.; SILVA, L. F., GOMEZ, J. G. C.; VALENTIN, H. E., STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by *Burkholderia* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 43, p. 880-86, 1995.

ROTANOVA, T. V.; MELNIKOV, E. E.; TSIRULNIKOV, K. B. Catalytic dyad Ser-Lys at the active site of *Escherichia coli* ATP-dependent Lon-proteinase. *Bioorg. Khim.*, v. 29, p. 97-99, 2003.

ROTANOVA, T. V.; MELNIKOV, E. E.; KHALATOVA, A. G.; MAKHOVSKAYA, O. V.; BOTOS, I.; WLODAWER, A.; GUSTCHINA, A. Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *Eur. J. Biochem.*, v. 271, p. 4865-4871, 2004.

ROTANOVA, T. V.; BOTOS, I.; MELNBIKOV, E. E.; RASULOVA, F.; GUSTCHINA, A.; MAURIZI, M. R.; WLODAWER, A. Slicing a protease: Structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains. *Prot. Scienc.*, v. 15, p. 1815-1828, 2006

SAEGUSA, H.; SHIRAKI, M.; KANAI, C.; SAITO, T. Cloning an intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol.*, v. 183, p. 94-100, 2001.

SAITO, T.; KOBAYASHI, T. Intracellular degradation of PHAs. In: STEINBÜCHEL, A.; DOI, Y., (Ed.). *Biopolymers, polyesters II, properties and chemical synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH, p. 23-40, 2001.

SANTOS, M.; GANGOITI, J.; KEUL H.; MÖLLER, M.; SERRA, J. L., LLAMA, M. J. Polyester hydrolytic and synthetic activity catalyzed by the medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Streptomyces venezuelae* S01. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 97, n. 1, p. 211-222, 2013.

SCHERER, T. M.; FULLER, C.; GOODWIN, S.; LENZ, R. W. Enzymatic hydrolysis of oligomeric models of poly-3-hydroxybutyrate. *Biomacromolec.*, v. 1, p. 577-83, 2000.

SCHLEGEL, H. G.; KALTWASSER, H.; GOTTSCHALK, G. Ein Submersverfahren zur Kultur Wasserstoff oxydierender Bakterien: wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.*, v. 38, p. 209-222, 1961.

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*. *J. Bacteriol.*, v. 170, p. 5837-5847, 1988.

SCHUBERT, P.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis *operon*: identification of the N terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and the identification of the promoter. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 168-175, 1991.

SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. The regulation of poly-3-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *J. Biochem.*, v. 34, p. 225-238, 1973.

SHIRAKI, M.; ENDO, T.; SAITO, T. Fermentative production of (R)-(-)-3-Hydroxybutyrate using 3-Hydroxybutyrate dehydrogenase null mutant of *Ralstonia eutropha* and recombinant *Escherichia coli*. *J. Biosc. Bioeng.*, v. 102, n. 6, p. 529-534, 2006.

SHOGREN, J.; TAYLOR, L. On behavioral-environmental economics. *Rev. Environ. Econ. Policy* v. 2, p. 26-44, 2008.

SLATER, S.C.; VOIGE, W.H.; DENNIS, D.E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 Poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* v. 170, p. 4431-4436, 1988.

SNIDER, J.; THIBAUT, G.; HOURLY, W. A. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol.*, v. 9, p. 216, 2008.

SOLAIMAN D.K.Y; ASHBY R.D. Genetic characterization of the poly(hydroxyalkanoate) synthases of various *Pseudomonas oleovorans* strains. *Curr. Microbiol.*, v. 50, p. 329-333, 2005.

SPRATT, S.; GINSBURGH, C.; NUNN, W. Isolation and genetic characterization of *Escherichia coli* mutant defective in propionate metabolism. *J. Bacteriol.*, v. 146, p. 1166-1169, 1981.

STEINBÜCHEL, A. P3HB and other polyhydroxyalkanoic acids. (Ed.). *Products of primary metabolism*. New York: Wiley, John and Sons, 1996, p. 405-464.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 128, p. 219-228, 1995.

STRIEBEL, F.; KRESS, W.; WEBER-BAN, E. Controlled destruction: AAA+ ATPase in protein degradation from bacterial to eukaryotes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 19, p. 209-217, 2009.

STUDIER, F. W.; MOFFAT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* v. 189, p. 113-130, 1986.

SU, S.; STEPHENS, B. B.; ALEXANDRE, G.; FARRAND, S. K. Lon protease of the alpha-proteobacterium *Agrobacterium tumefaciens* is required for normal growth, cellular morphology and full virulence. *Microbiol.*, v. 152, p. 1197-1207, 2006.

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

SUGIYAMA, A.; KOBAYASHI, T.; SHIRAKI, M.; SAITO, T. Roles of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase and 3HB-oligomer hydrolase in bacterial P3HB metabolism. *Curr. Microbiol.*, v. 48, p. 424-427, 2004.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S., MOLONEY, M. SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. *Biotechnol. Adv.*, v. 24, n. 2, p. 148-175, 2007.

SWAMY, K. H.; GOLDBERG, A. L. *E. coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent. *Nature*, v. 292, p. 652, 1981.

SZNAJDER, A.; JENDROSSEK, D. Biochemical characterization of a new type of intracellular PHB depolymerase from *Rhodospirillum rubrum* with high hydrolytic activity on native PHB granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 89, n. 5, p. 1487-1495, 2011.

SZNAJDER, A.; JENDROSSEK, D. To be or not to be a poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase: PhaZd1 (PhaZ6) and PhaZd2 (PhaZ7) of *Ralstonia eutropha*, highly active PHB depolymerases with no detectable role in mobilization of accumulated PHB. *Appl. and Environm. Microb.*, v.80, n. 16, p. 4936-4946, 2014.

SZNAJDER, A.; PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environ. Microbiol.*, v, 81, p. 1847-1858, 2015.

TAIDI, B.; MANSFIELD, D. A.; ANDERSON, A. J. Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 129, p. 201-261, 1995.

TAKAYA, A.; SUZUKI, M.; MATSUI, H.; TOMOYASU, T.; SASHINAMI, H.; NAKANE A.; YAMAMOTO T. Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection of mice. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 690-696, 2003.

TANIO, T.; FUKUI, T.; SHIRAKURA, Y.; SAITO, T.; TOMITA, K.; KAIHO, K.; MASAMUNE, S. An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Eur. J. Biochem.*, v. 124, p. 71-77, 1982.

THOMPSON, R. C.; MORRE, C. J.; vom SAALI F. S.; SWAN, S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 364, p. 2153-2166, 2009.

THOMSON, N. M.; SAIKA, A.; USHIMARU, K.; SANGIAMBUT, S.; TSUGE, T.; SUMMERS, D. K.; SIVANIAH, E. Efficient production of active polyhydroxyalkanoate synthase in *Escherichia coli* by coexpression of molecular chaperones. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 79, p. 1948-1955, 2013.

TOMOYASU, T.; TAKAYA, A.; ISOGAI, E.; YAMAMOTO T. Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. *Mol. Microbiol.*, v. 48, p. 443-452, 2003.

UCHINO, K.; SAITO, T. Thiolysis of poly(3-hydroxybutyrate) with polyhydroxyalkanoate synthase from *R. eutropha*. *J. Biochem.*, v. 139, p. 615-621, 2006.

UCHINO, K.; SAITO, T.; GEBAUER, B.; JENDROSSEK, D. Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. *J. Bacteriol.*, v. 189, n. 22, p. 8250-8256, 2007.

UCHINO, K.; SAITO, T.; JENDROSSEK, D. Poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated P3HB in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 74, p. 1058-1063, 2008.

ULMER, H. W.; GROSS, R. A.; POSADA, M.; WEISBACH, P; FULLER, R. C.; LENZ, R. W. Bacterial production of poly(β -hydroxyalkanoates) containing unsaturated repeating units by *Rhodospirillum rubrum*. *Macromolec.*, v. 27, p. 1675-1679, 1994.

USHIMARU, K.; MOTODA, Y.; NUMATA K.; TSUGE, T. Phasin proteins activate *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase but not *Ralstonia eutropha* PHA synthase. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 80, n. 9, p. 2867-2873, 2014.

VESELOVA, M. A.; LIPASOVA, V. A.; ZAITSEVA, V.; KOKSHAROVA, O. A.; CHERNUKHA, M. Y.; ROMANOVA, Y. M.; KHMEL', A. Mutants of *Burkholderia cenocepacia* with a change in synthesis of N-acyl-homoserine lactones—signal molecules of Quorum Sensing regulation. *Russian J. Genet.*, v. 48, n. 5, p. 513-521, 2012.

VICKERS, E.; KLEIN-MARCUSCHAMES, D.; KROEMER, O. Examining the feasibility of bulk commodity production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, v. 34, n. 4, p. 585-596, 2012.

VOLOVA, T. G.; KALACHEVA, G. S.; STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of multi-component polyhydroxyalkanoates by the bacterium *Wautersia eutropha*. *Macromolec. Symp.*, v. 269, n. 1, p. 1–7, 2008.

WANG, J.; TAN, Z.; PENG, J.; QIU, Q.; Li, M. The behaviors of microplastics in the marine environment. *Mar. Environ. Res.* v. 113, p. 7–17, 2016.

WANG, Q., YU, H.; XIA, Y.; KANG, Z.; QI, Q. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb. Cell Fact.*, v. 8, p. 47-55, 2009.

WICKNER, S.; MAURIZI, M. R.; GOTTESMAN, S. Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, v. 286, p. 1888– 1893, 1999.

WIECZOREK, R.; PRIES, A.; STEINBÜCHEL, A.; MAYER, F. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* v. 177, p-2425–2435, 1995.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, v. 12, p 3-7, 1999.

WORLD ECONOMIC FORUM, 2016. The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics. *Industry Agenda* REF 080116. Geneva, Switzerland, 2016.

WU, H.; FAN, Z.; JIANG, X.; CHEN, J., CHEN, G.-Q. Enhanced production of polyhydroxybutyrate by multiple dividing *E. coli*. *Microb. Cell Fact.* v. 15, p. 1–13, 2016.

WU, W. F.; ZHOU, Y.; GOTTESMAN, S. Redundant in vivo proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslUV) protease. *J. Bacteriol.*, v. 181, p. 3681-3687, 1999.

YANG, N.; DING, S.; FEIFEI, C.; ZHANG, X.; XIA, Y.; et al. The Crc protein participates in down-regulation of the Lon gene to promote rhamnolipid production and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molec. Microb.* 2015.

YORK, G. M.; LUPBERGER, J.; TIAN, J. LAWRENCE, A. G.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene. *J. Bacteriol.*, v. 185, p. 3788-3794, 2003.

YORK, G. M.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxy- butyrate. *J. Bacteriol.*, v. 183, p. 2394–2397, 2001.