

**LUCAS GARBINI CESPEDES**

**Controle da composição do copolímero P3HB-co-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes *phaA* e *phaB* em *Pseudomonas* sp. LFM461.**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

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

São Paulo  
2016

## RESUMO

Cespedes LG. Controle da composição do copolímero P3HB-co-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes *phaA* e *phaB* em *Pseudomonas* sp. LFM461. [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Os polihidroxicanoatos (PHA) são materiais poliésteres acumulados por bactérias e possuem propriedades termoplásticas, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis. Copolímeros de 3-hidroxi-butirato e 3-hidroxi-hexanoato (P3HB-co-3HHx) têm atraído interesse, pois apresentam propriedades semelhantes ao polietileno de baixa densidade para frações de 3HHx menores que 20 mol%; já em frações maiores de 3HHx o polímero tende a ser mais elástico assemelhando-se a PHA contendo monômeros de cadeia média. Recentemente, foi construída em nosso laboratório, uma linhagem de *Pseudomonas* sp. (LFM461) abrigando genes de biossíntese de PHA de *Aeromonas* sp., apresentando capacidade de produzir PHA contendo elevada fração de 3HHx (>20 mol%) a partir de glicose. Neste projeto, criou-se um sistema genético para regulação da composição do copolímero P3HB-co-3HHx pela indução de genes responsáveis pela biossíntese de precursores 3HB. Utilizando um plasmídeo contendo o gene de proteína fluorescente *mRFP1*, o promotor *lac* foi testado como funcional no hospedeiro LFM461. Assim, foram construídas cinco versões do plasmídeo de controle de copolímero (pCC), baseados no promotor *lac*. Em cada nova modificação do pCC, o plasmídeo resolveu problemas de estabilidade e expressão, tanto na linhagem teste *E. coli* MG1655 quanto na linhagem alvo *Pseudomonas* sp. LFM461. Entretanto, mesmo com a versão mais aprimorada, o pCC-5, não foi possível estabelecer um processo no qual houvesse o controle dos precursores 3HB em *Pseudomonas* sp. LFM461, e, portanto, controlar a composição do copolímero. Através de experimentos de atividade enzimática e RT-qPCR do mRNA, foi possível indicar que o problema está na impossibilidade do promotor *lac* de promover expressão dos genes de biossíntese de 3HB presentes nos pCC.

**Palavras-chave:** Polihidroxicanoatos. P3HB-co-3HHx. Polímeros biodegradáveis. *Pseudomonas*. Controle da Composição.

## ABSTRACT

Céspedes LG. Composition control of P3HB-co-3HHx through gradative expression of phaA and phaB genes in *Pseudomonas* sp. LFM461. [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyesters material accumulated by bacteria which has thermoplastic, biodegradable and biocompatible properties and can be produced from renewable feedstocks. Copolymers of 3-hydroxybutirate and 3-hydroxyhexanoate (P3HB-co-3HHx) which contain less than 20mol% of 3HHx have being investigated for its properties, which are similar to low density polyethylene. If the 3HHx content is more than 20mol% the PHA material tends to be more elastic and similar to medium-chain-length PHA (PHA<sub>MCL</sub>). Recently, our laboratory has been investigating a *Pseudomonas* sp. strain, LFM461, which can produce high 3HHx content (>20mol%) from glucose when hosting PHA biosynthesis genes from *Aeromonas*. In this project, a genetic system was designed for control of P3HB-co-3HHX composition by induction of 3HB monomers biosynthesis. Using a fluorescent protein *mRFP1* gene under control of a Lac promoter, the promoter functionality was successful tested in our *Pseudomonas* sp. LFM461 host. Thus, five versions of a copolymer control plasmid (pCC) were built based on the Lac promoter. However, even though improvements were made on stability and expression profile of pCC it was not possible to establish an assay of successful PHA composition control in *Pseudomonas* sp. LFM461. By enzymatic activity and RT-qPCR of cDNA experiments we have indications of problems in the Lac promoter on driving the expression of 3HB genes in pCC.

**Keywords:** Polyhydroxyalkanoates. P3HB-co-3HHx. Biodegradable polymers. *Pseudomonas*. Composition control.

## 1 INTRODUÇÃO

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres acumulados na forma de grânulos intracelulares por diversas bactérias em condições de limitação de um nutriente essencial e excesso de fonte de carbono (1). Os grânulos de PHA provêm reserva de fonte de carbono e energia para a célula bacteriana e chegam a corresponder a até 80% da massa total de células (2). Os PHA apresentam propriedades termoplásticas, são biodegradáveis e biocompatíveis, despertando interesse industrial como alternativa aos plásticos de origem petroquímica, cuja demanda tende a aumentar (3, 4).

A fórmula genérica do monômero de PHA é exibida na Figura 1, o radical ( $R^1$ ) define se o monômero é classificado como de cadeia curta ( $3HA_{SCL}$ , do inglês *short-chain-length*) ou de cadeia média ( $3HA_{MCL}$ , do inglês *medium-chain-length*) (5). O poli-3-hidroxibutirato (PHB) é formado por monômeros de 3-hidroxibutirato (3HB) e apresenta propriedades de baixo alongamento à ruptura e, portanto, características de material duro e quebradiço (6). Em contraste, os polímeros  $PHA_{MCL}$  formados por monômeros como 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxi octanoato (3HO), 3-hidroxidecanoato (3HD) e 3-hidroxidodecanoato (3HDD) são conhecidos por apresentarem maior alongamento à ruptura que o PHB e assim formarem materiais com propriedades elastoméricas (7).

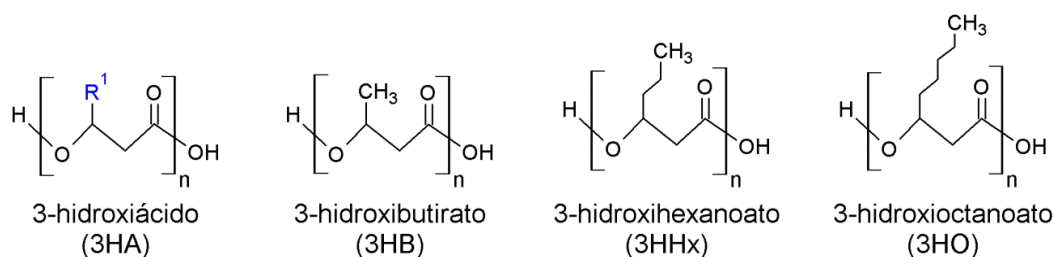


Figura 1 - a) Monômero de PHA, onde  $R^1$  é a cadeia que define HASCL ou HAMCL. b) Exemplos de monômeros de PHA: 3HB - 3-hidroxibutirato; 3HH - 3-hidroxihexanoato e 3HO - 3-hidroxi octanoato.

A composição monomérica do polímero depende de três fatores: i) dos tipos de monômeros que são sintetizados pela linhagem hospedeira, ii) da quantidade de cada tipo de monômero disponível no citoplasma e iii) da especificidade da enzima PHA sintase por estes diferentes monômeros. A fim de modular a composição do polímero, vários trabalhos utilizaram a clonagem do gene que codifica a PHA sintase

(*phaC*) seguida de sua expressão em um hospedeiro que a suprisse com monômeros diferentes dos encontrados no organismo de origem (8-12).

Tendo em vista uma maior aplicabilidade destes materiais, alguns estudos têm por objetivo produzir polímeros com novas propriedades (13). Os copolímeros de  $3HA_{MCL}$  e  $3HA_{SCL}$  produzidos nesses estudos mostraram ser promissores quanto a novas aplicações destes materiais, com destaque ao P3HB-co-3HHx, naturalmente produzido por bactérias do gênero *Aeromonas* quando supridas com fonte de carbono contendo ácidos graxos (14). Os copolímeros P3HB-co- $3HA_{MCL}$  com teor de  $3HA_{MCL}$  até 20 mol% demonstram ter propriedades semelhantes ao polietileno de baixa densidade (6).

Entretanto, para produzir copolímeros de 3HB e  $3HA_{MCL}$  em bactérias como *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha* e *Burkholderia* sp., deve-se fornecer ácidos graxos como fonte de carbono, devido à incapacidade das vias metabólicas destas bactérias em fornecer monômeros  $3HA_{MCL}$  a partir de carboidratos. Para superar essa limitação, em nosso laboratório (15), foi clonado o gene *phaC* de *Ralstonia eutropha* e expresso em um hospedeiro *phaC* (LFM461) derivado da linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046 (16). O trabalho teve sucesso em produzir P3HB-co- $3HA_{MCL}$  com cerca de 7 mol% de  $3HA_{MCL}$  utilizando glicose como única fonte de carbono (16). Em seguida, outro trabalho teve sucesso em aumentar ainda mais o teor de  $3HA_{MCL}$ . Desta vez, a PHA sintase recombinante de *Aeromonas* sp TSM81 foi usada para produzir o copolímero P3HB-co-3HHx a partir de carboidratos. Utilizando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaPCJ*, os resultados mostraram a produção de um copolímero contendo 63% de 3HB e 37 mol% de 3HHx (Cespedes et al., dados não publicados) e confirmam dados da literatura que demonstram a capacidade da PHA sintase de *Aeromonas* ter especificidade tanto por monômeros 3HB como 3HHx (11). Além de monômeros 3HHx, foram também identificados outros monômeros de  $3HA_{MCL}$  que podem ou não estar presentes no copolímero. Um teor de 3HHx maior que 20 mol% não é interessante do ponto de vista de propriedades desejáveis para o material pois a partir desta porcentagem o material passa a ser excessivamente maleável (6). Desta maneira, controlar o teor deste monômero no polímero é de interesse industrial e demonstra um desafio interessante na modificação de vias metabólicas.

Outra alternativa para modificar a composição do copolímero é controlar os monômeros supridos à PHA sintase. Os genes *phaA* ( $\beta$ -cetotiolase) e *phaB*

(cetoacetil-CoA redutase) podem ser superexpressos e seus produtos levam a um aumento da biossíntese de monômeros 3HB disponíveis à PHA sintase e, portanto, a um aumento do teor de 3HB na composição do copolímero. Ao aumentar a fração molar de 3HB no copolímero, é possível diminuir o teor de 3HHx no copolímero sem utilizar duas PHA sintases com especificidades diferentes. Utilizar duas PHA sintases com especificidades diferentes poderia levar à formação de duas cadeias poliméricas com composições diferentes e não um único copolímero com composição constante.

A simples superexpressão dos genes *phaA* e *phaB* provavelmente não seria a maneira mais eficiente de controlar a composição do polímero pois aumentaria desnecessariamente o fardo metabólico (17) e assim não seria possível modular o teor de 3HB. Uma estratégia mais interessante para o controle da composição do copolímero é utilizar uma regulação da expressão dos genes *phaAB*, assim, seria possível um controle mais preciso da composição, além de não aumentar o fardo metabólico. Um estudo da expressão do gene *prpE* – gene que catalisa a formação de propionil-CoA - sob o controle do promotor  $P_{\text{taclacUV5}}$  (induzido por IPTG) em *Salmonella entérica* mostrou-se eficiente no controle do copolímero poli-3-hidroxi-*butirato-co-3-hidroxi-*valerato** (18). Pela modulação da expressão gênica, alcançou-se variações de 2 a 25 mol% de 3-hidroxi-*valerato* (3HV) na composição do copolímero (18). Em outro trabalho, utilizou-se o controle da expressão do gene *prpE* – uma propionil-CoA sintetase - para modular a biossíntese de 3HV, a fim de produzir um copolímero de P3HB-*co-3HV* em *Escherichia coli*, atingindo uma faixa entre 5 e 18% de 3HV na composição molar do PHA (19).

Juntamente com técnicas de modificação gênica e engenharia metabólica, é interessante que se use fontes de carbono alternativas com objetivo de diminuir os custos de produção do processo. Biomassa de material lignocelulósico é altamente disponível por ser rejeito do setor agrícola. Celulose e hemicelulose estão sendo cada vez mais utilizados em bioprocessos devido a recentes avanços no pré-tratamento destas matérias prima (20). A lignina é um polímero complexo de diferentes compostos aromáticos ligados entre si, sua estrutura pode variar dependendo do método de extração e do material lignocelulósico do qual é retirado (21). Assim, uma oportunidade de utilização da lignina está no uso como substrato ao processo de produção de PHA por microrganismos capazes de consumir os

compostos aromáticos presentes, candidatas a este processo são as bactérias do gênero *Pseudomonas* (22).

## 2 CONCLUSÕES

Foram construídos cinco de plasmídeos capazes de controlar a produção de PHB em *E. coli* MG1655. Aprimoramentos foram observados nestes plasmídeos referente a manutenção no hospedeiro, vazamento da expressão e expressão total. A construção do pCC-1 demonstrou instabilidade no hospedeiro *Pseudomonas* sp. LFM461, assim, foi necessária edição do plasmídeo obtendo-se o pCC-3. A capacidade do hospedeiro em promover eventos de recombinação homóloga com facilidade pode ser explorada como característica útil para edição de seu genoma.

A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-3 não demonstrou a capacidade de controlar a composição do copolímero, e em condições de indução não foi detectado mudança de valores de atividade enzimática das proteínas sob controle do sistema  $P_{LAC}/lac^q$ . Assim, o pCC-3 foi aprimorado para pCC-4 e em seguida pCC-5. Apesar de melhoras terem sido percebidas em experimentos com *E. coli* MG1655 abrigando os pCC-4 e pCC-5, nenhuma das duas versões foram capazes de controlar a composição do copolímero P3HB-co-3HHx em *Pseudomonas* sp. LFM461. Em experimentos de RT-qPCR com pCC-4 e pCC-5 no hospedeiro final não se observou aumento dos níveis de transcrição dos *operon phaAB* em condições de indução.

Em um primeiro momento, através de experimentos de fluorescência anteriores a construção dos pCCs, o promotor lac foi validado para controle de expressão em *Pseudomonas* sp. LFM461, mas, ao avaliar o conjunto de evidências dos experimentos posteriores, conclui-se que o promotor lac não foi funcional no hospedeiro. Apesar do objetivo final não ter sido atingido, várias questões da biologia molecular e regulação gênica de *Pseudomonas* sp. LFM461 foram discutidas neste trabalho. Neste sentido, avanços foram realizados a fim de viabilizar futuros estudos sobre engenharia do metabolismo, produção de PHAs e outros bioprodutos na linhagem modelo *Pseudomonas* sp. LFM461 do Laboratório de Bioprodutos.

Em estágio no JBEI os experimentos realizados abriram oportunidades de estudo para os plasmídeos criados, bem como para a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461:



- O plasmídeo pCC-4 foi avaliado em linhagens relacionadas a *Pseudomonas* sendo fornecidas pelo próprio instituto. O plasmídeo demonstrou ser funcional em aumentar o teor de PHA produzido por estas linhagens e potencial para ser aplicado a outras linhagens relacionadas futuramente.
- A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 demonstrou bom crescimento celular no consumo de ácido cumárico para a produção de PHA, com níveis de biomassa similares a glicose. Desta maneira, oportunidades foram criadas para estudos mais profundos com fontes de carbono relacionadas a lignina.
- Foram construídos três vetores para a produção de ácidos 3-hidroxi-butírico e 3-hidroxi-propionico. Utilizando *Pseudomonas* sp. LFM461 pBT-4::*tesB* foi detectado a produção de 311 mg/L de 3HB, níveis comparativamente bons de produção considerando uma primeira tentativa (72, 88). Pode-se futuramente utilizar os pCCs para a produção controlada de 3HB em *E. coli* MG1655.

## REFERÊNCIAS\*

1. Brandl H, Gross RA, Lenz RW. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(b-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Adv Biochem Eng/Biotechnol.* 1990;41:77-93.
2. Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol rev.* 1990;54(4):450-72.
3. Gomez JGC, Bueno-Netto CL. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. *Revista Brasileira de Engenharia Química.* 17 (2), 24-29, 1997.
4. Crank M. PM, Marscheider-Weidemann F., Schleich J., Hüsing B., Angerer G., Wolf O. Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe. 2005.
5. Steinbuchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *Fems Microbiol Lett.* 1995;128(3):219-28.
6. Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci.* 2000;25(10):1503-55.
7. De Koning GJM, van Bilsen HMM, Lemstra PJ, Hazenberg W, Witholt B, Preusting H, et al. A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas oleovorans*. *Polymer.* 1994;35:2090-7.
8. Fukui T, Abe H, Doi Y. Engineering of *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer. *Biomacromolecules.* 2002;3(3):618-24.
9. Lu X, Zhang J, Wu Q, Chen GQ. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid beta-oxidation pathway in *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;221(1):97-101.
10. Lu XY, Wu Q, Zhang WJ, Zhang G, Chen GQ. Molecular cloning of polyhydroxyalkanoate synthesis operon from *Aeromonas hydrophila* and its expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 2004;20(5):1332-6.
11. Lu XY, Wu Q, Chen GQ. Production of poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyhexanoate) with flexible 3-hydroxyhexanoate content in *Aeromonas hydrophila* CGMCC 0911. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64(1):41-5.
12. Jian J, Li ZJ, Ye HM, Yuan MQ, Chen GQ. Metabolic engineering for microbial production of polyhydroxyalkanoates consisting of high 3-hydroxyhexanoate content by recombinant *Aeromonas hydrophila*. *Bioresour Technol.* 2010;101(15):6096-102.

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

13. 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. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1993;40:292-300.
14. Lee SH, Oh DH, Ahn WS, Lee Y, Choi Ji, Lee SY. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnol Bioeng.* 2000;67(2):240-4.
15. Gomes RDS. Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.
16. Gomez JGC. 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 [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2000.
17. Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem. Biol.* 2008;3(1):64-76.
18. Aldor I, Keasling JD. Metabolic engineering of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composition in recombinant *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Biotechnol Bioeng.* 2001;76(2):108-14.
19. Wong MS, Causey TB, Mantzaris N, Bennett GN, San KY. Engineering poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer composition in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng.* 2008;99(4):919-28.
20. Ragauskas AJ, Beckham GT, Biddy MJ, Chandra R, Chen F, Davis MF, et al. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science.* 2014;344(6185):1246843.
21. Li C, Zhao X, Wang A, Huber GW, Zhang T. Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. *Chem Rev.* 2015;115(21):11559-624.
22. Linger JG, Vardon DR, Guarnieri MT, Karp EM, Hunsinger GB, Franden MA, et al. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(33):12013-8.
23. Lenz RW, Marchessault RH. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules.* 2005;6(1):1-8.
24. Wallen LL, Davis EN. Biopolymers of activated sludge. *Environ Sci Technol.* 1972;6 (2):pp 161-4.
25. Gross RA, Brandl H, Ulmer HW, Posada MA, Fuller RC, Lenz RW. The biosynthesis and characterization of new poly(P-hydroxyalkanoates). *Polymer Prepr.* 1989;30:492-3.
26. Donaruma LG. Microbial polyesters, by Yoshiharu Doi, VCH, New York, 1990, 156 pp. *Journal of Polymer Science Part A: Polym. Chem.* 1991;29(9):1365-.
27. Steinbüchel A, Schlegel HG. Physiology and molecular genetics of poly(beta-hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* 1991;5(3):535-42.

28. De Smet MJ, Eggink G, Witholt B, Kingma J, Wynberg H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.* 1983;154(2):870-878.
29. Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G, Witholt B. Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54(12):2924-32.
30. Ulmer HW, Gross RA, Weisbach P, Fuller RC, Lenz RW. The bacterial synthesis of functional poly(b-hydroxyalkanoate). *Polymer Prep.* 1989;30:402-7.
31. Diniz SC, Taciro MK, Gomez JG, da Cruz Pradella JG. High-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. *Appl Biochem Biotechnol.* 2004;119(1):51-70.
32. Schubert P, Kruger N, Steinbuchel A. Molecular analysis of the *alcaligenes-eutrophus* poly(hydroxybutyrate) biosynthetic operon – Identification of the N-terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. *J. Bacteriol.* 1991;173(1):168-75.
33. Huisman GW, Wonink E, Meima R, Kazemier B, Terpstra P, Witholt B. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J Biol Chem.* 1991;266(4):2191-8.
34. Hoffmann N, Steinbuchel A, Rehm BH. The *Pseudomonas aeruginosa* phaG gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;184(2):253-9.
35. Liu F, Jian J, Shen X, Chung A, Chen J, Chen GQ. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* 4AK4 for production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoate. *Bioresour Technol.* 2011;102(17):8123-9.
36. Rehm BH. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J.* 2003;376(Pt 1):15-33.
37. Rehm BHA. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Micro.* 2010;8(8):578-92.
38. Matsuda, ST. Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais. [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.
39. Gomez JGC, Silva-Queiroz SR, Silva LMB, Costa M, Bretas AF, Silva LF, et al. PHA<sub>MCL</sub> production from renewable substrates. International Symposium on Biological Polyesters; Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany 2002.
40. Silva LF, Gomez JGC, Rocha RCS, Taciro MK, Pradella JGC. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova.* 2007;30:1732-43.

41. Anjum A, Zuber M, Zia KM, Noreen A, Anjum MN, Tabasum S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int J Biol Macromol.* 2016;89:161-74.
42. Rehm BH. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(8):578-92.
43. Rolnad-Holst D, Triolo R, Helft-Neal S, Bayrami B. Bioplastics in California - Economic assessment of market conditions for PHA/PHB production from waste methane. 2013.
44. Reddy CS, Ghai R, Rashmi, Kalia VC. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol.* 2003;87(2):137-46.
45. Toledo K. Plástico biodegradável de açúcar está pronto para escala industrial. 2012. (Acessado em 10 de junho 2016). Disponível em: [http://agencia.fapesp.br/plastico\\_biodegradavel\\_de\\_acucar\\_esta\\_esta\\_pronto\\_para\\_escala\\_industrial/15994/](http://agencia.fapesp.br/plastico_biodegradavel_de_acucar_esta_esta_pronto_para_escala_industrial/15994/)
46. Brämer CO, Vandamme P, da Silva LF, Gomez JGC, 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.* 2001;51(5):1709-13.
47. Raj SM, Rathnasingh C, Jo J-E, Park S. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. *Process Biochem.* 2008;43(12):1440-6.
48. Rathnasingh C, Raj SM, Jo JE, Park S. Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. *Biotechnol Bioeng.* 2009;104(4):729-39.
49. Wang Q, Nomura CT. Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. *J Biosci Bioeng.* 2010;110(6):653-9.
50. Cesário MT, Raposo RS, de Almeida MC, van Keulen F, Ferreira BS, da Fonseca MM. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *N Biotechnol.* 2014;31(1):104-13.
51. Silva LF, Gomez JG, Oliveira MS, Torres BB. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. *J Biotechnol.* 2000;76(2-3):165-74.
52. Doi Y, Kitamura S, Abe H. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules.* 1995;28(14):4822-8.
53. Mendonça TT. Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHx)] [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.
54. Rocha RC, da Silva LF, Taciro MK, Pradella JG. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co -3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. *World J Microb Biot.* 2008;24(3):427-31.

55. Budde CF, Riedel SL, Willis LB, Rha C, Sinskey AJ. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(9):2847-54.
56. Qiu YZ, Han J, Chen GQ. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;69(5):537-42.
57. Lopes MSG, Gomez JGC, Silva LF. Cloning and overexpression of the xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and production of polyhydroxybutyrate from xylose. *Can J Microbiol*. 2009;55(8):1012-5.
58. Qiu YZ, Han J, Guo JJ, Chen GQ. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from gluconate and glucose by recombinant *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Lett*. 2005;27(18):1381-6.
59. Wang HH, Zhou XR, Liu Q, Chen GQ. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;89(5):1497-507.
60. Tsuge T, Hisano T, Taguchi S, Doi Y. Alteration of chain length substrate specificity of *Aeromonas caviae* R-enantiomer-specific enoyl-coenzyme A hydratase through site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(8):4830-6.
61. Schubert P, Steinbuechel A, Schlegel HG. Cloning of the *Alcaligenes-eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (phb) and synthesis of phb in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 1988;170(12):5837-47.
62. Kidwell J, Valentin HE, Dennis D. Regulated expression of the *Alcaligenes-eutrophus* pha biosynthesis genes in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(4):1391-8.
63. Fukui T, Yokomizo S, Kobayashi G, Doi Y. Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of *Aeromonas caviae* establishes copolyester biosynthesis pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;170(1):69-75.
64. Taguchi K, Aoyagi Y, Matsusaki H, Fukui T, Doi Y. Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;176(1):183-90.
65. Taguchi K, Aoyagi Y, Matsusaki H, Fukui T, Doi Y. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. *Biotechnol Lett*. 1999;21(7):579-84.
66. Park SJ, Lee SY. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Appl Biochem Biotechnol*. 2004;113-116:335-46.
67. Wang Q, Zhu C, Yancone TJ, Nomura CT. The Effect of Co-Substrate Feeding on Polyhydroxyalkanoate (PHA) Homopolymer and Copolymer Production in Recombinant *Escherichia coli* LS5218. *J. Bioproc Eng Bioref*. 2012;1(1):86-92.
68. Adkins J, Pugh S, McKenna R, Nielsen DR. Engineering microbial chemical factories to produce renewable "biomonomers". *Front Microbiol*. 2012;3:313.

69. Chu HS, Kim YS, Lee CM, Lee JH, Jung WS, Ahn JH, et al. Metabolic engineering of 3-hydroxypropionic acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 2015;112(2):356-64.
70. Tseng HC, Martin CH, Nielsen DR, Prather KL. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of (R)- and (S)-3-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(10):3137-45.
71. Jiang X, Meng X, Xian M. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;82(6):995-1003.
72. Gao HJ, Wu Q, Chen GQ. Enhanced production of D-(-)-3-hydroxybutyric acid by recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;213(1):59-65.
73. Pradella JGC. Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório Técnico nº84396-205; Centro de Tecnologia de Processos e Produtos Laboratório de Biotecnologia Industrial., São Paulo: LBI/CTPP; 2006.
74. Sánchez RJ, Schripsema J, da Silva LF, Taciro MK, Pradella JGC, Gomez JGC. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. *Eur. Polym. J*. 2003;39(7):1385-94.
75. Simon R, Priefer U, Puhler A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech*. 1983;1(9):784-91.
76. Wen A, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S, Sly LI. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49 Pt 2:567-76.
77. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. 1995;166(1):175-6.
78. Choi KH, Schweizer HP. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc*. 2006;1(1):153-61.
79. Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dube B, Bataille P, Ramsay JA. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(7):2093-8.
80. Hansen LH, Knudsen S, Sorensen SJ. The effect of the *lacY* gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Curr Microbiol*. 1998;36(6):341-7.
81. Xu Y, Tao F, Ma C, Xu P. New constitutive vectors: useful genetic engineering tools for biocatalysis. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(8):2836-40.
82. Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*. 2012;33(2):366-9.
83. Cebolla A, Vázquez ME, Palomares AJ. Expression vectors for the use of eukaryotic luciferases as bacterial markers with different colors of luminescence. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(2):660-8.

84. Jensen LB, Ramos JL, Kaneva Z, Molin S. A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *gef* gene. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(11):3713-7.
85. Warren JW, Walker JR, Roth JR, Altman E. Construction and characterization of a highly regulable expression vector, pLAC11, and its multipurpose derivatives, pLAC22 and pLAC33. *Plasmid.* 2000;44(2):138-51.
86. Nikel PI, Romero-Campero FJ, Zeidman JA, Goñi-Moreno Á, de Lorenzo V. The glycerol-dependent metabolic persistence of *Pseudomonas putida* KT2440 reflects the regulatory logic of the GlpR repressor. *MBio.* 2015;6(2).
87. Laban A, Cohen A. Interplasmidic and intraplasmidic recombination in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet.* 1981;184(2):200-7.
88. Chen CW, Tsai JF, Chuang SE. Intraplasmid recombination in *Streptomyces lividans* 66. *Mol Gen Genet.* 1987;209(1):154-8.
89. Aldor IS, Keasling JD. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(5):475-83.
90. Marbach A, Bettenbrock K. *lac* operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *J Biotechnol.* 2012;157(1):82-8.
91. Yildirim N, Mackey MC. Feedback regulation in the lactose operon: A mathematical modeling study and comparison with experimental data. *Biophys. J.* 2003;84(5):2841-51.
92. Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, Peterson KM. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques.* 1994;16(5):800-2.
93. Yu J, Stahl H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresour Technol.* 2008;99(17):8042-8.
94. Chung A, Liu Q, Ouyang SP, Wu Q, Chen GQ. Microbial production of 3-hydroxydodecanoic acid by *pha* operon and *fadBA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442 harboring *tesB* gene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;83(3):513-9.
95. Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J. Chromatogr. A.* 1988; 445: 285-9